

# **THESE**

présentée devant

**L'ECOLE CENTRALE DE LYON**

Pour obtenir le grade de **DOCTEUR**

Spécialité **Génie des Matériaux**

par

**Marlène RICHARD**

---

**Nettoyage des surfaces métalliques vis-à-vis  
des protéines et du risque prion**

**Etudes des interfaces protéines/métal**

---

**Soutenue le 3 juillet 2006 devant le jury composé de :**

DR. Jean-Charles CETRE

PR. Jacques-Christian DARBORD

DR. Jean-Claude LABADIE

DR. Jean-Michel MARTIN

PR. Paul ROUXHET

PR. Nicholas SPENCER

Rapporteur

Directeur de thèse

Rapporteur

Membres invités :

DR Maria-Isabel DE BARROS BOUCHET

DR. Armand PERRET-LIAUDET

M. Gaétan RAUWEL



# REMERCIEMENTS

Les travaux présentés dans ce mémoire ont été réalisés dans le cadre d'une convention CIFRE de l'ARNT établie entre les Laboratoires ANIOS et le Laboratoire de Tribologie et Dynamique des Systèmes. Je tiens donc à remercier Bertrand et Thierry Letartre pour m'avoir accordé leur confiance en me confiant ce travail. Je remercie également Philippe Kapsa pour m'avoir accueilli dans son laboratoire.

J'adresse mes remerciements aux membres du jury pour l'honneur qu'ils m'ont fait et pour l'intérêt qu'ils ont porté à ces travaux et à l'examen de ce mémoire.

Je souhaite exprimer toute ma reconnaissance et mon amitié à Thierry Le Mogne, Armand Perret-Liaudet, Gaétan Rauwel et Jacques Criquelion pour leur aide, leurs conseils et leur soutien durant ces trois années ainsi qu'à Maria-Isabel De Barros Bouchet pour son investissement.

Je remercie également tous les membres du Laboratoire de Tribologie et Dynamique des Systèmes, le personnel des laboratoires de biochimie et de neuropathologie de l'Hôpital Neurologique de Lyon ainsi que le personnel des Laboratoires ANIOS, qui ont de près ou de loin participé à cette étude.

Enfin, un grand merci à mes amis et à ma famille, en particulier mes parents, pour m'avoir soutenu tout au long de cette aventure.



# SOMMAIRE

## INTRODUCTION GENERALE

## CHAPITRE I : LES ATNC, UN PROBLEME DE SANTE PUBLIQUE

<b>I.</b>	<b>GENERALITES</b> .....	<b>- 6 -</b>
I.1.	LE PRION : LE GENE PRNP PROTEINE PRION CELLULAIRE ET PROTEINE PRION PATHOLOGIQUE - 7	-
I.1.1.	<i>Le gène PRNP</i> .....	- 7 -
I.1.2.	<i>La protéine prion cellulaire PrPc</i> .....	- 8 -
I.1.3.	<i>La protéine prion pathologique PrPsc</i> .....	- 9 -
I.2.	LES MALADIES HUMAINES A PRIONS .....	- 11 -
<b>II.</b>	<b>LES RISQUES POUR LA SANTE PUBLIQUE</b> .....	<b>- 14 -</b>
II.1.	LES PATIENTS A RISQUE.....	- 14 -
II.2.	LES TISSUS A RISQUE .....	- 16 -
II.3.	LES ACTES A RISQUE.....	- 16 -
II.4.	INACTIVATION DES ATNC.....	- 17 -
<b>III.</b>	<b>LE TRAITEMENT DES DISPOSITIFS MEDICAUX REUTILISABLES : CAS PARTICULIER DES ENDOSCOPES SOUPLES THERMOSENSIBLES</b> .....	<b>- 18 -</b>
III.1.	LE PRETRAITEMENT OU PRE-DESINFECTION .....	- 19 -
III.2.	LE DOUBLE NETTOYAGE .....	- 19 -
III.3.	LE RINÇAGE INTERMEDIAIRE .....	- 19 -
III.4.	LA DESINFECTION.....	- 20 -
III.5.	LE RINÇAGE FINAL.....	- 20 -
<b>IV.</b>	<b>LE NETTOYAGE</b> .....	<b>- 21 -</b>
IV.1.	LES MECANISMES DE LA DETERGENCE.....	- 21 -
IV.2.	LES CARACTERISTIQUES DES FORMULATIONS NETTOYANTES ET/OU PRE-DESINFECTANTES	- 21 -
IV.2.1.	<i>Les Agents de surface</i> .....	- 22 -
IV.2.2.	<i>Les adjuvants</i> .....	- 22 -
<b>V.</b>	<b>CONCLUSIONS</b> .....	<b>- 23 -</b>
<b>VI.</b>	<b>REFERENCES</b> .....	<b>- 23 -</b>

## CHAPITRE II: EVALUATION DU NETTOYAGE

<b>I.</b>	<b>L'EVALUATION DU NETTOYAGE AUJOURD'HUI</b> .....	<b>- 29 -</b>
<b>II.</b>	<b>LE POUVOIR NETTOYANT DEGRAISSANT</b> .....	<b>- 31 -</b>
<b>III.</b>	<b>LES APPROCHES SURFACIQUES</b> .....	<b>- 33 -</b>
III.1.	LA SPECTROSCOPIE DE PHOTOELECTRONS .....	- 33 -
III.1.1.	<i>Le substrat</i> .....	- 34 -
III.1.2.	<i>La salissure</i> .....	- 35 -
III.1.3.	<i>Caractérisation des formulations nettoyantes et/ou pré-désinfectantes</i> .....	- 38 -
III.1.4.	<i>Performances des formulations sur substrats souillés</i> .....	- 43 -
III.1.5.	<i>Innocuité chimique des formulations vis-à-vis de la surface</i> .....	- 46 -
III.1.6.	<i>Synthèse</i> .....	- 46 -
III.2.	LE RADIOMARQUAGE.....	- 47 -
III.2.1.	<i>Le marquage des protéines par l'iode 125</i> .....	- 48 -
III.2.2.	<i>Adsorption de la BSA-<sup>125</sup>I sur acier inoxydable AISI304</i> .....	- 48 -
III.2.3.	<i>Les performances des formulations évaluées par radiomarquage</i> .....	- 49 -
<b>IV.</b>	<b>CONCLUSIONS</b> .....	<b>- 50 -</b>

---

V. REFERENCES.....	- 51 -
--------------------	--------

## **CHAPITRE III: EFFICACITE DU NETTOYAGE ET/OU DE LA DESINFECTION VIS-A-VIS DE LA PROTEINE PRION**

I. INTRODUCTION.....	- 57 -
II. SELECTION DES PROCEDES PAR METHODE ISOTOPIQUE.....	- 59 -
II.1. METHODOLOGIE.....	- 60 -
II.2. RESULTATS.....	- 63 -
II.2.1. Adsorption des protéines HSA- <sup>125</sup> I et HFN- <sup>125</sup> I.....	- 63 -
II.2.2. Concernant la phase de nettoyage.....	- 63 -
II.2.3. Concernant les procédés de nettoyage et de désinfection.....	- 65 -
II.3. DISCUSSION.....	- 69 -
III. EVALUATION DES PROCEDES VIS-A-VIS DE SOUILLURE CONTENANT DE LA PROTEINE PRION.....	- 71 -
III.1. DETECTION DIRECTE DE LA PRPRES SUR LAMELLES D'ACIER INOXYDABLE.....	- 71 -
III.1.1. Principe.....	- 71 -
III.1.2. Méthodologie.....	- 71 -
III.1.3. Résultats.....	- 72 -
III.1.4. Discussion.....	- 74 -
III.2. DETECTION INDIRECTE DE LA PRP ADSORBEE SUR FILS D'ACIER INOXYDABLE.....	- 75 -
III.2.1. Principe.....	- 75 -
III.2.2. Méthodologie.....	- 79 -
III.2.3. Résultats et discussion.....	- 81 -
III.2.4. Synthèse.....	- 93 -
IV. CONCLUSIONS.....	- 93 -
V. REFERENCES.....	- 94 -

## **CHAPITRE IV: LES PROTAGONISTES DE LA DETERGENCE**

I. OBSERVATIONS SURFACIQUES.....	- 99 -
I.1. METHODOLOGIE.....	- 100 -
I.2. OPTIMISATION DES PERFORMANCES PAR LES ENZYMES.....	- 100 -
I.3. MINIMISATION DES PERFORMANCES PAR LES PRINCIPES ACTIFS ANTIMICROBIENS.....	- 103 -
I.4. ROLE ET SPECIFICITE DES ENZYMES DANS LA DETERGENCE.....	- 105 -
I.5. INCIDENCE DE LA CONCENTRATION EN ENZYMES SUR L'EFFICACITE DE LA FORMULATION.....	- 108 -
I.6. SYNTHÈSE.....	- 108 -
II. OBSERVATION EN MILIEU HOMOGENE SUR LA PROTEINE PRION.....	- 109 -
II.1. OPTIMISATION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DE L'ANIOSYME N2.....	- 109 -
II.1.1. Les facteurs chimiques.....	- 109 -
II.1.2. Les facteurs physiques.....	- 116 -
II.2. MINIMISATION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE PAR LES PRINCIPES ACTIFS ANTIMICROBIENS DE L'ANIOSYME DD1.....	- 118 -
II.3. SYNTHÈSE.....	- 120 -
III. CONCLUSIONS.....	- 120 -
IV. REFERENCES.....	- 121 -

---

## CHAPITRE V: INTERFACE BSA/METAL

I.	INTRODUCTION.....	- 125 -
II.	STRUCTURE ET STABILITE CONFORMATIONNELLES DES PROTEINES .....	- 127 -
III.	CARACTERISATION DE LA BSA PAR XPS .....	- 130 -
III.1.	MATERIEL ET METHODE DE TRAVAIL.....	- 130 -
III.2.	RESULTATS.....	- 130 -
IV.	ETUDE XPS DE L'INTERFACE BSA/METAL .....	- 134 -
IV.1.	TROIS APPROCHES POUR ACCEDER A L'INTERFACE.....	- 134 -
IV.2.	CONSTRUCTION DE L'INTERFACE BSA/METAL PAR SUBLIMATION DE LA BSA.....	- 136 -
IV.2.1.	<i>Matériel et méthode de travail</i> .....	- 136 -
IV.2.2.	<i>Etude de l'interface BSA/CrOx</i> .....	- 136 -
IV.2.3.	<i>Interface BSA/Au</i> .....	- 140 -
IV.2.4.	<i>Discussion</i> .....	- 141 -
IV.3.	ANALYSE DE L'INTERFACE BSA/METAL PAR DESORPTION THERMIQUE SOUS VIDE .....	- 142 -
IV.3.1.	<i>Matériel et méthode de travail</i> .....	- 142 -
IV.3.2.	<i>Interfaces BSA/CrMet et BSA/CrOx</i> .....	- 143 -
IV.3.3.	<i>Interface BSA/Au</i> .....	- 150 -
IV.3.4.	<i>Discussion</i> .....	- 155 -
IV.4.	METALLISATION DE LA BSA .....	- 157 -
IV.4.1.	<i>Matériel et méthode de travail</i> .....	- 157 -
IV.4.2.	<i>Métallisation des protéines par le chrome métallique</i> .....	- 157 -
IV.4.3.	<i>Métallisation des protéines par l'oxyde de chrome</i> .....	- 164 -
IV.4.4.	<i>Métallisation des protéines par l'or sous atmosphère neutre</i> .....	- 167 -
IV.4.5.	<i>Métallisation des protéines par l'or sous atmosphère réactive</i> .....	- 171 -
V.	MODELES D'ADSORPTION DES PROTEINES SUR LES SURFACES METALLIQUES....	- 174 -
VI.	CONCLUSIONS.....	- 176 -
VII.	REFERENCES .....	- 176 -

## CONCLUSION GENERALE

## ANNEXES

ANNEXE 1 : LA SPECTROSCOPIE DE PHOTOELECTRONS .....	- 187 -
ANNEXE 2 : MARQUAGE DES PROTEINES A L'IODE 125 .....	- 191 -
ANNEXE 3 : LE WESTERN-BLOT.....	- 193 -
ANNEXE 4 : LES BIAIS METHODOLOGIQUES .....	- 199 -
ANNEXE 5 : CALCULS DES EPAISSEURS EQUIVALENTES.....	- 203 -



## INTRODUCTION GENERALE

La prévention du risque de contamination du dispositif médical nécessite un nettoyage minutieux. Le nettoyage, qui suit obligatoirement la phase de prétraitement, vise à éliminer à l'aide d'un produit détergent et/ou pré-désinfectant les souillures protéiques et une grande partie des micro-organismes par une action mécanique et chimique. Cette étape est essentielle et doit être efficace avant la désinfection et/ou la stérilisation des dispositifs médicaux.

En matière de sécurité sanitaire et de risque nosocomial, un réel problème de Santé Publique est apparu avec le variant de la Maladie de Creutzfeldt-Jakob (vMCJ), maladie à prions dont l'issue est irrémédiablement fatale. En raison des risques d'une transmission secondaire de l'agent infectieux du vMCJ par le sang et de l'exceptionnelle résistance des prions aux procédés chimiques et physiques d'inactivation, les risques potentiels de contamination, notamment au cours d'interventions exploratrices (endoscopes) ou chirurgicales (électrodes, pinces à biopsie...), sont à prendre en considération. En effet, il s'avère que les procédures de désinfection utilisées à l'encontre des pathogènes conventionnels dans le cadre du traitement de matériaux non stérilisables, et notamment des endoscopes, sont inadéquates vis-à-vis des prions.

Basés sur l'expérimentation et sur les connaissances scientifiques dans le domaine des prions, plusieurs textes réglementaires ont successivement été mis en place pour la gestion du risque prion dans le domaine de la Santé. Dans le cas particulier des endoscopes, beaucoup d'interrogations subsistent du fait de la complexité des matériels, de l'agressivité chimique de certains produits possédant une efficacité reconnue pour inactiver l'agent infectieux responsable du développement des maladies à prions.

A l'heure actuelle, aucun produit formulé ou procédé ne présente à la fois les caractéristiques de nettoyage et d'inactivation vis-à-vis de la protéine prion qui soient compatibles avec les dispositifs médicaux thermosensibles.

Les données disponibles concernant l'efficacité des étapes de nettoyage vis-à-vis des protéines et a fortiori de la protéine prion sont encore rares. Ceci est dû principalement à l'absence de méthode normalisée pour l'évaluation du nettoyage compte tenu des difficultés à identifier les compromis adéquats dans la définition d'une telle méthodologie.

Un tel contexte justifie d'une part la nécessité de disposer de méthodes sensibles pour évaluer le nettoyage vis-à-vis des protéines et plus spécifiquement de la protéine prion. D'autre part le développement de formulations ou procédés, dont l'efficacité aura été prouvée face au risque prion, apparaît comme une réelle nécessité pour limiter les risques de transmission et garantir la sécurité des patients. C'est ainsi que sont définis les premiers objectifs de ce travail de thèse qui font l'objet des chapitres II, III et IV.

Concrètement, le chapitre I est consacré à l'introduction générale du contexte dans lequel s'inscrit cette étude. Les propriétés biologiques et biochimiques des prions seront succinctement présentées préalablement à l'identification des risques qu'ils induisent pour la Santé Publique. Une attention particulière sera portée aux traitements des dispositifs médicaux réutilisables et notamment aux exigences des étapes du nettoyage selon les recommandations en vigueur.

Le chapitre II présente la mise en place et la validation de deux méthodologies pour évaluer l'efficacité du nettoyage à travers les performances des formulations détergentes et/ou pré-désinfectantes. Ces méthodologies font appel à des techniques surfaciques différentes que sont la spectroscopie de photoélectrons et le radiomarquage des protéines. Elles permettent, entre autre, d'évaluer qualitativement

---

et quantitativement l'efficacité du nettoyage vis-à-vis des protéines adsorbées. Bien que leur mise en œuvre nécessite d'adapter la salissure non seulement à la sensibilité, mais également à la spécificité de la technique, ces méthodes apparaissent comme étant complémentaires et parfaitement adaptées à l'étude du nettoyage des surfaces métalliques.

Le chapitre III relate la démarche expérimentale mise en œuvre afin de pouvoir proposer un procédé de nettoyage efficace vis-à-vis du risque prion. Compte tenu des contraintes liées à la manipulation de ces agents infectieux, cette démarche se scinde en deux étapes. En premier lieu, les formulations et les procédés performants sont sélectionnés en fonction de leur efficacité pour éliminer l'albumine et le fibrinogène adsorbés sur des surfaces d'acier inoxydable. Dans un deuxième temps, l'efficacité des procédés retenus est évaluée spécifiquement vis-à-vis du risque prion. Pour cela, nous avons mis en place une méthode de détection indirecte de la protéine prion résiduelle adsorbée sur fils d'acier inoxydable. L'incidence de l'environnement lipidique des prions ainsi que les effets de souches sont pris en considération dans l'évaluation des procédés. Cette démarche expérimentale nous permet de proposer un procédé de nettoyage et de désinfection dont l'efficacité à l'encontre du risque prion est établie *in vitro*.

Le chapitre IV est consacré à l'étude des enzymes et des principes actifs antimicrobiens entrant dans la composition des formulations nettoyantes et/ou prédésinfectantes. En raison des effets de synergie et d'antagonisme observés dans le cadre de la validation des procédés et compte tenu du fait que les performances des formulations sont définies par la maîtrise et la connaissance des constituants qui la composent, nous souhaitons apporter des éléments de réponse sur le rôle et le mode d'action de ces protagonistes.

En raison des difficultés rencontrées pour éliminer la protéine prion adsorbée sur les surfaces métalliques et au regard de l'adsorption irréversible des protéines en règle générale, nous pensons que la compréhension détaillée des interactions protéines/surfaces serait d'un grand intérêt. En formulant l'hypothèse d'une chimisorption des protéines, le dernier objectif de ce travail est de proposer une approche expérimentale permettant d'étudier les interfaces protéines/surfaces par spectroscopie de photoélectrons. Ainsi, le chapitre V est consacré à l'étude des interfaces formées entre les protéines et des surfaces métalliques de chrome et d'or. Des trois approches proposées, seule la métallisation des protéines nous permet d'accéder à la formation de l'interface et d'observer l'existence de modifications chimiques importantes en faveur de la chimisorption des protéines sur les surfaces métalliques.

## **SOMMAIRE DU CHAPITRE I**

# **LES ATNC, UN PROBLEME DE SANTE PUBLIQUE**

<b>I. GENERALITES.....</b>	<b>- 6 -</b>
I.1. LE PRION : LE GENE PRNP, PROTEINE PRION CELLULAIRE ET PROTEINE PRION PATHOLOGIQUE .....	- 7 -
I.1.1. <i>Le gène PRNP</i> .....	- 7 -
I.1.2. <i>La protéine prion cellulaire PrPc</i> .....	- 8 -
I.1.3. <i>La protéine prion pathologique PrPsc</i> .....	- 9 -
I.2. LES MALADIES HUMAINES A PRIONS .....	- 11 -
<b>II. LES RISQUES POUR LA SANTE PUBLIQUE .....</b>	<b>- 14 -</b>
II.1. LES PATIENTS A RISQUE .....	- 14 -
II.2. LES TISSUS A RISQUE.....	- 16 -
II.3. LES ACTES A RISQUE .....	- 16 -
II.4. INACTIVATION DES ATNC .....	- 17 -
<b>III. LE TRAITEMENT DES DISPOSITIFS MEDICAUX REUTILISABLES : CAS PARTICULIER DES ENDOSCOPES SOUPLES THERMOSENSIBLES .....</b>	<b>- 18 -</b>
III.1. LE PRETRAITEMENT OU PRE-DESINFECTION .....	- 19 -
III.2. LE DOUBLE NETTOYAGE .....	- 19 -
III.3. LE RINÇAGE INTERMEDIAIRE .....	- 19 -
III.4. LA DESINFECTION .....	- 20 -
III.5. LE RINÇAGE FINAL.....	- 20 -
<b>IV. LE NETTOYAGE.....</b>	<b>- 21 -</b>
IV.1. LES MECANISMES DE LA DETERGENCE.....	- 21 -
IV.2. LES CARACTERISTIQUES DES FORMULATIONS NETTOYANTES ET/OU PRE-DESINFECTANTES .....	- 21 -
IV.2.1. <i>Les Agents de surface</i> .....	- 22 -
IV.2.2. <i>Les adjuvants</i> .....	- 22 -
<b>V. CONCLUSIONS .....</b>	<b>- 23 -</b>
<b>VI. REFERENCES.....</b>	<b>- 23 -</b>



## **CHAPITRE I**

# **LES ATNC, UN PROBLEME DE SANTE PUBLIQUE**

Le terme « ATNC », Agents Transmissibles Non Conventionnels, désigne les agents responsables des Encéphalopathies Spongiformes Subaiguës Transmissibles (ESST). Les ESST sont également appelées maladies à prions.

Les ESST sont caractérisées par :

- Une longue période d'incubation asymptomatique de plusieurs années, suivie de l'installation des symptômes neurologiques évoluant de manière subaiguë et conduisant inéluctablement à la mort ;
- Des lésions pathologiques confinées au niveau du système nerveux central ;
- L'absence, à la phase d'état, de signe biologique ou clinique évocateur d'un processus infectieux ;
- L'existence d'une isoforme conformationnelle anormale de la protéine prion cellulaire.

Les ESST touchent aussi bien l'homme que l'animal. Elles regroupent chez l'homme, la maladie de Creutzfeldt-Jakob (MCJ), le Syndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (SGSS), l'Insomnie Familiale Fatale (IFF) et le Kuru. Chez l'animal, appartiennent à ce groupe, la tremblante naturelle du mouton et de la chèvre, la maladie du dépérissement chronique des ruminants sauvages, l'encéphalopathie spongiforme du chat, l'encéphalopathie du vison et l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB).

L'intérêt que suscitent ces maladies s'est accru au fil des années en raison de l'apparition dès 1985, en France, de formes iatrogènes de la MCJ qui se sont développées chez des enfants suite à des injections de lots contaminés d'hormones de croissance naturelles. Le principe de précaution face aux risques de transmission iatrogène a conduit à l'élaboration de la circulaire DGS/DH n°100 du 11 décembre 1995 relative aux précautions à observer en milieu chirurgical et anatomopathologique. Puis, en 1986, se déclare en Grande-Bretagne, l'épidémie d'ESB débouchant 10 ans plus tard sur l'émergence du variant de la MCJ.

De par la nature infectieuse des ATNC, l'ambition de ce premier chapitre est de présenter le problème de Santé Publique auquel nous sommes confrontés face à la nature infectieuse des ATNC. Ainsi, après une présentation générale de l'agent infectieux et des différentes maladies humaines à prions, nous présenterons les risques pour la Santé Publique qui ont conduit à la révision de la circulaire n°100 et à l'élaboration de la circulaire n°DGS/5C/DHOS/E2/2001/138 du 14 mars 2001, récemment étayée par la circulaire n° DGS/SD5C/DHOS/2005/435 du 23 septembre 2005. Par voie de conséquence, nous aborderons les traitements des dispositifs médicaux réutilisables, en particulier le traitement manuel des endoscopes souples thermosensibles, en insistant sur les exigences des étapes du nettoyage.

## I. GENERALITES

La nature de l'agent infectieux reste encore une énigme, mais les hypothèses ne manquent pas. La première fut émise dans les années 1950 et proposait que l'agent responsable de la tremblante du mouton soit un virus lent. Les données disponibles à cette époque, à savoir : un agent transmissible, filtrable, capable de se répliquer au cours de l'infection et caractérisé par une phase d'incubation prolongée, étaient en accord avec l'existence d'un virus. Ce virus sera qualifié de non conventionnel en raison de son exceptionnelle résistance aux traitements inactivants habituels.

Une seconde hypothèse, celle du virino, est particulièrement intéressante. Il s'agirait d'une information génétique qui ne coderait que pour elle-même et qui s'entourerait, dans l'organisme infecté, des protéines de l'hôte. Cette hypothèse permet d'expliquer plusieurs caractéristiques des ESST comme l'existence de souches, l'absence de signe inflammatoire et sa résistance à une inactivation par les nucléases. Bien qu'extrêmement séduisante, cette hypothèse se heurte à un problème majeur : aucune séquence d'acides nucléiques spécifique n'a été identifiée à ce jour.

L'hypothèse en vigueur actuellement est celle de la « protein only ». Suggérée par Griffith en 1967 et reprise par Prusiner au début des années 1980, cette hypothèse stipule que l'agent infectieux est exclusivement de nature protéique : la protéine prion. Elle fut isolée à partir de fractions purifiées de l'agent infectieux issues de cerveau de hamsters infectés expérimentalement par la tremblante du mouton [Prusiner 1982].

Il existe deux isoformes de la protéine prion. L'isoforme normale est présente naturellement chez l'hôte. On l'appelle protéine prion cellulaire (PrP<sup>c</sup>). En revanche, son isoforme anormale, co-purifiée avec l'infectiosité, est appelée protéine prion pathologique (PrP<sup>sc</sup>). La PrP<sup>sc</sup> est le seul marqueur moléculaire spécifique des ESST identifié à ce jour. Un faisceau d'arguments va dans le sens de cette hypothèse de la « protein only » :

- L'infectivité du prion peut être neutralisée par des anticorps [Enari, *et al.* 2001, Peretz, *et al.* 2001] ;
- Les mutations au niveau du gène PRNP génèrent le développement des ESST avec une pénétrance de 100% ;
- Les souris transgéniques surexprimant la protéine prion semblent développer spontanément les signes cliniques et neuropathologiques des ESST ;
- Les souris *Prnp 0/0*, n'exprimant pas la protéine prion, sont résistantes à l'infection [Brueler, *et al.* 1993] ;
- La PMCA (Protein Misfolding Cyclic Amplification), réalisée en système acellulaire, montre la capacité de la PrP<sup>sc</sup> à convertir de novo la PrP<sup>c</sup> en PrP<sup>sc</sup> [Saborio, *et al.* 2001]. La PrP<sup>sc</sup> ainsi produite est infectieuse [Castilla, *et al.* 2005] ;
- De la PrP murine synthétique polymérisée en fibrilles amyloïdes inoculée par voie intracérébrale à des souris entraîne l'apparition de signes neuropathologiques et de PrPres [Legname, *et al.* 2004] ;

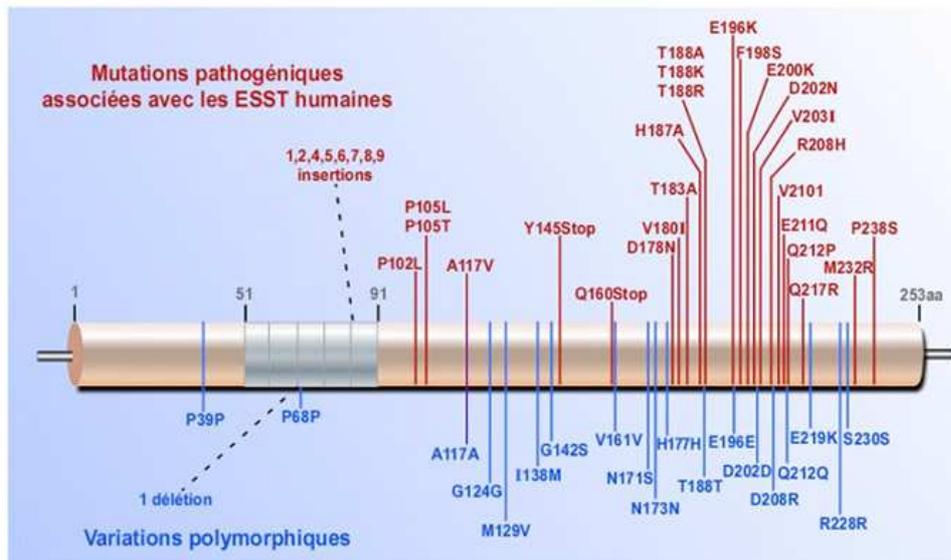
Pourtant, des incertitudes persistent et le fait que la purification de la PrP<sup>sc</sup> n'ait jamais abouti est un contre-argument important de l'hypothèse protéique. En effet, même les fractions les plus pures contiennent des acides nucléiques, des lipides et des polysaccharides.

## I.1. Le prion : le gène PRNP, protéine prion cellulaire et protéine prion pathologique

### I.1.1. Le gène PRNP

Chez l'Homme, le gène de la protéine prion est localisé sur le bras court du chromosome 20 et séquencé [Oesch, *et al.* 1985]. Il s'agit d'un gène simple composé de deux exons et seul le second exon est traduit, le premier exon étant une portion de la partie 5' non codante. Il semble donc impossible d'aboutir à la protéine prion cellulaire ou à la protéine prion pathologique par un mécanisme d'épissage alternatif.

Le gène PRNP est polymorphe (Figure I-1). Le polymorphisme le plus connu chez l'homme est celui du codon 129. Le codon 129 a deux variantes alléliques, l'une codant pour la méthionine (Met) et l'autre pour la valine (Val). La population est ainsi composée d'individus homozygotes Met/Met ou Val/Val et d'individus hétérozygotes Met/Val. Les études menées sur le polymorphisme du codon 129 ont montré qu'il affectait les caractéristiques phénotypiques des ESST. Outre son incidence sur les caractéristiques cliniques des ESST, le polymorphisme au codon 129 semble être associé à une sensibilité à l'infection puisque l'homozygotie Met/Met ou Val/Val augmente le risque de développer une ESST (tableau I-1). Dans les formes sporadiques de MCJ, une majorité de cas Met/Met est observée aux dépens des Met/Val et tous les variants MCJ diagnostiqués jusqu'à présent sont Met/Met au codon 129. On retrouve l'influence de ce polymorphisme sur les MCJ iatrogènes liées à l'hormone de croissance puisque les premiers cas apparus étaient homozygotes. Les cas de MCJ iatrogène associés à l'hétérozygotie Met/Val ne sont apparus que plus tard.



**Figure I-1 :** Mutations et polymorphismes sur la protéine prion humaine

Source : J. Chabry. Introduction aux Encéphalopathies Spongiformes Subaiguës Transmissibles (<http://www.123bio.net/revues/jchabry/index.html>)

**Tableau I-1 :** Polymorphisme au codon 129 du gène PRNP, d'après [Pauli 2005, Will 2003, Zimmerman, *et al.* 1999]

	MM (%)	MV (%)	VV (%)
Population caucasienne	39-48	42-50	10-13
MCJ sporadique	69-78	12-15	10-16
MCJ iatrogène (hGH)	48	20	32
Variant MCJ	100	0*	0

\* Un cas vMCJ MV sans signe clinique (Peden 2004)

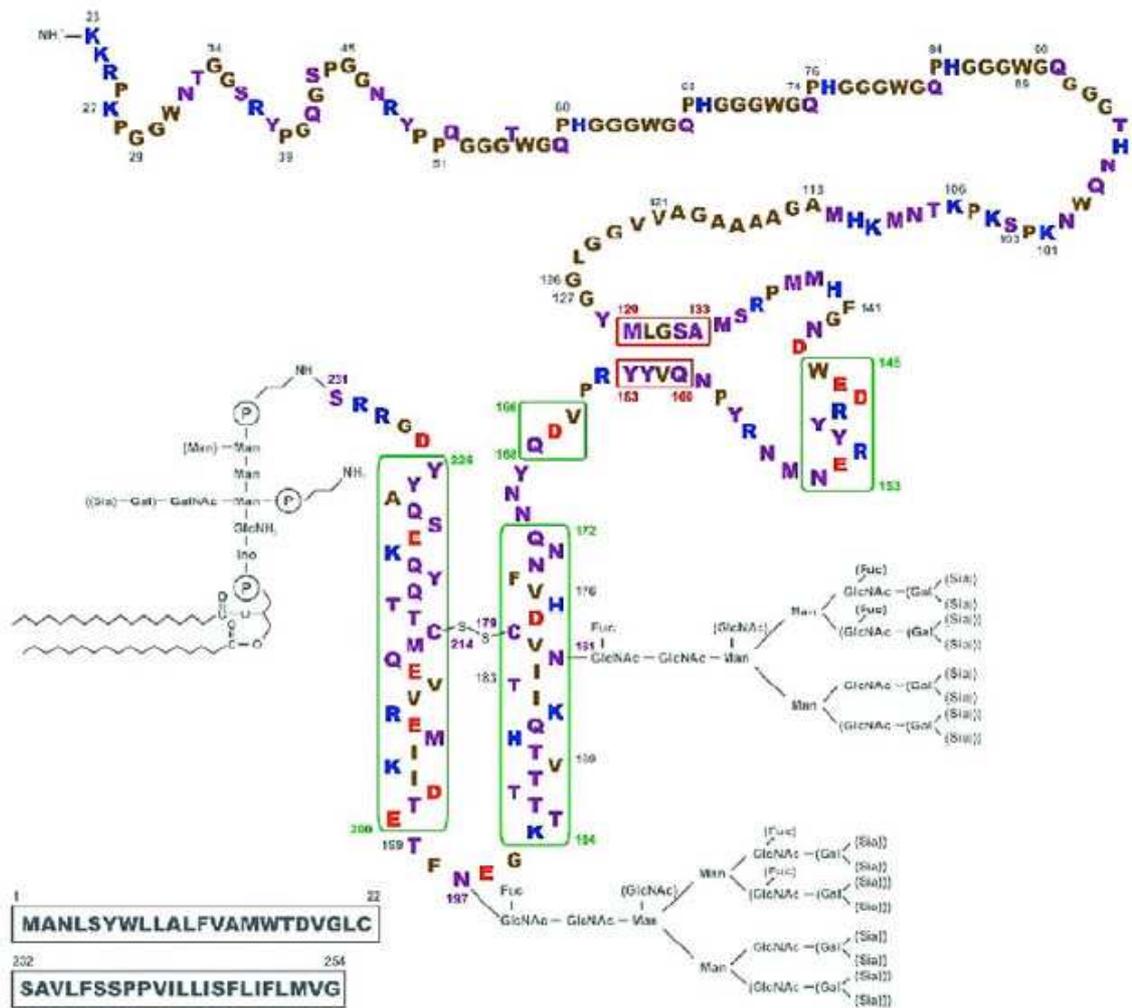
Comme pour les polymorphismes, de nombreuses mutations du gène PRNP ont été décrites. Il peut s'agir de mutations ponctuelles, d'insertions ou encore de délétions (figure I-1). Ces mutations sont directement associées aux formes génétiques des maladies à prions (MCJ familiales, SGSS et IFF)

### ***1.1.2. La protéine prion cellulaire PrPc***

Le gène PRNP comporte donc une unique phase de lecture ouverte codant pour une protéine de 253 acides aminés de 33 à 35 kDa. La voie de biosynthèse de la protéine prion cellulaire est celle d'une glycoprotéine membranaire [Caughey 1993].

L'ARNm de la PrP est traduit dans le réticulum endoplasmique rugueux où est également additionné un résidu glycoposphatidylinositol (GPI) du côté C-terminal. La protéine subit des modifications post-traductionnelles telles que le clivage de la séquence signal de 23 acides aminés en N-terminal. Au moment de l'addition de l'ancre GPI, une région hydrophobe C-terminal est également excisée. Après son passage dans l'appareil de Golgi, la PrPc est majoritairement ancrée par le GPI sur la face externe de la membrane plasmique. Secondairement, elle est réinternalisée via des puits cavéolés pour être dégradée dans le système lysosomal ou recyclée. Dans les cellules de neuroblastome de souris, la demi-vie de la PrPc est d'environ 6 heures.

La structure primaire de la PrP humaine est présentée sur la figure I-2. Deux sites putatifs de N-glycosylation sont présents en position N181 et N197, ce qui indique que la PrP peut être non glycosylée, mono- ou bi-glycosylée. Un pont disulfure intramolécule est présent entre les résidus C179 et C214. La partie N-terminale comporte 5 répétitions de 8 acides aminés {P(H/Q)GGG(G/-)WGQ} entre les résidus 51 et 91. Cette région de la protéine constitue un site de liaison du cuivre ou, avec une affinité moins importante, d'autres ions divalents tels que le zinc et le manganèse.



**Figure I-2 :** Séquence primaire de la PrP humaine (PrP 23-231) d’après [Riesner 2003]. Les hélices  $\alpha$  et les feuillets  $\beta$  sont respectivement encadrés en vert et rouge. Les ancrs GPI et les N-glycosylations apparaissent en gris. Les résidus en rouge portent une charge positive et en bleu une charge négative. Les résidus notés en violet sont neutres et en marron, hydrophobes.

### 1.1.3. La protéine prion pathologique PrPsc

Les séquences primaires de la PrPc et de la PrPsc sont identiques. La caractéristique majeure de la PrPsc est sa résistance partielle aux enzymes protéolytiques. La protéinase K digère totalement la PrPc alors qu’elle met en évidence sur la PrPsc, l’existence de trois régions [Parchi, *et al.* 2001] :

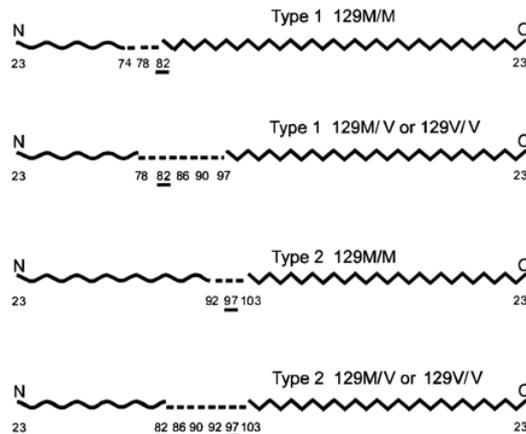
- Une région N-terminale qui est constamment sensible à la protéinase K ;
- Une région C-terminale au contraire constamment résistante ;
- Une région variable où sont situés les sites de clivages par la protéinase K.

Le fragment résiduel de PrPsc produit par la digestion enzymatique partielle est appelé PrPres pour protéine prion résistante aux protéases.

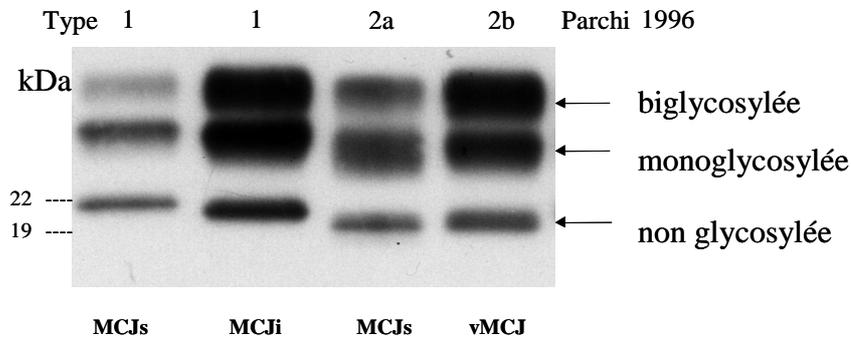
Comme l’illustre la figure I-3, il existe deux sites de coupures privilégiés pour la protéinase K : les sites 82 et 97. Le clivage au niveau de l’acide aminé 82 libère un fragment de PrPres plus grand que celui libéré par le clivage au niveau de l’acide aminé 97. Ce critère permet de définir le profil électrophorétique de la PrPres et d’identifier essentiellement deux types de PrPres [Parchi, *et al.* 2001] :

- La PrPres type 1 caractérisée par la position de sa bande non glycosylée à 21 kDa (site privilégié de la protéinase K sur acide aminé 82) ;
- La PrPres type 2 caractérisée par la position de sa bande non glycosylée à 19 kDa (site privilégié de la protéinase K sur acide aminé 97).

La PrPres des vMCJ est de type 2. Son profil électrophorétique a également permis de la distinguer des PrPres type 2 associées aux MCJs. En effet, comme le montre la figure I-4, la bande biglycosylée de la PrPres type 2 du vMCJ est majoritaire. Dans le cas des MCJs, c'est la bande monoglycosylée qui est majoritaire.



**Figure I-3 :** Schéma des zones de clivage de la protéinase K en relation avec les variations structurales des PrPsc humaines, d'après [Parchi, *et al.* 2001].



**Figure I-4 :** Profils électrophorétiques des PrPsc humaines

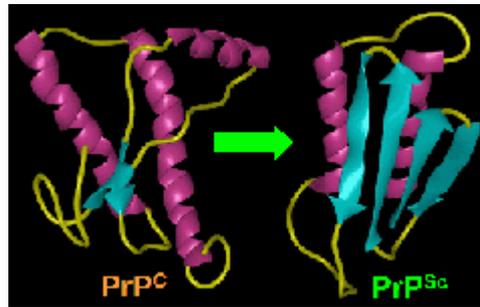
Source : Laboratoire de diagnostic des maladies à prions, Hôpital Neurologique de Lyon

A l'heure actuelle, nous ne disposons pas d'anticorps spécifiquement dirigé contre l'une ou l'autre des isoformes de la PrP utilisable en Western-blot. C'est pourquoi, le diagnostic biochimique des maladies à prions repose sur la mise en évidence de la résistance partielle de la PrPsc à la digestion protéolytique.

Une seconde caractéristique de la PrPres est qu'en présence de détergents, elle est capable de polymériser sous forme de fibrilles appelées scrapie associated fibrils (SAF) [Merz, *et al.* 1981] alors que la PrPc est soluble dans les détergents.

Ces caractéristiques de la PrPsc découlent de la différence majeure qu'il existe au niveau de leur structure secondaire. La PrPc contient 3% de feuillets  $\beta$ -plissés et 42% d'hélices  $\alpha$  alors que la PrPsc contiendrait environ 43% de feuillets  $\beta$ -plissés et 30% d'hélices  $\alpha$  [Pan, *et al.* 1993]. Il existe cependant une certaine variabilité des résultats concernant la proportion exacte de feuillets  $\beta$ -plissés dans la PrPsc en raison de sa nature insoluble.

Retenons simplement que la PrP<sup>sc</sup> présente une structure secondaire enrichie en feuillets  $\beta$ -plissés comparativement à la PrP<sup>c</sup> (figure I-5) et que cette différence confère à la PrP<sup>sc</sup> une résistance partielle aux protéases.



**Figure I-5 : Structure secondaire des protéines prion, d'après [DeArmond et Bouzamondo 2002].**

La conséquence directe de cette résistance est l'augmentation de la demi-vie de la PrP<sup>sc</sup> puisque celle-ci ne peut être totalement dégradée par les enzymes du système lysosomal. De plus, l'enrichissement en feuillets  $\beta$ -plissés de la PrP<sup>sc</sup> confère à la protéine un caractère plus hydrophobe favorisant son agrégation. Ainsi, la PrP<sup>sc</sup> s'accumule sous forme d'agrégats dans les cellules nerveuses et entraîne leur mort.

Si on admet que la protéine prion est le seul vecteur de l'infectiosité, la propagation de l'infection semble être causée par la modification conformationnelle de la PrP<sup>c</sup> en PrP<sup>sc</sup>.

## I.2. Les maladies humaines à prions

Les maladies humaines à prions sont au nombre de quatre, la Maladie de Creutzfeldt-Jakob (MCJ), le Syndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (SGSS), l'Insomnie Familiale Fatale (IFF) et le Kuru et peuvent être classées en trois groupes étiologiques : sporadique, génétique et acquise (tableau I-2).

La MCJ est la plus commune des ESST avec une incidence annuelle relativement constante comprise entre 1 et 1,5 cas par million d'habitants. Elle touche les deux sexes de la population. Son apparition est sporadique dans environ 85% des cas. Elle pourrait être déclenchée par une mutation somatique sur le gène de la protéine prion ou par une modification conformationnelle spontanée de la PrP<sup>c</sup> de l'hôte en PrP<sup>sc</sup> [Prusiner, *et al.* 1998].

Les formes génétiques, dites familiales, représentent jusqu'à 15% des cas, dans lesquelles sont regroupées : le SGSS, l'IFF et la MCJ génétique. Ces formes sont liées à des anomalies génétiques, mutations et insertions sur le gène PRNP (figure I-1) et sont héritées selon un mode autosomique dominant.

**Tableau I-2 : ESST humaines sporadiques, familiales et iatrogènes, d'après [Bruce, *et al.* 1997, Collinge et Rossor 1996, Lasmezas, *et al.* 1996, Parchi, *et al.* 1999]**

Groupe	Maladie	1 <sup>ère</sup> Description	Age moyen	Durée	Signes cliniques	Tableau neuropathologique
Sporadique	MCJs Forme de Heidenhain (70%)	1920	60 ans	4-8 mois	Ataxie, perte d'équilibre et de mémoire, troubles visuels, démence, myoclonies, symptômes pyramidaux et extra-pyramidaux,	Spongiose diffuse, perte neuronale, gliose, hypertrophie astrocytaire, présence de plaques amyloïdes (5% des cas)
	MCJs Forme ataxique (30%)				Ataxie précoce, démence tardive, pas d'EEG caractéristique	Lésions subcorticales, noyaux du tronc cérébral atteints, spongiose, dépôts focaux.
Génétique	MCJg	1924	40 ans	8-12 mois	Fonction de la mutation	
	SGSS	1936	45 ans	4-5 ans	Ataxie, troubles de la phonation et de la déglutition, mutisme, démence	Plaques amyloïdes concentriques
	IFF	1985	45 ans	12 mois	Insomnie caractérisée par une diminution du temps totale de sommeil et la disparition des phases paradoxales	Atrophie du thalamus
Acquise	MCJi liée à l'hormone de croissance	1974	10 à 35 ans après contamination	4-9 mois	Ataxie, démence, mutisme, état grabataire	
	vMCJ	1996	29 ans	15 mois	Dépression, anxiété, sensations de douleur, perte d'intérêts, ataxie, myoclonies, mutisme, état grabataire.	Spongiose, perte neuronale majeure dans les ganglions de la base et le thalamus, atrophie cérébelleuse, plaques florides
	Kuru	1957	5 à 35 ans après contamination	8-12 mois	Ataxie, tremblements, mouvements non coordonnés, état grabataire	Vacuolisation, mort neuronale, plaques mono-concentriques

Les formes iatrogènes se sont développées suite à des interventions médicales à visées reconstructives et thérapeutiques (tableau I-3). Ces infections sont le résultat d'une extraordinaire résistance de l'agent infectieux aux procédures conventionnelles de désinfection et de stérilisation.

**Tableau I-3 : Transmission iatrogène de la MCJ, d'après Pauli 2005.**

Source de l'infection	Nombre de cas
Hormone de croissance extractive	114
Gonadotrophine	4
Dure-mère	139
Cornée	3
Instruments neurochirurgicaux	5
Electrodes EEG	2

Le variant de la MCJ, la forme la plus médiatisée de ces maladies, est également une forme acquise. L'hypothèse probable de son origine est la transmission de l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) à l'homme par ingestion de viandes ou dérivés bovins infectieux [Bruce, *et al.* 1997, Collinge et Rossor 1996, Lasmezas, *et al.* 1996]. Elle fut identifiée pour la première fois en 1996 comme étant potentiellement une nouvelle ESST car elle présentait à la fois des caractéristiques communes et atypiques aux MCJ classiques (tableau I-4). La répartition de la vMCJ est mondiale (Tableau I-5).

**Tableau I-4 : Comparaison du variant MCJ et de la MCJ sporadique**

Critères	Variante MCJ	MCJ sporadique
Age moyen (ans)	29	60
Durée moyenne de la maladie (mois)	4	13
Symptômes psychiatriques précoces	Communs	Moins fréquents
Symptômes sensitifs	Communs	Rares
Ataxie cérébelleuse	Toujours	30% des cas
Démence	Tardive	Précoce
Electroencéphalogramme	Non spécifique	Complexes triphasiques périodiques (66%)
Imagerie résonance magnétique	Signal dans le pulvinar (77%)	Signal dans les ganglions de la base et le putamen
Liquide céphalorachidien – P14.3.3	57%	90%
Histopathologie	Plaques florides	Plaques amyloïdes dans 5% des cas
Amygdales - PrPsc	Positive	Négative
Polymorphisme au codon 129	M/M	M/M, M/V et V/V

**Tableau I-5 : Répartition mondiale de la vMCJ (Octobre 2005)**

Pays	Nombre de cas	Pays	Nombre de cas
Grande-Bretagne	184	Japon	1
France	17	Italie	1
Irlande	3	Pays-Bas	1
Etats-Unis	1	Espagne	1
Canada	1	Portugal	1
Arabie Saoudite	1		

Le Kuru est une maladie similaire à la MCJ qui s'est développée dans le peuple Fore des hauts plateaux de Nouvelle Guinée. Elle a causé la mort de 90% des femmes et des enfants de la tribu Fore suite aux

rituels cannibales. Le Kuru a pratiquement disparu avec la cessation de ces rituels, ce qui suggère fortement que la maladie peut être transmise oralement, comme cela est proposé pour l'ESB.

## II. LES RISQUES POUR LA SANTE PUBLIQUE

Les risques de transmission existent et ne sont pas sans conséquence sur la Santé Publique. La gestion de ces risques nécessite dans un premier temps de les identifier, puis de les classer en fonction du niveau de risque. Ainsi, 3 facteurs (non indépendants) ont été identifiés : ce sont les patients, les tissus et par conséquent les actes. Ces facteurs sont présentés selon les critères :

- De la circulaire n°DGS/5C/DHOS/E2/2001/138 du 14 mars 2001, relative aux précautions à observer lors des soins en vue de réduire les risques de transmission des ESST ;
- De la circulaire n°DGS/SD5C/DHOS/2005/435 du 23 septembre 2005 relative aux recommandations pour le traitement des dispositifs médicaux utilisés chez les sujets ayant reçu des produits sanguins labiles (PSL) provenant de donneurs rétrospectivement atteints de variant de la MCJ.

### II.1. Les patients à risque

Le patient pouvant être un vecteur de l'infection, il est nécessaire de pouvoir identifier le niveau de risque présenté par ce patient. En l'absence de test de dépistage des maladies à prions, le dépistage des patients à risque se fait essentiellement à l'aide d'un questionnaire médical.

La classification des patients à risque proposée est la suivante [Darbord 2004, Darbord et Hauw 2005] :

**Tableau I-6 : Classification des patients en fonction du risque de transmission des vMCJ et MCJs**

Patients	Caractéristiques
Sans caractéristique particulière	Tout adulte en phase pré-symptomatique est susceptible de transmettre la MCJ du fait de l'exposition de la population générale à l'agent de l'ESB et du risque de MCJs.
Patients à risque	Patients présentant un risque individuel de MCJ : <ul style="list-style-type: none"> <li>- antécédents de traitement par hormones de croissance contaminées ;</li> <li>- antécédents d'interventions neurochirurgicales antérieures à 1995 ;</li> <li>- antécédents familiaux de maladies à prions ;</li> <li>- antécédents de traitement par produits sanguins labiles provenant de donneurs atteints de vMCJ (Circulaire 435)</li> </ul>
Patients suspects, possibles ou probables	Patients présentant au moins un signe clinique neurologique, associé à des troubles intellectuels ou psychiatriques, d'apparition récente, d'évolution progressive et sans rémission. Toute autre cause aura préalablement été éliminée.
Patients atteints	Confirmation de la suspicion par l'examen neuropathologique

La circulaire 138 recommande de prendre en considération le risque de transmission de l'agent des ESST chez les patients sans caractéristique particulière, en raison de l'exposition de la population à l'agent de l'ESB et introduit la notion de porteurs asymptomatiques. Un exemple pour illustrer cette notion est la transmission du vMCJ par le sang. En 2004, deux cas de transmission probable du variant de la MCJ par transfusion sanguine ont été décrits [Llewelyn, *et al.* 2004, Peden, *et al.* 2004]. Le premier cas est un homme de 69 ans, homozygote Met/Met au codon 129, comme tous les vMCJ diagnostiqués jusqu'alors.

Il développa les signes cliniques du vMCJ six ans après avoir reçu du sang non leucodéplété. Le donneur, asymptomatique, développa le vMCJ trois ans et demi après avoir donné son sang.

Le second cas est une femme âgée, décédée d'une maladie autre que le vMCJ et ne présentant aucun signe clinique associé. Cependant, une autopsie fut pratiquée puisque cette femme avait reçu du sang d'un donneur asymptomatique qui développa et décéda d'une vMCJ. L'autopsie révéla la présence de PrPsc dans les tissus lymphoïdes périphériques, le système nerveux central en étant exempt. Cette patiente était hétérozygote Met/Val au codon 129.

L'hétérozygotie au codon 129, la présence de PrPsc et l'absence de signe clinique conforte l'existence de porteurs asymptomatiques, notamment dans la population hétérozygote. Ces porteurs asymptomatiques sont potentiellement en phase d'incubation et donc potentiellement infectieux.

Un troisième cas de transmission du vMCJ par le sang vient d'être rapporté en Grande-Bretagne. Les risques d'une transmission secondaire de la maladie par le sang existent donc réellement, mais c'est sans compter l'accroissement du risque de transmission iatrogène au cours d'interventions médicales invasives. Fort heureusement, ce scénario n'a pas été décrit à ce jour.

C'est dans ce contexte de transmission de l'agent infectieux par transfusion que la circulaire 435 du 23 septembre 2005 inclut les personnes ayant reçu des produits sanguins labiles, de donneurs atteints de vMCJ, dans les patients à risque (tableau I-6).

## II.2. Les tissus à risque

La circulaire 138 précise que : « L'évaluation du niveau de risque » de l'acte « doit tenir compte du potentiel infectieux des tissus concernés par l'acte... ».

Selon la classification de l'Organisation Mondiale de la Santé [Padilla 2005], les tissus sont classés en trois catégories en fonction de leur potentiel infectieux. Un résumé de cette classification pour les tissus et liquides biologiques d'origine humaine est proposé dans le tableau I-7.

**Tableau I-7 : Synthèse de la classification des tissus à risque extraite de la classification de l'OMS, d'après [Padilla 2005]**

Niveau d'infectiosité	Tissus	vMCJ		Autres ESST humaines	
		Infectiosité	PrPres	Infectiosité	PrPres
<b>Elevé</b>	Cerveau	+	+	+	+
	Moelle épinière	+	+	+	+
	Rétine	NT	+	+	+
	Nerf optique	NT	+	NT	+
	Ganglions sympathiques	+	+	NT	+
	Hypophyse	NT	+	+	+
	Dure-mère	NT	-	+	-
<b>Faible</b>	Système nerveux périphérique	+	+	-	+
	Tissus lymphoïdes	+	+	+	+(rate)
	Muscles squelettiques	NT	+	NT	+
	Liquide céphalo-rachidien	-	-	+	-
	Sang	+	?	-	?
<b>Indélectable</b>	Appareil reproducteur	NT	-	NT	-
	Tissus musculaires (cœur, tendon...)	NT	-	-	-
	Urine	?	?	?	?

Cette liste des tissus à risque évolue au fur et à mesure de l'augmentation de la sensibilité des systèmes de détection. Il y a peu, les tissus lymphoïdes considérés comme étant à risque ne concernaient que le vMCJ.

## II.3. Les actes à risque

Un autre critère est la notion d'actes à risque. Il convient de distinguer les actes non-invasifs des actes invasifs. Le risque imputable aux actes invasifs est défini en rapport avec les tissus à risque. Les actes touchant des organes à fort potentiel infectieux sont à différencier des autres.

Les dispositifs médicaux (DM) sont classés en trois catégories (classification de Spaulding) selon le risque infectieux vis-à-vis des agents transmissibles conventionnels :

- Les DM non critiques : en contact avec la peau saine ;
- Les DM semi-critiques : en contact avec une muqueuse, sans effraction ou avec des lésions cutanées superficielles ;
- Les DM critiques : pénétration d'un tissu stérile ou du système vasculaire.

Les DM présentant un risque de transmission des ATNC appartiennent aux catégories critiques et semi-critiques et sont utilisés lors de procédures invasives. Dans le cadre particulier de l'endoscopie, on peut citer :

- comme DM critiques : les cholédoscopes, coelioscopes...
- comme DM semi-critiques : les gastroscopes, bronchofibrosopes...

La circulaire 138 considère « l'acte comme à risque lorsque le ou les DM utilisés pour cet acte entrent en contact avec des tissus considérés comme infectieux, soit par effraction, soit par contact prolongé » d'une durée supérieure à une heure. Cette définition de l'acte à risque est reprise dans la circulaire 435, qui précise également la nature de ces actes :

- Neurochirurgie
- Ophtalmologie médicale et chirurgicale
- Biopsie ou curage ganglionnaire
- Acte endoscopique comportant une biopsie
- Anesthésie et réanimation
- Chirurgie ORL
- Chirurgie digestive
- Endoscopie digestive et ORL.

#### **II.4. Inactivation des ATNC**

Le qualificatif de « non conventionnel » a été attribué à l'agent transmissible des ESST en raison de son exceptionnelle résistance aux traitements d'inactivation des microorganismes conventionnels. La résistance des ATNC se décline au niveau :

- des procédés physiques (micro-ondes, ultra-violets, radiations ionisantes, chaleur sèche...);
- chimiques (agents alkylants, détergents, solvants, chaotropes...);
- biologiques (enzymes protéolytiques).

De nombreux travaux ont été réalisés sur l'inactivation des ATNC [Rutala et Weber 2001, Taylor D.M. 1999, 2000, Taylor D. M. 2001], pour revue. Toutefois, il est important de garder à l'esprit que les conditions opératoires dans lesquelles ont été conduits ces travaux ne sont pas, pour la plupart, représentatives des procédures utilisées pour le traitement des DM. Il n'est généralement pas tenu compte de la phase de nettoyage réalisée préalablement à la stérilisation ou à la désinfection.

La synthèse de ces travaux est rendue extrêmement difficile par la multiplicité des méthodologies employées. Cette multiplicité existe au niveau :

- des souches étudiées ;
- de la concentration de l'agent infectieux dans le cerveau ;
- de la nature de l'échantillon infectieux : tissu cérébral intact, homogénat de cerveau, préparations partiellement purifiées ;
- de l'interprétation des tests par inoculation à l'animal : période d'incubation ou dilution limites ;
- des temps d'exposition aux «inactivants » potentiels...

Malgré tout, certains procédés et/ou produits ont montré une certaine efficacité pour l'inactivation des ATNC.

La circulaire 138 propose un classement des produits ou procédés en fonction de leur efficacité sur l'inactivation des ATNC, d'après des études menées en expérimentation animale. Ce classement est résumé dans le tableau I-8.

**Tableau I-8 : Résumé du classement des produits ou procédés selon leur efficacité sur l'inactivation des ATNC, d'après la circulaire 138.**

Groupes	Produits et/ou procédés	
<b>I – Inefficace</b>	Chaleur sèche, éthanol, aldéhydes (produits fixant les protéines) Acide chlorhydrique, ammoniac, agents alkylants, eau bouillante, détergents	
<b>II – Efficacité partielle</b>	Acide péraacétique, autoclave 121°C-30min, NaOCl (0,5% chlore actif), NaOH (0,5 M – 30 min), urée (6 M – 4h)	
<b>III – Efficacité importante</b>	NaOCl(2 % chlore actif – 1h) NaOH(1 M – 1h) Autoclave pour charge poreuse 134°C – au moins 18 min	
<b>IV – Efficacité maximale</b>	Inactivation des ATNC	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Autoclave à déplacement de gravité avec NaOH 1M à 121°C – 30 min</li> <li>- NaOCl 2% - 1h ou NaOH 1M – 1h et autoclave à déplacement de gravité à l'eau à 121°C – 1h</li> </ul>
	Inactivation des ATNC et stérilisation des DM	<ul style="list-style-type: none"> <li>- NaOCl 2% - 1h ou NaOH 1M – 1h et autoclave pour charge poreuse à 134°C – 1h</li> <li>- NaOCl 2% - 1h et autoclave pour charge poreuse à 134°C – 18 min</li> <li>- NaOH 1M - 1h et autoclave pour charge poreuse à 134°C – 18 min</li> </ul>
<b>V – Destruction</b>	Incinération à plus de 800°C	

Les produits et/ou procédés efficaces (groupe IV) à l'encontre des ATNC s'avèrent extrêmement drastiques pour les DM [Brown, *et al.* 2005].

### **III. LE TRAITEMENT DES DISPOSITIFS MEDICAUX REUTILISABLES : CAS PARTICULIER DES ENDOSCOPES SOUPLES THERMOSENSIBLES**

Le traitement des DM est une étape primordiale pour limiter les risques de transmissions inter-humaines de maladies infectieuses. De nombreuses publications rapportent l'importance que revêt le traitement des DM et notamment des endoscopes thermosensibles pour limiter les risques d'infection dus aux agents transmissibles conventionnels [Heeg 2004, Rutala et Weber 2004, Systchenko, *et al.* 2000]. Bien qu'aucune transmission liée aux ATNC n'ait été rapportée en endoscopie, il convient de prendre ce risque en considération et ceci d'autant plus que les procédés d'inactivation des ATNC ne peuvent être que partiellement efficaces (groupe II de la circulaire 138). C'est dans ce contexte que la circulaire DHOS/E2/DGS/SD 5 C n°2003-591 du 17 décembre 2003, relative aux modalités de traitement manuel pour la désinfection des endoscopes non autoclavables dans les lieux de soins, a été établie. Cette circulaire recommande « la prise en compte systématique du risque lié aux ATNC dans le traitement requis pour les endoscopes ».

Le traitement manuel des endoscopes comporte cinq étapes dont le double nettoyage.

### **III.1. Le prétraitement ou pré-désinfection**

Réalisé immédiatement après l'acte endoscopique, le prétraitement permet de :

- Décoller les salissures ;
- Réduire le nombre de microorganismes présents ;
- Faciliter le nettoyage ;
- Protéger le personnel ;
- Réduire les risques de contamination de l'environnement.

Cette étape est réalisée avec un détergent à pH neutre (ou alcalin) ou un détergent pré-désinfectant.

### **III.2. Le double nettoyage**

Le nettoyage doit permettre :

- D'éliminer les salissures ;
- De réduire le nombre de micro-organismes présents sur l'endoscope par une action physico-chimique et mécanique.

Dans le cadre du traitement manuel des endoscopes, un double nettoyage est nécessaire et sa durée globale ne doit pas être inférieure à 15 minutes.

L'endoscope subit donc un premier nettoyage d'une durée minimum de 10 minutes dans un produit nécessairement détergent, d'efficacité prouvée. Si le produit contient au moins un principe actif antimicrobien, il doit être impérativement exempt d'aldéhyde.

L'endoscope doit ensuite être rincé méticuleusement à l'eau du réseau avant de subir le second nettoyage.

Ce premier rinçage permet :

- D'éliminer les salissures détachées de la surface par le nettoyage ;
- D'éliminer également les traces de détergent.

Le second nettoyage, doit permettre :

- D'abaisser encore le niveau de contamination ;
- D'éliminer les souillures résiduelles.

Sa durée ne doit pas être inférieure à 5 minutes. La solution de nettoyage doit être obligatoirement renouvelée entre le 1<sup>er</sup> et le 2<sup>nd</sup> nettoyage.

Le double nettoyage est supposé être plus efficace qu'un unique nettoyage de 15 minutes en raison de l'introduction d'un rinçage supplémentaire dans la procédure et du renouvellement de la solution nettoyante. L'optimisation de cette étape du traitement des endoscopes thermolabiles devrait permettre de réduire le risque de contamination par les ATNC.

### **III.3. Le rinçage intermédiaire**

Comme précédemment, l'endoscope doit être précautionneusement rincé à l'eau du réseau pour :

- Eliminer les salissures résiduelles ;
- Eliminer les traces des produits nettoyants qui pourraient interférer avec les produits chimiques utilisés dans la désinfection.

### III.4. La désinfection

L'Association Française de Normalisation (AFNOR) selon la norme NF T 72 101 définit la désinfection comme une « opération au résultat momentané, permettant d'éliminer ou de tuer les microorganismes et /ou d'inactiver les virus indésirables portés par des milieux inertes contaminés, en fonction des objectifs fixés ».

Dans le cadre de la désinfection des endoscopes thermosensibles, on distingue deux niveaux de traitement qui tiennent compte de la résistance intrinsèque des micro-organismes aux désinfectants (tableau I-9).

Les niveaux de traitement requis sont :

- La désinfection de haut niveau, elle fait appel à des produits désinfectants (groupe II de la circulaire 138) dont le spectre d'activité recherché est à la fois sporicide, mycobactéricide, virucide, fongicide et bactéricide. La désinfection de haut niveau est toujours complétée par un rinçage final à l'eau stérile.
- La désinfection de niveau intermédiaire qui fait appel à des désinfectants (groupe II) tuberculocides, virucides, fongicides et bactéricides. La qualité de l'eau requise pour le rinçage final est fonction de la destination de l'endoscope. Elle peut être simplement maîtrisée sur le plan bactériologique [Darbord et Hauw 2005].

**Tableau I-9 : Résistance des microorganismes à la désinfection**

Résistance	Micro-organismes et agents infectieux
	ATNC Spores ( <i>Bacillus</i> , <i>Clostridium</i> ) Mycobactéries Virus non enveloppés (polio, VHA) Champignons Bactéries Virus enveloppés (VIH, VHB)

### III.5. Le rinçage final

Le rinçage final doit permettre de réduire le risque de toxicité que pourrait générer des traces résiduelles de désinfectants sur le matériel. Il ne doit cependant pas modifier le niveau de propreté atteint lors des étapes antérieures du traitement.

La qualité de l'eau utilisée pour le rinçage final est fonction du niveau de désinfection requis (eau stérile, eau bactériologiquement maîtrisée...).

## **IV. LE NETTOYAGE**

Le nettoyage apparaît donc comme une étape primordiale pour pallier les risques de transmission des ATNC, son objectif étant le décrochage et l'élimination des souillures organiques et notamment des protéines. Le nettoyage faisant appel aux processus de la détergence, l'utilisation de détergents, associés à une action mécanique, est nécessaire pour atteindre cet objectif. Les produits employés doivent favoriser :

- Le mouillage ;
- Le déplacement de la salissure de la surface dans la solution de nettoyage ;
- Le maintien de la salissure dans la solution et sa non re-déposition.

Ainsi, les mécanismes mis en jeu et les caractéristiques des formulations employées sont brièvement rappelés.

### **IV.1. Les mécanismes de la détergence**

Lorsqu'un substrat souillé est mis en présence d'une solution de nettoyage, les tensioactifs s'adsorbent aux interfaces et provoquent un abaissement de la tension interfaciale. C'est le phénomène de mouillage. Les tensioactifs vont également pouvoir augmenter la solubilisation des matières relativement insolubles dans l'eau. La solubilisation est associée aux propriétés de micellisation des tensioactifs et est due à l'incorporation ou absorption de ces matières insolubles dans les micelles. La formation de micelle n'est possible que lorsque la concentration en tensioactif atteint une valeur seuil, appelée concentration micellaire critique (CMC). Chaque tensioactif est caractérisé par sa propre CMC. La capacité de mouillage et de solubilisation d'un tensioactif induit des propriétés de détergence. D'autres mécanismes peuvent intervenir dans la détergence. L'émulsification, par exemple, est la dispersion d'un liquide dans un autre liquide dans lequel il n'est pas miscible. On peut également citer la saponification en milieu alcalin, mécanisme durant lequel les acides gras et les triglycérides forment des savons, solubles pour la plupart dans l'eau. Ces mécanismes, couplés ou non à une agitation mécanique, permettent de pallier à la redéposition de la salissure sur la surface.

### **IV.2. Les caractéristiques des formulations nettoyantes et/ou pré-désinfectantes**

Selon la norme NF EN ISO 862, un détergent est défini comme « un produit dont la composition est spécialement étudiée pour le nettoyage selon un processus mettant en jeu les phénomènes de détergence. Un détergent comprend des composants essentiels (agents de surfaces) et généralement des composants complémentaires (adjuvants, etc...). Nous emploierons indifféremment « produit nettoyant » ou « formulation nettoyante » pour nommer le « détergent » selon la définition proposée par l'AFNOR.

La Société Française d'Hygiène Hospitalière (SFHH) définit un détergent désinfectant comme « un produit présentant la double propriété d'être un détergent et un désinfectant », le désinfectant étant un produit contenant au moins un principe actif antimicrobien, dont l'activité est déterminée par un système normatif reconnu.

Nous emploierons indifféremment « produit nettoyant/pré-désinfectant » ou « formulation nettoyante/pré-désinfectante » pour nommer le « détergent désinfectant » selon la définition proposée par la SFHH.

#### ***IV.2.1. Les Agents de surface***

Les agents de surface, plus communément appelés tensioactifs, ont la propriété de s'adsorber aux interfaces et donc de diminuer les tensions interfaciales. Cette propriété, ils la doivent à leur structure amphiphile. Ils possèdent donc :

- Une partie apolaire, hydrophobe, lipophile ;
- Une partie polaire, hydrophile, lipophobe.

Les tensioactifs sont classés en fonction de la nature de leur partie hydrophile. Il existe des :

- Tensioactifs ioniques, dont :
  - Tensioactifs anioniques : ils sont caractérisés par leur partie hydrophile chargée négativement en solution aqueuse. Ce groupement anionique peut être un carboxylate  $R-COO^-$ , un sulfate  $R-OSO_3^-$ , un sulfonate  $R-SO_3^-$  ou un phosphate  $R-OPO_3^{2-}$ . Leur groupement hydrophobe est classiquement une chaîne hydrocarbonée de 12 à 15 carbones. Ces tensioactifs possèdent un pouvoir détersif important mais sont sensibles à la dureté de l'eau. Les ions calcium et magnésium dissous dans l'eau sont effectivement capables d'inactiver ces tensioactifs en formant des liaisons ioniques avec eux. Les tensioactifs anioniques sont incompatibles avec les tensioactifs cationiques, ce qui limite leur emploi dans les formulations nettoyantes/pré-désinfectantes.
  - Tensioactifs cationiques : ils comportent un groupe ionique chargé positivement en solution aqueuse. Les tensioactifs cationiques sont généralement des sels d'ammonium quaternaire. Ils sont généralement utilisés comme principes actifs antimicrobiens en raison de leurs propriétés bactéricides et fongicides. Rappelons qu'ils sont incompatibles avec les tensioactifs anioniques.
  - Tensioactifs amphotères ou zwitterioniques : ils peuvent se comporter en anionique ou en cationique en fonction du pH de la solution aqueuse. Ils sont souvent utilisés en association avec d'autres tensioactifs car ils améliorent leur performance en agissant sur la formation et la structure des micelles. Ils présentent également une activité antimicrobienne. Leur compatibilité avec les tensioactifs anioniques ou cationiques dépend du pH.
- Tensioactifs non ioniques : ils ne produisent pas d'ions en solution. Ils possèdent un groupe hydrophile du type alcool, phénol, ester, éther ou même amide. Une hydrophilie relative leur est rendue grâce à la présence de polyéther de type poly-oxyde d'éthylène. Le groupe hydrophobe est souvent un radical alkyl ou un acide gras. Les tensioactifs non ioniques sont souvent retrouvés dans les produits nettoyants/pré-désinfectants puisqu'ils n'interfèrent pas avec les principes actifs antimicrobiens.

#### ***IV.2.2. Les adjuvants***

Les adjuvants sont définis comme les composés qui permettent de « construire » (builders en anglais) le système détergent autour de l'action des tensioactifs [Lavoué, *et al.* 2002]. Un adjuvant est considéré comme tel lorsqu'il possède au moins l'une des propriétés suivantes :

- Capacité tampon : maintien du pH (carbonates...);
- Agents de pH : acidification, alcalinisation (NaOH, KOH...);
- Adoucisseur d'eau, séquestrant des cations métalliques (EDTA, NTA...);
- Saponification (NaOH, KOH...);
- Capacité dispersante (silicates);
- Inhibiteur de corrosion;
- Action synergique avec les tensioactifs (phosphates, enzymes...).

Les produits utilisés au cours de la phase de nettoyage sont formulés à partir des ces différents composants (tensioactifs et adjuvants). La formulation des produits nettoyants et/ou nettoyants/prédésinfectants n'est pas simple. Il faut non seulement tenir compte de la compatibilité des composants entre eux, mais également :

- De la compatibilité de ces composants avec les substrats à nettoyer ;
- Du type de salissure à éliminer ;
- Des conditions finales (temps, température...) d'utilisation de tels produits ;
- Des performances attendues.

## V. CONCLUSIONS

Il est reconnu dans tous les établissements de soins que le nettoyage est une étape critique qui conditionne l'efficacité des étapes ultérieures du traitement des DM réutilisables (désinfection et stérilisation). Le risque ATNC ne fait que renforcer cet état de fait. Pourtant, à l'heure actuelle, il n'existe aucune méthodologie standardisée qui permettrait d'évaluer l'efficacité du nettoyage et de valider cette étape dans le traitement des DM réutilisables. L'absence d'une telle méthodologie s'explique par d'une part par le fait que l'attention portée à la phase de nettoyage est relativement récente et d'autre part, par la difficulté de trouver les compromis adéquats dans la définition de cette méthodologie. Dans ce contexte, le but de ce travail de thèse est de proposer des méthodes sensibles d'évaluation du nettoyage vis-à-vis des protéines et en particulier du risque prion.

## VI. REFERENCES

- BROWN, S.A., MERRITT, K., WOODS, T.O. and BUSICK, D.N.** (2005). Effects on instruments of the WHO-recommended protocols for decontamination after exposure to TSE-contaminated tissue. *Journal of Biomedical and Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. **72B**: 186-190
- BRUCE, M.E., WILL, R.G., IRONSIDE, J.W., MCCONNELL, I., DRUMMOND, D., SUTTIE, A., MCCARDLE, L., CHREE, A., HOPE, J., BIRKETT, C.R., S., C., FRASER, H. and BOSTOCK, C.J.** (1997). Transmissions to mice indicate that "new variant" CJD is caused by the BSE agent. *Nature*. **389**: 498-501
- BRUELER, H., AGUZZI, A., SAILER, A., GREINER, R.A., AUTENRIED, P., AGUET, M. and WEISSMANN, C.** (1993). Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature*. **356**: 577-582
- CASTILLA, J., SAA, P., HETZ, C. and SOTO, C.** (2005). In vitro generation of infectious scrapie prions. *Cell*. **121**: 195-206
- CAUGHEY, B.** (1993). Scrapie associated PrP accumulation and its prevention: insights from cell culture. *British Medical Bulletin*. **49**: 860-872
- COLLINGE, J. and ROSSOR, M.** (1996). A new variant of prion disease. *Lancet*. **347**: 916-917
- DARBORD, J.C.** (2004). Importance of cleaning for reprocessing endoscopes and thermolabile sterile medical devices: French use and regulations. *J Hosp Infect*. **56 Suppl 2**: S40-3
- DARBORD, J.C. and HAUW, J.J.** (2005). Pratiques Hospitalières et risque Prion. *Pathologie Biologie*. **53**: 237-245
- DEARMOND, S.J. and BOUZAMONDO, E.** (2002). Fundamentals of prion biology and diseases. *Toxicology*. **181-182**: 9-16

- ENARI, M., FLECHSIG, E. and WEISSMANN, C.** (2001). Scrapie prion protein accumulation by scrapie-infected neuroblastoma cells abrogated by exposure to a prion protein antibody. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **98**: 9285-9299
- HEEG, P.** (2004). Reprocessing endoscopes: national recommendations with a special emphasis on cleaning--the German perspective. *Journal of Hospital Infection*. **56 Suppl 2**: S23-6
- LASMEZAS, C.I., DESLYS, J.-P., DEMAIMAY, R., ADJOU, K.T., LAMOURY, F., DORMOND, D., ROBAIN, O., IRONSIDE, J.W. and HAUW, J.J.** (1996). BSE transmission to macaques. *Nature*. **381**: 743-744
- LAVOUE, J., BEGIN, D. and GERIN, M.** La substitution des solvants par les nettoyants aqueux: le dégraissage des métaux (2002) Université de Montréal
- LEGNAME, G., BASKAKOV, I.V., NGUYEN, H.O., RIESNER, D., COHEN, F.E., DEARMOND, S.J. and PRUSINER, S.B.** (2004). Synthetic mammalian prions. *Science*. **305**: 673-676
- LLEWELYN, C.A., HEWITT, P.E., KNIGHT, R.S.G., AMAR, K., COUSENS, S., MACKENZIE, J. and WILL, R.G.** (2004). Possible transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease by blood transfusion. *Lancet*. **363**: 417-421
- MERZ, P.A., SOMERVILLE, R.A., WISNIEWSKI, H.M. and IQBAL, K.** (1981). Abnormal fibrils from scrapie-infected brain. *Acta Neuropathologica*. **54**: 63-74
- OESCH, B., WESTAWAY, D., WALCHLI, M., MCKINLEY, M.P., KENT, S.B., AEBERSOLD, R., BARRY, R.A., TEMPST, P., TEPLow, D.B. and HOOD, L.** (1985). A cellular gene encodes scrapie PrP27-30 protein. *Cell*. **40**: 735-746
- PADILLA, A.** WHO Consultation on tissue infectivity distribution in Transmissible Spongiform Encephalopathies (2005) 14-16 septembre Genève, Suisse
- PAN, K.M., BALDWIN, M.A., NGUYEN, J., GASSET, M., SERBAN, A., GROTH, D., MELHORN, I., HUANG, Z., FLETTERICK, R.J., COHEN, F.E. and PRUSINER, S.B.** (1993). Conversion of  $\alpha$ -helices into  $\beta$ -sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **90**: 10962-10966
- PARCHI, P., GIESE, A., CAPELLARI, S., BROWN, P., SCHULZ-SCHAEFFER, W.J., WINDL, O., ZERR, I., BUDKA, H., KOPP, N., PICCARDO, P., POSER, S., ROJANI, A., STREICHENBERGER, N., JULIEN, J., VITAL, C., GHETTI, B., GAMBETTI, P. and KRETZSCHMAR, H.A.** (1999). Classification of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease based on molecular and phenotypic analysis of 200 subjects. *Annals of Neurology*. **46**:
- PARCHI, P., ZOU, W., WANG, W., BROWN, P., CAPELLARI, S., GHETTI, B., KOPP, N., SCHULZ-SCHAEFFER, W.J., KRETZSCHMAR, H.A., HEAD, M.W., IRONSIDE, J.W., GAMBETTI, P. and CHEN, S.G.** (2001). Genetic influence on the structural variations of the abnormal prion protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **97**: 10168-10172
- PAULI, G.** (2005). Tissue safety in view of CJD and variant CJD. *Cell and Tissue Banking*. **6**: 191-200
- PEDEN, A.H., HEAD, M.W., RITCHIE, D.L., BELL, J.E. and IRONSIDE, J.W.** (2004). Preclinical vCJD after blood transfusion in a PRNP codon 129 heterozygous patient. *Lancet*. **364**: 527-529
- PERETZ, D., WILLIAMSON, R.A., KANEKO, K., VERGARA, J., LECLERC, E., SCHMITT-ULMS, G., MEHLHORN, I.R., LEGNAME, G., WORMALD, M.R., RUDD, P.M., DWEK, R.A., BURTON, D.R. and PRUSINER, S.B.** (2001). Antibodies inhibit prion propagation and clear cell cultures of prion infectivity. *Nature*. **412**: 739-743
- PRUSINER, S.B.** (1982). Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science*. **216**: 136-144
- PRUSINER, S.B., SCOTT, M.R., DEARMOND, S.J. and COHEN, F.E.** (1998). Protein prion biology. *Cell*. **93**: 337-348

- RIESNER, D.** (2003). Biochemistry and structure of PrPc and PrPsc. *British Medical Bulletin*. **66**: 21-33
- RUTALA, W.A. and WEBER, D.J.** (2001). Creutzfeldt-Jakob disease: recommendations for disinfection and sterilization. *Clin Infect Dis*. **32**: 1348-56
- RUTALA, W.A. and WEBER, D.J.** (2004). Reprocessing endoscopes: United States perspective. *Journal of Hospital Infection*. **56 Suppl 2**: S27-39
- SABORIO, G.P., PERMANNE, B. and SOTO, C.** (2001). Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature*. **411**: 810-813
- SYTCHENKO, R., MARCHETTI, B., CANARD, J.N., PALAZZO, L., PONCHON, T., REY, J.F. and SAUTEREAU, D.** (2000). Guidelines of the French Society of Digestive Endoscopy: recommendations for setting up cleaning and disinfection procedures in gastrointestinal endoscopy. *Endoscopy*. **32**: 807-18
- TAYLOR, D.M.** (1999). Inactivation of prions by physical and chemical means. *Journal of Hospital Infection*. **43**: 569-576
- TAYLOR, D.M.** (2000). Inactivation of transmissible degenerative encephalopathy agents: a review. *The veterinary Journal*. **159**: 10-17
- TAYLOR, D.M.** (2001). Resistance of transmissible spongiform encephalopathy agents to decontamination. *Contrib Microbiol*. **7**: 58-67
- WILL, R.G.** (2003). Acquired prion disease: iatrogenic CJD, variant CJD, kuru. *British Medical Bulletin*. **66**: 255-265
- ZIMMERMAN, K., TURECEK, P.L. and SCHWARZ, H.P.** (1999). Genotyping of the prion protein gene at codon 129. *Acta Neuropathologica*. **97**: 355-358



**SOMMAIRE DU CHAPITRE II**

**EVALUATION DU NETTOYAGE**

**I. L’EVALUATION DU NETTOYAGE AUJOURD’HUI ..... - 29 -**

**II. LE POUVOIR NETTOYANT DEGRAISSANT ..... - 31 -**

**III. LES APPROCHES SURFACIQUES ..... - 33 -**

    III.1. LA SPECTROSCOPIE DE PHOTOELECTRONS..... - 33 -

        III.1.1. *Le substrat*..... - 34 -

        III.1.2. *La salissure* ..... - 35 -

        III.1.3. *Caractérisation des formulations nettoyantes et/ou pré-désinfectantes*..... - 38 -

        III.1.4. *Performances des formulations sur substrats souillés* ..... - 43 -

        III.1.5. *Innocuité chimique des formulations vis-à-vis de la surface* ..... - 46 -

        III.1.6. *Synthèse*..... - 46 -

    III.2. LE RADIOMARQUAGE..... - 47 -

        III.2.1. *Le marquage des protéines par l’iode 125*..... - 48 -

        III.2.2. *Adsorption de la BSA-<sup>125</sup>I sur acier inoxydable AISI304* ..... - 48 -

        III.2.3. *Les performances des formulations évaluées par radiomarquage*..... - 49 -

**IV. CONCLUSIONS ..... - 50 -**

**V. REFERENCES ..... - 51 -**



## **CHAPITRE II**

# **EVALUATION DU NETTOYAGE**

Une mission clé dans la protection de la Santé Publique est de minimiser les risques d'une transmission iatrogène des cas classiques de Maladie de Creutzfeldt-Jakob (MCJ), tout comme les risques d'une transmission secondaire du variant de la MCJ (vMCJ).

Une action possible pour répondre à cette mission est de réduire au maximum les risques encourus lors d'un acte à risque. Il convient donc de s'assurer que les procédures de décontamination des dispositifs médicaux réutilisables sont aussi efficaces qu'il est possible de l'être.

### **I. L'EVALUATION DU NETTOYAGE AUJOURD'HUI**

Evaluer le nettoyage sous-entend de définir le niveau de propreté recherché. Ce niveau de propreté est relatif aux besoins dictés par l'utilisation de ce qui est nettoyé : un substrat est propre lorsque son niveau de contamination est suffisamment bas pour ne pas interférer avec l'étape suivante du procédé. Dans le cadre du traitement des dispositifs médicaux (DM), les étapes de prétraitement et de nettoyage doivent être efficaces pour ne pas compromettre l'étape de désinfection ultérieure [Gautier, *et al.* 2003, Martiny, *et al.* 2004, McDonnell et Burke 2003, Merritt, *et al.* 2000, Rutala et Weber 2004, Thiveaud 2004, Vickery, *et al.* 2004]. Cependant, les recommandations actuellement en vigueur ne précisent pas les critères d'efficacité attendus et la preuve de l'efficacité du nettoyage ne peut être seulement justifiée par le simple respect des procédures de nettoyage. En effet, bien que les procédures semblent avoir été respectées, des transmissions nosocomiales via l'acte endoscopique ont été rapportées dans la littérature et sont majoritairement expliquées par le manque d'efficacité du nettoyage [Heeg 2004, Rutala et Weber 2004]. C'est dans ce contexte qu'apparaît la nécessité d'évaluer l'efficacité du nettoyage, indépendamment de la désinfection. Toutefois, proposer une méthode d'évaluation n'est pas simple, elle doit tenir compte de la nature de la contamination à éliminer et du niveau de propreté attendu. Ces deux critères sont extrêmement difficiles à définir, et ceci se traduit non seulement par la diversité des travaux publiés sur le sujet [Bloss et Kampf 2004, Boyd, *et al.* 2001, Chartier, *et al.* 2001, de Bruijn, *et al.* 2001, Lipscomb, *et al.* 2006, Miller, *et al.* 2001, Takashina 2001, Verjat, *et al.* 1999], mais également par l'absence d'une méthode d'évaluation normalisée. Un exemple éloquent nous est offert par la norme EN ISO 15 883 qui ne propose pas moins de 5 souillures tests pour démontrer l'efficacité du nettoyage des endoscopes dans les laveurs désinfecteurs. Cette norme spécifie également que les méthodes d'évaluation proposées ne sont pas de sensibilité équivalente.

La nature des salissures identifiées sur les dispositifs médicaux est à la fois organique et microbienne [Alfa, *et al.* 1999]. Les souillures organiques peuvent être amorphes (lipides, glucides, protéines...) et structurées (débris tissulaires, os,...). Avec l'émergence des risques de transmission des agents transmissibles non conventionnels (ATNC), la présence de protéines dans la définition d'une souillure test apparaît comme une évidence et ceci d'autant plus que les protéines sont des composés extrêmement difficiles à enlever d'une surface sur laquelle elles sont adsorbées [Chen, *et al.* 1999, DH 2005, Elwing et Golander 1990, Green, *et al.* 2001, Murray et Deshaires 2000, Wahlgren et Arnebrant 1991, You et Lowe 1996]. Miller rapporte la présence de protéines résiduelles par coloration à l'érythrosine B sur des

masques laryngés ainsi que sur des lames de laryngoscopes après nettoyage et stérilisation [Miller, *et al.* 2001].

Les souillures microbiennes peuvent être bactériennes, virales et/ou fongiques. L'introduction de microorganismes, tels que *Enterococcus faecium*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* ou *Pseudomonas aeruginosa*, dans les souillures tests est courante et permet d'évaluer les méthodes de nettoyage et de désinfection [Alfa et Nemes 2004, Bloss et Kampf 2004, Mackcow et Pauly 1998, Merritt, *et al.* 2000, Peterson et Mackcow 1997, Vickery, *et al.* 2004]. Ces souillures microbiennes sont bien adaptées pour évaluer l'efficacité de la désinfection, mais il faut rester critique quand ces souillures servent à l'évaluation du nettoyage puisqu'une surface pourrait être plus facilement débarrassée des microorganismes que des composés organiques amorphes et notamment des protéines. Bien que le biofilm soit extrêmement adhérent [Pajkos, *et al.* 2004, Vickery, *et al.* 2004], son développement et sa résistance au nettoyage sont probablement plus liés à la géométrie du DM qu'à l'efficacité de la solution de nettoyage elle-même.

La méthode d'évaluation du nettoyage doit également tenir compte du niveau de propreté attendu. Ce critère ne peut pas non plus être défini précisément. Dans le cas où le risque prion est omis, le seuil de propreté pourrait être défini par le niveau requis pour l'utilisation du dispositif à nettoyer. En revanche, en tenant compte du risque prion, le niveau de propreté requis devient plus abstrait, la dose minimale infectieuse n'étant pas établie. Dans ce contexte, il semble important d'augmenter la sensibilité des méthodes mises en œuvre pour évaluer le nettoyage, notamment vis-à-vis des protéines. Les techniques analytiques habituellement mises en œuvre ont recours aux méthodes de dosage des protéines. Parmi ces méthodes, on rencontre essentiellement des méthodes colorimétriques et fluorimétriques.

Les méthodes colorimétriques disponibles pour le dosage des protéines sont nombreuses :

- La réaction du Biuret est basée sur la formation d'un complexe pourpre entre le biuret (NH<sub>2</sub>-CO-NH-CO-NH<sub>2</sub>) et deux liaisons peptidiques consécutives en présence de cuivre et en milieu alcalin. Le complexe de coordination ainsi formé adsorbe fortement à 545 nm. Malgré sa spécificité, cette méthode est peu sensible.
- La méthode de Bradford est basée sur l'adsorption du bleu de Coomassie sur les protéines en milieu acide. Le complexe formé adsorbe à 590 nm. Cette méthode est relativement sensible (2 à 5 µg/ml) mais interfère avec les détergents. Elle montre également une réactivité différente vis-à-vis des diverses protéines.
- La méthode de Lowry combine une réaction du biuret et une réaction au réactif de Folin-Ciocalteu. Ce dernier, à base d'acide phosphotungstomolybdique, réagit avec les résidus tyrosine et tryptophane, et à moindre mesure avec les résidus cystéine et histidine pour donner une coloration bleue qui s'ajoute à celle du biuret. L'absorbance est lue à 750 nm. Sa sensibilité est de 5 à 10 µg/ml et est peu spécifique. Elle interfère également avec de nombreuses substances et notamment avec de nombreux détergents. Enfin, la loi de Beer Lambert n'étant pas parfaitement vérifiée, la zone de linéarité de la réaction est étroite. Toutefois, des améliorations ont été apportées, notamment avec le kit DC Biorad, permettant son utilisation dans le cadre de l'évaluation du nettoyage [Chartier, *et al.* 2001].
- La méthode au BCA (BiCinchoninique Acid) utilise le pouvoir réducteur des protéines en milieu alcalin pour réduire les ions cuivriques en ions cuivreux qui vont alors réagir avec l'acide bicinchoninique pour former un complexe coloré pourpre d'intensité proportionnelle à la concentration de protéines. L'absorbance est lue à 562 nm. C'est une méthode extrêmement intéressante car elle est compatible avec la plupart des tensioactifs ioniques et non ioniques. Elle permet un dosage des protéines totales dans une gamme de valeurs comprises entre 0,5 et 20 µg/ml.

Des méthodes fluorimétriques, nous retiendrons la méthode à l'orthophtaldéhyde (OPA) modifiée. Cette méthode, précédemment appliquée dans des travaux concernant l'efficacité du prétraitement [Verjat, *et al.* 1999] et du nettoyage [Fengler, *et al.* 2000], est proposée dans la norme ISO EN 15 883-1 pour évaluer la quantité de souillure protéique résiduelle dans le cadre des laveurs désinfecteurs.

Ces méthodes de dosage nécessitent l'élution des protéines résiduelles de la surface et les rendements de l'élution sont souvent incertains [Pineau, *et al.* 2002].

La norme EN ISO 15 883-1 propose également un test à la ninhydrine comme méthode de détection des souillures protéiques résiduelles. Ce test consiste à écouvillonner les surfaces du DM et à détecter la présence de protéines sur l'écouvillon par une réaction à la ninhydrine. Bien que ce test permette de détecter jusqu'à 2,5 µg d'albumine sur une zone écouvillonnée de 2 cm de diamètre, il est essentiellement qualitatif [de Bruijn, *et al.* 2001]. Il est également dépendant de l'opérateur mais peut être facilement mis en œuvre dans les services de stérilisation des établissements de santé.

L'utilisation des méthodes de dosage des protéines pour évaluer l'efficacité du nettoyage n'offre pas une sensibilité suffisante pour s'assurer de l'efficacité du nettoyage face aux risques de transmission des ATNC. Une étude, comparant la méthode de dosage à l'OPA modifiée et une méthode isotopique, a clairement montré la nécessité d'abaisser les limites de détection des méthodes pour l'évaluation du nettoyage [Draghici, *et al.* 2005].

Les méthodes pouvant proposer de meilleures sensibilités, comme la méthode isotopique, sont rarement adaptées à l'environnement des services de santé. Cependant, Lipscomb *et al.* proposent une nouvelle technique de microscopie (episcopic differential interference contrast/epifluorescence, EDIC/EF) couplée à l'emploi du SYPRO Ruby, un marqueur fluorescent couramment utilisé pour une détection sensible des protéines [Lipscomb, *et al.* 2006]. La limite de détection de la technique est annoncée à 85 pg/mm<sup>2</sup>. Les auteurs préconisent l'utilisation de cet outil pour la surveillance de la contamination des instruments dans les établissements de santé.

S'assurer de l'efficacité du nettoyage est primordial pour garantir la sécurité des patients. Comme nous l'avons vu, le nettoyage est une opération critique qui consiste à éliminer d'une surface donnée toute salissure visible ou invisible par l'action physico-chimique d'une solution de nettoyage. Dans le cadre de notre étude, nous supposons que la qualité du nettoyage découle de l'efficacité de la solution nettoyante. Notre objectif est de mettre en place des méthodes sensibles pour évaluer les performances des solutions de nettoyage vis-à-vis des protéines spécifiquement et de permettre ainsi aux professionnels de la détergence et de la désinfection de prouver l'efficacité de leurs produits. Nous ne prendrons pas en considération la géométrie du DM qui peut rendre le nettoyage du DM plus difficile puisqu'il incombe aux fabricants de démontrer la nettoyabilité de leurs matériels.

Après une brève présentation du Pouvoir Nettoyant Dégraissant, méthode développée dans les Laboratoires ANIOS, nous présenterons deux méthodes surfaciques permettant de qualifier et de quantifier les performances des formulations.

## II. LE POUVOIR NETTOYANT DEGRAISSANT

Dans les Laboratoires ANIOS, la performance des produits nettoyants et/ou pré- désinfectants est établie par le calcul du Pouvoir Nettoyant Dégraissant (PND). Le PND représente le pourcentage de protéines de la salissure éliminée par la formulation testée, il est exprimé en pourcentage de performance.

La salissure est de nature lipido-protéique. Il s'agit d'un broyat de cervelle de porc enrichi par 20% de matières grasses (CP+20%MG). La salissure est étalée sur une lame en acier inoxydable austénitique AISI 304. La quantité de protéines totales (Qt) contenue dans la salissure déposée est mesurée par une méthode colorimétrique au MicroBCA (acide bicinchoninique). Les lames souillées sont nettoyées pendant 15 minutes à température ambiante sous 50 rpm. La salissure résiduelle, non éliminée par le nettoyage, est éluee et la quantité de protéines résiduelles (Qr) est mesurée.

Le PND est calculé selon la relation suivante :

$$\text{PND} = \frac{Q_t - Q_r}{Q_t} \times 100$$

Après concertation avec les Laboratoires ANIOS, nous avons retenus cinq formulations. Elles sont présentées dans le tableau II-1 et leur PND sur la figure II-1.

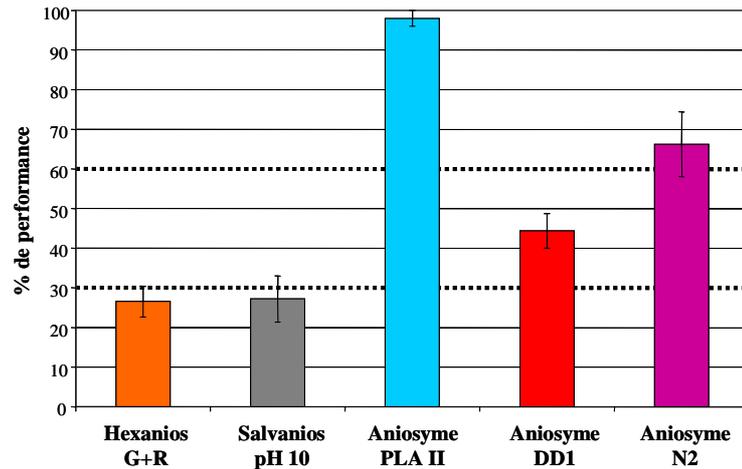
**Tableau II-1 : Les formulations nettoyantes et/ou pré-désinfectantes des Laboratoires ANIOS**

	Activité	Tensioactifs	Principes Actifs Antimicrobiens	pH à 0,5% en H <sub>2</sub> O
<b>Hexanios G+R</b>	Nettoyant Pré-désinfectant	Non-ionique	Biguanide Ammonium quaternaire	# 7
<b>Salvanios pH10</b>	Nettoyant Pré-désinfectant	Non-ionique	Acétate de guanidinium Ammonium quaternaire	# 9,5
<b>Aniosyme PLAII</b>	Nettoyant Pré-désinfectant Tri-enzymatique	Non-ionique	Ammonium quaternaire	# 10,5
<b>Aniosyme DD1</b>	Nettoyant Pré-désinfectant Tri-enzymatique	Amphotère <i>Non-ionique</i>	Biguanide Ammonium quaternaire	# 7
<b>Aniosyme N2</b>	Nettoyant Tri-enzymatique	Amphotère <i>Non-ionique</i>	<i>Biguanide</i> <i>Ammonium quaternaire</i>	# 7

Les compositions de l'Aniosyme DD1 et de l'Aniosyme N2 sont qualitativement comparables. En revanche, elles diffèrent par leur composition quantitative. L'Aniosyme DD1 contient 9 fois plus d'ammonium quaternaire et 25 fois plus de biguanide que l'Aniosyme N2. Les principes actifs antimicrobiens, insuffisamment représentés dans l'Aniosyme N2, n'octroient à cette formulation qu'une activité nettoyante.

D'après la figure II-1, les formulations sont hiérarchisées en fonction de leur performance. Trois niveaux de performance peuvent être définis :

- Les formulations à faibles PND: il s'agit des formulations présentant un PND inférieur à 30%. C'est le cas des formulations Hexanios G+R et Salvanios pH10 qui n'éliminent, respectivement, que 26 et 27% des protéines présentes avant l'étape de nettoyage. Toutefois ces PND sont supérieurs à celui de l'eau du réseau établi à environ 10% ;
- Les formulations à PND moyens : il s'agit des formulations qui présentent un PND compris entre 30 et 60% dans lesquelles se trouve l'Aniosyme DD1 ;
- Les formulations à forts PND : ce sont les produits qui présentent un PND supérieur à 60%. C'est le cas de l'Aniosyme N2 (67%) et surtout de l'Aniosyme PLA II avec un PND de 98%.



**Figure II-1** : PND de formulations détergentes et/ou pré-désinfectantes avec la salissure CP+20%MG. Les PND sont effectués dans les Laboratoires ANIOS de Lille

Cette méthodologie permet d'établir un classement de ces formulations en fonction de leur efficacité vis-à-vis des protéines. Elle est également utile pour étudier les effets synergiques ou antagonistes qui peuvent exister entre les différentes molécules qui composent la formulation.

Un inconvénient de cette méthode est la nécessité de devoir éluer les protéines de la surface dans une solution de récupération afin de pouvoir les doser. Bien que le rendement d'élution vis-à-vis de la BSA soit évalué à  $98,6 \pm 0,4$  %, il ne peut être représentatif du rendement d'élution de toutes les protéines. Cette méthode est également limitée par sa sensibilité puisqu'elle permet un dosage des protéines totales dans une gamme de valeurs comprises entre 0,5 et 20  $\mu\text{g/ml}$ .

### III. LES APPROCHES SURFACIQUES

Le moyen le plus pertinent pour évaluer l'efficacité du nettoyage est de s'intéresser à la surface elle-même et de mettre en évidence la présence de résidus (protéiques ou non) après nettoyage. Pour cela, deux techniques d'analyses ont été envisagées, la spectroscopie de photoélectrons et le marquage des protéines à l'iode radioactif ( $^{125}\text{I}$ ).

#### III.1. La spectroscopie de photoélectrons

La spectroscopie de photoélectrons (XPS) est une technique d'analyse chimique de la surface des solides. Sa profondeur d'analyse est inférieure à 10 nm. Son principe est basé sur l'effet photoélectrique, c'est-à-dire l'émission d'un électron sous l'impact d'un photon X. L'XPS est définie comme une technique d'analyse de l'extrême surface en raison de l'existence du libre parcours moyen des électrons dans la matière. En effet, lors du transfert de l'électron vers la surface à travers le solide, celui-ci peut subir des chocs inélastiques. Le libre parcours moyen, défini comme la distance moyenne entre deux chocs, joue donc un rôle prépondérant en limitant l'épaisseur analysée.

L'XPS permet :

- Une analyse élémentaire et qualitative de la surface puisque tous les électrons des couches électroniques de cœur ou de valence, dont l'énergie de liaison est inférieure à l'énergie des photoélectrons incidents, peuvent être extraits, sauf l'hydrogène. L'énergie de liaison caractérise un électron d'un niveau électronique d'un atome donné, ce qui permet l'identification élémentaire. Sa sensibilité est de l'ordre de 0,1 à 0,5% atomique ;

- Une analyse chimique puisque les niveaux de cœur d'un atome impliqué dans une liaison chimique vont réagir à la modification de l'environnement électronique par rapport à l'atome isolé. Ceci se traduit par des variations d'énergies d'orbitales de 0,1 à quelques eV, appelées déplacements chimiques (ou chemical shifts) ;
- Une analyse (semi-)quantitative puisque les aires sous les pics sont proportionnelles au nombre d'atomes.

L'XPS est une technique précise (2 à 5% en relatif) mais pas toujours juste (justesse de 10 à 20%).

Les spectres XPS sont obtenus avec un spectromètre Escalab 220i (Thermo Electron Corporation) équipé d'une source non monochromatisée de magnésium (Mg K $\alpha$  1253,6 eV). La surface analysée des échantillons est de 1 cm<sup>2</sup>. Les effets de charge sont corrigés par rapport à l'énergie de liaison de la composante hydrocarbonée du carbone à 284,8 eV (carbone de contamination). Les spectres résolus sont décomposés en utilisant le logiciel Advantage (Thermo Electron Corporation). Ce logiciel nous permet de décomposer les spectres en fixant certains paramètres :

- La largeur à mi-hauteur (FWHM) identique à 0,05 eV près pour toutes les composantes d'un même élément ;
- Les rapports d'aires entre différentes composantes ;
- L'énergie des composantes.

L'aire des pics est déterminée après soustraction du fond continu de type Shirley et un rapport L/G (rapport Lorentzienne/Gaussienne) de 60. Les sections efficaces d'ionisation utilisées pour l'analyse quantitative sont celles calculées par Scofield. Pour de plus amples informations sur la technique XPS, voir l'annexe 1.

Dans notre étude, nous utiliserons l'azote comme élément caractéristique des protéines. Cet élément est en effet présent au niveau des liaisons peptidiques essentiellement, mais il est également constitutif des chaînes latérales des résidus asparagine, glutamine, tryptophane, arginine, histidine et lysine.

### **III.1.1. Le substrat**

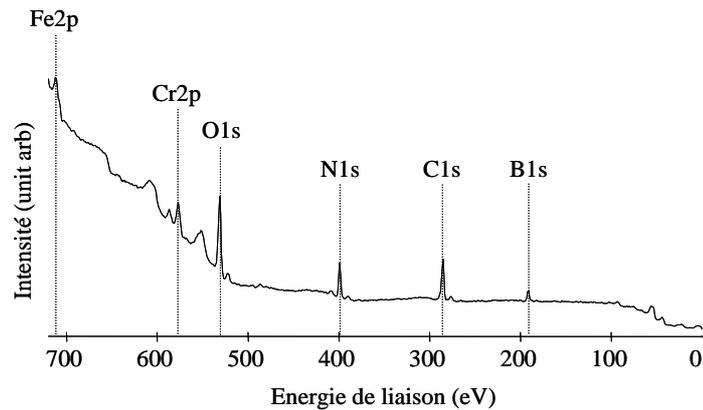
Les aciers inoxydables austénitiques rentrent dans la fabrication des instruments de chirurgie. Ce sont essentiellement les instruments à fonction statique (spéculems, écarteurs, valves...). Ils contiennent de 16 à 25 % de chrome et jusqu'à 20 % de nickel.

Nous avons sélectionné un acier inoxydable austénitique : l'AISI 304. Cet acier inoxydable est utilisé par les Laboratoires ANIOS pour la classification des formulations nettoyantes selon leur PND (Pouvoir Nettoyant Dégraissant).

Le spectre XPS du substrat AISI 304 (figure II-2) montre les éléments constitutifs des aciers inoxydables c'est-à-dire le fer (Fe), le chrome (Cr), le nickel (Ni) et l'oxygène (O). On observe également du carbone (C), de l'azote (N) et du bore (B).

La présence du carbone est attribuée au carbone de contamination constamment retrouvé sur les métaux exposés à l'air ([Gerin, *et al.* 1995, Ratner, *et al.* 1990]. Une acquisition centrée sur les pics d'azote et de bore permet de déterminer la forme chimique de ces éléments et, les données quantitatives, de conclure à la présence de nitrure de bore sur la surface. L'origine de la contamination de cet acier inoxydable par le nitrure de bore n'a pu être établie. Elle pourrait venir de la mise en forme des tôles par laminage.

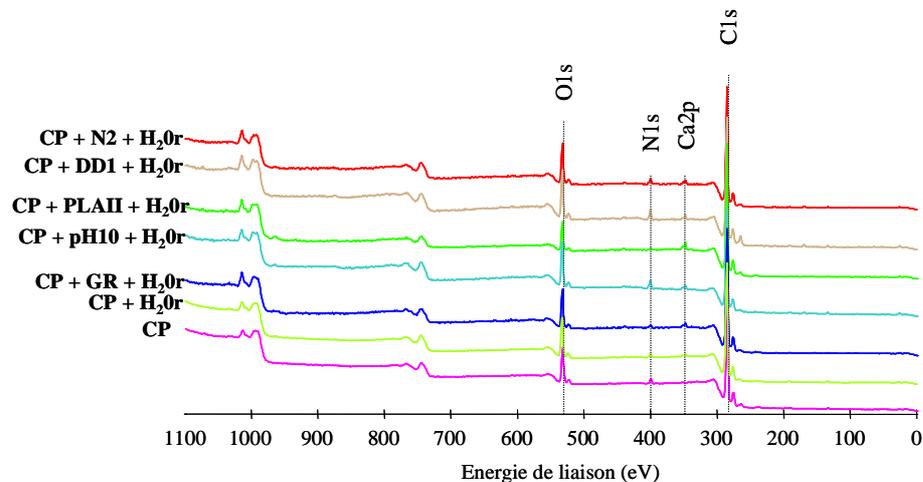
Fort heureusement, le nitrure de bore est un solide chimiquement inerte et n'est pas soluble. De plus, l'énergie de liaison de l'azote sous forme nitrure (398,0 eV) est nettement différente de l'énergie de liaison de l'azote dans la liaison peptidique N-C=O (400,1 eV). Nous mettrons donc à profit la contribution associée au nitrure comme standard interne pour évaluer la performance des formulations vis-à-vis des protéines, exclusivement.



**Figure II-2 :** Spectre XPS obtenu sur acier inoxydable austénitique AISI 304

### III.1.2. La salissure

Une étude préalable utilisant la salissure CP+20%MG, a montré que cette dernière ne pouvait être utilisée dans le cadre de ce travail. En effet, de par sa consistance extrêmement lipidique et sa compacité, l'épaisseur de la couche de salissure, après nettoyage et rinçage à l'eau du réseau, reste supérieure à la profondeur d'analyse de l'XPS, comme cela est illustré sur la figure II-3. Les acquisitions centrées confirment l'absence des éléments caractéristiques du substrat.



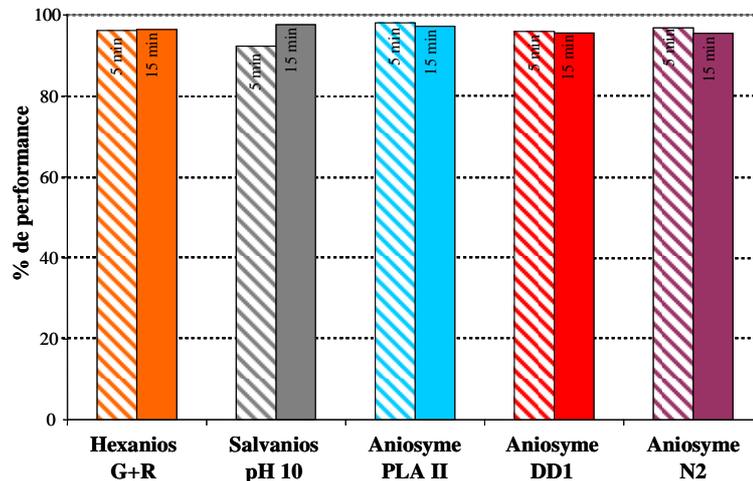
**Figure II-3 :** Spectres XPS obtenus sur substrats d'AISI 304 souillés par la salissure CP+20%MG, nettoyés par les différentes formulations et rincés à l'eau du réseau. Aucun élément caractéristique du substrat (Fe ou Cr) n'est détecté en raison de l'épaisseur de la couche résiduelle.

La salissure sélectionnée pour les analyses XPS est un homogénat de cerveau (HC) humain à 10% en glucose 5%, clarifié par centrifugation. La clarification permet de culotter les débris cellulaires et plus particulièrement les noyaux des cellules dans lesquels est confiné l'ADN.

Le choix de cette salissure est motivé d'une part, par sa composition complexe qui peut être représentative des souillures présentes sur les instruments neurochirurgicaux. Le tissu cérébral étant, de plus, une structure concentrée en protéine prion pathologique, de tels homogénats seront utilisés pour évaluer les performances des formulations vis-à-vis de la protéine prion spécifiquement. Ce dernier point fait l'objet d'un prochain chapitre.

D'autre part, cette salissure est adaptée à la sensibilité surfacique de la technique XPS, comme nous le verrons par la suite.

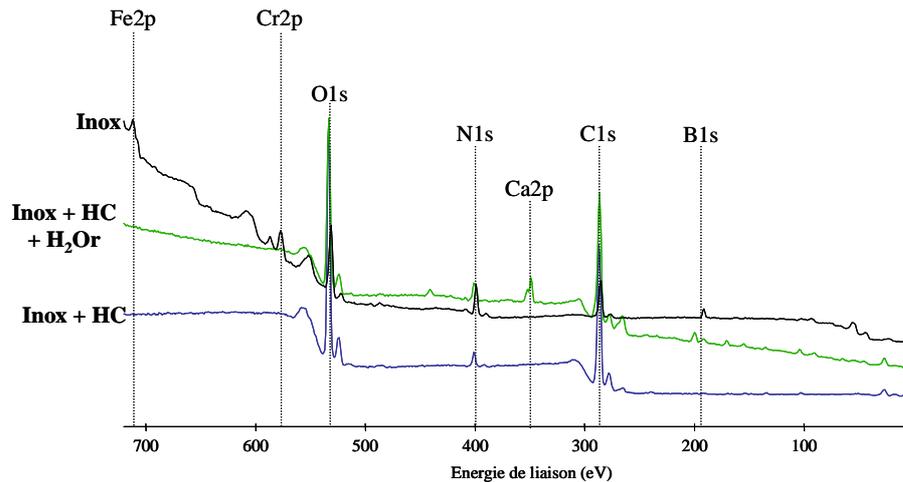
Nous avons réalisé un PND sur notre salissure (homogénat de cerveau 10%, HC). Les PND obtenus étant supérieurs à 90% quelle que soit la formulation testée (figure II-4), nous avons conclu que notre salissure ne pouvait être utilisée dans le cadre du PND.



**Figure II-4 :** PND des formulations nettoyantes et/ou pré-desinfectantes après 5 min et 15 min de contact avec la salissure HC. Toutes les formulations testées présentent des performances maximales vis-à-vis de la salissure HC.

Outre la définition d'une salissure de référence, ces premières données insistent sur la nécessité d'adapter la salissure à la méthode d'évaluation proposée. De la même façon, la méthode d'évaluation proposée sera fonction du seuil de sensibilité au-dessous duquel l'efficacité du nettoyage pourra être considérée comme satisfaisante.

Les substrats d'AISI 304 ont donc été souillés par immersion dans HC pour une durée d'une heure à température ambiante, puis sont séchés à air ambiant. Une analyse XPS du substrat souillé nous permet de déterminer la composition élémentaire de la salissure (figure II-5 – Inox + HC). On observe la présence d'oxygène, d'azote et de carbone, ce qui est en accord avec la composition glucido-lipido-protéique de la salissure. Notons que l'épaisseur de la couche de salissure est supérieure à la profondeur d'analyse de l'XPS puisque les éléments caractéristiques du substrat ne sont pas détectés.



**Figure II-5 :** Spectres XPS obtenus sur AISI 304 souillé par HC avant rinçage 5 (Inox + HC) et après rinçage à l'eau de réseau (Inox + HC + H<sub>2</sub>O<sub>r</sub>). Le spectre du substrat est donné en référence (Inox). Le rinçage à l'eau du réseau élimine seulement une partie de la salissure. Les éléments caractéristiques du substrat sont apparents.

L'essai contrôle est le substrat souillé et rincé par l'eau du réseau dans laquelle seront diluées les formulations à tester (figure II-5 – Inox + HC + H<sub>2</sub>O<sub>r</sub>). La dureté de l'eau est de 19° Français. Après rinçage, on observe une diminution de l'épaisseur de la salissure, les éléments caractéristiques des substrats commencent à réapparaître.

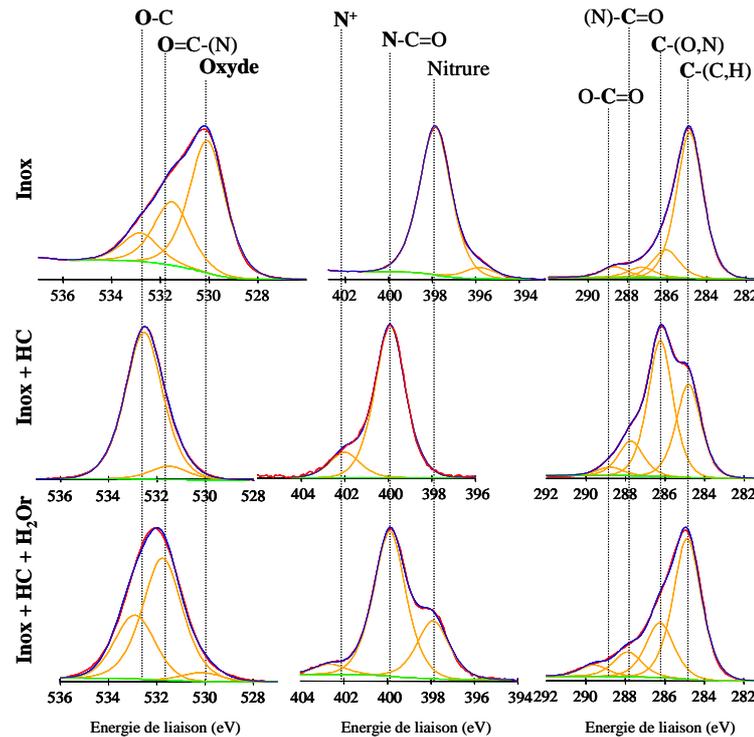
L'identification des fonctions chimiques de la salissure et les modifications chimiques générées par le rinçage sont mises en évidence par les acquisitions centrées sur les pics O1s, N1s et C1s (figure II-6), en accord avec les données bibliographiques [Gerin, *et al.* 1995, Lebugle, *et al.* 1995, Rouxhet, *et al.* 1994, Vinnichenko, *et al.* 2002, Xiao, *et al.* 1997].

Avant le rinçage à l'eau du réseau, la composante principale du pic C1s est C-O due au tampon glucosé de l'HC. Cette composante diminue significativement après le rinçage puisque le glucose est un composé soluble. Ceci est également observé sur le pic O1s : la composante O-C présente avant le rinçage diminue au profit de la liaison O=C après celui-ci. On voit également apparaître la contribution de l'oxyde métallique à plus faible énergie de liaison. La contribution C=O ne peut être attribuée spécifiquement aux protéines puisqu'il est extrêmement difficile, pour ne pas dire impossible de discriminer les liaisons carbonyles des liaisons amides sur le pic d'oxygène.

En ce qui concerne le pic d'azote, sa contribution majeure est celle de l'amide N-C=O à environ 400,0 eV, caractéristique des protéines. La présence de protéines est également indiquée par la contribution O=C-N du carbone à environ 288 eV.

Après le rinçage à l'eau du réseau, il y a une diminution de la contribution de l'azote sous forme amide et apparition de la contribution de l'azote sous forme de niture. Notons que ces deux composantes sont distantes de 2,1 eV.

Ces résultats indiquent que le rinçage a permis d'éliminer seulement une partie de la salissure. Son épaisseur résiduelle est maintenant inférieure à 10 nm puisque le niture, présent sur le substrat vierge est bien détecté.



**Figure II-6 :** Niveaux de cœur 1s de l'oxygène (O1s), de l'azote (N1s) et du carbone (C1s) obtenus sur substrats d'AISI 304 souillés par HC (Inox + HC) et par HC suivi d'un rinçage à l'eau du réseau (Inox + HC + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Les niveaux de cœur des éléments du support sont donnés en référence (Inox).

### III.1.3. Caractérisation des formulations nettoyantes et/ou pré-désinfectantes

Une caractérisation qualitative des composés chimiques entrant dans la composition des formulations est nécessaire pour pouvoir identifier les formes chimiques de ces composés.

Les analyses XPS sont réalisées sur les formulations, préalablement déposées sur le substrat d'acier inoxydable, afin de :

- Déterminer la composition élémentaire et les contributions chimiques de ces produits ;
- De tester leur rémanence sur la surface ;
- De vérifier leur innocuité chimique vis-à-vis de la surface.

Certains des composés chimiques entrant dans la composition des formulations sont des composés azotés. Etant donné que nous utilisons l'azote comme marqueur des protéines, il convient d'identifier les formes chimiques de l'azote dans les molécules tensioactives et antimicrobiennes et d'identifier précisément ces composantes en XPS, de façon à pouvoir les discriminer par la suite.

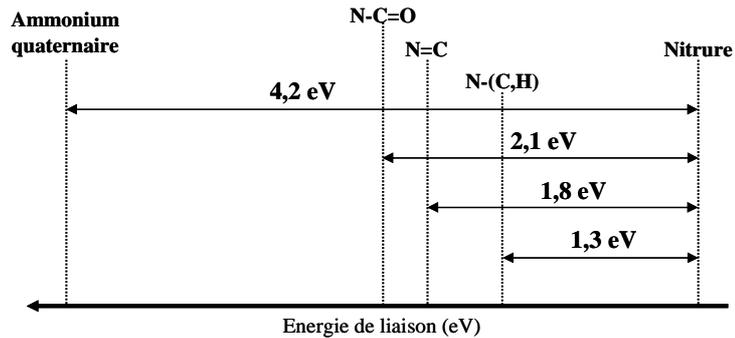
A l'exception de l'Aniosyme PLAI, trois formes chimiques de l'azote sont représentées dans les formulations. Il s'agit de :

- L'azote simplement lié au carbone ou à l'hydrogène : N-(C,H)
- L'azote doublement lié au carbone : N=C ;
- L'ammonium quaternaire.

Seules les formes N-C et ammonium existent pour l'Aniosyme PLAI. De ce fait, cette formulation nous sert d'étalon pour déterminer :

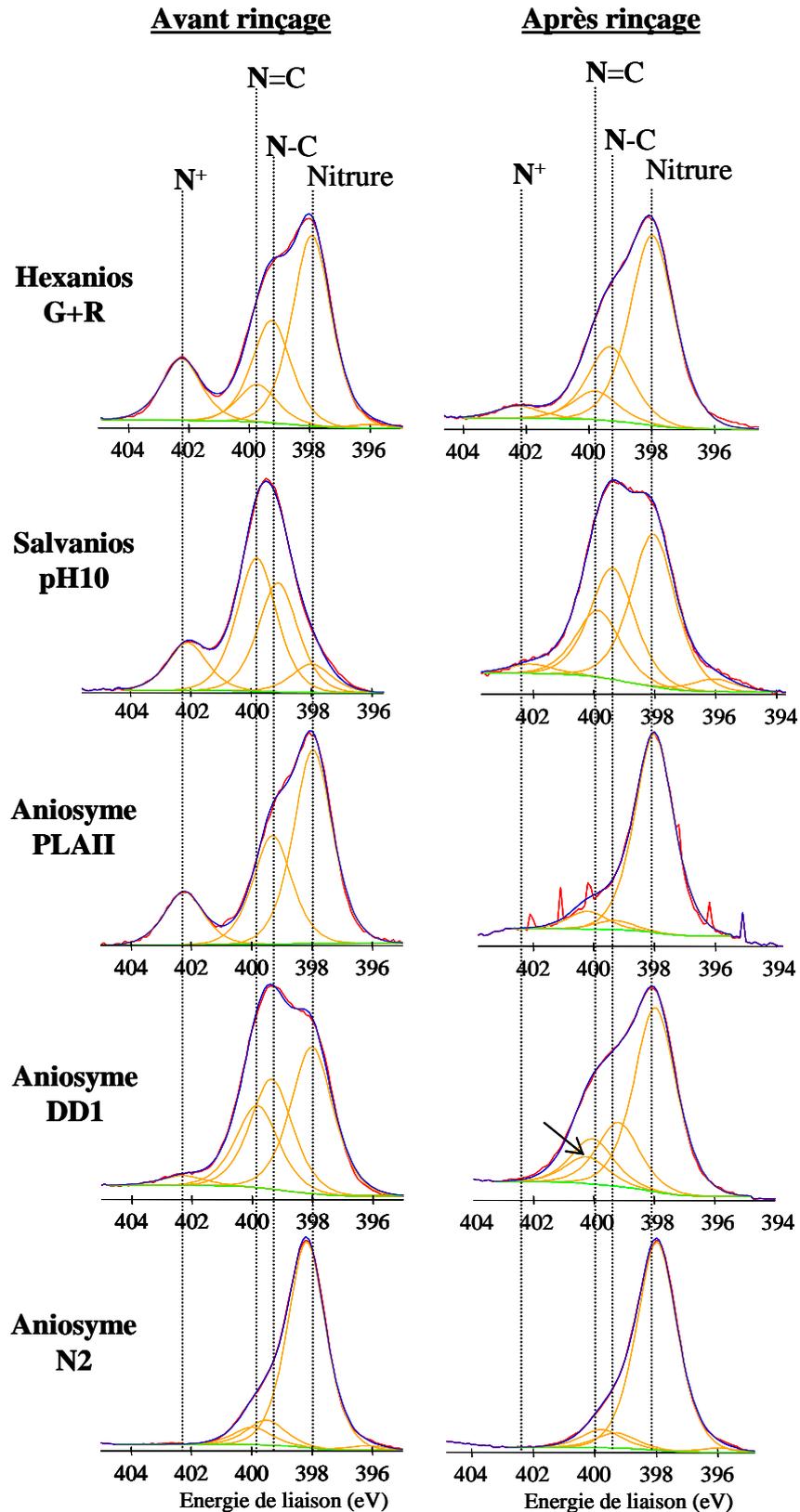
- L'énergie de liaison de l'azote simplement lié au carbone et de l'ammonium quaternaire ;
- L'écart entre les contributions de l'azote.

Ce dernier paramètre permet d'imposer une contrainte supplémentaire pour la décomposition des pics de l'azote obtenus pour les autres formulations. C'est ainsi que nous avons identifié la contribution de l'azote doublement lié au carbone. Elle est observée à 1,8 eV de celle du nitrure. Les écarts établis entre les contributions de l'azote sont résumés sur la figure suivante :



**Figure II-7 :** Ecart entre les contributions d'azotes sur le pic N1s, d'après les analyses XPS des composants azotés des formulations.

Les décompositions des pics d'azote pour les 5 formulations ont donc été réalisées suivant ces contraintes et les spectres résolus sont présentés sur la figure II-8, avant et après rinçage à l'eau du réseau.

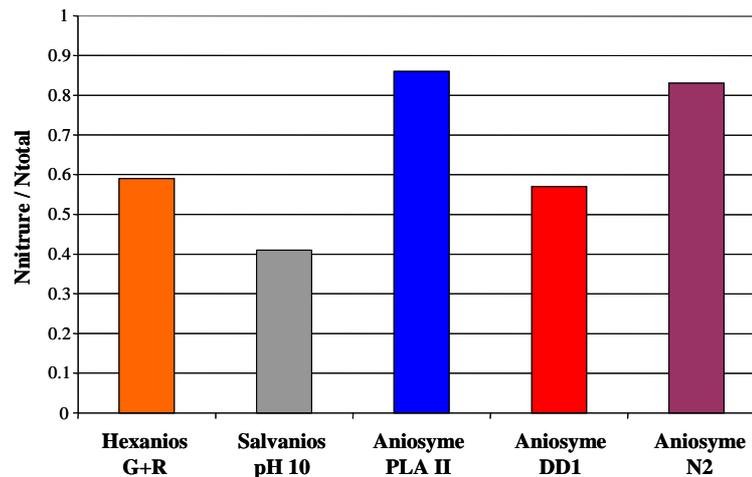


**Figure II-8 :** Niveaux de cœur de l'azote N1s obtenus sur les formulations déposées sur AISI 304 avant et après rinçage à l'eau du réseau.

Les spectres XPS réalisés sur les formulations après rinçage nous permettent de savoir si les molécules entrant dans la composition des formulations sont facilement éliminées de la surface au moment du rinçage ou si elles montrent une certaine rémanence. Ainsi, en comparant les spectres de la figure II-8 avant et après le rinçage, on observe une bonne rinçabilité des ammoniums quaternaires puisqu'ils disparaissent pratiquement après le rinçage. La réversibilité de l'adsorption des tensioactifs ioniques, par le rinçage, a précédemment été mise en évidence [Arnebrant, *et al.* 1989, Elwing et Golander 1990, Wahlgren et Arnebrant 1991]. En revanche, les composés azotés (N-C et/ou N=C) ont tendance à rester en surface. Le calcul du rapport  $N_{\text{nitrure}} / N_{\text{total}}$  permet d'apprécier cette tendance, un rapport de 1 qualifiant le substrat de référence (tableau II-2 et figure II-9).

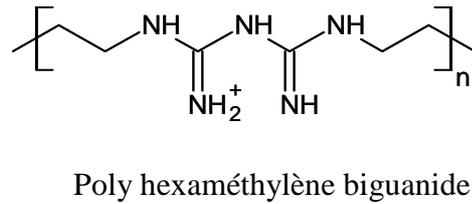
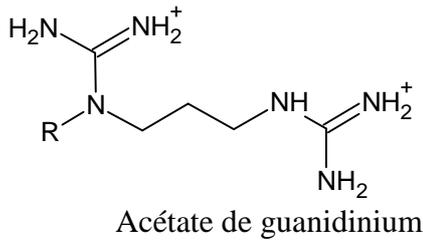
**Tableau II-2 : Rapports  $N_{\text{nitrure}} / N_{\text{total}}$  avant et après rinçage des formulations déposées sur les substrats d'AISI304**

	$N_{\text{nitrure}}/N_{\text{total}}$	
	Avant rinçage	Après rinçage
Hexanios G+R	0,47	0,59
Salvanios pH10	0,09	0,41
Aniosyme PLAI	0,54	0,86
Aniosyme DD1	0,39	0,57
Aniosyme N2	0,83	0,83



**Figure II-9 : Rapports  $N_{\text{nitrure}} / N_{\text{total}}$  après rinçage des formulations déposées sur les substrats d'AISI304**

Pour Hexanios G+R, Salvanios pH10 et Aniosyme DD1, les rapports  $N_{\text{nitrure}} / N_{\text{total}}$  sont largement inférieurs à 1, suggérant que les molécules azotées présentes dans ces formulations s'adsorbent sur la surface et qu'elles ne sont pas désorbées au cours du rinçage. En revanche, avec un rapport  $N_{\text{nitrure}} / N_{\text{total}}$  supérieur à 0,8, les molécules azotées constituant les Aniosyme PLAI et N2 semblent être facilement éliminées par le rinçage. Nous expliquons ce résultat par une rémanence préférentielle des principes actifs antimicrobiens dans lesquels l'azote est sous forme C=N, c'est-à-dire l'acétate de guanidinium et le biguanide.



Ces molécules sont effectivement présentes dans Hexanios G+R, Salvanios pH10 et Aniosyme DD1. Elles sont faiblement représentées dans Aniosyme N2 et absentes dans Aniosyme PLAI.

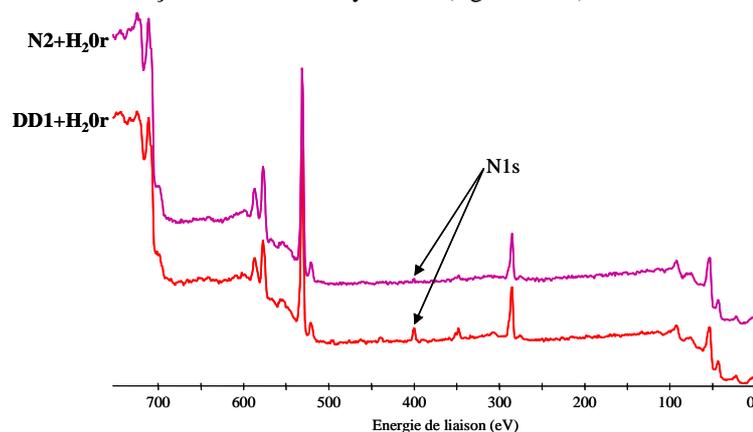
La décomposition du pic N1s pour l'Aniosyme DD1 (figure II-8) montre la présence d'une composante supplémentaire à plus haute énergie de liaison (indiquée par une flèche). Cette composante peut être attribuée à la fonction amide, caractéristique des protéines. L'Aniosyme DD1 étant une formulation trienzymatique, il est possible que ces enzymes restent en surface, soit par adsorption, soit par interaction avec les molécules rémanentes constitutives de la formulation. Cette dernière hypothèse est la plus probable car l'Aniosyme N2, également trienzymatique et qualitativement comparable à l'Aniosyme DD1, ne présente pas de contribution supplémentaire.

Cependant, sur des substrats dépourvus de nitrure de bore, nous avons comparé des spectres XPS et notamment ceux des pics N1s obtenus avec :

- Aniosyme DD1 trienzymatique ;
- Aniosyme DD1 sans enzyme.

Dans les deux cas, les spectres de l'azote peuvent être décomposés de la même façon sans qu'une nouvelle contribution soit nécessaire. Il en est de même pour Aniosyme N2 avec et sans enzymes. Les protéines enzymatiques, formulées, ne semblent donc pas rester adsorbées sur la surface. Ces résultats sont en accord avec la littérature [Wahlgren et Arnebrant 1991]. En effet, les protéines en présence de tensioactif présentent moins d'affinité pour les surfaces.

Cette expérience nous a néanmoins permis de confirmer la rémanence de certaines molécules azotées de l'Aniosyme DD1 et la bonne rinçabilité de l'Aniosyme N2 (figure II-10).

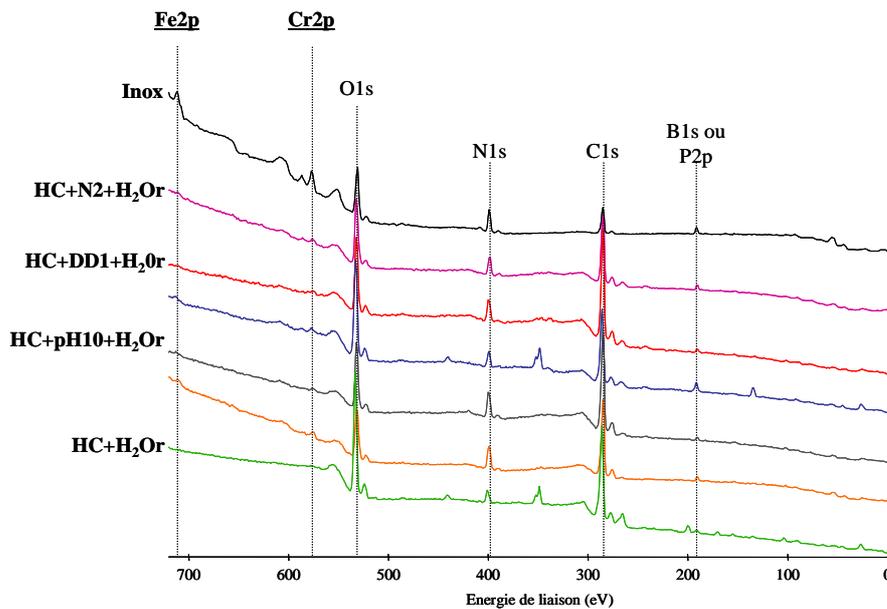


**Figure II-10** : Rinçabilité des formulations Aniosyme DD1 et N2 sur des substrats dépourvus de nitrure de bore. Les composés azotés présents dans l'Aniosyme DD1 ont tendance à rester adsorbés sur la surface.

### III.1.4. Performances des formulations sur substrats souillés

La finalité de cette étude étant d'évaluer les performances des formulations vis-à-vis des protéines par XPS, les substrats souillés par HC sont nettoyés par les 5 formulations étudiées, rincés puis séchés avant d'être analysés par XPS.

Les analyses XPS (figure II-11) des substrats nettoyés par les formulations montrent une diminution de l'épaisseur de la couche de salissure comparativement à l'essai contrôle (figure II-11 : HC + H<sub>2</sub>O<sub>r</sub>) puisque les éléments du substrat (fer et chrome) sont observés sur les spectres. Ceux-ci restent cependant bien moins apparents que pour le substrat de référence ce qui témoigne d'une couche résiduelle de salissure encore importante.



**Figure II-11** : Spectres XPS obtenus sur AISI 304 après nettoyage et rinçage des substrats AISI304 souillés par HC. Les spectres du substrat (Inox) et de l'essai contrôle (HC+H<sub>2</sub>O<sub>r</sub>) sont donnés en référence. Les éléments caractéristiques du substrat sont détectés ce qui témoigne d'une réduction de l'épaisseur de salissure.

Les spectres résolus du niveau de cœur 1s de l'azote (figure II-12) sont très utiles pour mettre en évidence l'efficacité des formulations pour éliminer les protéines de la surface du substrat, même si la désorption n'est pas totale. La performance de ces formulations, pour le nettoyage des substrats souillés, est évaluée d'après le rapport  $N_{\text{nitrate}} / N_{\text{amide}}$  (tableau II-3). Plus ce rapport est grand, plus la formulation est performante vis-à-vis des protéines. Afin de faciliter la visualisation des performances de ces formulations, les rapports sont présentés sous forme de diagramme bâtons sur la figure II-13.

D'après les résultats obtenus par XPS et le calcul du rapport  $N_{\text{nitrate}} / N_{\text{amide}}$ , l'Aniosyme N2 présente la meilleure performance de nettoyage vis-à-vis des protéines, suivie par ordre décroissant d'efficacité de l'Aniosyme PLAII, de l'Aniosyme DD1, de l'Hexanios G+R et de Salvanios pH10.

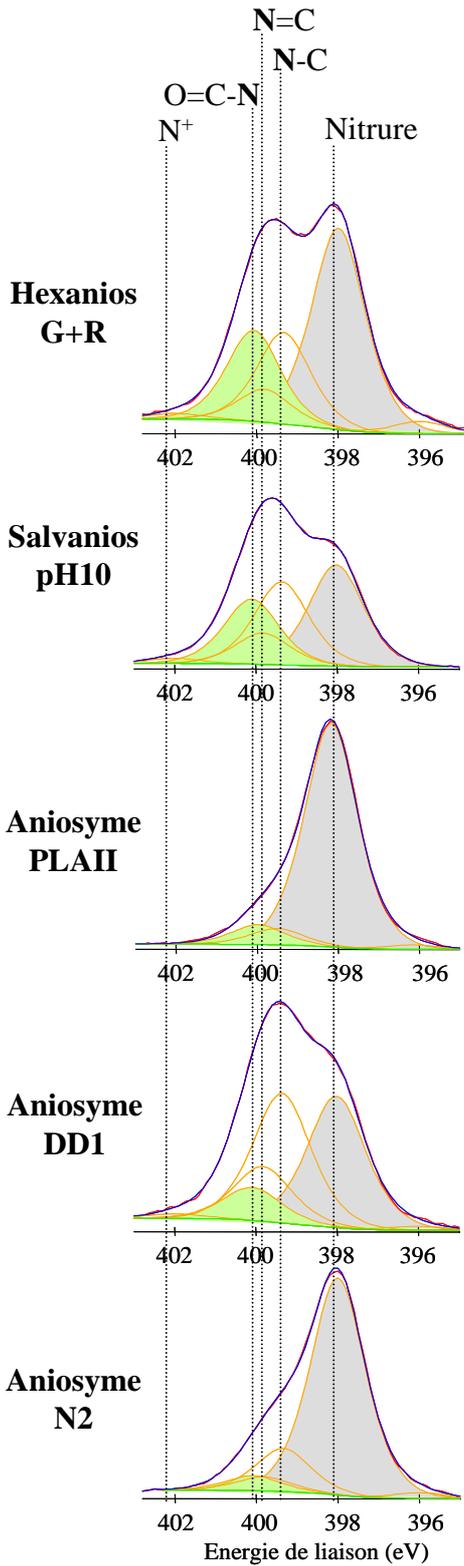
Cette classification diffère de celle obtenue d'après le PND. En effet, l'Aniosyme PLAII présente de meilleure performance en PND comparativement à l'Aniosyme N2. Cette divergence dans les résultats peut s'expliquer de plusieurs façons :

- Dans le cadre du PND, la souillure est beaucoup plus riche en lipide que ne l'est celle utilisée pour l'étude XPS. L'Aniosyme PLAII est une formulation présentant un pH alcalin (pH = 10,5).

L'alcalinité de la formulation pourrait alors favoriser la saponification des lipides et par conséquent l'élimination de la salissure et notamment des protéines. D'ailleurs, un PND réalisé sur de la cervelle de porc sans matière grasse ajoutée abaisse les performances de l'Aniosyme PLAI.

- Au cours de la décomposition des spectres XPS et notamment des spectres résolus de l'azote, nous avons recherché des composantes azotées d'après les informations disponibles sur leur structure chimique. Toutefois, de par la complexité de la souillure et des formulations elles-mêmes, il est impossible de démontrer l'exactitude de ces décompositions. Ainsi, des incertitudes demeurent quant à la position exacte en énergie des différentes composantes et de l'aire mesurée sous le pic. Il n'est donc pas exclu que la divergence observée soit due à ces incertitudes.

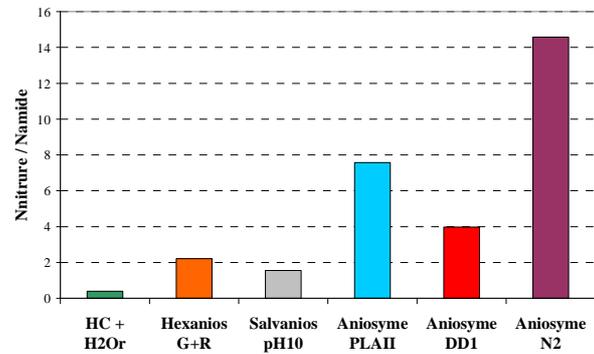
Cette ambiguïté sur la divergence des résultats obtenus par le PND et par XPS sera levée par la seconde approche surfacique, présentée dans la 2<sup>ème</sup> partie de ce chapitre, qui concerne le marquage des protéines à l'iode radioactif (<sup>125</sup>I).



**Figure II-12 :** Niveaux de cœur de l'azote N1s obtenus après nettoyage et rinçage des substrats d'AISI 304 souillés par HC.

**Tableau II-3 :** Rapport  $N_{\text{nitruce}} / N_{\text{amide}}$  pour les substrats AISI304 souillés, nettoyés et rincés.

	$N_{\text{nitruce}}/N_{\text{amide}}$
HC	0,4
Hexanios G+R	2,2
Salvanios pH10	1,6
Aniosyme PLAII	7,6
Aniosyme DD1	4,0
Aniosyme N2	14,6

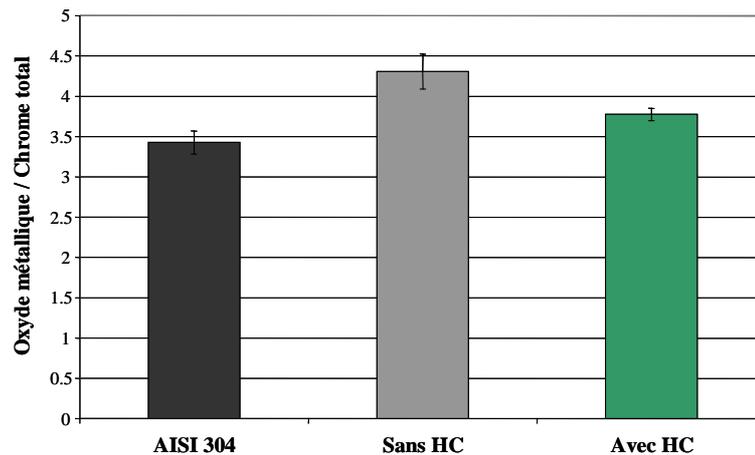


**Figure II-13 :** Performances des formulations évaluées d'après le rapport  $N_{\text{nitruce}} / N_{\text{amide}}$ .

### III.1.5. Innocuité chimique des formulations vis-à-vis de la surface

L’XPS étant une technique d’analyse chimique de la surface, il est possible de vérifier l’innocuité chimique des formulations vis-à-vis du matériau à nettoyer. Les aciers inoxydables sont caractérisés par la présence majeure d’oxyde de chrome en surface qui explique la protection de ces aciers de la corrosion. Le rapport de l’oxyde métallique sur le chrome total peut être utilisé comme un indicateur de l’inertie chimique des formulations. Ce rapport est donc calculé pour :

- les substrats de référence AISI 304 :  $3,4 \pm 0,1$
- les substrats AISI 304 non souillés et nettoyés par les formulations :  $4,3 \pm 0,2$
- les substrats AISI 304 souillés par HC et nettoyés :  $3,8 \pm 0,1$



**Figure II-14** : Variations des rapports Oxyde métallique / Cr des substrats AISI 304

Ces valeurs, présentées sur la figure II-14, suggèrent une augmentation de la couche d’oxyde métallique en surface des substrats après avoir été nettoyés. Les formulations testées pourraient donc « passiver » la surface du substrat. Nous pouvons également observer que la présence de salissure sur le substrat limite l’augmentation de cette couche d’oxyde métallique puisque les rapports calculés présentent des valeurs intermédiaires.

### III.1.6. Synthèse

Les travaux présentés précédemment montrent que la spectroscopie de photoélectrons est une technique d’analyse chimique de la surface, complémentaire des techniques traditionnelles, qui s’inscrit parfaitement dans la problématique du nettoyage et particulièrement dans l’élaboration des critères de performances des formulations. Elle permet de détecter la présence de molécules résiduelles sur les surfaces, qui sont indétectables par les méthodes d’éluion.

La technique XPS nous permet d’établir :

- La compatibilité chimique des formulations avec le matériau considéré. Il est important que les formulations employées ne provoquent pas de vieillissement prématuré des matériaux ;
- La rinçabilité des produits chimiques entrant dans la composition des formulations. La rémanence de composés chimiques en surface pourrait compromettre les étapes ultérieures du procédé ;
- Une hiérarchisation des performances de différentes formulations vis-à-vis des protéines et avec une sensibilité de l’ordre de 0,5% atomique.

Des incertitudes persistent malgré tout en raison de la présence de molécules azotées dans les formulations. Cependant, ces incertitudes sont sans conséquence majeure sur l'évaluation des performances. En effet, si l'on ne tient pas compte de la décomposition des spectres de l'azote, mais que l'on s'intéresse uniquement à la quantité d'azote (organique) résiduelle, le rapport calculé pour évaluer le nettoyage restera représentatif d'une quantité de souillure résiduelle pouvant contenir des protéines. Ainsi, l'efficacité du nettoyage vis-à-vis des protéines serait surestimée puisque les molécules azotées rémanentes seraient également considérées.

L'inconvénient de l'XPS est qu'elle reste une technique semi-quantitative. Associé au fait qu'elle n'est pas spécifique des protéines, il est difficile d'accéder à une quantité de protéines par unité d'aire et donc de déterminer la quantité de protéines résiduelles après nettoyage. Ces données sont accessibles par le marquage des protéines par un isotope radioactif.

### **III.2. Le radiomarquage**

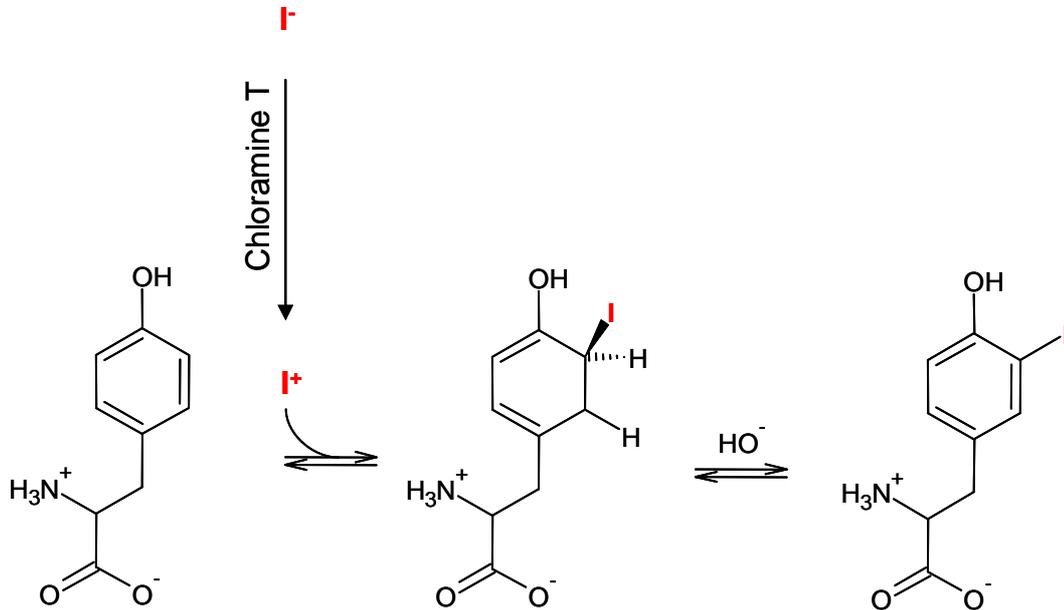
Il est souvent difficile de mesurer précisément de faibles quantités de protéines adsorbées sur une surface. Les techniques d'analyse utilisant le radiomarquage étant d'une grande sensibilité, elles sont couramment utilisées pour quantifier l'adsorption des protéines [Balasubramanian, *et al.* 1999, Cloix, *et al.* 1975, Lhoest, *et al.* 1998, Lhoest, *et al.* 2001, Moulton, *et al.* 2003, Tidwell, *et al.* 2001, Wagner, *et al.* 2003].

L'objectif de cette partie de l'étude est de déterminer quantitativement les performances des formulations vis-à-vis des protéines spécifiquement.

En raison de son poids moléculaire modéré (66 kDa), de sa forme globulaire, de son rôle dans le transport de divers ions et molécules dans le sang et également de son faible coût, la BSA est couramment utilisée comme protéine modèle pour étudier les caractéristiques de l'adsorption des protéines sur les surfaces. Notre objectif étant d'évaluer les performances des formulations vis-à-vis des protéines spécifiquement, la salissure choisie est simple et exclusivement protéique. Il s'agit d'une solution aqueuse à 1 mg/ml de BSA marquée à l'iode 125 (<sup>125</sup>I).

### III.2.1. Le marquage des protéines par l'iode 125

La méthode utilisée pour le marquage des protéines par l'iode 125 est une méthode d'oxydation chimique utilisant comme oxydant la chloramine T (Annexe 2) :



**Figure II-15** : Iodation de la tyrosine par oxydation des iodures et substitution électrophile

La substitution électrophile par l'iode 125 se fait en ortho- de l'hydroxyl du phénol des résidus de tyrosine et les dérivés obtenus sont essentiellement mono-iodés puisque les dérivés bi-iodés sont instables.

L'iode 125 non incorporé est séparé des protéines iodées par chromatographie d'exclusion diffusion sur une colonne Sephadex G50. Le profil d'élution est établi en mesurant l'activité des fractions d'élution. Les fractions présentant les plus fortes concentrations en protéines marquées sont collectées et diluées dans une solution de protéine froide (non iodée) à 1mg/ml. L'activité spécifique (Ac Sp) de la solution est calculée selon la relation [Fangyan, *et al.* 1998] :

$$\text{Ac Sp} = \frac{\text{cpm}}{V \times C_s}$$

avec Ac Sp : l'activité spécifique de la solution (cpm/mg)  
 cpm : coups par minute  
 V : volume de la solution du comptage (ml)  
 Cs : concentration de la solution de protéine (mg/ml)

### III.2.2. Adsorption de la BSA-<sup>125</sup>I sur acier inoxydable AISI304

Les adsorptions sont réalisées en multiplaques 24 puits par immersion des substrats dans la solution de BSA-<sup>125</sup>I à 1 mg/ml pendant une heure sous agitation à température ambiante. Les substrats sont alors rincés par dilution successive à l'eau distillée afin d'éliminer les protéines non adsorbées. Ils sont ensuite

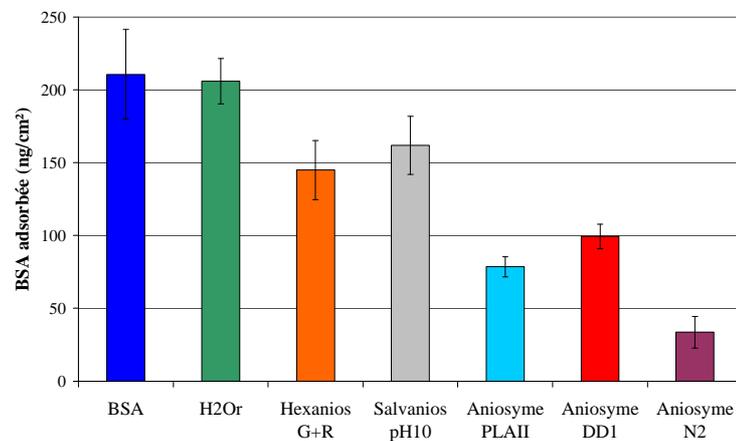
nettoyés par les formulations testées pendant 15 minutes sous agitation puis rincés à l'eau du réseau (H<sub>2</sub>O). La radioactivité de la BSA-<sup>125</sup>I adsorbée est détectée par un compteur gamma (LKB) avant et après la phase de nettoyage. La quantité de BSA-<sup>125</sup>I adsorbée par unité de surface est calculée selon la relation suivante :

$$CS = \frac{cpm}{Ac Sp \times S}$$

avec CS : la concentration surfacique (mg/m<sup>2</sup>)  
S : l'aire du substrat (m<sup>2</sup>)

### III.2.3. Les performances des formulations évaluées par radiomarquage

Les concentrations surfaciques moyennes de BSA adsorbée avant (BSA) et après nettoyage sont présentées sur la figure II-16. Les résultats sont exprimés en ng/cm<sup>2</sup>.



**Figure II-16 : Evaluation des performances des formulations vis-à-vis de la BSA-<sup>125</sup>I adsorbée à partir d'une solution à 1 mg/ml (moyenne ± écart-type avec n=30 pour BSA et n=3 pour chaque formulation, n : le nombre d'essai)**

La quantité de BSA adsorbée sur les substrats d'acier inoxydable est de 210 ± 30 ng/cm<sup>2</sup>. Si l'on considère que la BSA est un ellipsoïde de 14 x 4 x 4 nm, la quantité de protéine adsorbée est équivalente à l'adsorption d'une monocouche de BSA, son axe le plus long étant orienté parallèlement à la surface [Terashima et Tusuji 2002]. Lorsque ces substrats sont nettoyés par les différentes formulations, la quantité de BSA adsorbée diminue. Par ordre croissant d'efficacité, Salvanios pH10 (162 ± 20), Hexanios G+R (145 ± 20), Aniosyme DD1 (99 ± 8), Aniosyme PLAI (78 ± 7) et Aniosyme N2 (34 ± 10) éliminent respectivement 23%, 31%, 53%, 63% et 84% de la BSA adsorbée, l'eau du réseau n'en éliminant que 2%. L'eau du réseau ne possède aucune activité détergente sur la BSA adsorbée. La présence de tensioactifs est nécessaire pour diminuer la quantité de protéines adsorbées. La présence d'enzymes dans les formulations semble améliorer les performances des formulations. En effet, les trois formulations enzymatiques sont les plus efficaces.

Vis-à-vis de la souillure protéique, l'Aniosyme N2 présente des performances supérieures à l'Aniosyme PLAI. La hiérarchisation des formulations obtenue par radiomarquage est donc en accord avec celle précédemment obtenue en XPS. Ceci conforte l'idée que l'efficacité du nettoyage vis-à-vis de la salissure CP+20%MG par l'Aniosyme PLAI pourrait être due, en partie, à la saponification des lipides.

La méthode isotopique est un outil également précieux pour évaluer l'efficacité du nettoyage puisque les informations sur la qualité du nettoyage sont directement obtenues par la radioactivité résiduelle sur la surface. Cette méthode permet donc d'évaluer un procédé dans sa globalité, mais également de suivre l'évolution du procédé au cours de ces différentes étapes. C'est un atout majeur par rapport aux méthodes nécessitant une élution des protéines et l'évaluation du rendement de l'élution. Enfin, cette méthode offre une sensibilité adaptée à la problématique de la détergence puisque l'on peut détecter jusqu'à des picogrammes de protéines [Vandenberg et Krull 1991].

L'affinité des protéines pour une même surface dans des conditions opératoires définies va dépendre de la protéine elle-même, de par sa structure, la distribution de ses charges, son point isoélectrique, son poids moléculaire, son hydrophobicité... Ces critères influencent également la désorption des protéines de la surface. Ceci signifie que les performances observées vis-à-vis de la BSA ne pourront être totalement extrapolées à l'ensemble des protéines, ni aux multiples protéines constitutives d'une salissure complexe telle qu'un homogénat de cerveau.

Bien qu'une solution de BSA ne soit pas représentative d'une salissure retrouvée sur les DM, plusieurs arguments justifient son utilisation dans cette étude :

- La majorité des travaux concernant la détergence montre que les protéines, dont la BSA, sont difficilement éliminées des surfaces et que les procédés de nettoyage employés doivent être drastiques pour être efficaces. Ceci est également vérifié dans le cas de la protéine prion ;
- Les protéines s'adsorbent de façon spontanée [Norde 1986, 1995, Norde et Lyklema 1991] et cette adsorption est généralement décrite comme une étape initiatrice de divers processus comme l'adhésion cellulaire [Dufrêne, *et al.* 1996, Ratner, *et al.* 1990], le développement des biofilms ou encore la corrosion [Frateur, *et al.* 2006]. La BSA étant une protéine plasmatique, elle est couramment utilisée pour modéliser l'adsorption des protéines du plasma. Il en est de même pour le fibrinogène [Elwing, *et al.* 1989, Fangyan, *et al.* 1998, Hemmersam, *et al.* 2005].
- La BSA est décrite comme une protéine ayant une très forte affinité pour les surfaces d'acier inoxydable [Cosman, *et al.* 2005].
- Bien que la méthode isotopique puisse être mise en œuvre en utilisant une salissure complexe, l'interprétation des données est plus délicate en raison des interférences possibles entre les divers constituants de la salissure (lipides, glucides, ions...).

## IV. CONCLUSIONS

Trois méthodologies sont disponibles pour évaluer l'efficacité du nettoyage à travers les performances des formulations. Ces trois méthodologies font appel à des techniques très différentes et leurs mises en œuvre nécessitent d'adapter la salissure non seulement à la sensibilité, mais également à la spécificité de la technique.

Une classification des performances de 5 formulations a été établie par chacune de ces méthodologies. L'XPS et la méthode isotopique proposent un classement identique, qui diffère légèrement de celui obtenu par le PND, très certainement en raison de la nature extrêmement lipidique de la salissure utilisée pour cette méthode. De plus, le dosage des protéines nécessite leur élution préalable et son rendement n'est jamais de 100%.

Ainsi, le Pouvoir Nettoyant Dégraissant (PND) permet une évaluation macroscopique de la performance des formulations par un dosage colorimétrique des protéines. Bien que la salissure soit extrêmement lipidique, le PND est adapté au screening des formulations les plus intéressantes.

Les formulations ainsi sélectionnées par le PND pourront par la suite être analysées par la méthode isotopique afin de s'assurer de leur efficacité vis-à-vis d'une salissure protéique. Enfin, l'XPS permettra de contrôler la compatibilité chimique et la rinçabilité des formulations vis-à-vis du matériau et de valider leurs performances sur une salissure lipido-glucido-protéique plus représentative. Nous aurons également recours à cette technique pour étudier le mode d'action des enzymes et des principes actifs antimicrobiens en rapport à la surface.

L'XPS est une technique extrêmement informative, néanmoins elle reste délicate à mettre en œuvre. Le dispositif expérimental requiert une enceinte sous ultra haut vide et le transfert des échantillons jusqu'à la chambre d'analyse rallonge considérablement le temps requis pour leur analyse. Ainsi, nous aurons plus facilement recours à la méthode isotopique pour la sélection des formulations ou des procédés de nettoyage. Bien que la méthode isotopique soit contraignante en raison de la manipulation d'éléments radioactifs, c'est une méthode rapide nous permettant de traiter un nombre important d'échantillons en un minimum de temps.

## V. REFERENCES

- ALFA, M.J., DEGAGNE, P. and OLSON, N.** (1999). Worst-case soiling levels for patient-used flexible endoscopes before and after cleaning. *American Journal of Infection Control*. **27**: 392-401
- ALFA, M.J. and NEMES, R.** (2004). Manual versus automated methods for cleaning reusable accessory devices used for minimally invasive surgical procedures. *Journal of Hospital Infection*. **58**: 50-8
- ARNEBRANT, T., BÄCKSTRÖM, K., JÖNSSON, B. and NYLANDER, T.** (1989). An ellipsometry study of ionic surfactant adsorption on chromium surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science*. **128**: 303-312
- BALASUBRAMANIAN, V., GRUSIN, N., BUCHER, R., TUITTO, V. and SLACK, S.** (1999). Residence-time dependent changes in fibrinogen adsorbed to polymeric biomaterials. *Journal of Biomedical and Material Research*. **44**: 253-260
- BLOSS, R. and KAMPF, G.** (2004). Test models to determine cleaning efficacy with different types of bioburden and its clinical correlation. *Journal of Hospital Infection*. **56 Suppl 2**: S44-8
- BOYD, R.D., COLE, D., ROWE, D., VERRAN, J., PAUL, A.J. and WEST, R.H.** (2001). Cleanability of soiled stainless steel as studied by atomic force microscopy and time of flight secondary ion mass spectrometry. *J Food Prot*. **64**: 87-93
- CHARTIER, V., VERJAT, D., FARGEOT, C. and DARBORD, J.C.** (2001). Experimental results of detergent and pre-disinfection treatments before sterilisation of medical devices. *Zentral Sterilisation*. **9**: 104-107
- CHEN, Y., ZHANG, X., GONG, Y., ZHAO, N., ZENG, T. and SONG, X.** (1999). Conformational changes of fibrinogen adsorption onto hydroxyapatite and titanium oxide nanoparticles. *Journal of Colloid and Interface Science*. **214**: 38-45
- CLOIX, J.F., BADER, C.A., MONET, J.D. and FUNCK-BRENTANO, J.L.** (1975). [Radiolabeling (125I) with high specific activity of the 1-34 N-terminal derivative of bovine parathormone without loss of biological activity]. *Pathologie Biologie*. **23**: 827-31
- COSMAN, N.P., FATIH, K. and ROSCOE, S.G.** (2005). Electrochemical impedance spectroscopy study of the adsorption behaviour of  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -casein at stainless steel. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. **574**: 261-271
- DE BRUIJN, A.C.P., ORZECZOWSKI, T.J.H. and WASSENAAR, C.** (2001). Validation of the Ninhydrin swab test to monitor cleaning of medical instruments. *Zentral Sterilisation*. **9**: 235-247
- DH** Assessing the risk of vCJD transmission via surgery: an intermediate review (2005) Department of Health, London

- DRAGHICI, A., GAUER, J., MICHELS, W. and ROTH, K.** (2005). Etudes sur les performances du nettoyage selon la norme prEN/ISO 15883-1. *Zentral Sterilisation*. **13**: 59-64
- DUFRENE, Y.F., BOONAERT, C.J.-P. and ROUXHET, P.G.** (1996). Adhesion of *Azospirillum brasilense*: role of proteins at the cell-support interface. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. **7**: 113-128
- ELWING, H., ASKENDAL, A. and LUNDSTRÖM, I.** (1989). Desorption of fibrinogen and beta-globulin from solid surfaces induced by a nonionic detergent. *Journal of Colloid and Interface Science*. **128**: 296-300
- ELWING, H. and GOLANDER, C.G.** (1990). Protein and detergent interaction phenomena on solid surfaces with gradients in chemical composition. *Advanced in Colloidal and Interface Science*. **32**: 317-339
- FANGYAN, L., MEIYING, Z. and FENG, Z.** (1998). 125I labelling of human serum albumin and fibrinogen and a study of protein adsorption on the surface of titanium oxide film. *Applied Radiation and Isotopes*. **49**: 67-72
- FENGLER, T.W., PAHLKE, H., BISSON, S. and KRAAS, E.** (2000). The clinical suitability of laparoscopic instrumentation. A prospective clinical study of function and hygiene. *Surgical Endoscopy*. **14**: 388-94
- FRATEUR, I., LARTUNDO-ROJAS, L., METHIVIER, C., GALTAYRIZS, A. and MARCUS, P.** (2006). Influence of bovine serum albumin in sulphuric acid aqueous solution on the corrosion and the passivation of an iron-chromium alloy. *Electrochimica Acta*. **51**: 1550-1557
- GAUTIER, C., LABADIE, J.-C., BOULESTREAU, H. and GACHIE, J.-P.** (2003). Evaluation de l'activité des détergents au sein d'un protocole de désinfection des endoscopes souples non autoclavables. *Techniques Hospitalières*. **679**: 41-45
- GERIN, P.A., DENGIS, P.B. and ROUXHET, P.G.** (1995). Performance of XPS analysis of model biochemical compounds. *Journal de Chimie Physique*. **92**: 1043-1065
- GREEN, R.J., SU, T.J. and LU, J.R.** (2001). The displacement of preadsorbed protein with a cationic surfactant at the hydrophilic SiO<sub>2</sub>-water interface. *Journal of Physical Chemistry B*. **105**: 9331-9338
- HEEG, P.** (2004). Reprocessing endoscopes: national recommendations with a special emphasis on cleaning--the German perspective. *Journal of Hospital Infection*. **56 Suppl 2**: S23-6
- HEMMERSAM, A.G., FOSS, M., CHEVALLIER, J. and BESENBACHER, F.** (2005). Adsorption of fibrinogen on tantalum oxide, titanium oxide and gold studied by the QCM-D technique. *Colloid and Surfaces B: Biointerfaces*. **43**: 208-215
- LEBUGLE, A., SUBIRADE, M. and GUEGUEN, J.** (1995). Structural characteristics of a globular protein investigated by X-ray photoelectron spectroscopy: comparison between a legumin film and a powdered legumin. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1248**: 107-114
- LHOEST, J.-B., DETRAIT, E., VAN DEN BOSCH DE AGUILAR, P. and BERTRAND, P.** (1998). Fibronectin adsorption, conformation, and orientation on polystyrene substrates studied by radiolabeling, XPS and ToF-SIMS. *Journal of Biomedical and Materials Research*. **41**: 95-103
- LHOEST, J.-B., WAGNER, M., TIDWELL, C. and CASTNER, D.** (2001). Characterization of adsorbed protein films by ToF-SIMS. *Journal of Biomedical and Material Research*. **57**: 432-440
- LIPSCOMB, I.P., SIHOTA, A.K., BOTHAL, K.L., HARRIS, K.L. and KEEVIL, C.W.** (2006). Rapid method for the sensitive detection of protein contamination on surgical instruments. *Journal of Hospital Infection*. **62**: 141-148
- MACKCOW, J.A. and PAULY, D.V.** (1998). Determination of the efficacy of cleaning methods in the processing of reusable medical devices. *Biomedical Instrumentation and Technology*. **37**: 436

- MARTINY, H., FLOSS, H. and ZUHLSDORF, B.** (2004). The importance of cleaning for the overall results of processing endoscopes. *Journal of Hospital Infection*. **56 Suppl 2**: S16-22
- MCDONNELL, G. and BURKE, P.** (2003). The challenge of prion decontamination. *Clinical infectious diseases*. **36**: 1152-1154
- MERRITT, K., HITCHINS, V.M. and BROWN, S.A.** (2000). Safety and cleaning of medical materials and devices. *Journal of Biomedical Materials Research*. **53**: 131-136
- MILLER, D.M., YOUKHANA, I., KARUNARATNE, W.U. and PEARCE, A.** (2001). Presence of protein deposits on "cleaned" re-usable anaesthetic equipment. *Anaesthesia*. **56**: 1069-1072
- MOULTON, S.E., BARISCI, J.N., BATH, A., STELLA, R. and WALLACE, G.G.** (2003). Investigation of protein adsorption and electrochemical behavior at a gold electrode. *Journal of Colloid and Interface Science*. **261**: 312-319
- MURRAY, B.S. and DESHAIRES, C.** (2000). Monitoring protein fouling of metal surface via a quartz crystal microbalance. *Journal of Colloid and Interface Science*. **227**: 32-41
- NORDE, W.** (1986). Adsorption of proteins from solution at the solid-liquid interface. *Advanced in Colloidal and Interface Science*. **25**: 267-340
- NORDE, W. and LYKLEMA, J.** (1991). Why proteins prefer interfaces. *Journal of Biomaterials Science Polymer Edition*. **2**: 183-202
- NORDE, W.** (1995). Adsorption of proteins at solid-liquid interfaces. *Cells and Materials*. **5**: 97-112
- PAJKOS, A., VICKERY, K. and COSSART, Y.** (2004). Is biofilm accumulation on endoscope tubing a contributor to the failure of cleaning and decontamination. *Journal of Hospital Infection*. **58**: 224-229
- PETERSON, L.L. and MACKCOW, J.A.** (1997). A cleaning effectiveness study of reusable medical devices. *Biomedical Instrumentation and Technology*. **31**: 332
- PINEAU, L., DUESBUQUOIS, C., LUU-DUC, D. and MARCHETTI, B.** (2002). Détergence appliquée au traitement des endoscopes: importance et méthode d'évaluation. *Hygiènes*. **10**: 425-429
- RATNER, B.D., CASTNER, D.G., HORBETT, T.A., LENK, T.J., LEWIS, K. and RAPOZA, R.J.** (1990). Biomolecules and surfaces. *Journal of Vacuum and Science Technology A*. **8**: 2326-2316
- ROUXHET, P.G., MOZES, N., DENGIS, P.B., DUFRÊNE, Y.F., GERIN, P.A. and GENET, M.J.** (1994). Application of X-ray photoelectron spectroscopy to microorganisms. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. **2**:
- RUTALA, W.A. and WEBER, D.J.** (2004). Reprocessing endoscopes: United States perspective. *Journal of Hospital Infection*. **56 Suppl 2**: S27-39
- TAKASHINA, M.** (2001). Application of a bioluminescent method for checking cleaning results. *Zentral Sterilisation*. **9**: 248-258
- TERASHIMA, H. and TUSUJI, T.** (2002). Adsorption of bovine serum albumin onto mica surfaces studied by direct weighing technique. *Colloid and Surfaces B: Biointerfaces*. **27**: 115-122
- THIVEAUD, D.** (2004). Le nettoyage des dispositifs médicaux. *Hygiène en milieu hospitalier*. **68**: 21-30
- TIDWELL, C.D., CASTNER, D.G., GOLLEDGE, S.L., RATNER, B.D., MEYER, K., HAGENHOFF, B. and BENNINGHOVEN, A.** (2001). Static ToF-SIMS and XPS characterization of adsorbed albumin and fibronectin films. *Surface and Interface Analysis*. **31**: 724-733
- VANDENBERG, E. and KRULL, U.** (1991). The prevention of adsorption of interferents to radiolabelled protein by Tween 20. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. **22**: 269-277

- VERJAT, D., PROGNON, P. and DARBORD, J.C.** (1999). Fluorescence-assay on traces of protein on reusable medical devices: cleaning efficiency. *International Journal of Pharmaceutics*. **179**: 267-71
- VICKERY, K., PAJKOS, A. and COSSART, Y.** (2004). Removal of biofilm from endoscopes: evaluation of detergent efficiency. *American Journal of Infection Control*. **32**: 170-6
- VINNICHENKO, M., CHEVOLLEAU, T., PHAM, M.T., POPERENKO, L. and MAITZ, M.F.** (2002). Spectroellipsometric, AFM and XPS probing of stainless steel surfaces subjected to biological influences. *Applied Surface Science*. **201**: 41-50
- WAGNER, M., HORBETT, T. and CASTNER, D.** (2003). Characterization multicomponent adsorbed protein films using ESCA, ToF-SIMS, and radiolabeling: capabilities and limitations. *Biomaterials*. **24**: 1897-1908
- WAHLGREN, M.C. and ARNEBRANT, T.** (1991). Interaction of cetyltrimethylammonium bromide and sodium dodecyl sulfate with b-lactoglobulin and lysozyme at solid surface. *Journal of Colloid and Interface Science*. **142**: 503-511
- XIAO, S.J., TEXTOR, M., SPENCER, N.D., WIELAND, M., BKELLER, B. and SIGRIST, H.** (1997). Immobilization of cell-adhesive peptide Arg-Gly-Asp-Cys (RGDC) on titanium surfaces by covalent chemical attachment. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. **8**: 867-872
- YOU, H.X. and LOWE, C.R.** (1996). AFM studied of protein adsorption. *Journal of Colloid and Interface Science*. **182**: 586-601

## **SOMMAIRE DU CHAPITRE III**

# **EFFICACITE DU NETTOYAGE ET/OU DE LA DESINFECTION VIS-A-VIS DE LA PROTEINE PRION**

<b>I. INTRODUCTION.....</b>	<b>- 57 -</b>
<b>II. SELECTION DES PROCEDES PAR METHODE ISOTOPIQUE .....</b>	<b>- 59 -</b>
II.1. METHODOLOGIE .....	- 60 -
II.2. RESULTATS .....	- 63 -
II.2.1. Adsorption des protéines HSA- <sup>125</sup> I et HFN- <sup>125</sup> I.....	- 63 -
II.2.2. Concernant la phase de nettoyage.....	- 63 -
II.2.3. Concernant les procédés de nettoyage et de désinfection .....	- 65 -
II.3. DISCUSSION .....	- 69 -
<b>III. EVALUATION DES PROCEDES VIS-A-VIS DE SOUILLURE CONTENANT DE LA PROTEINE PRION.....</b>	<b>- 71 -</b>
III.1. DETECTION DIRECTE DE LA PRPRES SUR LAMELLES D'ACIER INOXYDABLE.....	- 71 -
III.1.1. Principe.....	- 71 -
III.1.2. Méthodologie .....	- 71 -
III.1.3. Résultats.....	- 72 -
III.1.4. Discussion .....	- 74 -
III.2. DETECTION INDIRECTE DE LA PRP ADSORBEE SUR FILS D'ACIER INOXYDABLE.....	- 75 -
III.2.1. Principe.....	- 75 -
III.2.2. Méthodologie .....	- 79 -
III.2.3. Résultats et discussion.....	- 81 -
III.2.4. Synthèse.....	- 93 -
<b>IV. CONCLUSIONS .....</b>	<b>- 93 -</b>
<b>V. REFERENCES .....</b>	<b>- 94 -</b>



## **CHAPITRE III**

# **EFFICACITE DU NETTOYAGE ET/OU DE LA DESINFECTION VIS-A-VIS DE LA PROTEINE PRION**

### **I. INTRODUCTION**

Sans vouloir rentrer dans les détails de l'étude bibliographique présentée dans le premier chapitre, il semble tout de même nécessaire de rappeler le contexte primordial de cette étude.

Certaines formes iatrogènes de maladie de Creutzfeldt-Jakob (MCJ) ont été rapportées suite à l'utilisation de procédés de nettoyage et de désinfection inappropriés vis-à-vis des agents transmissibles non conventionnels (ATNC). Ces agents sont en effet extrêmement résistants aux procédés de désinfection conventionnels qu'ils soient chimiques ou thermiques.

Différentes directives se sont succédées pour tenter de réduire les risques de transmission dans les établissements de santé. Les procédés de traitement efficaces actuellement, sont extrêmement drastiques pour les dispositifs médicaux (DM) [Brown, *et al.* 2005, McDonnell et Burke 2003]. Ils associent l'utilisation de solution d'hydroxyde de sodium (NaOH) 1M ou d'hypochlorite de sodium (NaClO) 2% pendant une heure à un autoclavage à 134°C pendant 18 minutes. Les autres procédés, notamment à base d'acide péracétique (APA) ont une efficacité considérée comme modérée [Darbord 2004, Lemmer, *et al.* 2004, Vadrot, *et al.* 2005, Verjat, *et al.* 1999].

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) recommande également de privilégier l'utilisation de matériel à usage unique au cours d'actes à risques. Cette recommandation n'est pourtant pas toujours la meilleure option. En effet, l'utilisation d'instruments à usage unique a été instaurée, en Grande-Bretagne, pour la pratique des amygdalectomies, afin de limiter les risques de transmission du vMCJ. L'utilisation de ces instruments a généré une augmentation des hémorragies post-opératoires de 1,7 à 7,8% chez l'enfant, par rapport à l'utilisation d'instruments réutilisables [Nix 2003].

De par la distribution périphérique de l'agent et la confirmation de la transmission secondaire du vMCJ par le sang, le développement de formulations ou procédés efficaces pour le traitement des DM apparaît donc comme une réelle nécessité. A l'évidence, ces nouveaux procédés devront tenir compte des exigences des DM thermosensibles.

La phase de nettoyage est probablement la plus importante étape du traitement des DM. Cependant, peu d'outils sont disponibles pour s'assurer de l'efficacité de tels produits ou de tels procédés vis-à-vis du risque prion et, par conséquent, l'efficacité ou l'inefficacité des produits commercialisés actuellement n'est pas clairement établie [McDonnell et Burke 2003]. Par exemple, la PrPsc est résistante à la dégradation enzymatique, mais la présence d'enzymes dans les produits de nettoyage améliore leurs performances [Merritt, *et al.* 2000]. A l'inverse, des effets d'antagonismes peuvent se produire comme dans le cas des aldéhydes [Kampf, *et al.* 2004, Merritt, *et al.* 2000, Taylor D. M. 1995, Verjat, *et al.* 1999]. Toutefois, il est actuellement admis que les agents désinfectants ayant la propriété de fixer les

protéines doivent être exclus des procédés de traitements des DM. C'est le cas en particulier pour le formaldéhyde [Taylor D. M. 1995, Verjat, *et al.* 1999].

Bien qu'ils ne soient pas adaptés à l'évaluation du traitement des DM, de nombreux travaux concernant l'inactivation des prions ont vu le jour. Cependant, la multiplicité des conditions opératoires et des méthodologies employées rend leur synthèse extrêmement délicate. De plus, les publications de travaux contradictoires sont de plus en plus fréquentes et sont la conséquence de cette multiplicité. Il y a donc un réel besoin de cohérence méthodologique pour démontrer l'efficacité d'un procédé de nettoyage et/ou de désinfection vis-à-vis du risque prion.

Une méthodologie basée sur l'utilisation de fils d'acier inoxydable a été décrite pour modéliser la transmission iatrogène par l'utilisation d'électrodes contaminées [Flechsig, *et al.* 2001, Zobeley, *et al.* 1999]. Dans cette étude, les fils d'acier inoxydable ont été contaminés par trempage dans un homogénat de cerveau contenant de la PrPsc (souche RML). Après avoir été rincés, les fils ont été implantés dans le cerveau d'une souris saine, qui développa la maladie en 70 jours. La transmission de l'infection par les fils d'acier inoxydable est aussi efficace qu'une inoculation intracérébrale de 30 µl d'un homogénat de cerveau à 1% puisque les périodes d'incubation sont identiques pour les deux voies de transmission.

Pour se conformer aux conditions réelles d'une intervention chirurgicale, les fils d'acier inoxydable ont été contaminés, non pas par un homogénat, mais par insertion de ces fils directement dans le cerveau d'une souris malade. Une implantation de 5 minutes seulement est suffisante pour transmettre la maladie [Weissmann 2002]. De la même façon, l'insertion de fils contaminés dans le cerveau de souris saines pendant seulement 30 minutes est suffisante pour l'initier [Weissmann 2002]. Un temps de contact aussi court que 5 minutes a également été rapporté pour la souche 263K [Yan, *et al.* 2004]. Dans les deux cas, la période d'incubation est rallongée.

Ces travaux montrent la faculté des prions à s'adsorber sur les surfaces d'acier inoxydable. Il semblerait qu'il en soit de même pour l'or [Flechsig, *et al.* 2001] ou les matières plastiques telles que le polystyrène ou le polypropylène [Weissmann 2002].

A en juger par les travaux récents, l'utilisation des fils d'acier inoxydable couplés aux essais *in vivo* est extrêmement intéressante pour tester l'efficacité de produits ou procédés potentiellement efficaces sur les prions [Fichet, *et al.* 2004, Jackson, *et al.* 1999, Weissmann 2002, Yan, *et al.* 2004]. Il faut pourtant rester prudent vis-à-vis des données rendues disponibles par ce système d'étude. En effet, ayant recours à des essais *in vivo*, il faut tenir compte de la résistance des prions qui varie en fonction des souches. Des résistances relatives ont été décrites notamment par rapport à la digestion enzymatique [Somerville 2002] et à l'inactivation thermique [Taylor D. M. 2001, Taylor D. M., *et al.* 1997, Taylor D. M., *et al.* 1999]. Le titre infectieux de la souche utilisée doit également être pris en compte dans l'interprétation des données. En résumé, la démonstration de l'efficacité d'un produit ou d'un procédé sur une souche, ne signifie pas que ce produit est efficace sur la totalité des souches. Les travaux de Yan et Jackson sur l'efficacité de l'autoclave ou encore les travaux de Jackson et Fichet sur LpH en sont une illustration [Fichet, *et al.* 2004, Jackson, *et al.* 1999, Yan, *et al.* 2004].

Bien qu'ils soient fondamentaux pour la validation des procédés, les essais *in vivo* sont consommateurs de temps (dépendant de la période d'incubation pour la souche considérée), d'argent et d'animaux. Il est donc nécessaire de disposer d'une méthodologie *in vitro*, sur support, pour la sélection des produits ou procédés potentiellement intéressants vis-à-vis du risque prion. Dans ce contexte, et en admettant que la présence de protéine prion pathologique est corrélée à l'infectiosité, deux approches peuvent être envisagées.

La première approche consiste à détecter la protéine prion directement sur le support contaminé par une réaction immunologique avec un anticorps dirigé contre les protéines prion (PrPsc et PrPc). Un essai en chimiluminescence sur de l'homogénat adsorbé sur des fils d'acier inoxydable montre que la protéine

prion est effectivement adsorbée sur les fils [Flechsig, *et al.* 2001]. Cependant, le signal observé n'a pu être spécifiquement associé à la présence de PrPsc puisque l'anticorps utilisé n'est pas spécifique d'une isoforme. Cependant, il est possible d'assurer une meilleure spécificité de la réaction immunologique en contaminant le support avec de la PrPres.

La seconde approche consiste à détecter la protéine prion résiduelle par une technique de Western-blot. Ceci nécessite une élution de la protéine prion à partir du support [Fichet, *et al.* 2004, Lemmer, *et al.* 2004]

Parallèlement à ces deux approches, la recherche de la protéine prion peut être effectuée à partir des effluents du nettoyage [Lemmer, *et al.* 2004].

Le but de cette étude est de proposer un procédé dont l'efficacité est définie par sa capacité à éliminer la protéine prion du support. L'inactivation du prion n'est pas l'objectif recherché en première intention. Les étapes de nettoyage seront complétées par l'étape de désinfection, applicable aux DM thermosensibles, afin de juger de l'efficacité du procédé dans sa globalité. Ce procédé devra d'autre part respecter la chimie des matériaux.

Le terme « procédé » est défini, dans ce travail, comme étant l'utilisation successive de formulations, chaque utilisation étant séparée de la précédente par un rinçage à l'eau.

Dans un premier temps, les formulations ou procédés permettant de réduire significativement la quantité de protéines adsorbées sur des surfaces d'acier inoxydable seront sélectionnés par méthode isotopique à l'iode 125. Nous avons effectivement montré, dans le chapitre précédent, l'utilité de cette méthode pour évaluer quantitativement l'efficacité des formulations vis-à-vis de protéines adsorbées. La sélection sera réalisée indépendamment sur deux solutions de protéines humaines : la sérum albumine (HSA) et le fibrinogène (HFN).

Dans un deuxième temps, les formulations et/ou procédés seront testés vis-à-vis de la PrPres avec une détection des protéines résiduelles directement sur le support.

Enfin, les formulations et/ou procédés qui auront été retenus par les méthodes précédentes seront évalués sur fils d'acier inoxydable vis-à-vis de la protéine prion. Quatre souches animales de prions et deux types de protéine prion humaine seront étudiés. Trois types de salissure seront également testés afin d'appréhender l'incidence de l'environnement des prions sur l'efficacité du nettoyage.

## **II. SELECTION DES PROCEDES PAR METHODE ISOTOPIQUE**

Le traitement des DM requière 5 étapes : le prétraitement, le nettoyage, le rinçage intermédiaire, la désinfection et le rinçage final. Dans cette étude, nous focaliserons notre attention sur la phase de nettoyage puis sur la phase de désinfection. Nous ne prendrons pas en compte l'étape de prétraitement.

La méthode isotopique, présentée dans le second chapitre, est mise en œuvre pour l'évaluation de l'efficacité de formulations et de procédés vis-à-vis de protéines adsorbées. L'intérêt d'utiliser cette méthode réside dans le fait de pouvoir évaluer l'efficacité du procédé à chacune de ces étapes.

Les formulations et procédés sont testés indépendamment vis-à-vis de deux protéines d'origine humaine dont les propriétés physico-chimiques sont différentes. Il s'agit de l'HSA et l'HFN. Le choix de ces protéines est motivé à la fois par leur origine humaine et plasmatique. Dans le chapitre précédent, la méthode isotopique a été mise en œuvre sur de la sérum albumine d'origine bovine. Bien que l'homologie de séquence entre la forme humaine et bovine de l'albumine soit de 76% [Gelamo, *et al.* 2002], il paraît plus judicieux d'évaluer la désorption des protéines d'origine humaine lorsqu'il s'agit de sélectionner les

procédés potentiellement applicables dans le domaine de la santé humaine. De plus, il semble que l'HSA et la BSA s'adsorbent différemment sur les surfaces métalliques [Kurrat, *et al.* 1997]. L'origine plasmatique de ces protéines est également un critère de choix face aux problèmes de santé publique. L'HSA est la protéine la plus abondante du plasma. Elle représente 60% des protéines plasmatiques totales et de ce fait, son adsorption est couramment étudiée. Il s'agit d'une protéine globulaire de 66 kDa, dont la structure secondaire est à 67%  $\alpha$ -hélicoïdal et ne contient aucune structure en feuillet  $\beta$ -plissé. Quant à l'HFN, elle représente 2 à 3% des protéines plasmatiques, elle est souvent utilisée dans les études concernant la biocompatibilité des implants. Il s'agit d'une protéine de 340 kDa constituée de trois chaînes polypeptidiques A $\alpha$ , B $\beta$  et  $\gamma$ . Du fait de sa structure secondaire, estimée par dichroïsme circulaire à 35,4% d'hélices  $\alpha$ , 20,8% de feuillets  $\beta$ , 12,8% de  $\beta$  turn et 31% de random coil [Chen, *et al.* 1999, Lin, *et al.* 2004], le fibrinogène est un modèle différent de l'HSA et donc complémentaire.

## II.1.Méthodologie

Les protéines HSA et HFN, ont été marquées à l'iode 125 ( $I^{125}$ ) par la méthode à la chloramine T, selon le principe présenté dans le chapitre II.

Les protéines sont adsorbées sur les substrats en acier inoxydable AISI 304 à partir de solutions aqueuses à 1 mg/ml pendant une heure sous agitation à température ambiante. Après rinçage par dilutions successives à l'eau distillée, la radioactivité est mesurée à l'aide d'un compteur gamma.

Huit formulations, dont trois désinfectants, sont proposées pour l'évaluation du nettoyage puis de la désinfection vis-à-vis des protéines HSA et HFN adsorbées. Les caractéristiques générales de ces formulations sont présentées dans le tableau III-1.

Ces formulations seront testées :

- Seules ;
- Par combinaisons de deux formulations afin d'évaluer le double nettoyage ;
- Par combinaisons de trois formulations pour évaluer le double nettoyage et la désinfection.

Les combinaisons et les conditions d'essais sont présentées dans le tableau III-2.

La radioactivité, traduisant la quantité de protéines résiduelles sur le substrat, est mesurée après chaque rinçage en eau de réseau.

**Tableau III-1: Composition qualitative des formulations testées dans le cadre du nettoyage et/ou de la désinfection**

<b>Formulations</b>	<b>Famille de composés</b>	<b>Activité</b>	<b>pH</b>
<b>D2M</b>	Base (NaOH) Ammonium quaternaire Tensioactif amphotère	Nettoyant Pré-désinfectant	> 12
<b>Alcaline</b>	Base (NaOH) Tensioactif non ionique	Nettoyant	> 12
<b>Acide</b>	Tensioactif amphotère Tensioactif non ionique Biguanide Ammonium quaternaire Acide (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )	Nettoyant Pré-désinfectant	3
<b>Aniosyme N2</b>	Tensioactif amphotère Tensioactif non ionique Enzymes <i>Biguanide</i> * <i>Ammonium quaternaire</i>	Nettoyant	Neutre
<b>Aniosyme DD1</b>	Biguanide Ammonium quaternaire Tensioactif amphotère Tensioactif non ionique Enzymes	Nettoyant Pré-désinfectant	Neutre
<b>Anioxyde 1000</b>	Acide péracétique Tensioactif cationique	Désinfectant	# 5
<b>Anioxy Twin Cu</b>	Acide péracétique Tensioactif non ionique Tensioactif cationique	Désinfectant	# 4
<b>TH5</b>	Glutaraldéhyde Tensioactif cationique	Désinfectant	1,9 à 20% 3 à 2%

\* Le biguanide et l'ammonium quaternaire sont très faiblement représentés dans l'Aniosyme N2

**Tableau III-2 : Séquences et conditions d’essais des procédés de nettoyage et/ou de désinfection pour leur évaluation par la méthode isotopique à l’iode 125.**

1 <sup>ère</sup> Séquence			1 <sup>er</sup> Rinçage		2 <sup>nde</sup> Séquence			2 <sup>nd</sup> Rinçage		3 <sup>ème</sup> Séquence			3 <sup>ème</sup> Rinçage	
Formulations	Conc	Temps		Temps	Formulations	Conc	Temps		Temps	Formulations	Conc	Temps		Temps
D2M	0,5%	15 min	H <sub>2</sub> Or	5 min										
Alcaline	1%	30 min	H <sub>2</sub> Or	5 min										
Acide	0,5%	15 min	H <sub>2</sub> Or	5 min										
Aniosyme N2	0,5%	15 min	H <sub>2</sub> Or	5 min										
Aniosyme DD1	0,5%	15 min	H <sub>2</sub> Or	5 min										
Anioxyde 1000	*	30 min	H <sub>2</sub> Or	5 min										
Anioxy Twin Cu	2,4%	30 min	H <sub>2</sub> Or	5 min										
TH5	20%	60 min	H <sub>2</sub> Or	5 min										
Aniosyme N2	0,5%	10 min	H <sub>2</sub> Or	5 min	Aniosyme N2	0,5%	5 min	H <sub>2</sub> Or	5 min					
Aniosyme DD1	0,5%	10 min	H <sub>2</sub> Or	5 min	Aniosyme DD1	0,5%	5 min	H <sub>2</sub> Or	5 min					
Aniosyme N2	0,5%	10 min	H <sub>2</sub> Or	5 min	Aniosyme DD1	0,5%	5 min	H <sub>2</sub> Or	5 min					
Aniosyme N2	0,5%	10 min	H <sub>2</sub> Or	5 min	Aniosyme N2	0,5%	5 min	H <sub>2</sub> Or	5 min	Anioxyde 1000	*	30 min	H <sub>2</sub> Or	5 min
										Anioxy Twin Cu	2,4%	30 min	H <sub>2</sub> Or	5 min
										TH5	20%	60 min	H <sub>2</sub> Or	5 min
Aniosyme DD1	0,5%	10 min	H <sub>2</sub> Or	5 min	Aniosyme DD1	0,5%	5 min	H <sub>2</sub> Or	5 min	Anioxyde 1000	*	30 min	H <sub>2</sub> Or	5 min
										Anioxy Twin Cu	2,4%	30 min	H <sub>2</sub> Or	5 min
										TH5	20%	60 min	H <sub>2</sub> Or	5 min
Aniosyme N2	0,5%		H <sub>2</sub> Or	5 min	Aniosyme DD1	0,5%	5 min	H <sub>2</sub> Or	5 min	Anioxyde 1000	*	30 min	H <sub>2</sub> Or	5 min
										Anioxy Twin Cu	2,4%	30 min	H <sub>2</sub> Or	5 min
										TH5	20%	60 min	H <sub>2</sub> Or	5 min

\* Formulation prête à l’emploi

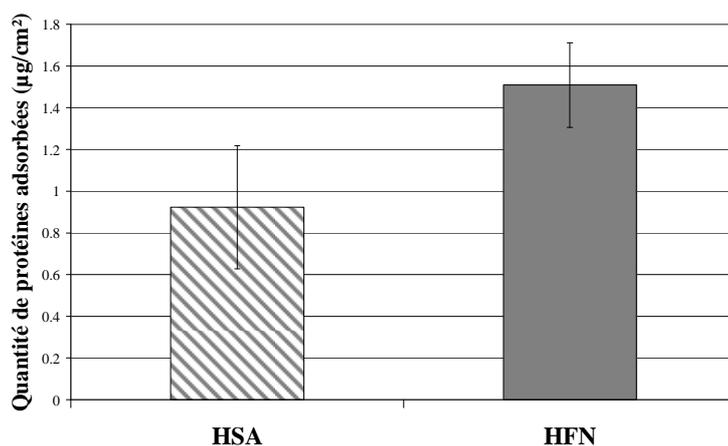
NB : Les fonds violets qualifient les formulations employées pour la phase de nettoyage et les fonds bleus pour la phase de désinfection

Le procédé de nettoyage consiste en une 1<sup>ère</sup> séquence, un 1<sup>er</sup> rinçage à l’eau du réseau (H<sub>2</sub>Or) suivie d’une 2<sup>nde</sup> séquence et d’un 2<sup>nd</sup> rinçage en H<sub>2</sub>Or. Il est classique d’utiliser un nettoyant/pré-désinfectant actif sur les agents transmissibles conventionnels (ATC) pour la 2<sup>nde</sup> séquence. La 3<sup>ème</sup> séquence est l’étape de désinfection visant une désinfection des ATC et une inactivation partielle des ATNC.

## II.2. Résultats

### II.2.1. Adsorption des protéines HSA-<sup>125</sup>I et HFN-<sup>125</sup>I

Les quantités d'HSA-<sup>125</sup>I et d'HFN-<sup>125</sup>I adsorbées sur les substrats d'AISI 304 à partir de solution à 1 mg/ml sont respectivement de  $0,92 \pm 0,29 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  et de  $1,51 \pm 0,20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ . Les quantités adsorbées sont relativement hétérogènes.



**Figure III-1** : Quantités d'HSA et d'HFN adsorbées sur substrats d'AISI 304 déterminées par méthode isotopique à l'iode 125 (moyenne ± écart type avec n = 24)

Pour s'affranchir de cette hétérogénéité, les résultats ultérieurement obtenus seront exprimés en pourcentage de performance et traduiront donc le pourcentage de protéines éliminé du substrat lors du nettoyage.

$$\% \text{ de performance} = \frac{\text{cpm (avant nettoyage)} - \text{cpm (après nettoyage)}}{\text{cpm (avant nettoyage)}} \times 100$$

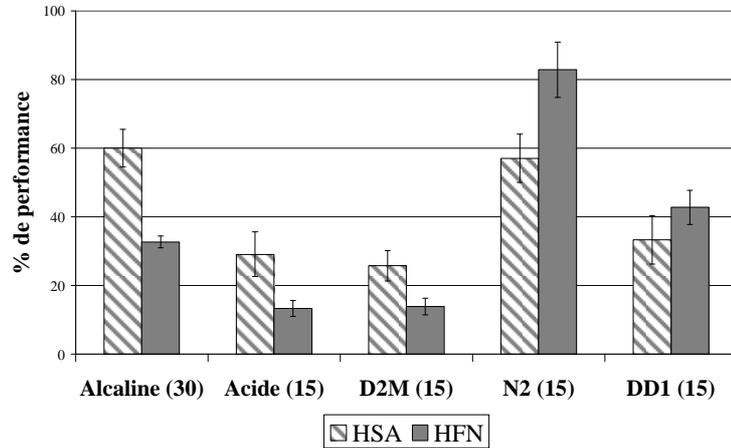
Chaque substrat sera traité de façon indépendante pour déterminer le pourcentage de performance de la formulation à chaque étape du nettoyage. Les moyennes et les écart-types seront calculés à partir des pourcentages de performance et non pas à partir de la quantité de protéines résiduelles. Les données obtenues sur les protéines HSA et HFN pourront ainsi être comparées.

### II.2.2. Concernant la phase de nettoyage

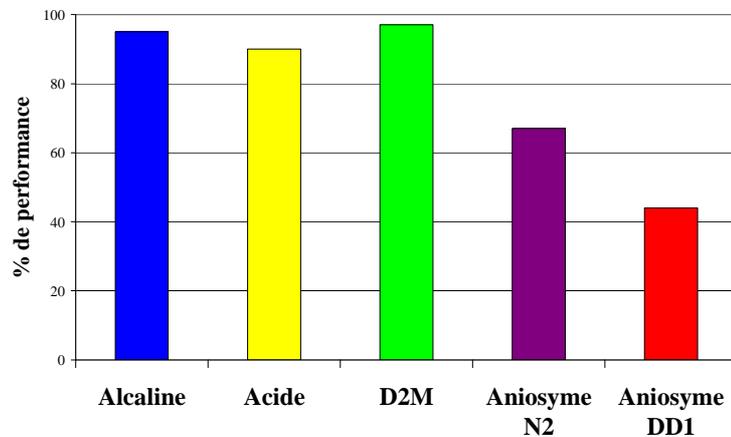
Dans un premier temps, les formulations alcaline, acide, D2M, Aniosyme N2 et DD1 ont été évaluées seules sur une durée de 15 minutes, à l'exception de la formulation alcaline testée sur 30 min (figure III-2). Les PND (Pouvoir Nettoyant Dégraissant) obtenus pour ces formulations sont présentés sur la figure III-3 pour comparaison.

Les 5 formulations testées ne présentent pas les mêmes performances vis-à-vis de l'HSA-<sup>125</sup>I et de l'HFN-<sup>125</sup>I. Globalement, les formulations alcaline, acide et D2M sont plus performantes sur l'HSA-<sup>125</sup>I comparativement à l'HFN-<sup>125</sup>I. Le cas inverse est observé pour les Aniosyme N2 et DD1 qui montrent

une meilleure efficacité sur l'HFN-<sup>125</sup>I adsorbée. La formulation alcaline et l'Aniosyme N2 ont une efficacité comparable sur l'HSA-<sup>125</sup>I adsorbée. En revanche, l'Aniosyme N2 présente une efficacité supérieure à la formulation alcaline vis-à-vis de l'HFN-<sup>125</sup>I. Il en est de même pour l'Aniosyme DD1, mais à moindre mesure. Les formulations acide et D2M sont globalement peu efficaces sur les protéines adsorbées.



**Figure III-2 :** Performances des formulations vis-à-vis des protéines HSA-<sup>125</sup>I et HFN-<sup>125</sup>I adsorbées sur des substrats d'AISI 304. La durée du nettoyage est indiquée entre parenthèse.



**Figure III-3 :** PND des formulations alcaline, acide, D2M, Aniosyme N2 et DD1 obtenus sur des substrats d'AISI 304 souillés par la salissure CP+20%MG.

Il est intéressant de comparer les résultats de la méthode isotopique sur les protéines adsorbées à ceux obtenus par le calcul du PND sur de la cervelle de porc enrichie à 20% de matières grasses (CP+20%MG). En effet, les PND réalisés sur les formulations alcaline, acide et D2M suggèrent une excellente activité détergente de ces formulations contrairement à ce qui est observé par la méthode isotopique. Il semble donc que les pH extrêmes, alcalin ou acide, ne présentent pas d'activité nettoyante performante sur les salissures de nature exclusivement protéique.

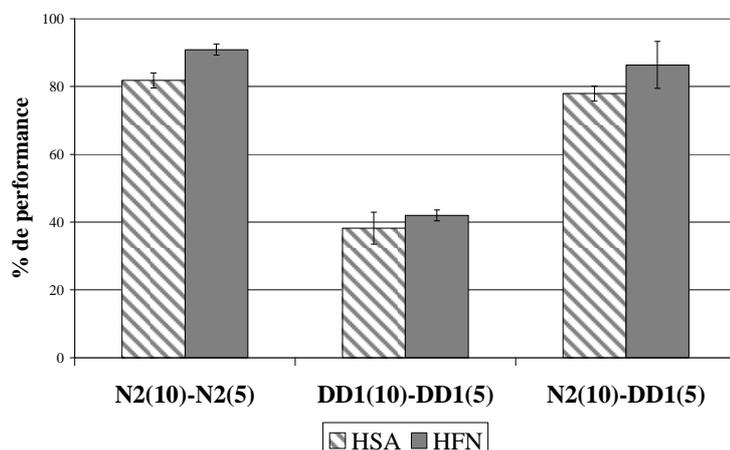
Les formulations Aniosyme N2 et DD1 sont des formulations présentant un bon compromis d'efficacité et de pH. Leur pH neutre permet une application sur les DM thermosensibles et leur efficacité vis-à-vis des protéines est particulièrement intéressante vis-à-vis du risque prion.

Ces deux formulations sont retenues et à présent évaluées dans le cadre du double nettoyage, selon les recommandations de la circulaire 138.

Trois combinaisons sont envisagées :

- Un double nettoyage par l'Aniosyme N2 ;
- Un double nettoyage par l'Aniosyme DD1 ;
- Un double nettoyage avec l'Aniosyme N2 en première intention puis l'Aniosyme DD1 en seconde intention.

Les résultats sont présentés pour chaque combinaison sur la figure III-4 et montrent que lorsque l'Aniosyme N2 est utilisée en première intention dans le double nettoyage, au minimum 75% des protéines adsorbées sont éliminées de la surface du substrat et ceci, indépendamment de la formulation utilisée en seconde intention.



**Figure III-4 : Performances des Aniosyme N2 et DD1 pour le double nettoyage des substrats d'AISI 304 vis-à-vis des protéines HSA-<sup>125</sup>I et HFN-<sup>125</sup>I adsorbées.**

On peut également constater que le double nettoyage par l'Aniosyme N2 (figure III-4) est plus efficace que le simple nettoyage de 15 minutes (figure III-2) par la même formulation, notamment vis-à-vis de l'HSA-<sup>125</sup>I. Cette remarque ne s'applique pas à l'Aniosyme DD1 pour laquelle les différences entre le simple et le double nettoyage sont minimes.

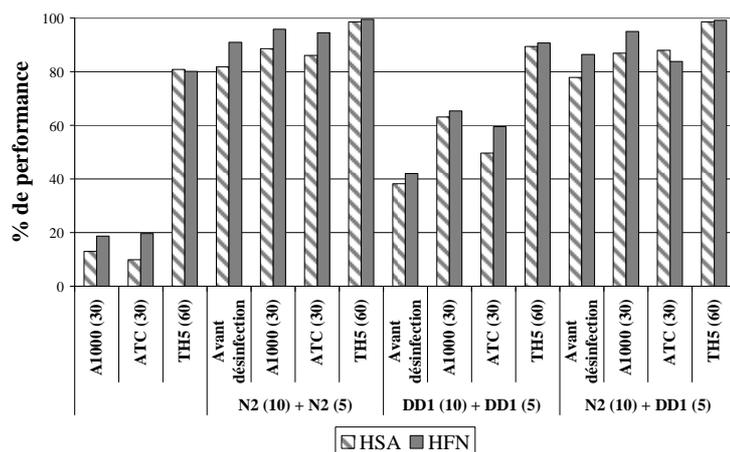
Enfin, le double nettoyage semble atténuer les différences d'efficacité observées vis-à-vis de chaque protéine. En effet, les pourcentages de performances vis-à-vis de l'HSA-<sup>125</sup>I et de l'HFN-<sup>125</sup>I sont comparables.

### II.2.3. Concernant les procédés de nettoyage et de désinfection

Le double nettoyage étant le pré-requis à la désinfection pour le traitement des DM, il nous paraît intéressant d'évaluer le procédé dans sa globalité.

La désinfection est précédée du double nettoyage pour chacune des trois séquences d'Aniosymes N2 et DD1 évaluées précédemment. Globalement, les résultats montrent une légère augmentation des performances de ces procédés par rapport au seul double nettoyage (figure III-5). Nous avons cherché à

étudier, dans un deuxième temps, l'effet isolé des trois désinfectants sans nettoyage préalable. Les résultats sont représentés par les trois premiers doublets du diagramme bâtons de la figure III-5. A part le TH5, permettant d'éliminer 80% des protéines adsorbées en 60 minutes, l'Anioxyde 1000 (A1000) et l'Anioxy Twin Cu (ATC) ne montrent aucune activité détergente en 30 minutes. Ainsi, nous pouvons conclure que la légère augmentation des performances constatée, lorsque la désinfection est associée au double nettoyage, est essentiellement due à l'introduction d'un rinçage supplémentaire dans le procédé. Ces résultats confirment donc que le nettoyage est une étape essentielle dans le traitement des DM et qu'elle est indispensable avant toute désinfection.



**Figure III-5 : Performances des procédés de nettoyage et de désinfection vis-à-vis des protéines HSA-<sup>125</sup>I et HFN-<sup>125</sup>I adsorbées sur substrats d'AISI 304.**

### Cas particulier de TH5

Comme nous avons pu le constater, la formulation TH5, évaluée sur les protéines adsorbées, montre une activité détergente particulièrement élevée. Ce résultat, tout à fait inattendu, mérite notre attention. En effet, TH5 est une formulation désinfectante à base de glutaraldéhyde, un fixateur des protéines. La dose d'emploi de ce désinfectant est, en temps normal, de 2%. La dose d'emploi dans notre étude est de 20%. Nous pensions augmenter le pouvoir fixateur du glutaraldéhyde en augmentant la concentration de la formulation d'un facteur 10. Cependant, c'est le phénomène inverse qui s'est produit : l'augmentation de la dose d'emploi de TH5 augmente significativement l'activité détergente de ce produit contenant pourtant du glutaraldéhyde.

Afin d'essayer de comprendre ce phénomène, nous avons procédé à une étude de la composition du TH5. Celui-ci est essentiellement composé de glutaraldéhyde, d'un ammonium quaternaire aromatique et d'acide phosphorique  $H_3PO_4$ . Nous avons déterminé l'activité détergente, toujours par méthode isotopique, de chaque composant de la formulation, seul ou en association, pour des doses d'emploi de 2% et de 20%.

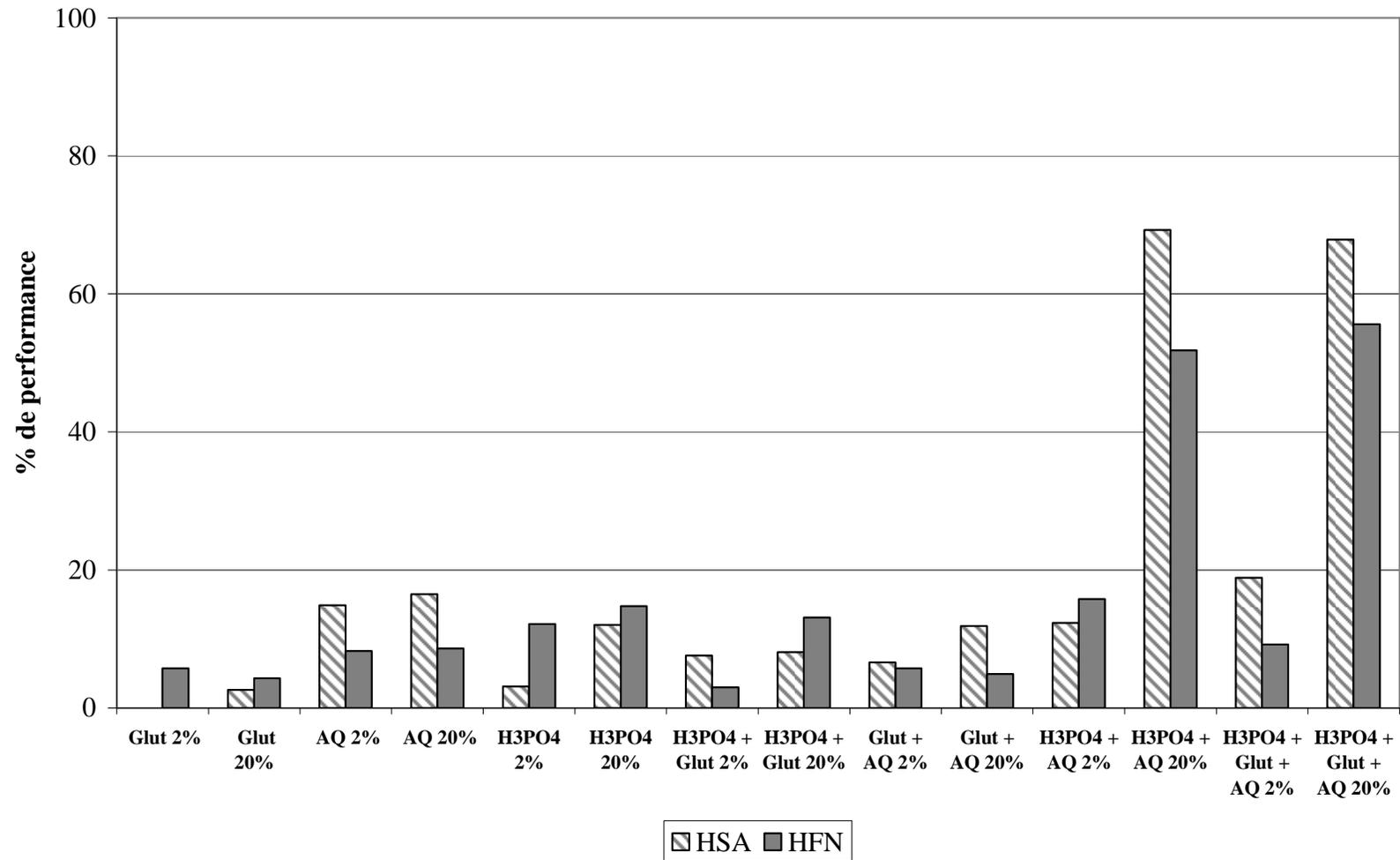
Les résultats, présentés sur la figure III-6, montrent clairement que le glutaraldéhyde (glut) utilisé seul ne présente aucune activité détergente à 2 ou à 20%. Il en est de même pour l'ammonium quaternaire (AQ) et pour l'acide phosphorique ( $H_3PO_4$ ).

L'association du glutaraldéhyde avec soit l'acide phosphorique, soit l'ammonium quaternaire n'améliore pas l'activité détergente pour les deux concentrations testées. En revanche, l'association de l'acide phosphorique et de l'ammonium quaternaire inefficace à 2% montre une performance similaire à celle obtenue par TH5 ( $H_3PO_4$  + Glut + AQ) lorsqu'elle est testée à 20%. C'est donc l'action combinée d'un

ammonium quaternaire et d'un pH fortement acide qui est responsable de l'activité détergente de TH5 vis-à-vis des protéines adsorbées et ceci indépendamment de la présence d'un fixateur des protéines.

La formulation TH5 à sa dose d'emploi de 2% ne présente donc pas d'activité détergente supérieure aux deux autres formulations désinfectantes testées.

Ces données, bien qu'anecdotiques, soulignent la complexité de la chimie de formulation, qui relève constamment de compromis entre les effets synergiques et/ou antagonistes des molécules entrant dans la composition des formulations.



**Figure III-6 :** Performances des composants, seuls ou associés, de la formulation TH5 vis-à-vis des protéines HSA-<sup>125</sup>I et HFN-<sup>125</sup>I sur substrats d'AISI 304

### II.3. Discussion

Cette première évaluation des performances par la méthode isotopique a permis de mettre en évidence la part de chaque étape dans le traitement des DM. En particulier, la pertinence du double nettoyage, recommandé dans la circulaire 138 du 14 mars 2001, a pu être observée notamment lors de l'utilisation de l'Aniosyme N2 en première intention. Nos résultats montrent également que la phase de désinfection ne participe pas à l'optimisation des procédés de nettoyage testés vis-à-vis des protéines adsorbées.

Les salissures utilisées pour la méthode isotopique sont de nature exclusivement protéique. Ayant mis en évidence, dans le chapitre précédent, une incidence de la nature de la salissure sur l'efficacité des formulations, nous avons comparé les résultats obtenus en 15 minutes par la méthode isotopique à ceux obtenus par le calcul du PND sur la salissure CP+20%MG. Les méthodologies utilisées sont certes différentes, mais les résultats sont extrêmement divergents lorsque l'on compare l'efficacité d'une formulation sur des salissures de nature différente. La présence de lipides semble considérablement influencer l'efficacité du nettoyage et ceux-ci, indépendamment du pH de la solution de nettoyage. La saponification des lipides en milieu alcalin participe sans aucun doute à l'optimisation du nettoyage, cependant, un pH très acide favorise également l'élimination des salissures lipidiques. En revanche, ces pH extrêmes ne présentent que peu d'efficacité sur les salissures protéiques.

Quant aux formulations de pH neutre, elles présentent des efficacités satisfaisantes quelque soit la nature de la salissure et de la méthode utilisée.

Lorsque l'on compare l'effet d'une même formulation vis-à-vis soit de l'HSA soit de l'HFN, on peut observer une légère différence d'efficacité. D'une manière générale, les formulations présentant des pH extrêmes sont plus performantes sur l'HSA que sur l'HFN, notamment la formulation alcaline. A l'inverse, les formulations à pH neutre, et en particulier l'Aniosyme N2, sont plus efficaces sur l'HFN.

Ces observations sont difficiles à expliquer en raison des différences importantes de poids moléculaires, et de structures de ces deux protéines. On peut néanmoins supposer que le nettoyage par des formulations de pH extrême provoque la dénaturation des protéines [Durchschlag, *et al.* 2000]. L'HSA étant de plus faible masse moléculaire que l'HFN, sa dénaturation doit être plus rapide. Sa désorption pourrait être partiellement favorisée par l'augmentation des forces de répulsion électrostatiques. En effet, à des pH très acides ou très basiques, des charges de même signe sont vraisemblablement portées à la fois par la protéine et par la surface. Ceci est présentement le cas puisque les points isoélectriques (pI) des protéines et de la surface sont pratiquement identiques. Le pI de l'HSA est de 4,6, celui de l'HFN est compris entre 5,3 et 6,1 et celui de l'acier inoxydable est d'environ 4,5 [Boulangé-Petermann, *et al.* 1995, Karlsson, *et al.* 1996, Wahlgren et Arnebrant 1991].

Concernant les formulations à pH neutre, ce sont essentiellement les tensioactifs qui vont influencer la désorption plus ou moins importante des protéines. Suivant la nature du tensioactif, leur interaction avec les protéines peut conduire à des modifications conformationnelles des structures secondaires et/ou tertiaires de ces protéines. Les tensioactifs anioniques, les plus couramment étudiés, sont connus pour modifier fortement la structure des protéines [Durchschlag, *et al.* 2000]. Bien que les données soient plus rares, les tensioactifs non ioniques ou cationiques peuvent également se complexer avec les protéines mais il semble que les modifications conformationnelles engendrées soient moins déstructurantes [Gelamo, *et al.* 2002, Lanio, *et al.* 2002]. La structure de la protéine est également à prendre en considération dans leurs interactions avec ces molécules. Deux protéines présentant des homologies de séquences et de structures ne subissent pas les mêmes modifications structurales vis-à-vis d'un même tensioactif [Gelamo, *et al.* 2002]. Enfin, l'effet des tensioactifs sur les protéines adsorbées est également fonction des propriétés de la surface [Elwing et Golander 1990, Wahlgren et Arnebrant 1991]. Dans ce contexte, il nous paraît difficile d'expliquer clairement le mécanisme favorisant la désorption de l'HFN au détriment de l'HSA par les tensioactifs amphotères (et à moindre mesure les tensioactifs non ioniques) de l'Aniosyme N2.

La méthode isotopique, employée dans le cadre d'une présélection de procédés représente un très bon compromis méthodologique. En effet, les avantages de cette méthodologie sont :

- Le suivi des performances à chaque étape du procédé ;
- La sensibilité de la détection surfacique ;
- La détection spécifique des protéines ;
- La quantification des protéines résiduelles directement sur la surface du matériau.

Bien que nous nous soyons focalisés sur des matériaux en acier inoxydable, l'efficacité des procédés vis-à-vis des protéines peut également être appréciée pour d'autres matériaux de type polymère ou céramique par exemple. De nombreuses études comparant l'adsorption d'une même protéine sur différents matériaux ont recours à cette méthode [Balasubramanian, *et al.* 1999, Pamula, *et al.* 2004, Tidwell, *et al.* 2001, Van Dulm et Norde 1983].

Si la nature protéique de la salissure utilisée pour la méthode isotopique apparaît comme un inconvénient, elle permet cependant d'évaluer les procédés selon le pire des scénarios. De plus, elle semble être acceptée par la communauté scientifique comme salissure modèle. En effet, la salissure proposée dans l'annexe L de la norme EN ISO 15 883-5 est constituée uniquement d'un mélange de quatre protéines. Il a également été montré que cette salissure était la plus résistante aux procédés de nettoyage, comparativement aux salissures proposées dans les annexes A, F et R (L. Pineau Biotech Germande, communication personnelle).

Cependant, nous ne pouvons avoir recours à cette méthodologie pour évaluer les procédés vis-à-vis de la protéine prion spécifiquement. En effet, si la manipulation d'iode radioactif nécessite de travailler en zone confinée, les prions d'origine humaine doivent également être manipulés dans des laboratoires de sécurité biologique de niveau 3 [Richard, *et al.* 1999]. D'un point de vue pratique, il n'est pas possible, à l'heure actuelle, de manipuler de la protéine prion marquée à l'iode 125 dans le laboratoire de diagnostic des maladies à prions de l'Hôpital Neurologique de Lyon.

C'est donc dans ce contexte que deux nouvelles méthodologies sont envisagées pour l'évaluation des procédés vis-à-vis de la protéine prion.

Les résultats obtenus pour les formulations Aniosyme N2 et DD1 par les différentes méthodes mises en œuvres (PND, XPS et méthode isotopique sur BSA, HSA et HFN) nous conduisent à sélectionner ces formulations pour être évaluées vis-à-vis d'une salissure contenant de la protéine prion. En effet, ces formulations montrent une bonne efficacité sur les différentes salissures testées. De plus, nous avons pu constater que ces formulations étaient relativement inertes vis-à-vis des surfaces d'acier inoxydable.

Le double nettoyage par l'utilisation successive de ces deux formulations garantirait une efficacité du 1<sup>er</sup> nettoyage vis-à-vis des protéines par l'Aniosyme N2 et également une pré-désinfection au cours du 2<sup>nd</sup> nettoyage par l'Aniosyme DD1. Le double nettoyage par les Aniosyme N2 puis DD1 serait donc un bon compromis entre efficacité et sécurité si leurs performances étaient également validées face au risque prion.

### **III. ÉVALUATION DES PROCÉDES VIS-A-VIS DE SOUILLURE CONTENANT DE LA PROTÉINE PRION**

L'efficacité des formulations et procédés pour l'élimination de la protéine prion des surfaces d'acier inoxydable est évaluée à la fois par des méthodes de détection directe et indirecte. Ces approches nous permettront de nous intéresser aux effets de souches de prions dans l'évaluation des procédés.

#### **III.1. Détection directe de la PrPres sur lamelles d'acier inoxydable**

Dans un premier temps, les formulations et procédés sont évalués vis-à-vis de la PrPres d'une souche animale, la souche 6PB1. Il s'agit de la souche de l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) adaptée à la souris [Lasmez, *et al.* 1996].

Ces travaux sont réalisés par la société SPI-BIO sous la direction de Pascal Clayette.

##### ***III.1.1. Principe***

Une quantité connue de PrPres est déposée sur des lamelles en acier inoxydable. Ces lamelles subissent les différents traitements de nettoyage et/ou de désinfection, puis la PrPres résiduelle est détectée directement sur les lamelles par une réaction immunologique utilisant un anticorps anti-PrP et un système de révélation en chimiluminescence.

##### ***III.1.2. Méthodologie***

###### ***Préparation de la PrPres***

La PrPres est préparée à partir d'homogénat de cerveau 10% à l'aide du kit commercialisé par BioRad « BSE purification kit » et d'une digestion à 10 µg/ml de protéinase K pendant une heure à 37°C.

###### ***Contamination des lamelles d'acier inoxydable***

Les lamelles d'acier inoxydable d'environ 25 mm<sup>2</sup> sont contaminées par un inoculum de PrPres titré à 3,8 log. Les lamelles sont ensuite séchées une nuit sous hotte à flux laminaire pour favoriser l'adsorption de la salissure.

###### ***Évaluation des formulations ou procédés***

Une fois séchées, les lamelles sont placées dans des tubes de 2,2 ml et incubées en présence de 1 ml de la formulation à tester. La lamelle contrôle est incubée dans 1 ml de l'eau du réseau utilisée pour la dilution des formulations.

Les lamelles sont rincées à l'issue du traitement et entre chaque séquence du procédé par de l'eau du réseau.

La nature des 19 formulations et/ ou procédés, ainsi que les conditions d'essais sont rappelés dans le tableau III-3.

###### ***Détection de la PrPres résiduelle sur les lamelles***

La PrPres résiduelle est directement détectée sur les lamelles par l'anticorps SAF83 couplé à la peroxydase. Cet anticorps est spécifiquement dirigé contre la PrP de souris. La réaction immunologique est révélée en chimiluminescence à l'aide du substrat « SuperSignal R-West Extended Duration substrate » commercialisé par Pierce.

### **III.1.3. Résultats**

Les résultats suivants sont présentés avec l'accord de Pascal Clayette de la société SPI-BIO. La radiographie des lamelles d'acier inoxydable est présentée sur la figure III-7.

Les lamelles contrôles sont :

- PC : lamelle contaminée par de la PrPres mais n'ayant subi aucun traitement. Il s'agit du contrôle positif de l'adsorption de la PrPres.
- PC1, PC2 et PC3 : lamelles contaminées par de la PrPres ayant subi respectivement 1, 2 ou 3 rinçages. Il s'agit des contrôles concernant l'efficacité des rinçages à l'eau du réseau vis-à-vis de la désorption de la PrPres.
- NC : lamelle contaminée par de la PrP préparée à partir d'un homogénat de cerveau sain, exempt de protéine prion pathologique. Cette lamelle a subi un seul rinçage. Ce contrôle permet de s'assurer de la spécificité de la détection.

Concernant les essais, seulement 5 lamelles sont positives pour la détection de la PrPres résiduelle (figure III-7). Il s'agit des essais :

- A1 : Aniosyme N2, 15 minutes
- A3 : la formulation alcaline, 30 minutes à température ambiante
- A4 : l'Anioxy Twin Cu, 30 minutes
- A18 : la formulation acide, 15 minutes
- A19 : la formulation acide, 15 minutes suivie de l'Anioxy Twin Cu, 30 minutes.

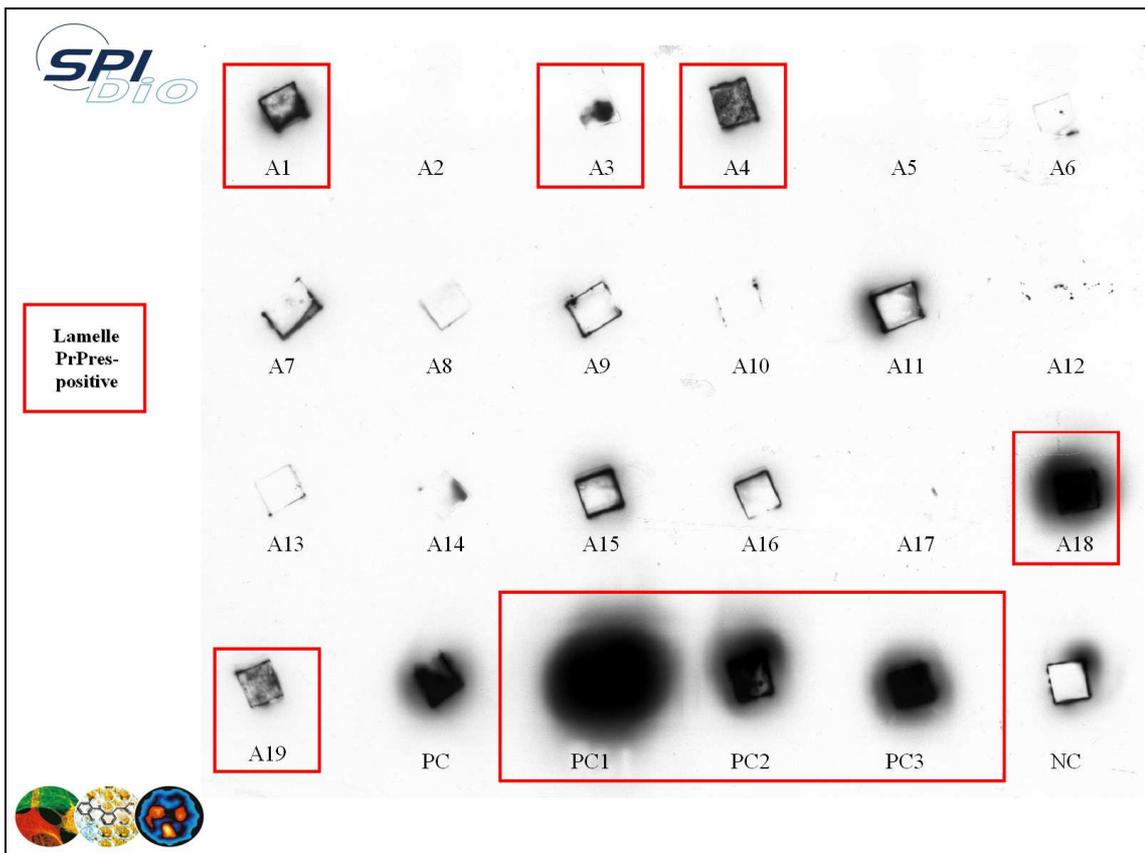
Un simple nettoyage de 15 minutes par l'Aniosyme N2 (A1) est insuffisant pour éliminer la PrPres de la surface. En revanche, la PrPres n'est plus observée lors du double nettoyage par les Aniosymes N2 et DD1 (A2).

La formulation alcaline n'enlève pas totalement la PrPres en 30 minutes à température ambiante (A3) mais est efficace dès 10 minutes à 55°C (A5). Ces résultats ont précédemment été observés puisque certaines formulations alcalines actuellement commercialisées ne présentent une efficacité vis-à-vis du prion qu'à des températures supérieures à 43°C [Fichet, *et al.* 2004]. Ces données peuvent également être comparées à celles disponibles sur l'incidence de la température sur l'inactivation des prions par l'hydroxyde de sodium [Lemmer, *et al.* 2004, Taylor D.M. 2000, Taylor D. M., *et al.* 1997].

Enfin, la formulation acide, employée seule ou en combinaison avec l'Anioxy Twin Cu, ne permet pas d'éliminer la PrPres adsorbée.

**Tableau III-3 : Formulations et procédés évalués sur la PrPres de la souche 6PB1 adsorbée sur lamelles d’acier inoxydable. Ce tableau est présenté avec l’accord de Pascal Clayette de la société SPI BIO.**

Essais	1ère Séquence			1er Rinçage		2ème Séquence			2ème Rinçage		3ème Séquence			3ème Rinçage	
	Formulations	Temps	T°C		Temps	Formulations	Temps	T°C		Temps	Formulations	Temps	T°C		Temps
NC	H <sub>2</sub> O	2													
PC															
PC1	H <sub>2</sub> O	2		H <sub>2</sub> O	2										
PC2	H <sub>2</sub> O	2		H <sub>2</sub> O	2	H <sub>2</sub> O	2								
PC3	H <sub>2</sub> O	2		H <sub>2</sub> O	2	H <sub>2</sub> O	2								
A1	Aniosyme N2	15	RT	H <sub>2</sub> O	2										
A2	Aniosyme N2	10	RT	H <sub>2</sub> O	2	Aniosyme DD1	5	RT	H <sub>2</sub> O	2					
A3	Alcaline	30	RT	H <sub>2</sub> O	2										
A4	Anioxy-Twin Cu	30	RT	H <sub>2</sub> O	2										
A5	Alcaline	10	55	H <sub>2</sub> O	2										
A6	Aniosyme N2	10	RT	H <sub>2</sub> O	2	Aniosyme N2	5	RT	H <sub>2</sub> O	2	Anioxyde 1000	30	RT	H <sub>2</sub> O	2
A7	Aniosyme N2	10	RT	H <sub>2</sub> O	2	Aniosyme N2	5	RT	H <sub>2</sub> O	2	Anioxy-Twin Cu	15	RT	H <sub>2</sub> O	2
A8	Aniosyme N2	10	RT	H <sub>2</sub> O	2	Aniosyme N2	5	RT	H <sub>2</sub> O	2	Anioxy-Twin Cu	30	RT	H <sub>2</sub> O	2
A9	Aniosyme N2	10	RT	H <sub>2</sub> O	2	Aniosyme N2	5	RT	H <sub>2</sub> O	2	TH5	60	RT	H <sub>2</sub> O	2
A10	Aniosyme DD1	10	RT	H <sub>2</sub> O	2	Aniosyme DD1	5	RT	H <sub>2</sub> O	2	Anioxy-Twin Cu	30	RT	H <sub>2</sub> O	2
A11	Aniosyme DD1	10	RT	H <sub>2</sub> O	2	Aniosyme DD1	5	RT	H <sub>2</sub> O	2	Anioxyde 1000	30	RT	H <sub>2</sub> O	2
A12	Alcaline	10	55	H <sub>2</sub> O	2	DLM	5	55	H <sub>2</sub> O	2					
A13	D2M	15	RT	H <sub>2</sub> O	2	Anioxy-Twin Cu	30	RT	H <sub>2</sub> O	2					
A14	D2M	15	RT	H <sub>2</sub> O	2	TH5	60	RT	H <sub>2</sub> O	2					
A15	Aniosyme N2	10	RT	H <sub>2</sub> O	2	Aniosyme DD1	5	RT	H <sub>2</sub> O	2	Anioxyde 1000	30	RT	H <sub>2</sub> O	2
A16	Aniosyme N2	10	RT	H <sub>2</sub> O	2	Aniosyme DD1	5	RT	H <sub>2</sub> O	2	Anioxy-Twin Cu	30	RT	H <sub>2</sub> O	2
A17	Aniosyme N2	10	RT	H <sub>2</sub> O	2	Aniosyme DD1	5	RT	H <sub>2</sub> O	2	TH5	60	RT	H <sub>2</sub> O	2
A18	Acide	15	RT	H <sub>2</sub> O	2										
A19	Acide	15	RT	H <sub>2</sub> O	2	Anioxy-Twin Cu	30	RT	H <sub>2</sub> O	2					



**Figure III-7 : Radiographie de la PrPres résiduelle sur les lamelles d’acier inoxydable détectée en chimiluminescence. La PrPres résiduelle est détectée sur les lamelles A1, A3, A4, A18 et A19, encadrées en rouge. PC est la lamelle contrôle n’ayant subit aucun traitement. PC1, PC2 et PC3 sont les lamelles ayant subit respectivement 1, 2 ou 3 rinçages à l’eau du réseau. La lamelle NC, contaminée par de la PrP préparée à partir d’un homogénat de cerveau sain, n’a subit qu’un seul rinçage. Ces résultats sont présentés avec l’accord de Pascal Clayette de la société SPI-BIO.**

Les données obtenues par détection directe de la PrPres sont en accord avec les résultats précédemment obtenus par la méthode isotopique :

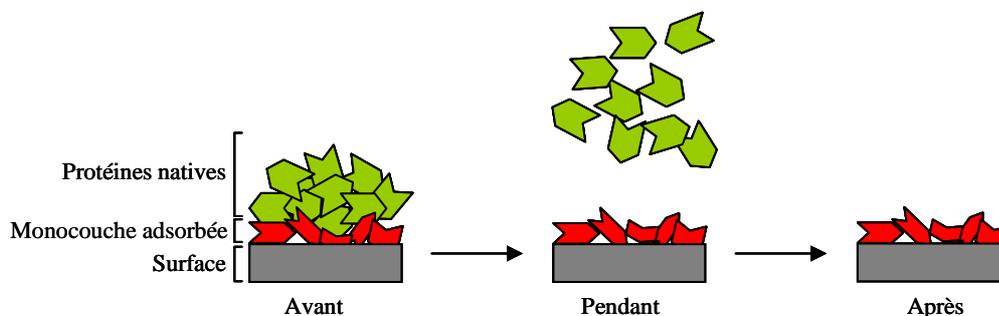
- Le double nettoyage s'avère plus efficace que le simple nettoyage pour un temps de contact équivalent de 15 minutes.
- La formulation alcaline, à température ambiante en 30 minutes, est peu efficace lorsqu'il s'agit d'éliminer des protéines adsorbées, dans un environnement exempt de matière lipidique.
- La formulation acide, efficace sur une salissure relativement lipidique, ne montre vis-à-vis des protéines, que peu d'intérêt.

### III.1.4. Discussion

D'après ces résultats, les procédés mettant en œuvre un double nettoyage par les Aniosyme N2 et DD1 et l'étape de désinfection sont très intéressants lorsque l'on utilise une salissure à base de PrPres adsorbée. Comparativement aux résultats de la méthode isotopique sur l'HSA et l'HFN adsorbées, on peut constater que les procédés présentant des pourcentages de performance supérieurs à 50% dans le cadre du nettoyage (figure III-4) confirment leur efficacité sur la PrPres.

La méthode de détection directe de la PrPres ne permet pas d'observer de différence d'efficacité concernant les séquences du double nettoyage par les Aniosyme N2 et DD1 (de A6 à A11 et de A15 à A17) alors que la méthode isotopique laissait présager une diminution de l'efficacité du double nettoyage lors d'une double utilisation de l'Aniosyme DD1 (figure III-4 : DD1(10)-DD1(5)). En effet, contrairement à la méthode isotopique, la détection de la PrPres directement sur le support ne permet pas d'établir de classification des performances des formulations ou procédés. Il s'agit d'une méthodologie ON/OFF.

Pour la plupart des procédés testés, aucun signal n'est observé sur la radiographie des lamelles. Cette absence de signal suggère que la quantité de PrPres résiduelle est inférieure à la limite de détection de la méthode. La limite de détection annoncée pour le système de révélation utilisé est de l'ordre de la dizaine de femtogramme ( $10^{-14}$  g) dans le cadre du Western blot. Cette valeur n'est probablement pas représentative dans le cadre de cette application. On peut d'ailleurs se demander si la méthode de détection par chimiluminescence est suffisamment sensible pour détecter une monocouche de protéines adsorbées. En effet, lorsque le volume (connu) de PrPres est déposé sur la surface de la lamelle, seule la première monocouche de PrPres est en interaction avec le substrat en acier inoxydable. Or, il est reconnu que les protéines adsorbées subissent des modifications conformationnelles pour réduire l'énergie libre du système ([Norde 1986, 1995, Norde et Lyklema 1991, Norde et Zoungrana 1998]. Les protéines des couches supérieures, n'entrant pas en contact avec la surface, conserveraient leur structure native [Hook, *et al.* 1998]. Ainsi, si la majeure partie de la salissure peut être éliminée lors du nettoyage, ce n'est probablement pas le cas de la monocouche adsorbée (figure III-8). Ceci est d'ailleurs fortement suggéré par la méthode isotopique puisque aucun procédé n'a permis d'atteindre la limite de détection de cette méthode.



**Figure III-8 :** Schéma hypothétique illustrant le comportement de la monocouche de protéines adsorbées (▴) et des couches supérieures de protéines natives (▾) avant, pendant et après le nettoyage d'une surface.

De par l'utilisation d'anticorps, nous pourrions également attribuer l'absence de signal à leur inaccessibilité au site antigénique. En effet, les molécules tensioactives modifient la conformation et/ou l'orientation des protéines au cours des étapes de nettoyage [Wahlgren et Arnebrant 1991]. Elles pourraient donc diminuer voire masquer les épitopes initialement accessibles.

L'utilisation de la PrPres comme salissure pour la méthode de détection directe sur support présente à la fois des avantages et des inconvénients. Détecter spécifiquement la présence de PrPsc n'est possible que si la PrPc est préalablement digérée par la protéinase K puisque l'Ac anti-PrP employé est un Ac séquentiel. De ce fait, travailler avec de la PrPres assure la spécificité de la détection. Cependant, la PrPsc n'est que partiellement résistante à la dégradation enzymatique puisque sa partie N-terminale y est sensible. Les propriétés de la PrPres sont donc modifiées par rapport à la PrPsc et ces différences pourraient avoir des conséquences sur l'efficacité d'un procédé notamment lorsque celui-ci implique l'utilisation de molécules tensioactives et d'enzymes. En effet, la PrPres est obtenue suite à un traitement enzymatique à la protéinase K. La question de la sensibilité de cette PrPres à un second traitement enzymatique est donc posée et nous tenterons d'y apporter des éléments de réponses.

La PrPres constitue une nouvelle fois une salissure de nature essentiellement protéique, modélisant probablement le pire des scénarios. Cependant, il est important de prendre en considération la présence des autres constituants de la matière organique. Ainsi, dans les étapes suivantes, les procédés mettant en œuvre le double nettoyage par les formulations Aniosyme N2 et DD1 sont évalués vis-à-vis de la PrPsc dans une salissure plus représentative et plus complexe.

### **III.2. Détection indirecte de la PrP adsorbée sur fils d'acier inoxydable**

La finalité de notre projet est de démontrer *in vitro* l'efficacité d'un procédé vis-à-vis du risque prion. Dans un premier temps, les procédés seront évalués sur une salissure complexe contenant de la protéine prion du vMCJ. Dans un deuxième temps, et compte tenu de l'incidence que semble avoir la nature de salissure sur l'efficacité du nettoyage, certains procédés seront également évalués sur des salissures protéiques de PrPsc et de PrPres également issues du vMCJ. Enfin, pour s'assurer de l'absence de spécificité des procédés de nettoyage et de désinfection, ceux-ci seront évalués vis-à-vis de protéine prion issue de différentes souches animales et de la forme sporadique de la MCJ.

Après avoir présenté le principe de la méthode de détection indirecte de la protéine prion adsorbée sur fils d'acier inoxydable, nous présenterons les types de PrP humaine et les salissures qui leur sont associés ainsi que les souches animales étudiées.

#### ***III.2.1. Principe***

Afin d'évaluer les performances du double nettoyage et de la désinfection vis-à-vis de la PrPsc dans une salissure plus représentative, il est nécessaire de pouvoir dissocier l'isoforme cellulaire de l'isoforme pathologique de la protéine prion. Une détection spécifique directe n'est donc plus possible. Il est nécessaire d'avoir recours à une méthode indirecte de détection et donc de procéder à une élution des protéines résiduelles après nettoyage et/ou désinfection. La PrPsc résiduelle dans l'éluât peut alors être spécifiquement mise en évidence par Western blot. Parallèlement, un traitement préalable des substrats d'acier inoxydable par la protéinase K, avant élution, permettra de confirmer la présence de PrPsc résiduelle adsorbée.

#### **Les fils d'acier inoxydable**

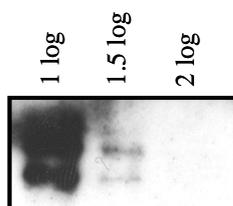
Cette méthodologie nécessite de faire un compromis entre spécificité et sensibilité. En effet, comme il l'est expliqué précédemment, la spécificité de la détection n'est assurée qu'après élution de la PrP résiduelle du support sur lequel elle est adsorbée. Or, si le volume de la solution d'élution nécessaire à la

désorption de la PrP résiduelle est trop important, la sensibilité de la détection sera diminuée. Il est donc nécessaire de disposer de support d'adsorption caractérisé par un rapport surface/volume élevé. L'utilisation de courts segments de fils d'acier inoxydable de faible diamètre permet de répondre à ce critère [Lemmer, *et al.* 2004]. Ces fils d'acier inoxydable étant également employés pour les essais *in vivo* d'inoculation à l'animal, leur utilisation pour la validation des essais *in vitro* est d'autant plus pertinente.

#### Les types de PrP des maladies humaines

Dans le cadre des maladies humaines à prion, on ne parle pas de souches mais plutôt de types de PrP. Le typage de la PrP est établi suivant son profil électrophorétique après digestion à la protéinase K (figure I-4). En raison du problème de santé publique provoqué par l'émergence du vMCJ, de sa distribution périphérique et de l'efficacité de sa transmission par le sang, les procédés doivent être évalués prioritairement vis-à-vis de la PrP du vMCJ. Dans cette forme de MCJ, la PrPres est de type 2. Elle est différenciée de la PrPres type 2 des formes sporadiques par sa bande biglycosylée majoritaire (figure I-4). La forme des maladies à prions la plus courante est la forme sporadique de la MCJ (tableau I-2 : Forme de Heidenhain). Ce phénotype de la MCJs est associé à la présence de PrPres de type 1 et à une homozygotie Met/Met au codon 129 (Parchi 1996). Ainsi, l'évaluation des procédés sera également réalisée à partir de PrP de type 1 provenant d'un patient homozygote Met/Met au codon 129.

L'adsorption sur fils d'inox à partir d'un simple homogénat de cerveau à 10% pour les formes humaines, ne permet pas d'établir l'efficacité du procédé avec une sensibilité suffisamment importante. En effet, lorsque la PrP, adsorbée à partir de cette salissure, est éluee des fils d'acier inoxydable et que l'éluât est analysé en Western blot, la dernière dilution de l'éluât pour laquelle la PrP est observée est celle au  $1/33^{\text{ème}}$ , correspondant à 1,5 log de PrP (figure III-9).



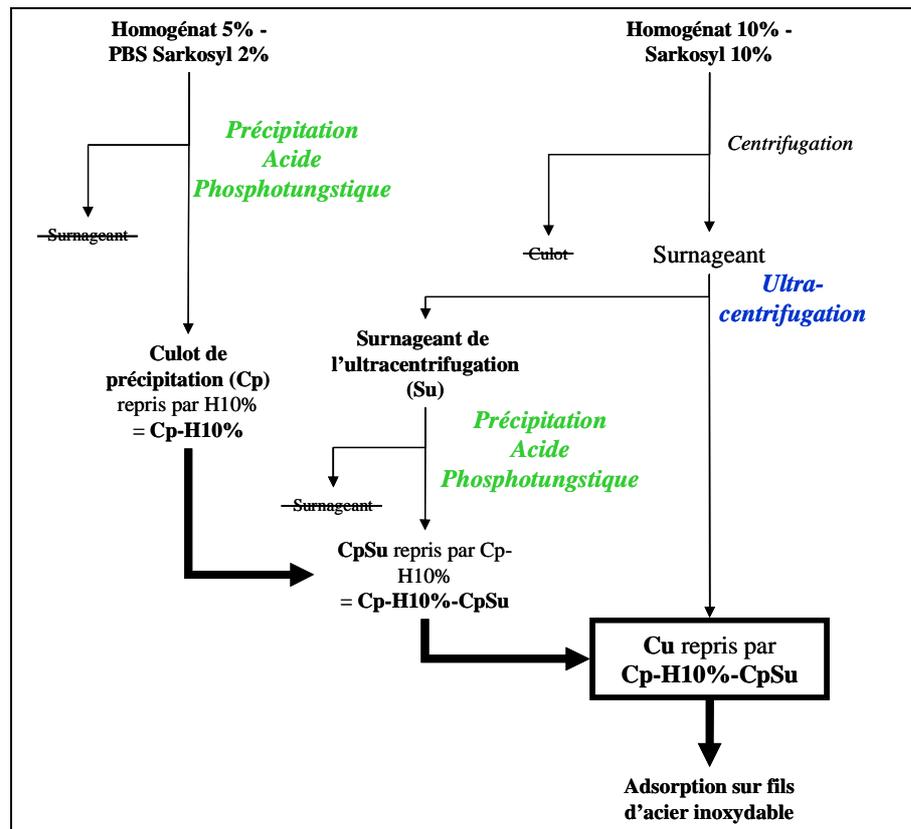
**Figure III-9 : Limite de détection en Western blot de la PrP humaine adsorbée sur fils d'acier inoxydable à partir d'un homogénat de cerveau 10%.**

Evaluer l'efficacité des procédés sur 1,5 log n'est pas pertinent compte tenu des sensibilités offertes par les essais *in vivo* sur l'animal. Il est vrai que travailler sur les formes humaines n'est pas toujours évident. Contrairement aux souches animales qui sont stabilisées et titrées, la quantité de PrPsc dans les formes humaines est variable et dépendante du patient. En effet, la quantité de PrPsc va varier en fonction du stade de la maladie auquel est survenu le décès. Plus le stade sera avancé, plus la quantité de PrPsc sera importante. Mais il faut également préciser que la répartition cérébrale de la PrPsc n'est pas homogène, la quantité de PrPsc dans un homogénat d'une zone cérébrale donnée n'est donc pas représentative de la quantité de PrPsc accumulée au cours du développement de la maladie.

Afin d'augmenter la sensibilité de notre méthode, nous avons utilisé des techniques de concentration de la PrP. Ces techniques de concentration sont couramment mises en œuvre dans le Laboratoire de Diagnostic des Maladies à Prion de l'Hôpital Neurologique de Lyon. Ces techniques consistent en :

- Une concentration par précipitation sélective de la PrPsc par l'acide phosphotungstique, initialement décrite par Wadsworth [Wadsworth, *et al.* 2001] ;
- Une concentration de la PrPsc par ultracentrifugation en présence de Sarkosyl [Bolton, *et al.* 1984]. Cette dernière technique est également utilisée pour concentrer la PrPres à partir d'un homogénat de cerveau préalablement traité par la protéinase K.

La protéine prion, ainsi concentrée, sera reprise dans un homogénat de cerveau à 10% permettant de tester les procédés sur de la PrPsc en milieu lipidique cérébral avec une sensibilité plus adaptée. Le protocole employé pour la préparation de cette salissure est schématisé sur la figure III-10.



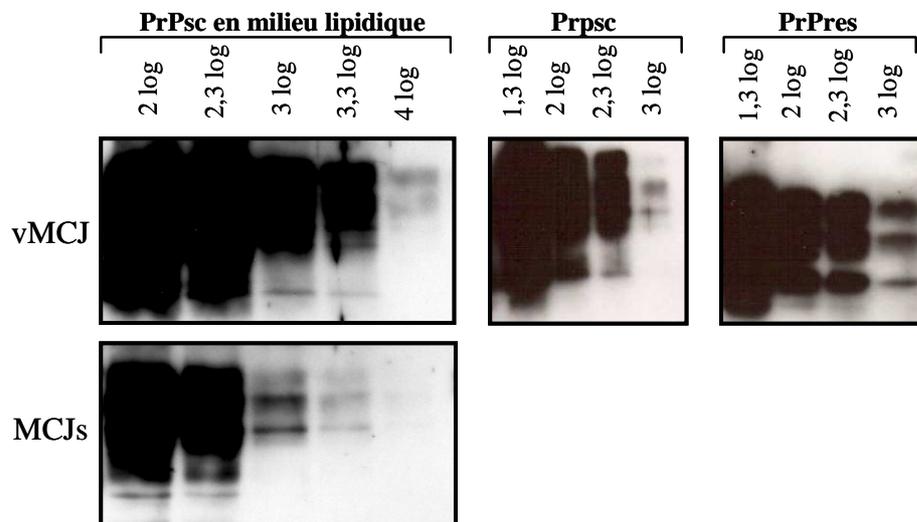
**Figure III-10** : Schéma du protocole de concentration de la PrPsc pour la préparation de la salissure PrPsc en milieu lipidique cérébral. Le culot Cu repris par Cp-H10%-CpSu constitue la salissure PrPsc en milieu lipidique cérébral utilisée pour l'adsorption sur les fils d'acier inoxydable.

Afin d'établir un parallèle avec la méthode de détection directe de la PrPres sur support, et d'étudier l'incidence de la nature de la salissure sur l'efficacité du nettoyage, des salissures constituées exclusivement de PrPsc ou de PrPres du vMCJ seront également préparées par ultracentrifugation. La préparation des différentes salissures employées dans cette étude est résumée dans le tableau III-4.

**Tableau III-4 : Les différentes salissures de protéine prion et les techniques de concentration correspondantes. Ces salissures sont préparées à partir d'homogénat de cerveau à 10%.**

Salissures	Protéinase K	Techniques de concentration	Tampons de reprise
PrPsc en milieu lipidique cérébral	-	Précipitation à l'acide phosphotungstique Ultracentrifugation	Homogénat de cerveau à 10%
PrPsc	-	Ultracentrifugation	PBS pH7,2
PrPres	+	Ultracentrifugation	PBS pH7,2

L'utilisation de ces salissures pour l'adsorption de la PrPsc sur les fils d'acier inoxydable permet d'évaluer l'efficacité des procédés avec des sensibilités plus adaptées. Vis-à-vis de la PrP du vMCJ, la salissure PrPsc en milieu lipidique cérébral permet de tester l'efficacité des procédés sur 4 log de PrP adsorbée et les salissures PrPsc et PrPres sur 3 log. Concernant la PrP de la MCJs, les procédés sont évalués sur 3,3 log de PrP adsorbée à partir de la salissure PrPsc en milieu lipidique cérébral (figure III-11).

**Figure III-11 : Limite de détection en Western blot de la PrP humaine adsorbée sur fils d'acier inoxydable à partir des salissures « PrPsc en milieu lipidique cérébral », PrPsc et PrPres.**

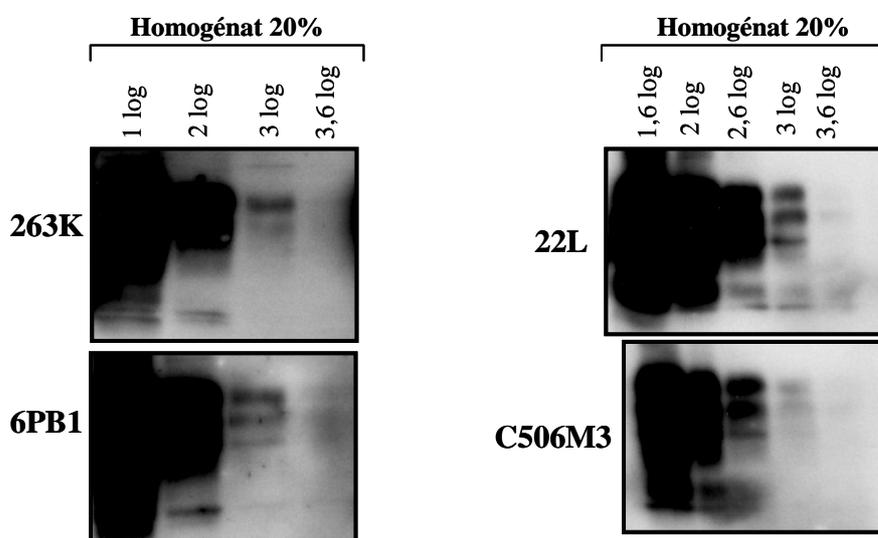
### Les souches animales

Etant donné que les propriétés de résistance des prions et que les titres infectieux varient en fonction des souches il paraît important de pouvoir établir l'efficacité d'un procédé vis-à-vis de plusieurs souches. Néanmoins, les propriétés de résistance des prions observées pour les procédés d'inactivation ne sont probablement pas transposables aux procédés de nettoyage. En effet, nous nous intéressons au déplacement des prions de la surface vers la solution de nettoyage sans chercher à les inactiver. Les souches animales utilisées dans cette étude sont présentées dans le tableau III-5 :

**Tableau III-5 : Caractéristiques des souches animales sur lesquelles les procédés de nettoyage et de désinfection sont évalués. Les souches 6PB1, 263K et C506M3 sont un don de Pascal Clayette de la société SPI BIO. La souche 22L est un don de Sylvain Lehmann du CNRS UPR 142.**

Souches	Porteur	Origine	Titre infectieux (LD50 /g de cerveau)	Période d'incubation après inoculation intracérébrale (I.C.)
<b>6PB1</b>	C57/BL6	ESB	$10^8$ à $10^9$	≈ 150 jours
<b>263K</b>	Hamster syrien doré	Tremblante	$10^{11}$	≈ 70 jours
<b>C506M3</b>	C57/BL6	Tremblante	$10^8$ à $10^9$	$171 \pm 3$ jours
<b>22L</b>	C57/BL6	Tremblante	Non titrée	

Les adsorptions sur fils d'acier inoxydable sont réalisées à partir d'homogénat de cerveau à 20% pour chacune des souches présentées et ces salissures permettent d'évaluer l'efficacité des procédés sur 3 log de PrP adsorbée, pour toutes les souches considérées (figure III-12).



**Figure III-12 : Limite de détection en Western blot de la PrP des souches animales 263K, 6PB1, 22L et C506M3 adsorbées sur fils d'acier inoxydable à partir d'homogénats de cerveau à 20%.**

### III.2.2. Méthodologie

#### Fils d'acier inoxydable :

Les supports employés sont des segments de fils d'acier inoxydable de 5 mm de longueur et de 0,125 mm de diamètre. Chaque essai comportant 40 fils, la surface disponible pour l'adsorption est d'environ 80 mm<sup>2</sup>.

Les fils sont stérilisés à 121°C pendant 20 min avant d'être utilisés.

#### Adsorption :

Chaque essai, contenant 40 fils, est incubé en présence de 100 µl de la salissure considérée, pendant 2h à 37°C sous agitation à 350 rpm. Les fils sont ensuite répartis sur une boîte de pétri et séchés une nuit sous hotte à flux laminaire.

**Nettoyage et/ou désinfection :**

Une fois séchés, les fils sont collectés dans des tubes de 1,5 ml et incubés en présence de 1 ml de la formulation à tester. Les tubes sont placés sur un agitateur rotatif assurant une bonne agitation mécanique des fils dans la formulation. Les conséquences d'une agitation mécanique inappropriée seront illustrées dans la discussion de la méthode.

Les procédés évalués sont présentés dans le tableau III-6. Les fils sont rincés pendant 3 minutes à l'issue du traitement et entre chaque étape du procédé par de l'eau du réseau. Le désinfectant évalué dans les procédés de nettoyage et de désinfection est l'Anioxy Twin Cu à 2,4% pendant 15 ou 30 minutes. La sélection de l'Anioxy Tween Cu, par les Laboratoires ANIOS, comme le désinfectant de référence dans la validation du procédé est en relation avec les évolutions possibles que pourraient subir ce produit désinfectant dans le cadre des traitements des DM thermosensibles.

**Tableau III-6 : Procédés de nettoyage et de désinfection évalués vis-à-vis de la protéine prion du vMCJ en milieu lipidique.**

1 <sup>er</sup> nettoyage		2 <sup>nd</sup> nettoyage		Désinfection	
Formulation	Temps	Formulation	Temps	Formulation	Temps
Aniosyme N2 0,5%	10 min	Aniosyme N2 0,5%	5 min	Anioxy Twin Cu 2,4%	15 min
				Anioxy Twin Cu 2,4%	30 min
Aniosyme N2 0,5%	10 min	Aniosyme DD1 0,5%	5 min	Anioxy Twin Cu 2,4%	15 min
				Anioxy Twin Cu 2,4%	30 min
Aniosyme DD1 0,5%	10 min	Aniosyme N2 0,5%	5 min	Anioxy Twin Cu 2,4%	15 min
				Anioxy Twin Cu 2,4%	30 min
Aniosyme DD1 0,5%	10 min	Aniosyme DD1 0,5%	5 min	Anioxy Twin Cu 2,4%	15 min
				Anioxy Twin Cu 2,4%	30 min

Le contrôle de la détergence est effectué par une incubation de 40 fils dans 1 ml de l'eau du réseau utilisée pour la dilution des formulations.

Les fils ne subissant aucun traitement sont conservés en boîte de pétri à température ambiante. Ces fils seront le contrôle positif de l'adsorption.

Après traitement, les fils sont à nouveau séchés une nuit en boîte de pétri sous hotte à flux laminaire.

**Traitement et analyse des effluents du nettoyage :**

Les effluents du 1<sup>er</sup> et 2<sup>nd</sup> nettoyage sont collectés et analysés en Western blot afin de s'assurer de la désorption de la protéine prion à partir des fils d'acier inoxydable. L'activité enzymatique des formulations Aniosyme N2 et DD1 est inhibée par le chauffage des effluents 10 minutes à 100°C.

**Elution des protéines résiduelles :**

Afin d'éluer les protéines résiduelles, les fils sont incubés dans 50 µl d'une solution de dénaturation (4% SDS, 192 mM glycine, 5% saccharose, 25 mM Tris-HCl, 2% β-mercaptoéthanol), traités 2 heures aux ultrasons puis chauffés 10 minutes à 100°C. La solution de dénaturation est prélevée et 20 µl sont déposés en Western blot pour la détection de la protéine prion.

Dans le cas des contrôles positifs de l'adsorption, les fils subissent une double désorption. En effet, n'ayant pas subi de traitement, la quantité de salissure adsorbée est importante et il est nécessaire d'éluer les protéines dans 2 x 50 µl de solution de dénaturation pour s'assurer d'une désorption maximale de la PrP. Le facteur dilution (de 2) sera pris en compte dans la conversion des dilutions de l'éluât en nombre de log de PrP éluée.

**Western blot :**

Les protéines de l'éluât sont séparées par électrophorèse SDS/PAGE puis transférées sur une membrane de PVDF. La PrP est détectée sur la membrane par une méthode indirecte utilisant un anticorps primaire de souris anti-PrP et un anticorps secondaire anti-IgG de souris couplé à la peroxydase. La révélation est réalisée par chimiluminescence. Les conditions opératoires sont présentées dans l'Annexe 3.

**III.2.3. Résultats et discussion****Efficacité des procédés de nettoyage vis-à-vis de la PrPsc du vMCJ en milieu lipidique cérébral :**

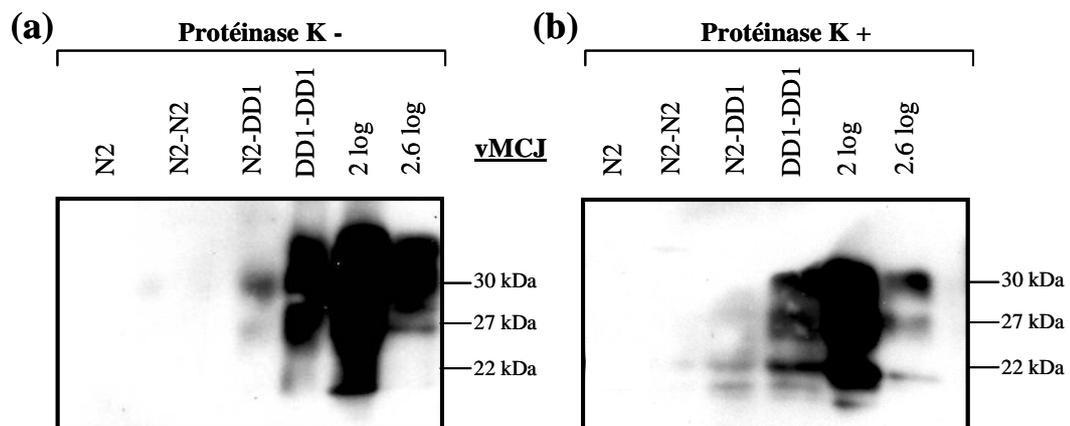
Dans un premier temps, le double nettoyage par les formulations Aniosyme N2 et DD1 a été évalué vis-à-vis de la « PrPsc en milieu lipidique cérébral » du vMCJ.

Trois procédés du double nettoyage sont testés :

- Le double nettoyage par l'Aniosyme N2 (N2-N2) ;
- Le double nettoyage par l'Aniosyme N2 puis par l'Aniosyme DD1 (N2-DD1) ;
- Le double nettoyage par l'Aniosyme DD1 (DD1-DD1).

Un contrôle de l'efficacité de l'Aniosyme N2 en première intention, sur 10 minutes, est également réalisé (N2). L'essai contrôle de l'adsorption est inclus et est exprimé en nombre de log de PrP éluée.

Les résultats obtenus pour ces procédés sont présentés sur la figure III-13(a).



**Figure III-13 : Détection indirecte de la protéine prion du vMCJ résiduelle par Western blot. (a) sans traitement des fils à la protéinase K, (b) après traitement des fils à la protéinase K**

La radiographie du Western blot montre que la PrP n'est pas détectée lorsque les fils subissent :

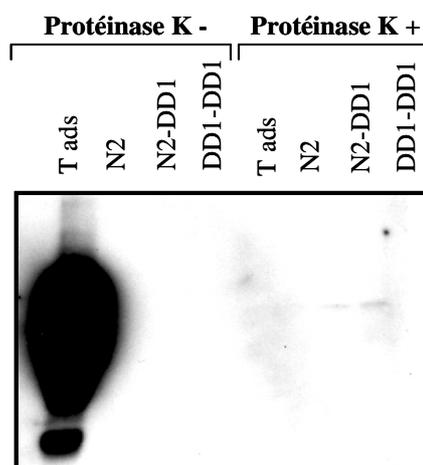
- Un premier nettoyage par l'Aniosyme N2 pendant 10 min ;
- Un double nettoyage par l'Aniosyme N2.

Un signal de faible intensité est observé lors du double nettoyage par les Aniosyme N2 et DD1. Cependant, nous ne le considérons pas comme significatif puisque les deux résultats précédents suggèrent une efficacité de l'Aniosyme N2 dès le 1<sup>er</sup> nettoyage.

En revanche, lorsque les fils subissent un double nettoyage par l'Aniosyme DD1, on observe une quantité importante de PrP résiduelle. Compte tenu de l'intensité des signaux obtenus pour le contrôle de l'adsorption et de la sensibilité de la méthode (évaluée à 4 log pour le vMCJ), on peut supposer que la quantité de PrP résiduelle est comprise entre 1,4 et 2 log.

Afin de s'assurer que la détection est spécifique de la PrPsc, les mêmes essais ont été réalisés en parallèle avec un traitement à la protéinase K avant élution. Les résultats de ces essais sont présentés sur la figure III-13(b) et montrent la présence de PrP résiduelle résistante à la protéinase K. Cela confirme donc que les signaux observés sur la figure III-13(a) sont spécifiques de la PrPsc résiduelle et constitue également une confirmation des performances de chaque procédé vis-à-vis de la protéine prion du vMCJ. Lorsque l'Aniosyme N2 est utilisé en première intention dans le double nettoyage, la quantité de PrPsc résiduelle est inférieure à la limite de détection de notre méthode.

Outre le traitement à la protéinase K, les essais menés sur de la protéine prion normale (PrPc) en milieu lipidique cérébral pourraient également nous permettre de démontrer la spécificité de notre méthode. En effet, lorsqu'une salissure exempte de PrPsc, mais préparée dans les mêmes conditions, est utilisée pour évaluer l'efficacité des procédés, la PrPc n'est jamais détectée (figure III-14). Seul le contrôle de l'adsorption sans traitement à la protéinase K est observé et témoigne de la présence effective de la PrPc avant nettoyage. Le signal de la PrPc disparaît lorsque les fils sont traités à la protéinase K puisque cette isoforme est sensible à la digestion enzymatique. Cela suggère à la fois une bonne efficacité de l'ensemble des procédés vis-à-vis de la PrPc adsorbée et également que la PrP détectée dans le cas de la salissure du vMCJ est bien l'isoforme pathologique de la protéine.



**Figure III-14 : Détection indirecte de la protéine prion cellulaire résiduelle par Western blot**

Certaines observations viennent néanmoins compliquer cette interprétation. La première observation concerne la quantité de PrPc adsorbée. Bien que la salissure de PrPc soit préparée dans les mêmes conditions que la PrPsc, la quantité de PrPc adsorbée sur les fils n'est pas comparable à celle de la PrPsc. Cela est dû d'une part au fait que la quantité de PrPc dans un cerveau est moins importante comparativement à celle de la PrPsc puisque cette dernière s'accumule. Le cerveau d'une souris malade contiendrait cinq fois plus de PrP que celui d'une souris saine [Flechsigs, *et al.* 2001]. D'autre part, les techniques mises en œuvre pour la concentration de la protéine prion sont relativement spécifiques de l'isoforme pathologique [Wadsworth, *et al.* 2001]. Ainsi, si les procédés peuvent être évalués sur 4 log de PrP dans le cas du vMCJ, cette sensibilité est réduite à 1,5 log dans le cas de la PrPc.

La seconde observation concerne la composition enzymatique des formulations Aniosyme N2 et DD1. La PrPc étant sensible aux protéases, ces enzymes vont donc dégrader la PrPc pendant la phase de nettoyage. Cependant, si ces enzymes sont actives sur la PrPc, leur activité devrait également être observée sur la PrPsc et se traduire par une diminution des masses moléculaires des différents glycoformes, comme cela est observé suite à une digestion par la protéinase K. Or, si l'on observe le signal obtenu pour le double nettoyage par l'Aniosyme DD1 sur la figure III-13(a), les masses moléculaires des glycoformes ne sont

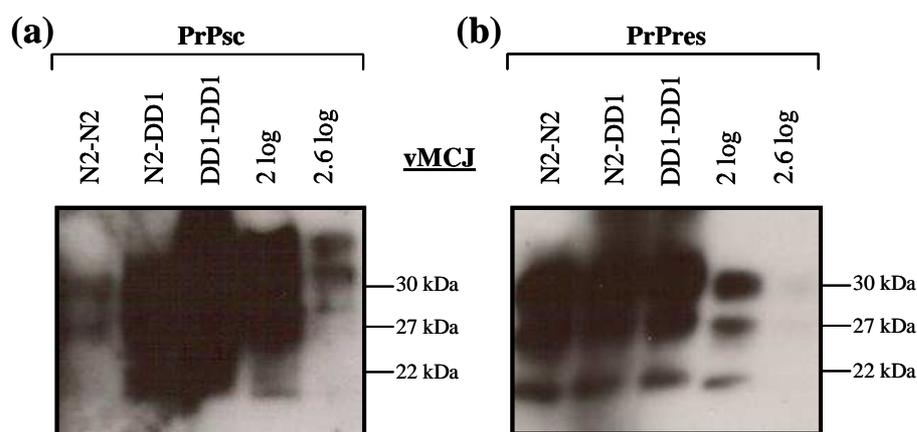
pas différentes de celles observées pour le contrôle de l'adsorption. Cela pose donc la question de la part de l'activité enzymatique dans les procédés de nettoyage.

En résumé, la faible sensibilité offerte par la salissure de PrPc et les interrogations concernant le rôle des enzymes dans le nettoyage compromettent, en l'état actuel de nos connaissances, la possibilité d'une détection indirecte et spécifique de la PrPsc sans confirmation préalable par un traitement à la protéinase K.

### **Efficacité des procédés de nettoyage vis-à-vis des salissures protéiques PrPsc et PrPres du vMCJ :**

Les méthodes précédentes : le PND, la méthode isotopique et la méthode de détection directe de la PrPres sur support, nous ont permis de constater une incidence possible de la nature de la salissure sur l'efficacité du procédé. En effet, des formulations présentant des PND élevés sur une salissure riche en lipides s'avéraient peu efficaces vis-à-vis d'une salissure protéique. Bien que ces salissures protéiques ne soient pas représentatives de la nature réelle des salissures, nous souhaitons vérifier ces observations vis-à-vis de la protéine prion. Nous avons donc évalué les procédés du double nettoyage par les Aniosyme N2 et DD1 sur de la PrPsc et de la PrPres (partiellement) purifiées provenant du vMCJ.

Les résultats sont présentés sur la figure III-15(a) pour la PrPsc et III-15(b) pour la PrPres.



**Figure III-15 : Détection indirecte de la PrPsc résiduelle (a) et de la PrPres résiduelles (b) du vMCJ par Western blot.**

Quel que soit le procédé du double nettoyage testé, la PrPsc résiduelle est détectée par Western blot. Une classification des performances est cependant possible. Le double nettoyage par l'Aniosyme N2 est plus efficace que le double nettoyage par les Aniosyme N2 et DD1, lui-même plus efficace que le double emploi de l'Aniosyme DD1.

Dans le cas du double nettoyage par l'Aniosyme N2, nous constatons une digestion partielle de la PrPsc objectivée par une diminution des poids moléculaires de l'ensemble des glycoformes, donnant une allure caractéristique de la PrPres du vMCJ. Ceci témoigne d'une activité enzymatique des protéases contenues dans cette formulation. La PrP détectée est donc de la PrPres. Ce résultat nous permet également de suggérer une activité des protéases de la formulation, à la surface des supports, sur les protéines adsorbées.

Pour le procédé Aniosyme N2 puis DD1, la diminution des masses moléculaires des glycoformes ne semble que partielle. Cette diminution n'étant pas observée pour le double nettoyage par l'Aniosyme DD1, ceci traduit une activité enzymatique plus ou moins efficace suivant la formulation puisque les concentrations et la nature des enzymes sont identiques pour les deux formulations.

Concernant l'efficacité des procédés sur la PrPres du vMCJ, aucun des procédés testés ne permet de diminuer la quantité de PrPres en dessous du seuil de détection de la méthode. Contrairement à ce qui est observé pour la PrPsc, les procédés testés présentent le même degré d'efficacité (d'inefficacité) sur la PrPres. Les différences observées entre les formulations vis-à-vis de la PrPsc ne le sont pas vis-à-vis de la PrPres. Néanmoins, il est possible que la dégradation enzymatique de la PrPres par les enzymes des formulations soit inefficace compte tenu du traitement enzymatique préalable de cette protéine par la protéinase K. Ces données suggèrent donc une résistance accrue de la PrPres à un traitement enzymatique secondaire.

Concernant l'activité détergente proprement dite des formulations Aniosyme N2 et DD1, aucune différence d'efficacité n'est observée entre ces formulations. Jusqu'à présent, l'Aniosyme N2 présentait de très bonnes performances comparativement à l'Aniosyme DD1. Ainsi, et compte tenu que les enzymes semblent inefficaces vis-à-vis de la PrPres, nous pouvons supposer que les enzymes contribuent significativement aux performances détergentes de l'Aniosyme N2 comparativement à l'Aniosyme DD1. Cette hypothèse prend en considération le fait que l'Aniosyme N2 est plus concentrée en tensioactifs que ne l'est l'Aniosyme DD1. Ces tensioactifs participent sans aucun doute aux performances de l'Aniosyme N2 dans la détergence mais pourraient également optimiser l'activité des enzymes dans cette formulation. L'évaluation du double nettoyage par la méthode de détection directe de la PrPres sur lamelles d'acier inoxydable n'a pas mis en évidence de PrPres résiduelles, contrairement à la méthode indirecte. Il existe des différences entre ces méthodologies : l'origine de la PrPres et la sensibilité de la détection. Les PrPres utilisées pour la méthode directe et indirecte sont préparées respectivement à partir de la souche animale 6PB1 et du vMCJ. La souche 6PB1 est la souche de l'ESB adaptée à la souris et le vMCJ est considéré comme étant la forme humaine de cette maladie. On pourrait donc supposer que les propriétés physicochimiques de ces deux PrPres soient relativement comparables. Quant à la sensibilité des méthodes, la méthode indirecte semble particulièrement sensible. La surface disponible pour l'adsorption est 3,2 fois plus importante dans le cas de la méthode indirecte. Néanmoins, le facteur de réduction obtenu par la méthode de détection directe est supérieur à 3,8 log alors que ce facteur est inférieur à 1 log par la méthode indirecte. En effet, compte tenu de l'intensité des signaux obtenus pour le contrôle de l'adsorption et de la sensibilité de la méthode (évaluée à 3 log pour la PrPres du vMCJ), le facteur de réduction est estimé inférieur à 1log (figure III-15(b)).

Ces résultats, comparés à ceux obtenus sur la PrPsc en milieu lipidique cérébral, confirment l'incidence de la nature de la salissure sur l'évaluation de l'efficacité d'un procédé. Ces résultats sont d'autant plus éloquents que les limites de détection de la PrP pour les salissures PrPsc en milieu lipidique cérébral et les salissures protéiques sont équivalentes.

**En résumé :**

**Le double nettoyage utilisant la formulation Aniosyme N2 en première intention est efficace vis-à-vis de la PrPsc du vMCJ en milieu lipidique cérébral, la quantité de PrP résiduelle étant inférieure à la limite de détection de la méthode.**

**Le double nettoyage n'est que partiellement efficace vis-à-vis des salissures protéiques PrPsc et PrPres et ce, indépendamment des séquences de formulations testées.**

**La nature de la salissure conditionne donc l'efficacité du procédé.**

La gestion des informations à présent disponibles sur l'efficacité des procédés de nettoyage en fonction de la nature de la salissure, est extrêmement complexe. En effet, des procédés apparemment performants sur la PrP dans une salissure complexe s'avèrent partiellement inefficaces sur une salissure protéique. Quelle salissure doit-on dès lors privilégier pour l'évaluation *in vitro* des procédés ? La salissure protéique représente, sans aucun doute, le pire des scénarios et son utilisation devient pour cela particulièrement intéressante. Mais à long terme, l'utilisation de telle salissure ne serait-elle pas un frein au développement des formulations chimiquement inertes et potentiellement efficaces ? A l'heure actuelle, les essais *in vivo* d'inoculation à l'animal ne sont mis en œuvre que lorsque l'efficacité du procédé est validée *in vitro*. Dans ce contexte, l'association d'une salissure extrêmement résistante à une méthode de détection particulièrement sensible va considérablement augmenter les exigences de performances des formulations. Le point noir de ce système est qu'il risque de nous apprendre ce que l'on connaît déjà et de nous conduire à développer des formulations toujours plus drastiques en terme d'agressivité chimique. Le second argument en défaveur d'une salissure purement protéique est qu'elle n'est pas « réelle ». Même si le plasma et les tissus périphériques sont nettement moins riches en lipides que le cerveau, ils ne sont pas pour autant purement protéiques. Pourtant, de par la présence de lipides, il pourrait être reproché à la salissure complexe, en milieu lipidique, de favoriser le nettoyage. Il est alors bien à propos de rappeler que les travaux concernant l'inactivation des prions attribuent aux lipides un rôle protecteur. En effet, les lipides augmenteraient la résistance des prions à l'inactivation et la stabilité de la PrP<sup>Sc</sup> [Appel, *et al.* 2001]. De plus, il semble que les quantités de protéines adsorbées soient plus importantes en présence de lipides [Rebeix, *et al.* 2000].

Tout en ayant conscience de la résistance de la PrP<sup>Sc</sup> et de la PrP<sup>Pres</sup> aux procédés de nettoyage, nous poursuivrons donc les évaluations des procédés vis-à-vis de la protéine prion dans un environnement lipidique cérébral. Ce choix fut principalement motivé par la prise en compte des conditions opératoires pour les essais *in vivo* d'inoculation à l'animal. En effet, les fils inoculés sont généralement souillés par des homogénats de cerveau [Fichet, *et al.* 2004, Flechsig, *et al.* 2001, Jackson, *et al.* 1999, Yan, *et al.* 2004]. Ainsi, une homogénéité des méthodologies est assurée entre les essais *in vitro* et *in vivo*.

### **Efficacité des procédés de nettoyage vis-à-vis de la protéine prion de type 1 et vis-à-vis de souches animales :**

La nature des salissures influe sur l'efficacité d'un procédé. On peut également se demander, pour une même salissure, si le type de protéine prion ou les souches de prion ont une incidence sur l'efficacité du nettoyage.

Pour cela, nous avons testé les mêmes procédés que précédemment vis-à-vis de :

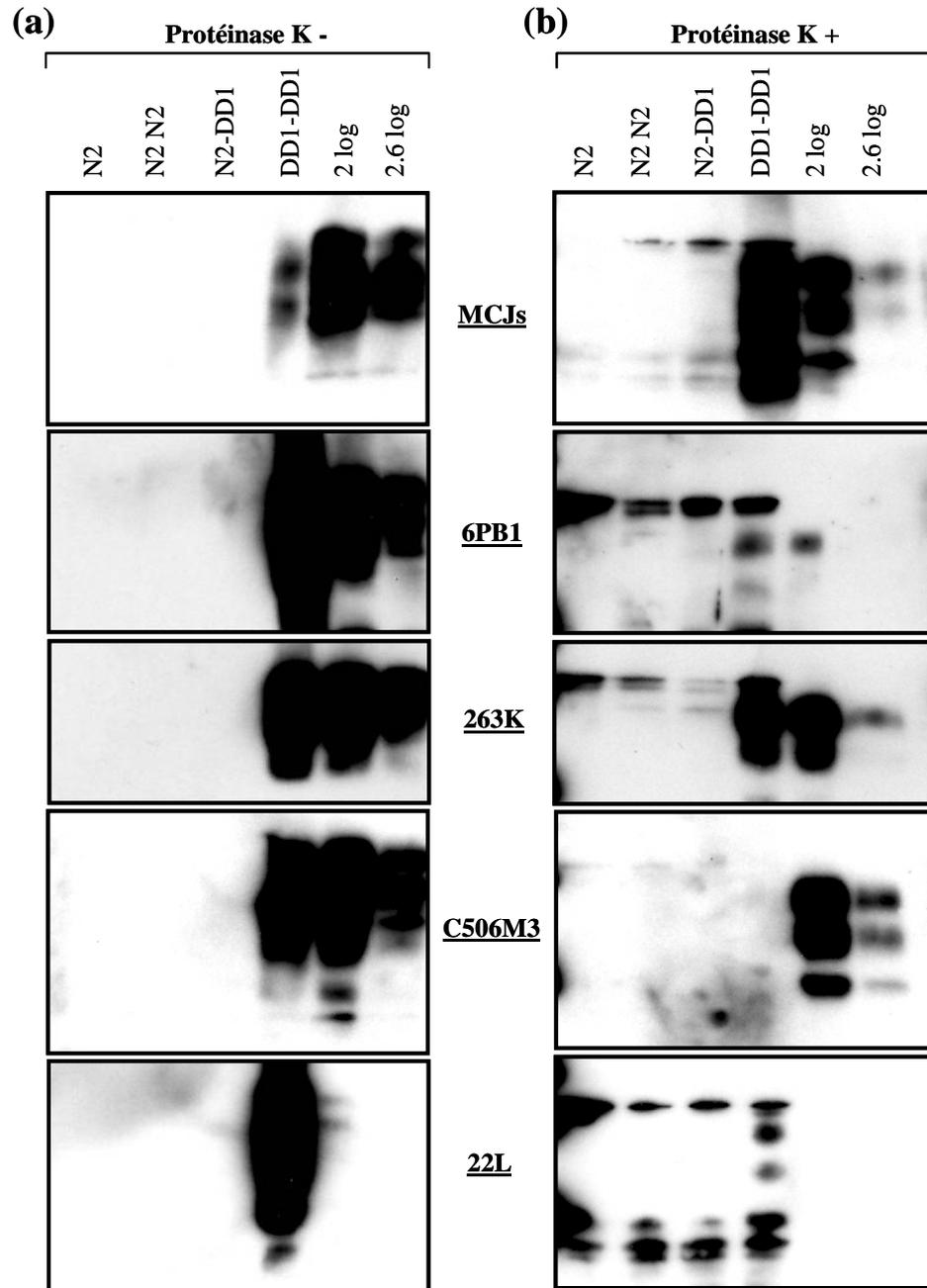
- la protéine prion de type 1 en milieu lipidique cérébral, provenant d'un cas de MCJs homozygote Met/Met au codon 129 ;
- la protéine prion de quatre souches animales (tableau III-5), à partir d'homogénat de cerveau 20%.

Les radiographies des Western blot sont présentées sur la figure III-16 pour l'ensemble des types et souches de protéine prion. La PrP<sup>Sc</sup> résiduelle est mise en évidence uniquement lorsque le procédé consiste en un double nettoyage par l'Aniosyme DD1 et ceci quel que soit le type ou la souche de protéine prion adsorbée (figure III-16(a)). Ces résultats sont en parfait accord avec ceux obtenus sur la PrP<sup>Sc</sup> du vMCJ montrant une efficacité du procédé dès lors que l'Aniosyme N2 est utilisé au 1<sup>er</sup> nettoyage.

Lorsque les fils subissent un nettoyage efficace, la PrP<sup>Sc</sup> résiduelle d'aucune des souches n'est mise en évidence. Il ne semble donc pas y avoir d'effet de souche dans le nettoyage. Cependant, lorsque le nettoyage est moins efficace (double nettoyage par l'Aniosyme DD1), des différences peuvent être observées entre les souches. Il semble par exemple que les souches 6PB1 et 22L soient plus résistantes au

nettoyage, les intensités du signal pour ces deux souches étant plus importantes que celles observées pour les autres souches, comparativement au témoin d'adsorption. Ces observations sont néanmoins insuffisantes pour conclure à un effet de souche.

Pour les raisons de spécificité de la détection précédemment évoquées, des essais, menés en parallèle, ont subi un traitement à la protéinase K (figure III-16(b)). La comparaison des radiographies obtenues avec ou sans un traitement à la protéinase K permet d'observer des résistances plus ou moins importantes des souches vis-à-vis de la digestion enzymatique. Notons que tous les types et toutes les souches de PrP ont été traités dans les mêmes conditions (par 7,5 µg de protéinase K pendant une heure à 37°C). Si la PrPsc humaine du vMCJ (figure III-13) et de la MCJs ainsi que la souche 263K sont relativement résistantes à la protéinase K, la souche 6PB1 y est particulièrement sensible. La souche C506M3 ne montre pas de résistance particulière lorsqu'elle est éluee à partir du contrôle de l'adsorption, qui ne subit aucun procédé. En revanche, lorsqu'elle subit un double nettoyage par l'Aniosyme DD1 puis une digestion enzymatique à la protéinase K, le signal de la PrPres disparaît. Il est donc possible que le double nettoyage ait sensibilisé la protéine prion de cette souche à la digestion enzymatique.



**Figure III-16** : Détection indirecte par Western blot de la protéine prion résiduelle du MCJs et des souches animales 6PB1, 263K, C506M3 et 22L. (a) sans traitement des fils à la protéinase K, (b) après traitement des fils à la protéinase K.

NB : les résultats sont discordants pour le double nettoyage par l'Aniosyme DD1 sur la salissure MCJs avec et sans traitement à la protéinase K. Le faible signal observé sans traitement à la protéinase K est un artefact. Les résultats présentés sur la figure suivante le confirment.

Ces données sur la sensibilité variable, intrinsèque ou acquise, des souches à la digestion enzymatique posent la question de savoir si une digestion à la protéinase K est réellement judicieuse dans la problématique qui est la nôtre. En effet, cette digestion, nous permettant de contrôler la spécificité de la détection représente un risque de faux négatifs, comme l'illustre la situation observée pour la souche C506M3.

Il est néanmoins possible de minimiser ce risque en ayant recours à des digestions enzymatiques partielles par des concentrations croissantes de protéinase K [Fichet, *et al.* 2004]. Toutefois, cette option conduit à

une augmentation conséquente du nombre d'essais par souche et par procédé. C'est pourquoi, nous conduirons la validation des procédés de nettoyage et de désinfection sans traitement à protéinase K, ce dernier n'étant mené que pour vérifier la spécificité de la PrP<sup>sc</sup>.

### **Efficacité des procédés de nettoyage et de désinfection vis-à-vis des protéines prion humaines et animales:**

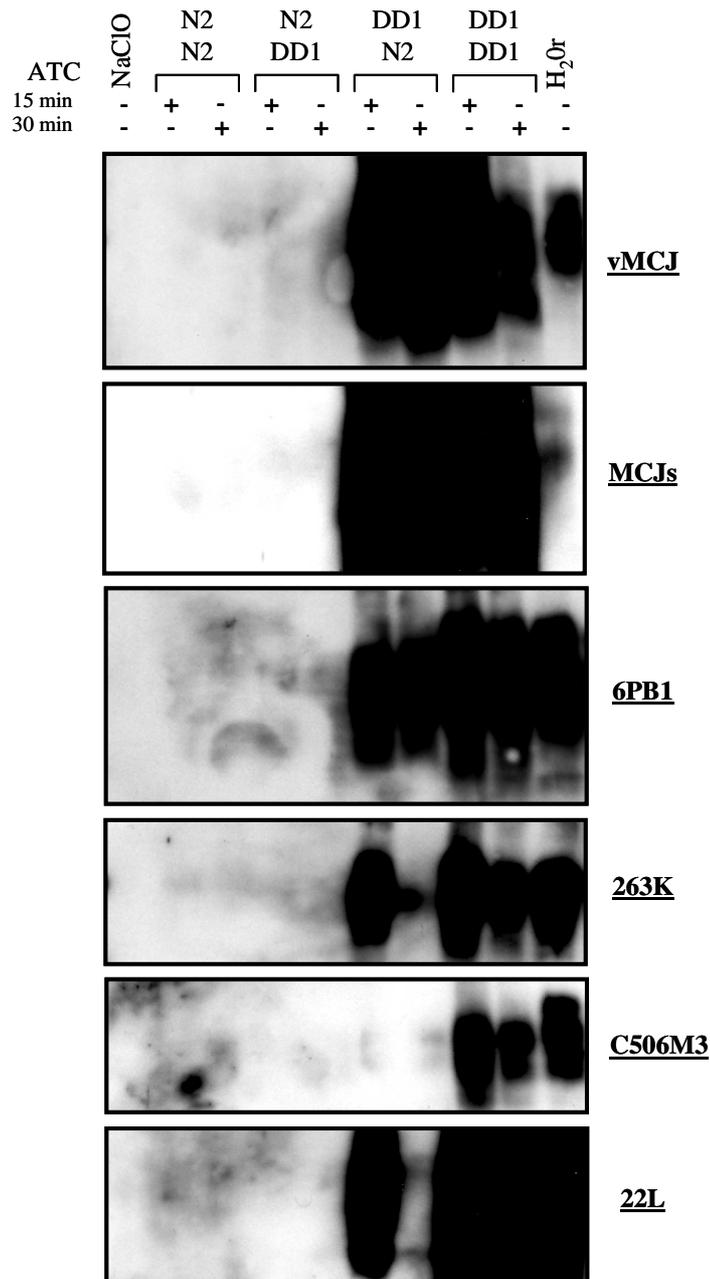
Compte tenu de la reproductibilité des résultats obtenus sur les trois procédés de nettoyage vis-à-vis des différentes protéines prion, nous proposons de valider ces procédés en prenant la phase de désinfection en considération. Un procédé de nettoyage supplémentaire est néanmoins ajouté : il s'agit du double nettoyage par l'Aniosyme DD1 puis par l'Aniosyme N2. L'Aniosyme DD1 étant un nettoyeur pré-désinfectant peu efficace en double nettoyage vis-à-vis de la protéine prion, il est possible que l'Aniosyme N2 en seconde intention permette d'améliorer l'efficacité du procédé compte tenu des performances de cette formulation. Cela permettrait donc de procéder au double nettoyage des DM avec une phase de pré-désinfection dès la première séquence.

La formulation désinfectante sélectionnée pour la validation *in vitro* des procédés de nettoyage et de désinfection est l'Anioxy Twin Cu (ATC). Deux temps de contact sont évalués pour la phase de désinfection. Bien que les désinfectants ne soient pas reconnus pour leur activité détergente, cela nous permet d'une part de déterminer l'incidence de la durée de la désinfection sur les procédés et d'autre part, de s'assurer d'une certaine reproductibilité du procédé. Parallèlement aux procédés, deux essais contrôles sont réalisés. Le premier consiste à traiter les fils d'acier inoxydable souillés par une solution d'hypochlorite de sodium (NaClO) à 2% pendant une heure à température ambiante. Le second contrôle négatif des procédés consiste à traiter les fils uniquement par l'eau du réseau servant aux dilutions des formulations.

Les radiographies des Western blot obtenus pour chacun des procédés évalués et pour chacune des souches étudiées sont présentées sur la figure III-17.

Ces résultats, obtenus dans le cadre de la validation des procédés de nettoyage et de désinfection sont identiques à ceux précédemment obtenus sur les procédés du double nettoyage. Les procédés mettant en oeuvre l'Aniosyme N2 dès la première séquence du nettoyage se montrent efficaces vis-à-vis des PrP<sup>sc</sup> en milieu lipidique cérébral, et ce indépendamment des souches testées.

Le procédé de nettoyage, introduit dans cette partie de l'étude et consistant en un double nettoyage par les Aniosyme DD1 puis N2, semble se montrer efficace sur la souche C506M3 alors qu'il ne l'est pas sur les autres souches. Ce résultat est en accord avec les observations faites précédemment sur la sensibilité de cette souche à la digestion enzymatique. En effet, sur la figure III-16, nous avons observé qu'après nettoyage par l'Aniosyme DD1, la souche semblait devenir sensible à la digestion enzymatique puisque qu'elle n'était plus détectée après le traitement par la protéinase K. De plus, nous avons pu observer une forte activité enzymatique de l'Aniosyme N2 sur la PrP<sup>sc</sup> (figure III-15). Compte tenu de ces observations, il est possible que le 1<sup>er</sup> nettoyage avec l'Aniosyme DD1 facilite la dégradation enzymatique de la PrP de la souche C506M3 lors du 2<sup>nd</sup> nettoyage par l'Aniosyme N2.



**Figure III-17 : Détection indirecte par Western blot de la protéine prion résiduelle des différentes formes humaines et animales ayant subi les procédés du double nettoyage par les Aniosyme N2 et DD1 ainsi qu'une phase de désinfection de 15 ou 30 minutes par l'Anioxy Twin Cu (ATC). Les contrôles NaClO 2% et H<sub>2</sub>O<sub>r</sub> sont inclus.**

Cependant, si ce procédé semble être efficace sur la souche C506M3, il n'en est pas ainsi pour les autres souches. En effet, le double nettoyage par les Aniosyme DD1 puis N2 ne se montre pas significativement plus performant que le double nettoyage par l'Aniosyme DD1. Compte tenu des performances observées pour l'Aniosyme N2, cela porte à croire que l'utilisation de l'Aniosyme DD1 en première intention « inhiberait » l'efficacité de l'Aniosyme N2. De plus, l'efficacité du double nettoyage par l'Aniosyme DD1 en première intention est rarement supérieure, voir même souvent inférieure, à l'efficacité de l'eau du réseau. Il semble donc que l'Aniosyme DD1 favorise plutôt la rétention de la PrP sur les surfaces que sa désorption. La présence de principes actifs antimicrobiens et notamment de biguanide pourrait être à l'origine de ce problème. En effet, dans le chapitre II, nous avons mis en évidence la rémanence des

principes actifs antimicrobiens sur les surfaces et l'adsorption réversible de l'ammonium quaternaire suite au rinçage. Or, les principes actifs antimicrobiens de l'Aniosyme DD1 étant le biguanide et l'ammonium quaternaire. Il est plus que probable que le biguanide soit responsable de la rétention de la protéine prion. De plus, en s'adsorbant de façon irréversible, il « inhiberait » l'efficacité du 2<sup>nd</sup> nettoyage par l'Aniosyme N2. La circulaire 591 relative aux modalités de traitement manuel pour la désinfection des endoscopes non autoclavables autorise l'utilisation de détergents/désinfectants si ces formulations sont exemptes d'aldéhyde. Compte tenu de nos observations, il semble que les aldéhydes ne soient pas les seuls principes actifs antimicrobiens à avoir des effets néfastes sur l'efficacité de la détergence des protéines et notamment des prions.

Concernant la durée de la phase de désinfection, elle ne semble pas avoir d'incidence majeure sur l'efficacité du procédé. Les radiographies des Western blot présentées pour les souches 263K et 22L montrent néanmoins une diminution significative du signal lorsque celles-ci subissent une désinfection de 30 minutes après le double nettoyage par les Aniosyme DD1 puis N2, comparativement à une désinfection de 15 minutes. Cependant, ces résultats n'ont pas été reproduits lors des essais de confirmation. Ceci conforte donc le fait que la désinfection ne participe pas à l'efficacité du nettoyage. Corrélée aux observations précédentes sur la présence de désinfectants dans les formulations de nettoyage, il semble même que la désinfection puisse compromettre l'efficacité de la détergence. Mafu Akier Assanta du Centre de Recherche et de Développement sur les Aliments d'agriculture et agroalimentaire de St Hyacinthe au Canada a écrit : « Un nettoyage sans désinfection ultérieure vaut mieux qu'une désinfection sans nettoyage préalable ».

**En résumé :**

**Le double nettoyage utilisant l'Aniosyme N2 en première intention est efficace vis-à-vis de la PrPsc en milieu lipidique cérébral indépendamment de la souche animale et du type de PrP humaine.**

**La souche C506M3 acquiert une sensibilité aux traitements enzymatiques à la suite du premier nettoyage.**

**L'aniosyme DD1 compromet les performances de l'Aniosyme N2 lorsqu'il est utilisé en première intention, suggérant un rôle inhibiteur des principes actifs antimicrobiens dans le procédé de nettoyage.**

**L'étape de désinfection n'optimise pas l'efficacité du procédé.**

**Les effluents du nettoyage :**

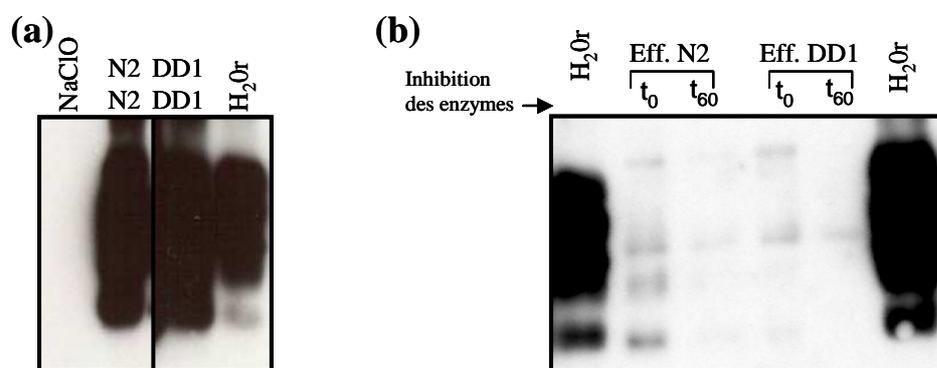
L'analyse des effluents du nettoyage permet non seulement de s'assurer du déplacement de la PrP de la surface du support, vers la solution de nettoyage, mais également de compléter l'interprétation des résultats obtenus sur les fils.

En raison de la présence d'enzymes dans les formulations Aniosyme N2 et DD1, il est nécessaire d'inhiber leur activité immédiatement après le nettoyage afin de ne pas introduire de biais dans la détection de la PrP dans les effluents. En effet, bien que la PrPsc soit partiellement résistante aux protéases, les influences conjointes des tensioactifs et du temps peuvent conduire à une dégradation complète de la PrPsc. Lors de la phase d'optimisation de la méthode, nous avons effectivement constaté une activité enzymatique importante dans la formulation N2 conduisant à la disparition du signal de la PrPsc d'un homogénat cérébral en fonction du temps (résultats non présentés). L'activité enzymatique est donc inhibée immédiatement après le nettoyage par chauffage des effluents à 100°C pendant 10 minutes.

D'un autre côté, il est tout de même intéressant de prendre en considération la dégradation de la PrPsc par les enzymes dans les effluents du nettoyage. Celle-ci pourrait effectivement participer à une inactivation

partielle des bains de nettoyage et faciliter le traitement ultérieur de ces effluents. Nous avons donc souhaité conduire une analyse des effluents dans ce sens. Pour cela, les effluents du nettoyage sont maintenus 60 minutes à température ambiante avant d'être chauffés à 100°C pendant 10 minutes. La confrontation des résultats obtenus sur les supports à ceux obtenus sur les effluents est primordiale. Ceci est d'autant plus vrai que l'on s'intéresse à l'efficacité des procédés de nettoyage qui consistent à déplacer une salissure d'une surface vers la solution de nettoyage (l'effluent).

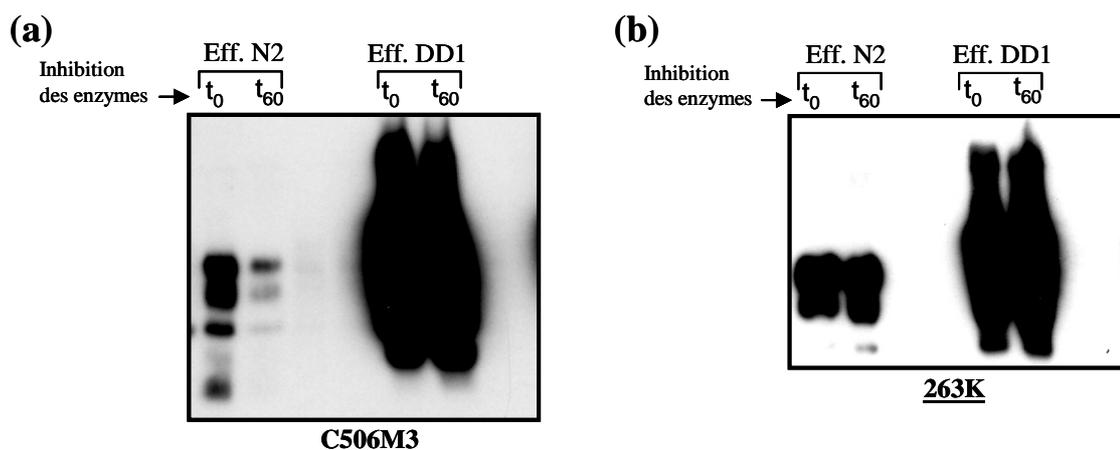
Sur un plan méthodologique, cette comparaison nous a permis de confirmer des points critiques de la méthodologie, notamment l'agitation mécanique. Lors d'un de nos essais, aucun des procédés de nettoyage testés ne présentaient d'efficacité quelconque vis-à-vis de la protéine prion. Peu de différence d'efficacité était observé entre le double nettoyage par l'Aniosyme N2 et celui par l'Aniosyme DD1. Le nettoyage par l'eau du réseau (H<sub>2</sub>O<sub>r</sub>) lui-même semblait plus efficace puisque l'intensité du signal était légèrement plus faible (figure III-18(a)).



**Figure III-18 : Western blot de la PrP (a) Détection de la PrP résiduelle sur support, (b) Détection de la PrP dans les effluents du nettoyage**

Afin de vérifier que la salissure avait bien été déplacée des supports vers les effluents, nous avons donc procédé à l'analyse de ces effluents par Western blot. La radiographie de cette analyse est présentée sur la figure III-18(b). Les résultats mettent en évidence la présence de PrP<sup>sc</sup> dans les effluents de l'eau du réseau (H<sub>2</sub>O<sub>r</sub>). En revanche, la quantité de PrP est très faible dans les effluents des formulations Aniosyme N2 et DD1, même lorsque l'activité enzymatique est inhibée tout de suite après la phase de nettoyage (t<sub>0</sub>). La mise en commun des résultats obtenus sur support et dans les effluents nous permet donc de conclure au déplacement de la salissure par l'eau du réseau. En revanche, les formulations Aniosyme N2 et DD1 n'ont pas permis un tel déplacement. Sachant que l'eau du réseau n'est pas reconnue pour son activité détergente (à température ambiante), nous avons conclu à un biais méthodologique identifié au niveau de l'hétérogénéité de l'agitation entre les essais. Cette analyse nous a donc non seulement permis d'optimiser nos conditions opératoires, mais elle nous a également évité une interprétation erronée de nos résultats.

Pour la compréhension des résultats obtenus sur support, l'étude des effluents nous a permis notamment de corroborer l'existence d'une sensibilité de la protéine prion aux protéases. Cette sensibilité semble également fonction de la composition des formulations. Nous avons précédemment observé une différence de sensibilité des souches animales à la digestion enzymatique avec notamment une sensibilité acquise pour la souche C506M3. L'analyse des effluents nous a permis de confirmer cette hypothèse. La figure III-19 présente les radiographies des Western blot réalisés à partir des effluents du 1<sup>er</sup> nettoyage sur les souches C506M3 (figure III-19 (a)) et 263K (figure III-19(b)).



**Figure III-19** : Recherche de la PrP par Western blot dans les effluents de nettoyage (a) souche C506M3, (b) souche 263K.

La comparaison des résultats obtenus dans les effluents d'Aniosyme N2 pour les deux souches considérées, suggère une sensibilité aux protéases de la souche C506M3 supérieure à celle de la souche 263K. En effet, lorsque l'activité enzymatique est inhibée seulement une heure après la fin du nettoyage, l'intensité du signal de la PrP pour la souche C506M3 diminue alors qu'elle reste pratiquement constante pour la souche 263K.

De la même façon, l'analyse de la PrP dans les effluents nous permet de vérifier le comportement différent de la formulation Aniosyme DD1 vis-à-vis de la salissure, comparativement à l'Aniosyme N2. Du fait de son profil électrophorétique, la PrP détectée dans les effluents de l'Aniosyme N2 correspond clairement à de la PrPres. Ainsi, les enzymes de la formulation Aniosyme N2, ou plus particulièrement les protéases, sont plus actives que dans l'Aniosyme DD1. Les compositions des formulations Aniosyme N2 et DD1 étant qualitativement identiques mais quantitativement différentes, il est probable que les quantités plus importantes en principes actifs antimicrobiens de l'Aniosyme DD1 perturbent l'activité enzymatique de la protéase.

Nous avons précédemment insisté sur les risques d'une interprétation erronée des résultats si celle-ci est conduite uniquement sur les supports. Ceci est également vrai pour les effluents. En effet, si l'on ne prend pas en compte les résultats obtenus sur les supports pour l'interprétation des résultats de la figure III-19, nous pourrions conclure que l'Aniosyme DD1 est plus performante que l'Aniosyme N2 pour la désorption de la PrPsc puisque les effluents de cette formulation sont plus riches en PrP. L'analyse des effluents pour l'évaluation des procédés de nettoyage est donc nécessaire mais pas suffisante.

La complémentarité des analyses sur supports et des effluents est mise en avant par les travaux de Lemmer *et al.* 2004 concernant la compréhension du mode d'action de divers procédés de nettoyage ou d'inactivation des prions. Dans notre étude, la confrontation des données obtenues sur supports et dans les effluents nous permet d'interpréter nos résultats non seulement en terme de détergence, mais également en terme d'inactivation (figure III-20). En effet, les modifications des profils électrophorétiques observées en Western blot traduisent une inactivation biologique partielle des prions par les enzymes.

<u>SUPPORTS</u>		<u>EFFLUENTS</u>		<u>INTERPRETATION</u>
Peu ou pas de modification du signal	+	Absence de signal	→	Procédé <b>inefficace</b> pour la <b>détergence</b>
Diminution du signal, sans modification du profil électrophorétique	+	Augmentation du signal, sans modification du profil électrophorétique	→	Procédé <b>efficace</b> pour la <b>détergence</b>
Diminution du signal, avec modification du profil électrophorétique	+	Légère augmentation du signal, avec modification du profil électrophorétique	→	Procédé <b>efficace</b> pour la <b>détergence</b> et <b>l'inactivation partielle des prions</b>

**Figure III-20 : Interprétation de l'efficacité des procédés en terme de détergence et d'inactivation des prions compte tenu des informations disponibles sur les supports et dans les effluents.**

Les effluents constituent une source riche d'informations pour une interprétation fiable et complète de l'efficacité des procédés de nettoyage évalués sur supports.

### III.2.4. Synthèse

Une méthodologie axée sur la détection indirecte de la protéine prion adsorbée sur fils d'acier inoxydable est disponible pour évaluer l'efficacité des procédés de nettoyage et/ou de désinfection vis-à-vis de la protéine prion.

La mise en œuvre de cette méthode nous a permis :

- De montrer l'efficacité des procédés du double nettoyage utilisant l'Aniosyme N2 en première intention ;
- D'évaluer cette efficacité vis-à-vis de la protéine prion :
  - du vMCJ et de la MCJs, en milieu lipidique cérébral ;
  - des souches animales 6PB1, 263K, C506M3 et 22L ;
- De confirmer l'incidence de la nature des salissures sur l'efficacité des procédés, les salissures exclusivement protéiques représentant sans aucun doute le pire des scénarios ;
- De mettre en évidence un comportement différent des souches, notamment de la souche C506M3, face à une sensibilisation à la digestion enzymatique ;
- De suggérer un rôle inhibiteur des principes actifs antimicrobiens de l'Aniosyme DD1 pour le nettoyage des surfaces notamment vis-à-vis du risque prion. Cependant, ces effets antagonistes peuvent être significativement réduits lorsque les surfaces sont préalablement nettoyées.

Cette méthodologie représente donc un pré-requis pertinent à la validation *in vivo* des procédés.

## IV. CONCLUSIONS

La démarche expérimentale mise en œuvre pour la sélection des formulations d'intérêt et la validation des procédés de nettoyage et/ou de désinfection s'est révélée particulièrement adaptée à notre problématique. En effet, la sélection des formulations par la méthode isotopique à l'iode 125 vis-à-vis de l'HSA et de l'HFN, ainsi que par la méthode de détection directe de la PrPres a permis que cette sélection soit réalisée selon le pire des scénarios. La mise en place de la méthode de détection indirecte de la PrPsc était néanmoins nécessaire pour :

- abaisser les limites de détection de la protéine prion résiduelle ;
- vérifier le comportement respectif des souches dans la phase de nettoyage ;
- confirmer la résistance des salissures protéiques aux procédés de nettoyage ;
- mettre en évidence les biais introduits par la digestion enzymatique à la protéinase K.

Le double nettoyage préconisé lors du traitement des DM s'avère être une mesure particulièrement pertinente en particulier lorsque les formulations présentent une activité exclusivement détergente.

Dans ce contexte du double nettoyage, l'utilisation consécutive des formulations Aniosyme N2 et DD1 semble être particulièrement prometteuse vis-à-vis du risque prion. Le pouvoir détergent de l'Aniosyme N2 assurerait l'efficacité du premier nettoyage et le pouvoir désinfectant de l'Aniosyme DD1, la sécurité du 2<sup>nd</sup>.

Cependant, bien que la quantité de PrPsc soit souvent corrélée à l'infectiosité, l'absence de PrPsc ne garantit pas totalement l'absence d'infectiosité. La preuve finale de l'efficacité du procédé ne pourra donc être établie que par des essais *in vivo* d'inoculation à l'animal. Il faudra alors déterminer la souche à inoculer.

## V. REFERENCES

**APPEL, T.R., WOLFF, M., VON RHEINBABEN, F., HEINZEL, M. and RIESNER, D.** (2001). Heat stability of prion rods and recombinant prion protein in water, lipid and lipid-water mixtures. *Journal of General Virology*. **82**: 465-473

**BALASUBRAMANIAN, V., GRUSIN, N., BUCHER, R., TUITTO, V. and SLACK, S.** (1999). Residence-time dependent changes in fibrinogen adsorbed to polymeric biomaterials. *Journal of Biomedical and Material Research*. **44**: 253-260

**BOLTON, D.C., MCKINLEY, M.P. and PRUSINER, S.B.** (1984). Molecular characteristics of the major scrapie prion protein. *Biochemistry*. **23**: 5898-906

**BOULANGE-PETERMANN, L., DOREN, A., BAROUX, B. and BELLON-FONTAINE, M.N.** (1995). Zeta potential measurements on passive metals. *Journal of Colloid and Interface Science*. **171**: 179-186

**BROWN, S.A., MERRITT, K., WOODS, T.O. and BUSICK, D.N.** (2005). Effects on instruments of the WHO-recommended protocols for decontamination after exposure to TSE-contaminated tissue. *Journal of Biomedical and Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. **72B**: 186-190

**CHEN, Y., ZHANG, X., GONG, Y., ZHAO, N., ZENG, T. and SONG, X.** (1999). Conformational changes of fibrinogen adsorption onto hydroxyapatite and titanium oxide nanoparticles. *Journal of Colloid and Interface Science*. **214**: 38-45

**DARBORD, J.C.** (2004). Importance of cleaning for reprocessing endoscopes and thermolabile sterile medical devices: French use and regulations. *J Hosp Infect*. **56 Suppl 2**: S40-3

**DURCHSCHLAG, H., TIEFENBACH, K.J., WEBER, R., KUCHENMÜLLER, B. and JAENICKE, R.** (2000). Comparative investigations of the molecular properties of detergents and protein-detergent complexes. *Colloid and Polymer Science*. **278**: 312-320

**ELWING, H. and GOLANDER, C.G.** (1990). Protein and detergent interaction phenomena on solid surfaces with gradients in chemical composition. *Advanced in Colloidal and Interface Science*. **32**: 317-339

**FICHET, G., COMOY, E., DUVAL, C., ANTLOGA, K., DEHEN, C., CHARBONNIER, A., McDONNELL, G., BROWN, P., LASMEZAS, C.I. and DESLYS, J.P.** (2004). Novel methods for disinfection of prion-contaminated medical devices. *Lancet*. **364**: 521-6

**FLECHSIG, E., HEGYI, I., ENARI, M., SCHWARZ, P., COLLINGE, J. and WEISSMANN, C.** (2001). Transmission of scrapie by steel-surface-bound prions. *Molecular Medicine*. **7**: 679-684

**GELAMO, E.L., SILVA, C.H.T.P., IMASATO, H. and TABAK, M.** (2002). Interaction of bovine (BSA) and human (HSA) serum albumins with ionic surfactants: spectroscopy and modelling. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1594**: 84-99

- HOOK, F., RODAHL, M., KASEMO, B. and BRZEZINSKI, P.** (1998). Structural changes in hemoglobin during adsorption to solid surfaces: effects of pH, ionic strength, and ligand binding. *Proc Natl Acad Sci USA*. **95**: 12271-12276
- JACKSON, G.S., HOSSZU, L.L., POWER, A., HILL, A.F., KENNEY, J., SAIBIL, H., CRAVEN, C.J., WALTHO, J.P., CLARKE, A.R. and COLLINGE, J.** (1999). Reversible conversion of monomeric human prion protein between native and fibrillogenic conformations. *Science*. **283**: 1935-7
- KAMPF, G., BLOSS, R. and MARTINY, H.** (2004). Surface fixation of dried blood by glutaraldehyde and peracetic acid. *J Hosp Infect*. **57**: 139-43
- KARLSSON, C.A.-C., WAHLGREN, M.C. and TRÄGARDH, A.C.** (1996). Beta-lactoglobulin fouling and its removal upon rinsing and by SDS as influenced by surface characteristics, temperature and adsorption time. *Journal of Food Engineering*. **30**: 43-60
- KURRAT, R., PRENOSIL, J.E. and RAMSDEN, J.J.** (1997). Kinetics of human and bovine serum albumin adsorption at silica-titania surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science*. **185**: 1-8
- LANIO, M.E., ALVAREZ, C., MARTINEZ, F.D., CASALLANOVO, F., SCHREIER, S., CAMPOS, A.M., ABUIN, E. and LISSI, E.** (2002). Effect of a zwitterionic surfactant (HPS) on the conformation and hemolytic activity of St I and St II, two isotoxins purified from *Stichodactyla helianthus*. *Journal of Protein Chemistry*. **21**: 401-405
- LASMEZAS, C.I., DESLYS, J.-P., DEMAIMAY, R., ADJOU, K.T., HAUW, J.J. and DORMOND, D.** (1996). Strain specific and common pathogenic events in murine models of scrapie and bovine spongiform encephalopathy. *Journal of General Virology*. **77**: 1601-1609
- LEMMER, K., MIELKE, M., PAULI, G. and BEEKES, M.** (2004). Decontamination of surgical instruments from prion proteins: in vitro studies on the detachment, destabilization and degradation of PrPSc bound to steel surfaces. *Journal of General Virology*. **85**: 3805-16
- LIN, S.-Y., WEI, Y.-S., HSIEH, T.-F. and LI, M.-J.** (2004). Pressure dependence of human fibrinogen correlated to the conformational alpha-helix to beta-sheet transition: an fourier transform infrared study microspectroscopic study. *Biopolymers*. **75**: 393-402
- MCDONNELL, G. and BURKE, P.** (2003). The challenge of prion decontamination. *Clinical Infectious Diseases*. **36**: 1152-1154
- MERRITT, K., HITCHINS, V.M. and BROWN, S.A.** (2000). Safety and cleaning of medical materials and devices. *Journal of Biomedical Materials Research*. **53**: 131-136
- NIX, P.** (2003). Prions and disposable surgical instruments. *International Journal of Clinical Practice*. **57**: 678-680
- NORDE, W.** (1986). Adsorption of proteins from solution at the solid-liquid interface. *Adv Colloid Interface Sci*. **25**: 267-340
- NORDE, W. and LYKLEMA, J.** (1991). Why proteins prefer interfaces. *J Biomater Sci Polym Ed*. **2**: 183-202
- NORDE, W.** (1995). Adsorption of proteins at solid-liquid interfaces. *Cells and Materials*. **5**: 97-112
- NORDE, W. and ZOUNGRANA, T.** (1998). Surface-induced changes in the structure and activity of enzymes physically immobilized at solid/liquid interfaces. *Biotechnol Appl Biochem*. **28 ( Pt 2)**: 133-43
- PAMULA, E., DE CUPERE, V., DUFRÊNE, Y.F. and ROUXHET, P.G.** (2004). Nanoscale organisation of adsorbed collagen: influence of substrate hydrophobicity and adsorption time. *Journal of Colloid and Interface Science*. **271**: 80-91

- REBEIX, V., SOMMER, F., MARCHIN, B., BAUDE, D. and MINH DUC, T.** (2000). Artificial tear adsorption on soft contact lenses: methods to test surfactant efficacy. *Biomaterials*. **21**: 1197-1205
- RICHARD, M., BIACABE, A.G., PERRET-LIAUDET, A., MCCARDLE, L., IRNSIDE, J.W. and KOPP, N.** (1999). Protection of personnel and environment against Creutzfeldt-Jakob disease in pathology laboratories. *Clinical and Experimental Pathology*. **47**: 192-200
- SOMERVILLE, R.A.** (2002). TSE agent strains and PrP: reconciling structure and function. *Trends in Biochemical Sciences*. **27**: 606-12
- TAYLOR, D.M.** (1995). Survival of mouse-passaged bovine spongiform encephalopathy agent after exposure to paraformaldehyde-lysine-periodate and formic acid. *Vet Microbiol*. **44**: 111-2
- TAYLOR, D.M., FERNIE, K. and MCCONNELL, I.** (1997). Inactivation of the 22A strain of scrapie agent by autoclaving in sodium hydroxide. *Veterinary Microbiology*. **58**: 87-91
- TAYLOR, D.M., FERNIE, K., MCCONNELL, I. and STEELE, P.J.** (1999). Survival of scrapie agent after exposure to sodium dodecyl sulphate and heat. *Vet Microbiol*. **67**: 13-6
- TAYLOR, D.M.** (2000). Inactivation of transmissible degenerative encephalopathy agents: a review. *The veterinary Journal*. **159**: 10-17
- TAYLOR, D.M.** (2001). Resistance of transmissible spongiform encephalopathy agents to decontamination. *Contrib Microbiol*. **7**: 58-67
- TIDWELL, C.D., CASTNER, D.G., GOLLEDGE, S.L., RATNER, B.D., MEYER, K., HAGENHOFF, B. and BENNINGHOVEN, A.** (2001). Static ToF-SIMS and XPS characterization of adsorbed albumin and fibronectin films. *Surface and Interface Analysis*. **31**: 724-733
- VADROT, C., BRANCHU, B., VERMILLAT, V., SINGERE, M. and DARBORD, J.C.** (2005). Rôle d'agents chimiques de désinfection dans la fixation de tissus nerveux sur les dispositifs médicaux réutilisables. *Zentral Sterilisation*. **13**: 65-68
- VAN DULM, P. and NORDE, W.** (1983). The adsorption of human plasma albumin on solid surfaces, with special attention to the kinetic aspects. *Journal of Colloid and Interface Science*. **91**: 248-255
- VERJAT, D., PROGNON, P. and DARBORD, J.C.** (1999). Fluorescence-assay on traces of protein on reusable medical devices: cleaning efficiency. *International Journal of Pharmaceutics*. **179**: 267-71
- WADSWORTH, J.D., JOINER, S., HILL, A.F., CAMPBELL, T.A., DESBRUSLAIS, M., LUTHERT, P.J. and COLLINGE, J.** (2001). Tissue distribution of protease resistant prion protein in variant Creutzfeldt-Jakob disease using a highly sensitive immunoblotting assay. *Lancet*. **358**: 171-80
- WAHLGREN, M.C. and ARNEBRANT, T.** (1991). Interaction of cetyltrimethylammonium bromide and sodium dodecyl sulfate with b-lactoglobulin and lysozyme at solid surface. *Journal of Colloid and Interface Science*. **142**: 503-511
- WEISSMANN, C.** (2002). Transmission of prions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **99**: 16378-16383
- YAN, Z.X., STITZ, L., HEEG, P., PFAFF, E. and ROTH, K.** (2004). Infectivity of prion protein bound to stainless steel wires: a model for testing decontamination procedures for transmissible spongiform encephalopathies. *Infect Control Hosp Epidemiol*. **25**: 280-3
- ZOBELEY, E., FLECHSIG, E., COZZIO, A., ENARI, M. and WEISSMANN, C.** (1999). Infectivity of scrapie bound to a stainless steel surface. *Molecular Medicine*. **5**: 240-243

**SOMMAIRE DU CHAPITRE IV**

**LES PROTAGONISTES DE LA DETERGENCE :  
ENZYMES ET PRINCIPES ACTIFS  
ANTIMICROBIENS**

<b>I. OBSERVATIONS SURFACIQUES .....</b>	<b>- 99 -</b>
I.1. METHODOLOGIE.....	- 100 -
I.2. OPTIMISATION DES PERFORMANCES PAR LES ENZYMES.....	- 100 -
I.3. MINIMISATION DES PERFORMANCES PAR LES PRINCIPES ACTIFS ANTIMICROBIENS .....	- 103 -
I.4. ROLE ET SPECIFICITE DES ENZYMES DANS LA DETERGENCE .....	- 105 -
I.5. INCIDENCE DE LA CONCENTRATION EN ENZYMES SUR L'EFFICACITE DE LA FORMULATION .....	- 108 -
I.6. SYNTHESE .....	- 108 -
<b>II. OBSERVATION EN MILIEU HOMOGENE SUR LA PROTEINE PRION.....</b>	<b>- 109 -</b>
II.1. OPTIMISATION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DE L'ANIOSYME N2.....	- 109 -
II.1.1. <i>Les facteurs chimiques</i> .....	- 109 -
II.1.2. <i>Les facteurs physiques</i> .....	- 116 -
II.2. MINIMISATION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE PAR LES PRINCIPES ACTIFS ANTIMICROBIENS DE L'ANIOSYME DD1 .....	- 118 -
II.3. SYNTHESE.....	- 120 -
<b>III. CONCLUSIONS .....</b>	<b>- 120 -</b>
<b>IV. REFERENCES.....</b>	<b>- 121 -</b>



## CHAPITRE IV

# LES PROTAGONISTES DE LA DETERGENCE : ENZYMES ET PRINCIPES ACTIFS ANTIMICROBIENS

L'efficacité d'une formulation de nettoyage réside dans la connaissance et la maîtrise des constituants qui la composent. Si parfois l'association de ces divers constituants améliore les performances de la formulation, il n'en est pas toujours ainsi. Dans les deux précédents chapitres, nous avons constaté, parmi les formulations testées, que les formulations enzymatiques présentaient les meilleures performances. Cependant, la présence de principes actifs antimicrobiens semble compromettre considérablement l'efficacité des formulations nettoyantes/pré-désinfectantes, notamment vis-à-vis du risque prion (Chapitre III).

Ce chapitre est consacré à l'étude de ces deux protagonistes de la détergence. Dans un premier temps, nous nous intéresserons à l'efficacité de l'activité enzymatique et plus particulièrement à l'activité des protéases vis-à-vis d'une salissure adsorbée sur une surface. En parallèle, nous montrerons l'effet antagoniste des principes actifs antimicrobiens dans la détergence. Ces travaux seront réalisés à l'aide de la technique XPS et de la méthode isotopique. Dans un second temps, nous nous intéresserons à l'activité enzymatique en milieu liquide et à son optimisation vis-à-vis de la protéine prion. Nous aurons pour cela, recours à la technique biochimique du Western blot.

### I. OBSERVATIONS SURFACIQUES

Parmi les formulations sur lesquelles nous avons travaillé, ce sont les formulations enzymatiques qui présentent les meilleures performances. En effet, les formulations retenues pour le double nettoyage des dispositifs médicaux (DM) sont deux formulations trienzymatiques : les Aniosyme N2 et DD1. Les enzymes entrant dans leur composition figurent dans le tableau IV-1. La protéase, la lipase et l'amylase sont des enzymes dont les substrats sont respectivement les protéines, les lipides et les polysaccharides. Dans le cadre de la détergence, l'activité simultanée de ces enzymes va favoriser la dégradation des composés organiques retrouvés dans les salissures complexes. Compte tenu du contexte de notre étude, nous nous sommes essentiellement focalisés sur l'activité enzymatique de la protéase.

**Tableau IV-1 : Composition enzymatique des formulations Aniosyme N2 et DD1**

Enzymes	Aniosyme N2 et DD1
Protéase	0,8%
Lipase	1%
Amylase	0,3%

Afin de connaître l'apport réel des enzymes dans l'efficacité de ces formulations, nous nous sommes posés les questions suivantes :

- La présence des enzymes améliore-t-elle les performances détergentes de la formulation ?
- Les enzymes, utilisées seules, présentent-elles un pouvoir détergent ?
- L'activité protéasique, dans la détergence, est-elle spécifique de son substrat ?
- Les enzymes agissent-elles sur les molécules adsorbées sur les surfaces ?
- Les molécules entrant dans la composition des formulations peuvent-elles avoir un rôle inhibiteur, direct ou indirect, sur l'activité protéasique ?

Pour répondre à ces questions, nous avons mis en œuvre les techniques et méthodes surfaciques présentées dans le chapitre II : la spectroscopie de photoélectrons (XPS) et la méthode isotopique à l'iode 125.

### I.1. Méthodologie

Les analyses XPS sont réalisées avec la source non monochromatisée d'aluminium (Al K $\alpha$  1486,6 eV). Deux couples salissures/substrats ont été étudiés :

- Homogénat de cerveau 10% (HC) sur substrat d'acier inoxydable AISI 304 : il s'agit du couple que nous considérons représentatif d'un DM souillé en raison de la nature complexe de la salissure. Les conditions d'adsorption et de nettoyage sont rappelées dans le tableau IV-2.
- Sérum Albumine Bovine (BSA) sur substrat d'oxyde de chrome : la BSA est choisie comme protéine modèle pour l'adsorption. Quant à l'oxyde de chrome, il est couramment utilisé et décrit comme un substrat de choix pour modéliser les propriétés de surface des aciers inoxydables. En effet, l'oxyde de chrome est le composant majoritaire des premières couches atomiques des aciers inoxydables (Rubio 2002, Karlsson 1996...). Les conditions d'adsorption et de nettoyage sont également présentées dans le tableau IV-2.

**Tableau IV-2 : Conditions opératoires pour la préparation des échantillons analysés par XPS**

Couple Salissure / Substrat	HC/AISI 304	BSA/oxyde de chrome
Adsorption par immersion	HC10% - 1h – Tamb – 50 rpm	BSA 1mg/ml – 1h – Tamb – 50 rpml
1 <sup>er</sup> Rinçage		Dilutions successives en H <sub>2</sub> O distillée
1 <sup>er</sup> Séchage	A l'air	Sous flux d'azote sec
Nettoyage	Les formulations et solutions sont testées à 0,5% en eau du réseau 15 minutes – Tamb – 50 rpm	
2 <sup>nd</sup> Rinçage	En eau du réseau	
2 <sup>nd</sup> Séchage	Sous flux d'azote sec	

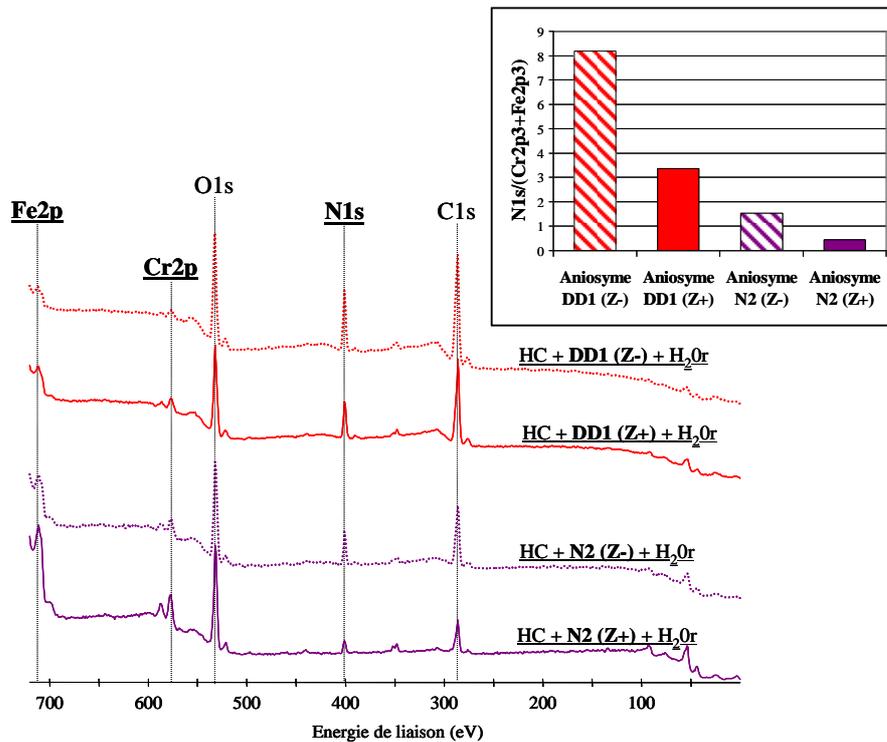
Concernant la méthode isotopique, le couple salissure/substrat étudié est celui présenté dans le chapitre II, à savoir la BSA-<sup>125</sup>I adsorbée sur des substrats d'acier inoxydable AISI 304. Nous n'avons pas eu recours aux substrats d'oxyde de chrome pour la méthode isotopique.

### I.2. Optimisation des performances par les enzymes

En XPS, une meilleure performance des formulations enzymatiques, comparativement à ces mêmes formulations ne contenant pas d'enzymes, doit se traduire par une diminution du signal de l'azote relatif aux éléments caractéristiques du substrat.

Bien que certaines molécules azotées, constitutives des formulations, aient tendance à rester adsorbées sur les surfaces et à contribuer au signal de l'azote détecté par XPS, nous ne chercherons pas à les discriminer par cette technique.

Dans un premier temps, nous avons comparé les performances des formulations Aniosyme N2 et DD1 avec et sans enzymes vis-à-vis du couple HC/AISI 304. Les spectres généraux obtenus sur ces surfaces ainsi que les rapports  $N1s/(Cr2p3 + Fe2p3)$  sont présentés sur la figure IV-1.



**Figure IV-1** : Spectres XPS généraux obtenus sur des substrats d'AISI 304 souillés par HC et nettoyés par les formulations Aniosyme N2 et DD1 avec (Z+) ou sans enzymes (Z-). Les performances de chacune des formulations sont traduites par le rapport  $N1s/(Cr2p3+Fe2p3)$  présenté sur le diagramme bâtons. La présence de protéase, d'amylase et de lipase améliore les performances des formulations.

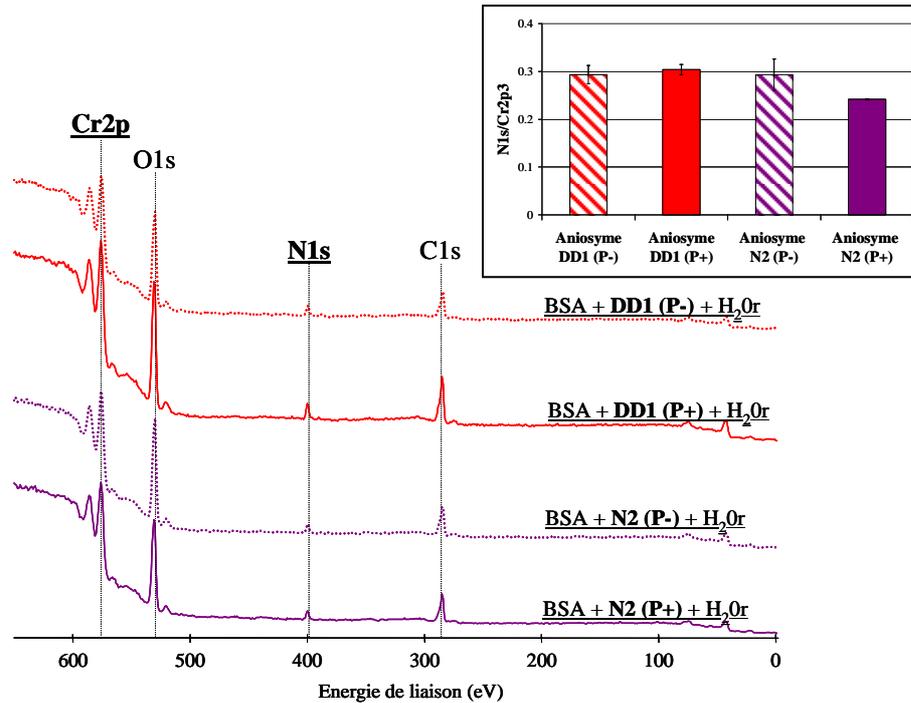
Concernant les formulations Aniosyme N2 et DD1 avec et sans enzymes, notées respectivement (Z+) et (Z-), les résultats qualitatifs présentés par les spectres généraux permettent d'observer à la fois les éléments caractéristiques du substrat (le chrome et le fer) ainsi que l'élément considéré comme caractéristique des protéines, l'azote. Les acquisitions centrées sur les niveaux de cœur 2p du chrome et du fer ainsi que sur le niveau de cœur 1s de l'azote ont permis de calculer le rapport  $N1s/(Cr2p3 + Fe2p3)$ . Plus ce rapport est faible, moins il y a d'azote à la surface du substrat et donc plus la formulation est performante.

Ce rapport, calculé pour les deux formulations Aniosyme N2 et DD1, est plus faible lorsque la formulation est tri-enzymatique. La présence des enzymes dans les formulations permet effectivement d'en améliorer les performances et cela se traduit sur la surface nettoyée par une quantité moins importante d'azote résiduel.

Les enzymes présentes dans les formulations sont des protéases, lipases et amylases qui vont dégrader respectivement les protéines, les lipides et les polysaccharides. Face à une salissure complexe,

l'élimination de certains constituants va influencer celle des autres. On a pu constater, par exemple, que l'élimination des lipides favorisait également celle des protéines. C'est pourquoi, nous avons souhaité, dans un deuxième temps, évaluer la spécificité de l'activité enzymatique et plus particulièrement celle de la protéase.

Nous avons donc comparé les performances des formulations Aniosyme N2 et DD1 avec et sans protéase vis-à-vis du couple BSA/oxyde de chrome. L'utilisation de la BSA et d'une couche d'oxyde de chrome permet de modéliser le couple précédent et de se focaliser sur l'activité enzymatique de la protéase vis-à-vis d'une protéine adsorbée. Les spectres généraux obtenus pour ce couple ainsi que les rapports N1s/Cr2p3 sont présentés sur la figure IV-2.



**Figure IV-2 :** Spectres XPS généraux obtenus sur de la BSA adsorbée sur des substrats d'oxyde de chrome, nettoyés par les formulations Aniosyme N2 et DD1 avec (P+) ou sans protéase (P-). Les performances de chacune des formulations sont traduites par le rapport N1s/Cr2p3 présenté sur le diagramme bâtons (moyenne  $\pm$  écart-type pour n=2). La présence de protéase améliore seulement les performances de l'Aniosyme N2.

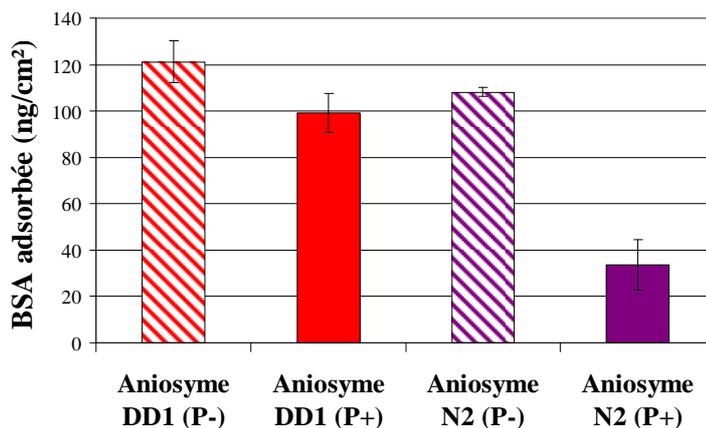
Comme précédemment, les résultats qualitatifs présentés par les spectres généraux permettent d'observer à la fois l'élément caractéristique du substrat (le chrome) ainsi que l'élément caractéristique des protéines, l'azote. Le rapport N1s/Cr2p3 est calculé et montre que la présence de protéase n'a pas d'effet significatif sur les performances de l'Aniosyme DD1. Une amélioration de la performance de l'Aniosyme N2 est cependant observée en présence de protéase puisque le rapport diminue.

Les Aniosyme N2 et DD1 sont deux formulations qualitativement identiques mais quantitativement différentes. Néanmoins, elles contiennent la même protéase et en même quantité. Or, d'après nos résultats, il semblerait que la protéase, formulée dans l'Aniosyme DD1 perde son activité. Deux hypothèses non exclusives sont envisagées :

- Certaines molécules constitutives de l'Aniosyme DD1 pourraient inhiber l'activité de la protéase ;
- L'adsorption des principes actifs antimicrobiens sur la surface d'oxyde de chrome pourrait « masquer » l'effet de l'activité protéasique.

En effet, nous avons constaté que les principes actifs antimicrobiens de l'Aniosyme DD1 restaient adsorbés sur les substrats d'AISI 304 nettoyés (Chapitre II). Il est donc possible que l'azote détecté provienne en partie des molécules de principes actifs antimicrobiens. La seconde hypothèse n'exclut cependant pas la première puisqu'il est également possible que ces principes actifs antimicrobiens inhibent l'activité enzymatique de la protéase avant même de s'adsorber sur les surfaces. Les résultats obtenus dans le cas de l'Aniosyme N2 ne permettent pas de trancher puisque les principes actifs antimicrobiens sont très peu représentés et par conséquent ne persistent pas sur les surfaces (figure II-10). Pour la même raison, ils n'entraîneraient pas d'inhibition de l'activité enzymatique.

Afin d'aller plus loin dans la compréhension de ces résultats, nous avons eu recours à la méthode isotopique sur de la BSA-<sup>125</sup>I adsorbée sur substrat d'AISI 304. Le changement de substrat est justifié par le fait que l'adsorption des principes actifs antimicrobiens sur le substrat d'AISI 304 a précédemment été observée. La méthode isotopique, permettant de quantifier la quantité de protéines adsorbées résiduelles, nous permet de montrer que la présence de la protéase dans l'Aniosyme DD1 améliore les performances de la formulation (figure IV-3). Ceci va donc dans le sens de la seconde hypothèse émise. La rémanence des principes actifs antimicrobiens sur la surface contribue donc au signal de l'azote et de ce fait masque les effets de l'activité protéasique de cette formulation. Cependant, l'amélioration des performances de l'Aniosyme N2 par la protéase est largement plus significative que celle observée pour l'Aniosyme DD1. Il est donc aussi probable que les principes actifs antimicrobiens soient néfastes pour l'activité enzymatique.



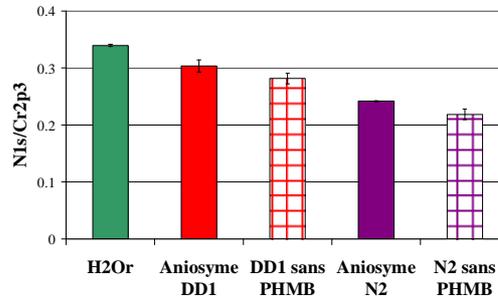
**Figure IV-3 : Quantité de BSA résiduelle sur substrats d'AISI 304 nettoyés par les formulations Aniosyme N2 et DD1 avec (P+) ou sans (P-) protéase (moyenne  $\pm$  écart-type pour n=3). Les protéases sont actives dans les deux formulations mais à moindre efficacité dans l'Aniosyme DD1.**

Les enzymes jouent donc un rôle important dans les Aniosyme N2 et DD1 puisqu'elles peuvent significativement améliorer les performances des formulations. Ces améliorations peuvent cependant vite être limitées par les interactions existant entre les molécules entrant dans la composition de ces formulations. L'exemple de l'Aniosyme DD1 traité ici semble définir le compromis existant entre la détergence et la désinfection.

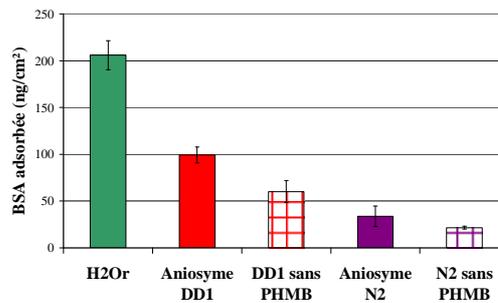
### I.3. Minimisation des performances par les principes actifs antimicrobiens

La plupart de nos données convergent vers l'idée que le biguanide, plus précisément le polyhexaméthylène biguanide (PHMB), est le principe actif antimicrobien le plus néfaste envers

l'efficacité des formulations. Pour confirmer l'effet antagoniste du PHMB dans la détergence, nous avons suivi la même démarche que précédemment. Nous avons donc comparé les performances des formulations Aniosyme N2 et DD1 avec et sans PHMB. Les rapports N1s/Cr2p3 calculés à partir des données XPS pour chacune des formulations sont présentés sur la figure IV-4. Les résultats obtenus par la méthode isotopique sont présentés sur la figure IV-5.



**Figure IV-4 :** Rapport N1s/Cr2p3 obtenu sur le couple BSA/oxyde de chrome nettoyé par les formulations Aniosyme DD1 et N2 avec ou sans polyhexaméthylène biguanide (PHMB)



**Figure IV-5 :** Quantité de BSA résiduelle sur substrats d'AISI 304 nettoyés par les formulations Aniosyme N2 et DD1 avec ou sans polyhexaméthylène biguanide (PHMB). Le contrôle H<sub>2</sub>O est présenté pour comparaison. Le PHMB minimise les performances des Aniosyme DD1 et N2.

La différence observée entre les rapports N1s/Cr2p3 obtenus pour l'Aniosyme DD1 avec et sans PHMB n'est pas significativement différente, comparativement à celle observée pour l'Aniosyme N2 (figure IV-4). Le PHMB est peu présent dans l'Aniosyme N2 par rapport à l'Aniosyme DD1. Pourtant, le rapport N1s/Cr2p3 diminue de 12% lorsque le PHMB est omis de l'Aniosyme N2 alors qu'il ne diminue que de 7% pour l'Aniosyme DD1. Néanmoins, dans les deux cas, l'absence de PHMB abaisse le rapport N1s/Cr2p3.

La méthode isotopique en revanche montre une réduction significative des quantités résiduelles de BSA adsorbée en l'absence de PHMB (figure IV-5). Auparavant, et compte tenu que l'Aniosyme DD1 contient 25 fois plus de PHMB que l'Aniosyme N2, les différences d'efficacité observées entre ces deux formulations sont déjà une indication de l'effet antagoniste du biguanide. A présent, si le PHMB est omis dans chacune de ces deux formulations, on observe dans les deux cas une diminution de la quantité de BSA adsorbée. Pour l'Aniosyme DD1 sans PHMB, la quantité de BSA adsorbée diminue de 39% par rapport à cette même formulation en présence de PHMB. Pour l'Aniosyme N2, la quantité de BSA est réduite de 36%.

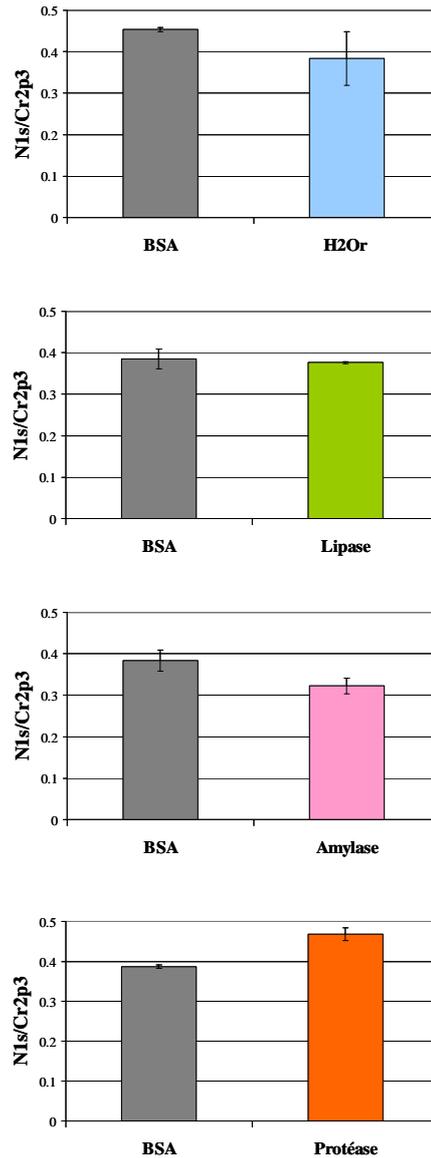
Ces résultats montrent que le PHMB est néfaste vis-à-vis des performances des formulations, et ce même lorsqu'il est formulé en très faible quantité, comme c'est le cas pour l'Aniosyme N2.

#### I.4. Rôle et spécificité des enzymes dans la détergence

Les enzymes ou plus particulièrement les protéases, lorsqu'elles sont formulées, améliorent les performances des produits et ceci se traduit sur la surface par une diminution de la quantité de protéines résiduelles. Comment expliquer cette synergie ?

- Une simple solution d'enzymes, non formulée, pourrait présenter une activité détergente intrinsèque, qui s'ajouterait aux propriétés détergentes initiales de la formulation. Ceci est peu probable puisque les enzymes sont également des protéines. Elles auraient donc plutôt tendance à s'adsorber sur les surfaces.
- Les tensioactifs de la formulation permettant de désorber les protéines, les protéases pourraient alors les dégrader en solution limitant ainsi leur éventuelle réadsorption. Cependant, compte tenu des résultats présentés dans le chapitre III, il semble fort probable que les protéases agissent également sur les protéines adsorbées. En effet, nous avons observé que la protéine prion résiduelle, après nettoyage par la formulation Aniosyme N2, présentait les caractéristiques électrophorétiques de la PrPres (figure III-15). Ces résultats suggèrent donc une digestion enzymatique sur la PrPsc adsorbée à la surface des fils d'acier inoxydable. Dans ce contexte, la présence de tensioactifs permettrait la désorption des complexes protéines-protéases ou des peptides résiduels, plus solubles.

Dans le but d'infirmer et de confirmer respectivement ces hypothèses, nous avons utilisé le couple BSA/oxyde de chrome et traité ces substrats par des solutions de lipase, d'amylase et de protéase non formulées, les concentrations en enzymes étant les mêmes que celles utilisées pour les formulations Aniosyme N2 et DD1. Les propriétés détergentes des solutions enzymatiques sont comparées à celle de l'eau du réseau (H<sub>2</sub>O). Les résultats obtenus sont présentés dans la figure IV-6 et montrent que les solutions de lipases et d'amylases ne présentent pas d'activité détergente puisque la réduction du rapport N1s/Cr2p3 n'est pas plus importante que celle observée pour l'eau du réseau, comparativement au rapport calculé avant traitement (BSA).

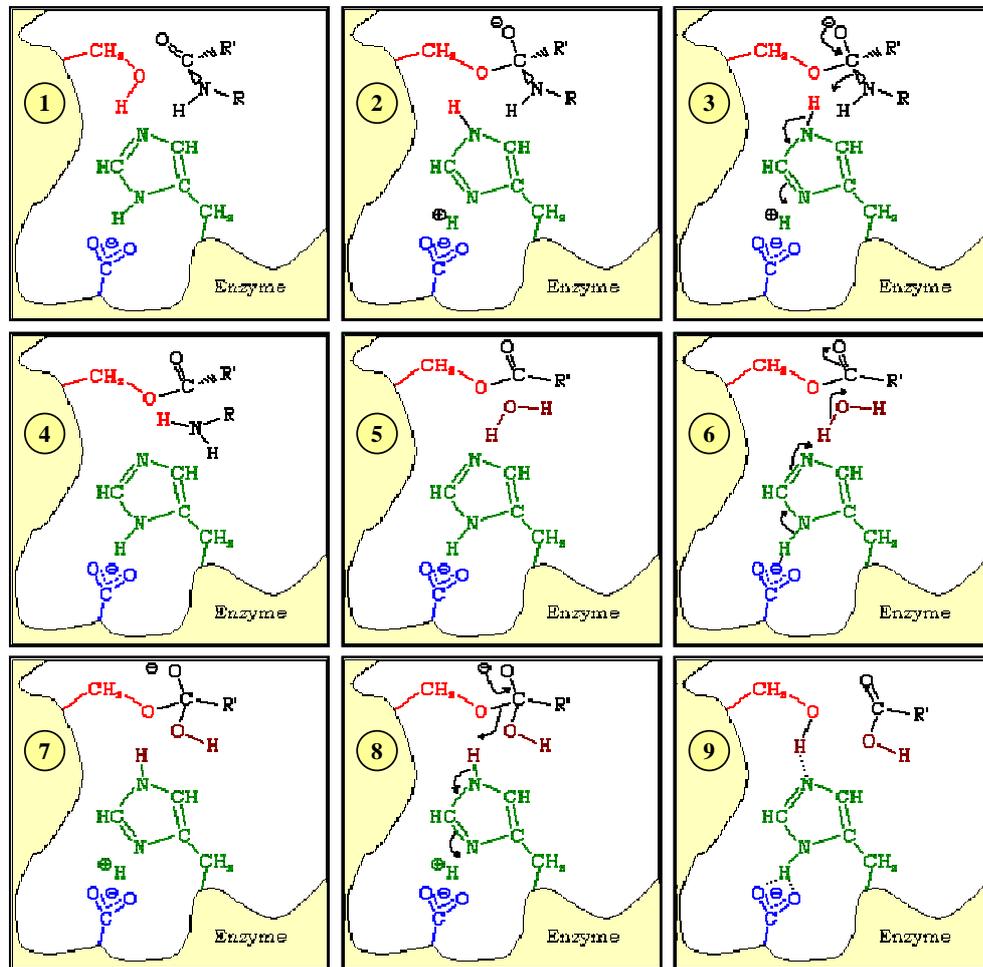


**Figure IV-6 :** Rapports N1s/Cr2p3 obtenus le couple BSA/oxyde de chrome nettoyé par des solutions de lipase, amylase et protéase non formulées. Leurs performances sont comparées à celle de l'eau du réseau (H<sub>2</sub>O<sub>r</sub>). Les rapports N1s/Cr2p3 obtenus pour la BSA adsorbée, avant traitement, sont également présentés (BSA). Les enzymes ne présentent pas d'activité détergente supérieure à celle de H<sub>2</sub>O<sub>r</sub>.

En revanche, ce rapport augmente lorsque le couple BSA/oxyde de chrome est traité par la solution de protéase. Cette augmentation du rapport s'explique par l'adsorption de la protéase sur la BSA, elle-même adsorbée sur l'oxyde de chrome. Cette observation confirme donc l'activité surfacique de la protéase et met également en évidence la spécificité des interactions enzymes-substrats. En effet, cette interaction protéase-BSA est supposée spécifique de l'interaction enzyme-substrat étant donné que la lipase et l'amylase qui sont également des protéines ne restent pas adsorbées sur la BSA.

Les protéases sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse de la liaison peptidique. La protéase étudiée est une endoprotéase et plus particulièrement une protéase à sérine. Les endoprotéases catalysent l'hydrolyse des protéines au niveau de sites internes spécifiques. Cette spécificité est assurée par la nature des acides aminés formant la poche catalytique. Pour la classe des protéases à sérine, cette poche catalytique est

souvent définie par les acides aminés histidine (H), sérine (S) et acide aspartique (D). On parle de la triade catalytique HSD. Le mécanisme de l'hydrolyse des protéines catalysée par les protéases à sérine est schématisé sur la figure IV-7.



**Figure IV-7 :** Exemple du mécanisme réactionnel de l'hydrolyse d'une liaison peptidique catalysée par une protéase à sérine (<http://chimie.scola.ac-paris.fr/>). La triade catalytique HSD et son substrat sont représentés, en vert : l'histidine (H) ; en rouge : la sérine (S) ; en bleu : l'acide aspartique (D) et en noir : le substrat.

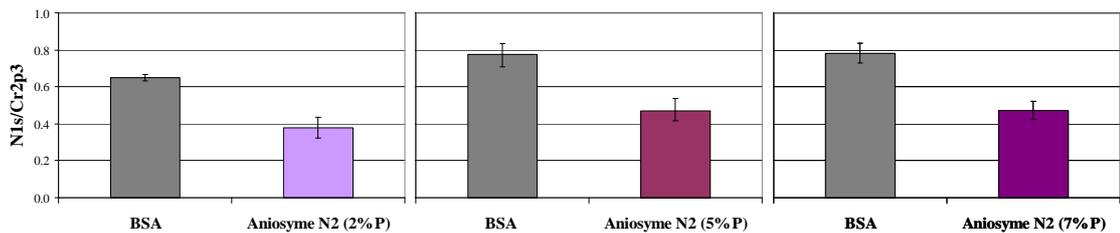
Le mécanisme réactionnel, proposé en exemple, permet d'observer la formation d'un intermédiaire covalent entre l'enzyme et son substrat: la fonction alcool de la sérine (en rouge) forme une liaison ester avec la fonction amide du substrat (en noir). Il est donc possible d'expliquer l'augmentation du rapport N1s/Cr2p3 par l'existence de cet intermédiaire réactionnel puisque la liaison covalente ne peut être rompue par un simple rinçage à l'eau. Il semble donc que les protéases puissent agir directement sur la surface lorsque leur substrat y est adsorbé.

D'autre part, ces résultats, obtenus pour des solutions d'enzymes non formulées mettent en évidence le rôle majeur des tensioactifs. En effet, compte tenu que pour un temps de contact équivalent, le rapport N1s/Cr2p3 diminue lorsque la protéase est formulée, ce sont vraisemblablement les tensioactifs qui vont permettre d'accélérer la vitesse de réaction et/ou favoriser la désorption du complexe enzyme-substrat. Il existe donc un effet synergique entre l'activité enzymatique et les tensioactifs.

### I.5. Incidence de la concentration en enzymes sur l'efficacité de la formulation

La protéase formulée dans l'Aniosyme N2 améliore considérablement les performances de cette formulation vis-à-vis des protéines adsorbées en agissant directement sur la surface. Dans le souci constant de vouloir optimiser l'efficacité des formulations, on peut se demander si l'augmentation de la concentration de protéases dans la formulation s'accompagne d'une amélioration des performances vis-à-vis des protéines adsorbées.

Pour cela, nous avons comparé par XPS les rapports N1s/Cr2p3 obtenus à partir du couple BSA/oxyde de chrome avant (BSA) et après 15 minutes de nettoyage par les formulations d'Aniosyme N2 contenant des concentrations croissantes de protéases, de 2%, 5% et 7%. Ces rapports sont présentés sur la figure IV-8.



**Figure IV-8 : Rapports N1s / Cr2p3 pour le couple BSA/oxyde de chrome avant nettoyage (BSA) et après nettoyage par la formulation Aniosyme N2 contenant 2% (2%P), 5% (5%P) et 7% (7%P) de protéases. L'augmentation de la concentration en protéase dans la formulation Aniosyme N2 ne permet pas d'améliorer ses performances dans le cadre d'un nettoyage de 15 minutes.**

Les rapports N1s/Cr2p3 calculés pour le couple BSA/oxyde de chrome (BSA) avant nettoyage sont plus élevés que ceux calculés après le nettoyage. Cela confirme donc une diminution de la quantité d'azote sur la surface et donc une diminution de la quantité de BSA adsorbée lorsque les substrats sont nettoyés. Cependant, pour les trois concentrations de protéases testées, les réductions observées de ce rapport sont environ de 40%. Augmenter les concentrations en protéases de la formulation Aniosyme N2 n'a donc pas d'effet significatif, en 15 minutes, sur ses performances vis-à-vis des protéines adsorbées.

La notion du temps de nettoyage est un facteur important lorsque l'on s'intéresse à l'activité enzymatique. Une diminution de la quantité de protéines adsorbées en fonction des concentrations croissantes de protéases serait probablement observée pour des temps de contact plus long. Compte tenu des recommandations sur la durée du nettoyage des DM qui est fixé dans sa globalité à 15 minutes, nous n'avons pas souhaité vérifier cette hypothèse. De plus, l'utilisation excessive de protéase dans les formulations génère des risques d'allergies pour les manipulateurs [Rosenberg et Gervais 1987, Tripathi et Grammer 2001].

### I.6. Synthèse

Ces travaux montrent à nouveau la complémentarité de la technique XPS et de la méthode isotopique pour une meilleure compréhension des interactions possibles entre les protéines, les surfaces et les composés constitutifs des formulations.

En effet, un certain nombre de réponses sur le rôle et le mode d'action des enzymes, et notamment des protéases, vis-à-vis des protéines adsorbées ont été apportées par la mise en œuvre de l'XPS et de la méthode isotopique. Les enzymes sont des composants particulièrement actifs dans la définition d'une formulation performante. Elles participent à l'élimination des salissures qui leur sont spécifiques et

peuvent agir sur les surfaces. Néanmoins, elles ne sont pas suffisantes. Vis-à-vis de la surface, une solution d'enzymes ne montre pas d'activité détergente supérieure à celle de l'eau de réseau. Il est donc nécessaire de les formuler pour pouvoir observer le bénéfice apporté par ces molécules. Cependant, si la présence de composés détergents favorise leur activité, il semble en être autrement en présence de principes actifs antimicrobiens.

## **II. OBSERVATION EN MILIEU HOMOGENE SUR LA PROTEINE PRION**

L'addition d'enzymes dans les produits nettoyants et/ou pré-désinfectants est devenue courante puisqu'elle permet d'améliorer considérablement les performances des formulations. Dans le cadre des maladies à prions, l'efficacité du nettoyage est un enjeu majeur pour limiter les risques de transmission. Compte tenu de la synergie observée précédemment entre les protéases et la formulation vis-à-vis des protéines adsorbées, il paraît important d'optimiser l'activité enzymatique vis-à-vis de la protéine prion. Les techniques surfaciques mises en œuvre précédemment ne pouvant être appliquées spécifiquement aux risques prions, nous proposons d'étudier l'activité enzymatique des formulations en milieu liquide. Cette approche nous permettra de déterminer l'influence des facteurs chimiques et physiques sur la dégradation enzymatique de la PrP. Nous montrerons également l'effet antagoniste du principe actif antimicrobien sur l'activité enzymatique de la formulation Aniosyme N2.

### **II.1. Optimisation de l'activité enzymatique de l'Aniosyme N2**

Compte tenu de son efficacité dans les procédés de nettoyage et de son activité enzymatique, il est opportun de s'intéresser à la formulation Aniosyme N2 pour chercher à optimiser cette activité enzymatique. Nous étudierons essentiellement deux types de facteurs pouvant influencer sur son activité enzymatique : les facteurs chimiques et physiques. Ces derniers, que sont la température et le pH, sont extrêmement importants puisqu'ils conditionnent l'activité enzymatique. Cependant, nos contraintes de travail sont définies par les conditions d'utilisation des formulations (pH neutre, température ambiante). Ces deux paramètres ne seront donc étudiés, après optimisation des autres facteurs, que dans des gammes limitées de pH et de température.

#### ***II.1.1. Les facteurs chimiques***

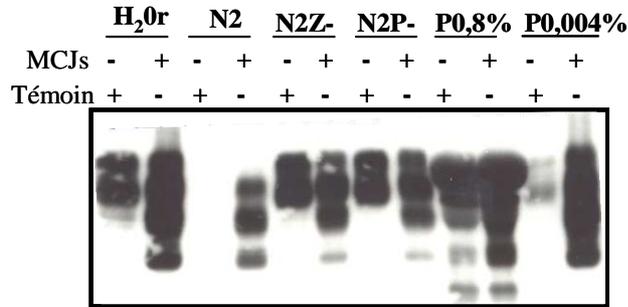
Dans ce travail, les facteurs chimiques représentent les molécules entrant dans la composition de l'Aniosyme N2. Dans un premier temps, et compte tenu de sa complexité, nous focaliserons notre attention sur les tensioactifs et le séquestrant. Dans un deuxième temps, nous nous intéresserons à l'incidence d'une augmentation de la concentration en enzymes sur la dégradation de la protéine prion, ainsi qu'à l'activité de différentes protéases, seules ou en association.

Nous avons montré, dans la première partie de ce travail, que la protéase de la formulation Aniosyme N2 pouvait agir sur la surface du matériau et que le fait d'être formulée favorisait son activité et/ou la désorption du complexe enzyme-substrat. Afin de déterminer le rôle de la formulation sur l'activité enzymatique, nous avons incubé des homogénats de cerveau de MCJs et de cerveau sain (Témoin) en présence soit de la formulation Aniosyme N2 (N2), soit de la protéase non formulée (P0,004%).

Les essais contrôles sont :

- L'eau du réseau (H<sub>2</sub>O<sub>r</sub>) servant à la dilution des formulations et de la protéase ;
- L'Aniosyme N2 sans les enzymes (N2Z-);
- L'Aniosyme N2 sans la protéase (N2P-)
- La protéase à 0,8% correspondant à la quantité de protéase dans l'Aniosyme N2 concentré.

Les résultats obtenus sont présentés sur la figure IV-9. Le contrôle H<sub>2</sub>O<sub>r</sub> permet d'observer la PrPc dans l'homogénat Témoin et, à la fois la PrPc et la PrPsc dans l'homogénat MCJs. Lorsque les homogénats sont traités par la formulation Aniosyme N2, on observe la disparition du signal de la PrPc dans l'homogénat témoin et la présence de la PrPres dans l'homogénat MCJs. Ces résultats sont en parfait accord avec la sensibilité de la PrPc et la résistance partielle de la PrPsc à la digestion enzymatique. Les contrôles N2Z- et N2P- confirment que les enzymes, et plus spécifiquement la protéase, sont responsables de la digestion complète et partielle de la PrPc et de la PrPsc respectivement.



**Figure IV-9** : Western blot de la PrPc (Témoin) et de la PrPsc (MCJs) suite au traitement par l'Aniosyme N2 (N2) et par la protéase non formulée (P0,004%). Les essais contrôles sont H<sub>2</sub>O<sub>r</sub> : eau du réseau, N2Z- : Aniosyme N2 sans enzyme, N2P- : Aniosyme N2 sans la protéase et P0,8% : la protéase dans l'Aniosyme N2 concentré. L'activité protéasique est responsable de la digestion complète de la PrPc et de la dégradation partielle de la PrPsc en PrPres. Cependant, la protéase seule est moins active que la protéase formulée.

Si on considère à présent l'activité de la protéase P0,004% non formulée, on constate que la dégradation de la PrPc n'est pas totale et ceci est corroboré par les résultats obtenus sur la PrPsc puisque les poids moléculaires des différentes glycoformes ne sont que partiellement diminués. Ainsi, ces données montrent que l'activité protéasique est améliorée lorsque les enzymes sont formulées.

C'est donc en raison de cette synergie que nous souhaitons optimiser l'activité enzymatique des formulations vis-à-vis de la protéine prion.

Lorsque l'on s'intéresse à la dégradation enzymatique des prions dans le cadre de la détergence, il convient, dans un premier temps, de prendre en considération le rapport entre le volume de la formulation et celui de la salissure. Ce rapport nous permet de modéliser le volume des bains de nettoyage par rapport à la surface des dispositifs médicaux. Compte tenu du matériel à notre disposition et de la praticabilité des essais, nous avons attribué à ce rapport une valeur de 100. Dans ces conditions, la salissure est donc diluée au 1/100<sup>ème</sup> dans la formulation considérée. Il faut donc, dans un deuxième temps, avoir recours à une technique de précipitation des protéines pour pouvoir détecter la protéine prion en Western blot. De plus, comme nous l'avons précisé dans le chapitre III, il est nécessaire d'inhiber l'activité des enzymes de la formulation pour ne pas introduire de biais dans la détection de la protéine prion au temps « t » considéré. Pour nous conformer au mode d'inhibition rapporté dans la littérature, nous aurons essentiellement recours à l'inhibition par la chaleur [Jackson, *et al.* 1999, McLeod, *et al.* 2004]. Acidifier le pH de la solution sera néanmoins une alternative à ce mode d'inhibition.

Ces travaux sont réalisés à partir d'un homogénat de cerveau 10% (HC) d'une MCJs. Un volume d'HC (10 µl) est incubé en présence de 100 volumes de la formulation considérée pendant 15 minutes à température ambiante sous agitation 3D à 50 rpm. Après avoir inhibé l'activité enzymatique et précipité la protéine prion par l'acide phosphotungstique, celle-ci est détectée par Western blot avec ou sans traitement préalable à la protéinase K. Ce traitement par la protéinase K nous permet de disposer d'un contrôle PrPres. L'anticorps anti-PrP utilisé est le 3F4. Toutes les formulations étudiées sont préparées sur la base de l'Aniosyme N2. Les enzymes de la formulation sont les mêmes que précédemment, à

savoir la lipase, l'amylase et la protéase. Dans le cadre de cette étude, chaque enzyme est formulée à 2% dans l'Aniosyme N2 concentrée. Les seules variables sont, dans un premier temps, les tensioactifs et le séquestrant. Les résultats obtenus pour les divers tensioactifs testés seront comparés à ceux obtenus par la formulation Aniosyme N2, considérée comme la formulation de référence.

Les tensioactifs et le séquestrant de l'Aniosyme N2 :

Deux tensioactifs et un séquestrant entrent dans la composition de la formulation Aniosyme N2. Les tensioactifs sont :

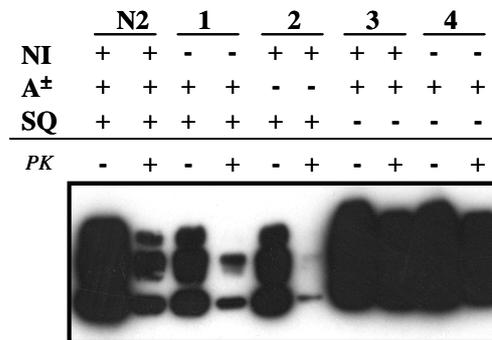
- Un tensioactif non ionique (NI) : l'alcool gras polyéthoxylé isoC<sub>13</sub>E<sub>8</sub> (8 moles d'oxyde d'éthylène);
- Un tensioactif amphotère (A<sup>±</sup>) : le N-lauryl-iminodipropionate de sodium.

Le séquestrant est l'iminodisuccinate de sodium.

Dans un premier temps, nous allons nous intéresser à l'incidence de ces tensioactifs et du séquestrant sur l'activité de la protéase vis-à-vis de la PrPsc. Pour cela, quatre formulations ont été préparées :

- La formulation n°1 est la formulation Aniosyme N2 sans le tensioactif non ionique ;
- La formulation n°2 est la formulation Aniosyme N2 sans le tensioactif amphotère ;
- La formulation n°3 est la formulation Aniosyme N2 sans le séquestrant ;
- La formulation n°4 est la formulation n°1 sans le séquestrant.

Les résultats obtenus sont présentés sur la figure IV-10.



**Figure IV-10 :** Western blot de la PrP traitée par l'Aniosyme N2 et ses variantes. L'activité enzymatique est inhibée par la chaleur et la PrP est précipitée par l'acide phosphotungstique. N2 : Aniosyme N2 ; NI : tensioactif non ionique ; A<sup>±</sup>: tensioactif amphotère ; SQ : séquestrant ; PK : protéinase K.

Comparativement à la formulation Aniosyme N2 (N2) sans traitement à la protéinase K (PK-), les formulations n°1 et n°2 améliorent légèrement l'activité de la protéase puisque l'intensité du signal est plus faible pour ces deux formulations. En revanche, les formulations n°3 et n°4 ne permettent pas d'améliorer la digestion de la PrP. Ces premiers résultats suggèrent que les formulations sont plus efficaces dès lors que le tensioactif utilisé est seul, soit non ionique (formulation n°2) soit amphotère (formulation n°3). L'association des deux tensioactifs semble légèrement diminuer l'activité enzymatique (N2). D'autre part, les résultats obtenus pour les formulations n°3 et n°4 montrent que l'absence de séquestrant dans les formulations nuit à l'activité enzymatique. Il semble que l'activité enzymatique de la protéase soit sensible à la présence de cations métalliques. Dans le cas présent, ces cations sont essentiellement les ions Ca<sup>2+</sup> et Mg<sup>2+</sup> présents dans l'eau du réseau servant à la dilution des formulations.

Compte tenu de l'activité enzymatique observée en présence de l'alcool gras polyéthoxylé isoC<sub>13</sub>E<sub>8</sub>, nous avons souhaité tester d'autres tensioactifs non ioniques :

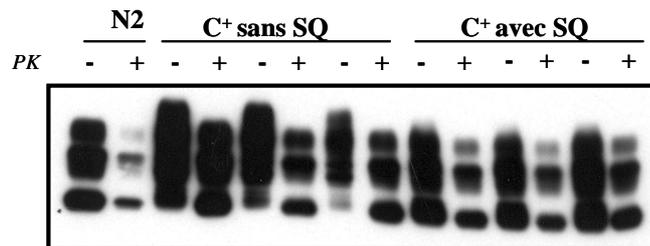
- un alcool gras polyéthoxylé à 25 moles d'oxyde d'éthylène ;
- l'oxyde de diméthyl-lauryl amine ;
- un alcool gras alkoxylé.

L'analyse des Western blot (résultats non présentés) montre qu'aucun de ces tensioactifs non ioniques n'améliore l'activité enzymatique, par rapport au tensioactif non ionique déjà présent dans l'Aniosyme N2.

Nous avons également testé un autre tensioactif amphotère : le cocoamphodipropionate disodique. Comme précédemment, aucune amélioration de l'activité enzymatique n'a été observée.

Etant donné que les interactions entre les tensioactifs et les protéines sont en partie fonction de la nature des tensioactifs [Deep et Ahluwalia 2001, Durchschlag, *et al.* 2000, Xiong, *et al.* 2001], il paraît intéressant de tester des tensioactifs dont la nature diffère de ceux présents dans l'Aniosyme N2. Ainsi, dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés aux tensioactifs cationiques et anioniques.

Pour cela, nous avons substitué les tensioactifs de l'Aniosyme N2 par un tensioactif cationique (C<sup>+</sup>) : le N alkyl « coco » di(pentadécahydroxyéthyl) méthylammonium-méthylsulfate. Comme précédemment, l'HC est traité par la formulation « C<sup>+</sup> » avec ou sans séquestrant (SQ). Les résultats sont présentés en triplicats sur la figure IV-11.



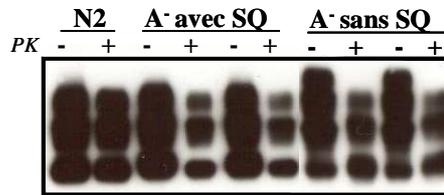
**Figure IV-11** : Western blot de la PrP traitée par l'Aniosyme N2 et sa variante cationique (C<sup>+</sup>) avec ou sans séquestrant (SQ). L'activité enzymatique est inhibée par la chaleur et la PrP est précipitée par l'acide phosphotungstique. N2 : Aniosyme N2 ; PK : protéinase K.

La comparaison des résultats obtenus pour cette formulation « C<sup>+</sup> » avec et sans séquestrant, met en évidence une différence d'activité enzymatique essentiellement liée à la présence ou non de séquestrant. Lorsque la formulation en est exempte, la protéine prion détectée est essentiellement de la PrPsc. En revanche, nous observons de la PrPres en présence de séquestrant. Comme nous l'avons souligné précédemment, l'activité enzymatique est particulièrement sensible à la présence des cations métalliques. Quoi qu'il en soit, le tensioactif cationique contenu dans la formulation ne permet pas d'améliorer l'activité enzymatique de la protéase, comparativement aux tensioactifs de l'Aniosyme N2.

Puis, dans la même logique, nous avons substitué les tensioactifs de l'Aniosyme N2 par un tensioactif anionique (A<sup>-</sup>) : le lauryléthersulfate à 3 moles d'oxyde d'éthylène. L'HC est traité par la formulation « A<sup>-</sup> » avec ou sans séquestrant (SQ).

Nous avons dû, face à des résultats « biaisés », modifier le mode d'inhibition de l'activité enzymatique. Il semblerait en effet, que la présence du tensioactif anionique modifie la thermorésistance de la protéine prion, avec une disparition du signal de la PrP en Western blot (Annexe 4) Pour contourner ce biais méthodologique, nous avons inhibé l'activité enzymatique en acidifiant le pH de la solution. Pour cela, de

l'acide chlorhydrique (HCl) 1M est ajouté à la formulation jusqu'à l'obtention d'un pH 3. La protéine prion est précipitée par l'acide phosphotungstique. Les résultats sont présentés sur la figure IV-12

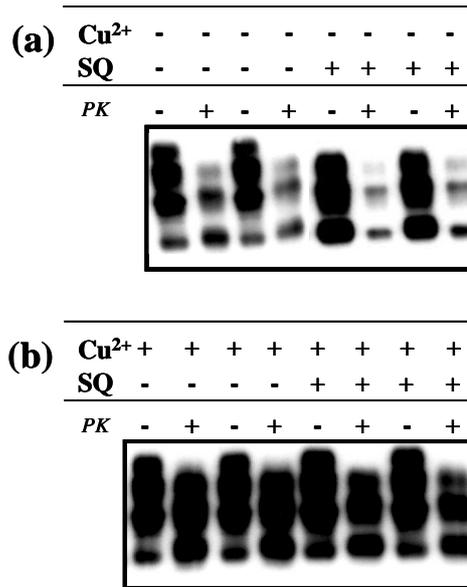


**Figure IV-12** : Western blot de la PrP traitée par l'Aniosyme N2 et sa variante anionique (A<sup>-</sup>) avec ou sans séquestrant (SQ). L'activité enzymatique est inhibée par l'acidité du pH et la PrP est précipitée par l'acide phosphotungstique. N2 : Aniosyme N2 ; PK : protéinase K.

Comparativement à l'Aniosyme N2, la présence du tensioactif anionique et du séquestrant n'améliore pas l'activité enzymatique de la protéase. On peut néanmoins observer que le traitement secondaire par la protéinase K est favorisé en présence de ce tensioactif. Une fois encore, on constate l'importance du séquestrant pour favoriser l'activité enzymatique de la protéase.

#### Mode d'action du séquestrant:

La présence du séquestrant favorise considérablement l'activité enzymatique de la protéase vis-à-vis de la protéine prion. Cet effet de synergie est observé pour toutes les formulations testées : la formulation Aniosyme N2 (figure IV-10), la formulation cationique (figure IV-11) et la formulation anionique (figure IV-12). L'hypothèse la plus probable est un rôle inhibiteur des cations métalliques présents dans l'eau du réseau. Le séquestrant permettrait donc de pallier à l'effet inhibiteur de ces cations par ces fonctions de séquestrant (Kumar 1998). Néanmoins, on ne peut exclure la possibilité d'une synergie liée à la molécule elle-même. Le séquestrant pourrait en effet être un effecteur de l'activité enzymatique. Afin de s'assurer du rôle du séquestrant et de justifier le rôle inhibiteur des cations métalliques sur l'activité enzymatique, nous avons introduit des ions Cu<sup>2+</sup> dans les formulations, saturant ainsi préalablement le séquestrant. Les résultats obtenus sont présentés sur la figure IV-13(a) et (b) pour les formulations anioniques respectivement sans et avec Cu<sup>2+</sup>.



**Figure IV-13 : Incidence du séquestrant sur l'activité enzymatique de la protéase de la formulation anionique. (a) sans saturation préalable du séquestrant par les ions  $\text{Cu}^{2+}$  ; (b) séquestrant préalablement saturé par les ions  $\text{Cu}^{2+}$ . SQ : séquestrant ; PK : protéinase K.**

Les résultats présentés sur la figure IV-13(a) confirment l'importance du séquestrant pour garantir l'activité enzymatique de la protéase. En effet, en absence de séquestrant, la protéine prion n'est pas digérée alors qu'en sa présence, elle est détectée sous sa forme PrPres.

Les résultats de la figure IV-13(b) montrent qu'en présence d'ions  $\text{Cu}^{2+}$ , la protéine prion détectée n'est pas dégradée et ce indépendamment de la présence ou non du séquestrant. Seul le traitement secondaire par la protéinase K permet d'observer la PrPres. Ces résultats confirment donc le rôle inhibiteur des cations métalliques sur l'activité enzymatique. En effet, lorsque le séquestrant est préalablement saturé par les ions  $\text{Cu}^{2+}$ , il n'est plus disponible pour séquestrer les cations métalliques de l'eau du réseau qui peuvent donc inhiber l'activité enzymatique de la protéase.

Si la formulation de l'enzyme augmente son activité enzymatique, la nature du tensioactif ne semble pas être un facteur prépondérant. Cependant, compte tenu de la diversité des tensioactifs à l'intérieur d'une même famille, les résultats obtenus ne peuvent être généralisés.

Nous avons pu observer que la présence d'un seul tensioactif, non ionique ou amphotère, était plus bénéfique que l'association de ces deux tensioactifs, sur l'activité de la protéase. Il faut néanmoins rappeler que la complexité de la chimie de formulation réside dans l'identification et le choix des meilleurs compromis. Ainsi, si l'association des tensioactifs semble légèrement diminuer l'activité enzymatique, elle favorise en revanche l'efficacité de la détergence. La présence du tensioactif non ionique permet également de stabiliser la formulation dans le temps.

Le séquestrant est également un facteur important dans l'optimisation de l'activité des enzymes sensibles à la dureté de l'eau.

Après avoir focalisé notre attention sur les tensioactifs et le séquestrant, nous avons souhaité évaluer d'une part l'incidence de la concentration en enzymes sur l'inactivation de la protéine prion et d'autre part, nous intéresser à l'activité d'autres protéases seules ou en association vis-à-vis de la protéine prion.

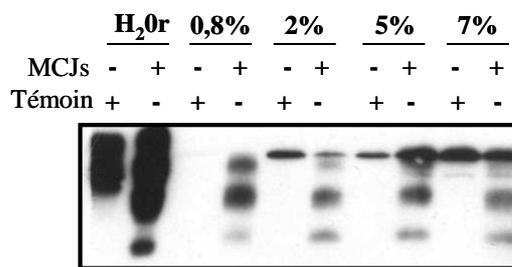
#### Les enzymes :

Lors de nos travaux concernant l'activité enzymatique en surface, nous avons observé une activité surfacique de la protéase. Cependant, augmenter la concentration de la formulation en enzymes n'avait

pas d'influence significative sur l'efficacité de la formulation en rapport à la surface (figure IV-8). Mais qu'en est-il en milieu liquide vis-à-vis de la protéine prion ?

Pour répondre à cette question, nous avons évalué par Western blot, l'activité enzymatique de la formulation Aniosyme N2 contenant des concentrations croissantes de 0,8% à 7% de protéase sur un HC témoin, exempt de PrPsc et sur un HC de MCJs. Du point de vue méthodologique, l'activité enzymatique est inhibée par un abaissement du pH de la formulation après 15 minutes de contact à température ambiante (19-23°C). La protéine prion est précipitée par l'acide phosphotungstique. L'essai contrôle est traité par de l'eau du réseau (H<sub>2</sub>O<sub>r</sub>).

Les résultats présentés sur la figure IV-14 montrent que la PrPc de l'HC témoin est totalement digérée en 15 minutes, quelle que soit la concentration en protéase de la formulation. Notons qu'une concentration de 0,8% est suffisante.



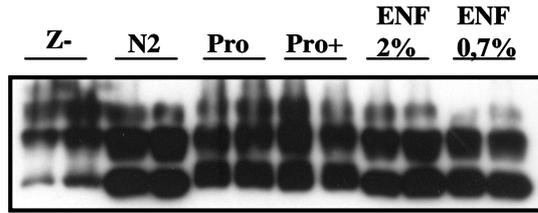
**Figure IV-14 : Incidence de la concentration en protéase dans la formulation Aniosyme N2 sur la digestion de la PrPc dans un HC témoin et de la PrPsc dans un HC de MCJs. Les concentrations en protéases testées sont 0,8% ; 2% ; 5% et 7%. Les concentrations en protéase n'influent pas sur l'inactivation de la PrPsc en 15 minutes. La PrPc est intégralement digérée quelle que soit la concentration en protéase testée.**

En ce qui concerne la dégradation de la protéine prion, on observe une activité de la protéase puisque la PrP détectée est de la PrPres, mais cette activité est indépendante de la concentration en enzymes de la formulation. En effet, l'intensité des signaux observés n'est pas significativement différente pour les quatre concentrations de protéase testées.

Ainsi, quel que soit le référent étudié (la surface ou le milieu liquide), l'augmentation de la concentration en enzyme n'optimise ni l'efficacité de la formulation, ni la digestion de la protéine prion en 15 minutes. Contenu du fait qu'une augmentation de concentration en enzyme se traduit généralement par une augmentation de la vitesse initiale de la réaction catalysée, nous étions en droit de nous attendre à de meilleures performances.

Nous avons également souhaité évaluer l'activité enzymatique d'autres protéases, seules ou en association, dans l'Aniosyme N2 vis-à-vis de la protéine prion. Différentes classes de protéases ont été testées, notamment des protéases à sérine, des protéases à aspartate ou encore des métallo-protéases.

Toutes ces enzymes digèrent complètement la PrPc d'un HC témoin en 15 minutes (résultats non présentés), mais aucune d'entre elle ne présente d'activité enzymatique significativement plus intéressante que la protéase de l'Aniosyme N2 vis-à-vis de la PrPsc. De la même façon, aucune des associations d'enzymes testées ne s'est révélée pertinente. Un extrait des résultats obtenus est présenté sur la figure IV-15 pour deux protéases (Pro et Pro+) ainsi que pour une association de protéases formulée à 0,7% et 2%.



**Figure IV-15** : Western blot de la PrP traitée par différentes protéases ou association de protéases formulées dans l'Aniosyme N2. Z- : contrôle sans enzymes, Pro : Protamex ; Pro+ : Protamex Plus ; ENF : Espérase 0,8L + Neutrase 0,8L + Flavourzyme 500L.

La radiographie présentée sur la figure IV-15 montre en effet que les enzymes testées seules ou en association ne montrent pas d'activité enzymatique significativement différente de la protéase de l'Aniosyme N2.

En ce qui concerne l'association de plusieurs protéases, les résultats ne sont pas plus intéressants. En effet, aucune différence n'est observée comparativement à l'Aniosyme N2. Ces données nous permettent de confirmer le fait que l'augmentation de la concentration en enzymes n'améliore en rien la dégradation de la protéine prion, dans nos conditions.

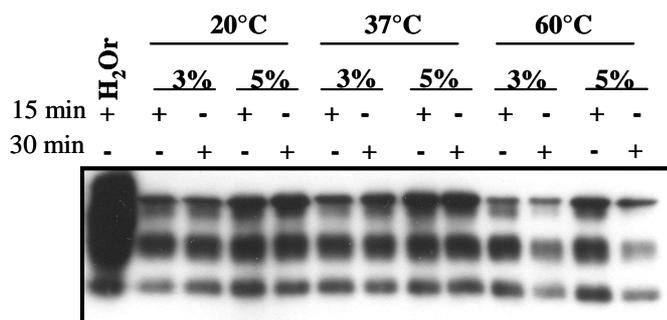
L'optimisation de l'activité enzymatique vis-à-vis de la protéine prion via les facteurs chimiques est un réel défi. Les paramètres testés, à partir de la formulation Aniosyme N2, n'ont pas permis d'améliorer l'activité enzymatique de la protéase vis-à-vis de la protéine prion. L'activité enzymatique étant également régie par des facteurs physiques, on peut se demander si la température et le pH favoriseraient la digestion de la PrPsc.

### *II.1.2. Les facteurs physiques*

#### La température :

La vitesse de la plupart des réactions chimiques augmente quand on élève la température. Il en est de même pour les réactions enzymatiques. Cependant, la vitesse de la réaction enzymatique n'augmente avec la température que jusqu'à une valeur maximale au-delà de laquelle elle décroît rapidement puisque la chaleur dénature l'enzyme et sa vitesse de dénaturation augmente avec la température. La température pour laquelle la vitesse de la réaction est maximale est définie comme la température optimale de l'enzyme.

Il semble donc intéressant d'étudier l'incidence de la température sur l'activité enzymatique de la protéase de l'Aniosyme N2. Trois températures ont été testées : 20°C, 37°C et 60°C, cette dernière étant la température optimale de la protéase étudiée. Ayant montré que l'activité enzymatique vis-à-vis de la protéine prion était indépendante de la concentration en protéase, nous avons souhaité vérifier cette donnée sous l'influence conjointe de la température et du temps. Ainsi, la protéase a été formulée à 3% et 5% dans l'Aniosyme N2 et évaluée pour des temps de contact 15 et 30 minutes. L'essai contrôle consiste à traiter l'HC par de l'eau du réseau 15 minutes à 20°C. Les résultats sont présentés sur la figure IV-16.



**Figure IV-16 : Influence de la température sur l'activité enzymatique de la protéase formulée à 3% et 5% dans l'Aniosyme N2 pour des temps de contact de 15 et 30 minutes. Les influences conjointes de la température, du temps et de la concentration en protéase n'ont pas d'effet significatif sur la dégradation de la protéine prion.**

Ces résultats montrent une digestion partielle de la protéine prion puisque les profils électrophorétiques correspondent à celui de la PrPres. L'intensité des signaux de PrPres observée est comparable pour les différentes variables analysées. Une très légère diminution du signal est néanmoins observée à 60°C avec la formulation à 5% d'enzymes et pour un temps de contact de 30 minutes.

Ces données montrent que la digestion enzymatique de la PrPsc en PrPres en 15 minutes est effective dès 20°C et que l'augmentation de la température lors de la phase de nettoyage n'a pas d'influence significative sur la dégradation de la protéine prion.

Il faut atteindre des températures beaucoup plus élevées pour observer une activité protéasique sur la PrPsc. En effet, les travaux portant sur l'inactivation de la protéine prion associent un prétraitement par la chaleur (115°C, 40 min), en présence de tensioactif, à un traitement enzymatique consécutif. L'effet combiné de la chaleur et du traitement enzymatique permet d'observer la digestion complète de la PrPsc en présence de sarkosyl [Langeveld, *et al.* 2003]. Cette digestion n'est en revanche que partielle en présence de désoxycholate de sodium ou de Triton X-100 [Langeveld, *et al.* 2003]. Le sarkosyl favoriserait la solubilisation et la dénaturation de la PrPsc par la chaleur, facilitant par conséquent l'activité des protéases. Les températures auxquelles l'activité enzymatique est optimisée en présence de tensioactifs sont incompatibles avec les exigences du nettoyage des DM thermosensibles. De plus, l'inactivation de la protéine prion n'est pas l'objectif recherché.

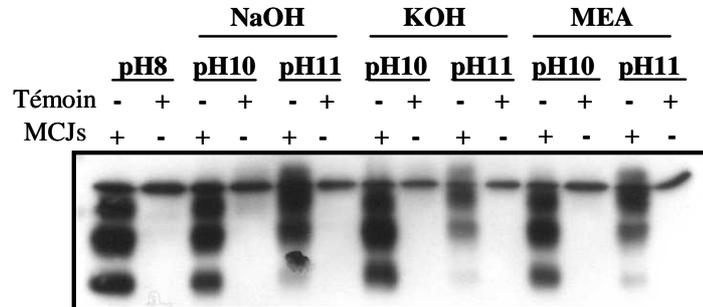
Ces travaux permettent également de montrer que la seule nature d'un tensioactif n'est pas un facteur déterminant. S'il est vrai que l'action combinée de tensioactifs anioniques et de la chaleur augmente la sensibilité de la protéine prion au traitement enzymatique ultérieur [Jackson, *et al.* 1999, Langeveld, *et al.* 2003, Taylor, *et al.* 1999], cela ne peut être extrapolé pour l'ensemble des tensioactifs anioniques. Ceci est montré notamment par le deoxycholate de sodium [Langeveld, *et al.* 2003].

### Le pH :

Le pH peut modifier l'activité enzymatique en générant des modifications conformationnelles des structures secondaires ou tertiaires des enzymes ou en modifiant les charges électriques des chaînes latérales des acides aminés du site catalytique de l'enzyme. Il existe un pH pour lequel les charges électriques des chaînes latérales du site catalytique sont plus favorables à l'interaction enzyme-substrat. Il s'agit du pH optimum de la réaction enzymatique. Le pH optimum de la protéase de l'Aniosyme N2 est pH 8.

Nous avons évalué l'incidence du pH sur l'activité de la protéase vis-à-vis de la protéine prion d'un HC témoin et d'un HC de MCJs. Compte tenu de l'efficacité des formulations alcalines vis-à-vis du risque prions [Baier, *et al.* 2004, Fichet, *et al.* 2004, Kasermann et Kempf 2003, Lemmer, *et al.* 2004], nous avons privilégié les pH alcalins. La formulation Aniosyme N2 étant une formulation de pH neutre, nous avons dû ajuster les pH par des solutions alcalines. Etant donné que les acides gras et les triglycérides

sont susceptibles de former des savons et que la solubilité de ces savons est fonction du sel auxquels ils sont associés, nous avons ajusté les pH par trois bases différentes : l’hydroxyde de sodium (NaOH) et l’hydroxyde de potassium (KOH), qui sont des agents alcalins forts, et la monoéthanolamine (MEA), un agent alcalinisant faible. Les résultats sont présentés sur la figure IV-17.



**Figure IV-17 : Influence du pH sur l’activité enzymatique de la protéase l’Aniosyme N2 pour des temps de contact de 15 minutes.**

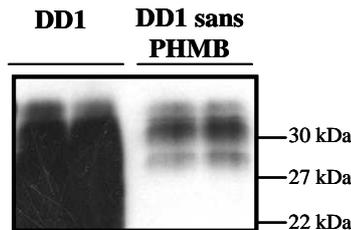
Les résultats observés montrent que les bases utilisées pour ajuster les pH n’ont pas d’incidence sur l’activité enzymatique. La PrPc est complètement digérée quel que soit le pH de la formulation. La PrPres est observée à pH 8, le pH optimal de l’enzyme, ainsi qu’à pH 10 sans différence significative de l’activité de la protéase. En revanche, il semble qu’à pH 11 l’activité enzymatique de la protéase soit inhibée puisque les profils électrophorétiques ne correspondent plus à celui de la PrPres. Ce pH dénature vraisemblablement la protéase.

Les études récentes, conduites sur l’inactivation biologique de la protéine prion par les enzymes dont le pH optimal est alcalin, montrent que leur activité sur la protéine prion requiert qu’elles puissent être actives à pH 12 [McLeod, *et al.* 2004]. Bien que l’on ne connaisse pas exactement les effets des pH fortement alcalins sur la stabilité structurale de la PrPsc, il est probable qu’elle soit significativement réduite permettant ainsi d’augmenter sa sensibilité aux protéases.

La température et le pH n’ont donc pas d’influence significative sur l’activité enzymatique de la protéase formulée. Ces données corroborant les résultats obtenus à propos des facteurs chimiques, nous pouvons conclure que l’activité enzymatique est optimale dans la formulation Aniosyme N2. En effet, aucune de nos tentatives n’a pu aboutir compte tenu des contraintes de temps, de pH et de température de nos conditions expérimentales et de la résistance physico-chimique intrinsèque de la protéine prion.

## II.2.Minimisation de l’activité enzymatique par les principes actifs antimicrobiens de l’Aniosyme DD1

Nous avons pu constater, dans la partie consacrée aux observations surfaciques, que le polyhexaméthylène biguanide (PHMB) était néfaste vis-à-vis de l’efficacité détergente des formulations. (figure IV-5). Il a également été suggéré que les principes actifs antimicrobiens puissent avoir un effet inhibiteur sur l’activité enzymatique (figure IV-3 et III-19). Dans ce contexte, nous avons évalué les capacités de la protéase à digérer la protéine prion lorsqu’elle est formulée dans l’ Aniosyme DD1 soit avec, soit sans PHMB. Les résultats sont présentés sur la figure IV-18.

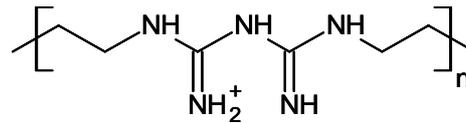


**Figure IV-18** : Western blot de la protéine prion traitée par la formulation Aniosyme DD1 avec ou sans PHMB.

L'intensité des signaux observés pour la protéine prion avec et sans PHMB est significativement différente. La quantité de protéine prion détectée est nettement moins importante en absence de PHMB, ce qui conforte l'hypothèse d'un effet antagoniste de ce principe actif antimicrobien sur l'activité enzymatique de la protéase. Le profil électrophorétique particulier, observé en présence de PHMB, suggère également l'existence d'une interférence entre la protéine prion et le PHMB. En effet, les trois glycoformes de la protéine prion ne sont pas résolues sur ce profil et nous pouvons observer une traînée du signal. Dès lors, il convient de se demander si les effets antagonistes du PHMB sont dus à une inhibition directe ou indirecte de l'activité enzymatique. En effet, l'étendue de la traînée vers les plus faibles poids moléculaires suggère une rétention des produits de dégradation de la protéine prion. Ceci pourrait donc témoigner d'une activité enzymatique effective de la protéase mais également d'une interaction de ces produits de dégradation avec le PHMB, qui verraient donc leur migration électrophorétique ralentie.

La confrontation des différents résultats obtenus jusqu'à présent semble converger vers l'hypothèse d'un antagonisme direct du PHMB sur l'efficacité de la détergence et indirect sur l'activité enzymatique. Dans le chapitre II, nous avons mis en évidence l'adsorption irréversible du biguanide sur les substrats d'AI SI 304, que ceux-ci soient ou non souillés par l'HC (figure II-8 et II-12). Dans le chapitre III, nous avons observé la « rétention » de la protéine prion sur les fils d'acier inoxydable lorsque ces fils étaient nettoyés par la formulation Aniosyme DD1. L'emploi de la formulation Aniosyme N2 en seconde intention ne permettait pas d'améliorer l'efficacité du nettoyage malgré les performances détergentes de cette formulation (figure III-17). Compte tenu des différences qualitatives en biguanide entre l'Aniosyme N2 et DD1, nous avons émis l'hypothèse que le biguanide pouvait être responsable de cet effet. Associé aux présents résultats sur le comportement électrophorétique de la protéine prion en présence de PHMB, il semble que l'effet antagoniste de ce principe actif antimicrobien soit donc lié à sa forte capacité d'adsorption. Ce phénomène de « coating » du PHMB a été confirmé par Carole Bolot (Laboratoires ANIOS) dans le cadre de son Master. Elle a en effet montré qu'un prétrempage de la salissure dans une solution de PHMB compromettrait la phase de nettoyage ultérieure. Ce coating a également pu être visualisé par l'intermédiaire d'un fluoresceur anionique. Ainsi, le coating du PHMB sur la salissure adsorbée empêcherait d'une part la protéase d'accéder à son substrat et empêcherait d'autre part l'action détersive des tensioactifs. Ce phénomène explique par conséquent les moindres performances, à la fois détergente et enzymatique, de la formulation Aniosyme DD1.

Le PHMB est un principe actif antimicrobien polymérique et cationique utilisé dans diverses applications telles que la désinfection des piscines, le traitement des systèmes de refroidissement d'eau ou encore la prévention de la formation de la plaque dentaire [Rosin, *et al.* 2001]. C'est un polymère extrêmement basique existant sous forme cationique jusqu'à pH 10, ce qui lui permet d'interagir fortement et rapidement avec les espèces anioniques. Les groupements cationiques sont séparés par des chaînes hexaméthylènes qui confèrent également à cette molécule un caractère hydrophobe favorisant par conséquent les interactions de cette nature.



Polyhexaméthylène biguanide (PHMB)

Le caractère à la fois polymérique, cationique et hydrophobe du PHMB favorise donc ses interactions avec de nombreuses molécules tels que les phospholipides neutres ou acides des membranes biologiques [Gilbert et Moore 2005] et les acides nucléiques [Allen, *et al.* 2004]. Dans ce contexte, la nécessité de nettoyer les surfaces avant de procéder à leur désinfection semble plus compréhensible et le double nettoyage se trouve d'autant plus justifié. En effet, le premier nettoyage strictement détergent favorisera le second nettoyage par un détergent/ désinfectant pour lequel la part de la désinfection sera d'autant plus efficace que la surface sera nettoyée. Cela est d'autant plus important que le PHMB est décrit comme un principe actif antimicrobien extrêmement efficace, comparativement à ses homologues cationiques [Gilbert et Moore 2005].

### II.3.Synthèse

Vis-à-vis de la protéine prion, l'activité enzymatique de la protéase est optimisée lorsqu'elle est formulée dans l'Aniosyme N2.

Parmi les facteurs chimiques de la formulation, le séquestrant est un composé particulièrement important qui favorise l'activité de la protéase en inhibant l'interférence des cations métalliques. Dans nos conditions expérimentales de température et de pH, la seule nature des tensioactifs influe peu sur la digestion enzymatique de la protéine prion. De la même façon, parmi les protéases testées, seules ou en association et quelle que soit leur concentration, aucune d'entre elles ne permet de dégrader plus efficacement la PrPsc.

La modification des paramètres physiques de nos conditions expérimentales n'améliore pas non plus l'activité enzymatique de la protéase vis-à-vis de la PrPsc. Des conditions drastiques de pH et de températures sont nécessaires pour observer un effet significatif sur l'activité enzymatique. Ces conditions ne sont pas compatibles avec les exigences du nettoyage des DM thermosensibles.

Compte tenu de ces données, l'efficacité détersive des formulations enzymatiques doit être l'objectif recherché en priorité. Notons qu'il n'y a pas lieu d'augmenter ni les concentrations enzymatiques, ni la température, ni le pH pour favoriser la digestion enzymatique de la protéine prion durant la phase de nettoyage.

Enfin, l'effet antagoniste des principes actifs antimicrobiens et plus particulièrement du PHMB sur l'activité enzymatique est vraisemblablement un effet indirect, le PHMB empêchant l'enzyme d'accéder à son substrat. L'effet « coating » du PHMB a en revanche un effet négatif direct sur l'efficacité détersive de la formulation.

## III. CONCLUSIONS

Les formulations enzymatiques présentent les meilleures performances. Ces performances sont la conséquence d'une synergie entre les enzymes et la formulation dans laquelle elles se trouvent. Une solution d'enzymes isolées ne présente pas d'activité détergente supérieure à celle de l'eau du réseau et une formulation dépourvue d'enzymes est significativement moins efficace. Cette synergie est d'autant plus intéressante qu'elle se traduit non seulement dans la solution de nettoyage mais également au niveau de la surface des matériaux. Associée à de bonnes performances détergentes, cette activité surfacique des enzymes est particulièrement importante dans le cadre du risque prion. En effet, la digestion même partielle de la PrPsc en PrPres à la surface des matériaux permet probablement de réduire l'infectiosité de la protéine prion et par conséquent de limiter les risques d'une contamination iatrogène.

Les moindres performances des formulations nettoyantes/pré-désinfectantes sont la conséquence d'un antagonisme entre les mécanismes de la détergence et ceux de la désinfection. Les principes actifs antimicrobiens doivent leurs activités biocides à leurs propriétés physico-chimiques qui leur confèrent une forte capacité d'interaction avec les microorganismes. Cependant, ces interactions n'étant pas spécifiques aux microorganismes, les principes actifs antimicrobiens peuvent également s'adsorber sur les salissures organiques et compromettre l'action détersive des tensioactifs et des enzymes. Il est donc préférable d'avoir recours aux formulations nettoyantes/pré-désinfectantes après que les matériaux aient été préalablement nettoyés. Dans ce contexte, la mise en place du double nettoyage se trouve parfaitement justifiée.

#### IV. REFERENCES

- ALLEN, M.J., MORBY, A.P. and WHITE, G.F. (2004). Cooperativity in the binding of the cationic biocide polyhexamethylene biguanide to nucleic acids. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **318**: 394-404
- BAIER, M., SCHWARZ, A. and MIELKE, M. (2004). Activity of an alkaline 'cleaner' in the inactivation of the scrapie agent. *Journal of Hospital Infection*. **57**: 80-4
- DEEP, S. and AHLUWALIA, J.C. (2001). Interaction of bovine serum albumin with anionic surfactants. *Physical Chemistry Chemical Physics*. **3**: 4583-4591
- DURCHSCHLAG, H., TIEFENBACH, K.J., WEBER, R., KUCHENMÜLLER, B. and JAENICKE, R. (2000). Comparative investigations of the molecular properties of detergents and protein-detergent complexes. *Colloid and Polymer Science*. **278**: 312-320
- FICHET, G., COMOY, E., DUVAL, C., ANTLOGA, K., DEHEN, C., CHARBONNIER, A., MCDONNELL, G., BROWN, P., LASMEZAS, C.I. and DESLYS, J.P. (2004). Novel methods for disinfection of prion-contaminated medical devices. *Lancet*. **364**: 521-6
- GILBERT, P. and MOORE, L.E. (2005). Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet. *Journal of Applied Microbiology*. **99**: 703-705
- JACKSON, G.S., HOSSZU, L.L., POWER, A., HILL, A.F., KENNEY, J., SAIBIL, H., CRAVEN, C.J., WALTHO, J.P., CLARKE, A.R. and COLLINGE, J. (1999). Reversible conversion of monomeric human prion protein between native and fibrillogenic conformations. *Science*. **283**: 1935-7
- KASERMANN, F. and KEMPF, C. (2003). Sodium hydroxide renders the prion protein PrP<sup>Sc</sup> sensitive to proteinase K. *Journal of General Virology*. **84**: 3173-6
- LANGEVELD, J.P., WANG, J.J., VAN DE WIEL, D.F., SHIH, G.C., GARSEN, G.J., BOSSERS, A. and SHIH, J.C. (2003). Enzymatic degradation of prion protein in brain stem from infected cattle and sheep. *Journal of Infectious Disease*. **188**: 1782-9
- LEMMER, K., MIELKE, M., PAULI, G. and BEEKES, M. (2004). Decontamination of surgical instruments from prion proteins: in vitro studies on the detachment, destabilization and degradation of PrP<sup>Sc</sup> bound to steel surfaces. *Journal of General Virology*. **85**: 3805-16
- MCLEOD, A.H., MURDOCH, H., DICKINSON, J., DENNIS, M.J., HALL, G.A., BUSWELL, C.M., CARR, J., TAYLOR, D.M., SUTTON, J.M. and RAVEN, N.D. (2004). Proteolytic inactivation of the bovine spongiform encephalopathy agent. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **317**: 1165-70
- ROSENBERG, N. and GERVAIS, P. (1987). Rhinite et asthme professionnels aux enzymes. *Documents pour le médecin du travail*. **29**: 1-4

**ROSIN, M., WELK, A., BERNHARDT, O., RUHNAU, M., PITTEN, F.A., KOCHER, T. and KRAMER, A.** (2001). Effect of a polyhexamethylene biguanide mouthrinse on bacterial counts and plaque. *Journal of Clinical Periodontology*. **28**: 1121

**TAYLOR, D.M., FERNIE, K., MCCONNELL, I. and STEELE, P.J.** (1999). Survival of scrapie agent after exposure to sodium dodecyl sulphate and heat. *Veterinary Microbiology*. **67**: 13-6

**TRIPATHI, A. and GRAMMER, L.C.** (2001). Extrinsic allergic alveolitis from a proteolytic enzyme. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*. **86**: 425-427

**XIONG, L.W., RAYMOND, L.D., HAYES, S.F., RAYMOND, G.J. and CAUGHEY, B.** (2001). Conformational change, aggregation and fibril formation induced by detergent treatments of cellular prion protein. *Journal of Neurochemistry*. **79**: 669-678

## SOMMAIRE DU CHAPITRE V

# INTERFACE BSA/MÉTAL

<b>I. INTRODUCTION.....</b>	<b>- 125 -</b>
<b>II. STRUCTURE ET STABILITE CONFORMATIONNELLES DES PROTEINES.....</b>	<b>- 127 -</b>
<b>III. CARACTERISATION DE LA BSA PAR XPS.....</b>	<b>- 130 -</b>
III.1. MATERIEL ET METHODE DE TRAVAIL.....	- 130 -
III.2. RESULTATS.....	- 130 -
<b>IV. ETUDE XPS DE L'INTERFACE BSA/MÉTAL .....</b>	<b>- 134 -</b>
IV.1. TROIS APPROCHES POUR ACCEDER A L'INTERFACE.....	- 134 -
IV.2. CONSTRUCTION DE L'INTERFACE BSA/MÉTAL PAR SUBLIMATION DE LA BSA.....	- 136 -
IV.2.1. <i>Matériel et méthode de travail</i> .....	- 136 -
IV.2.2. <i>Etude de l'interface BSA/CrOx</i> .....	- 136 -
IV.2.3. <i>Interface BSA/Au</i> .....	- 140 -
IV.2.4. <i>Discussion</i> .....	- 141 -
IV.3. ANALYSE DE L'INTERFACE BSA/MÉTAL PAR DESORPTION THERMIQUE SOUS VIDE .....	- 142 -
IV.3.1. <i>Matériel et méthode de travail</i> .....	- 142 -
IV.3.2. <i>Interfaces BSA/CrMet et BSA/CrOx</i> .....	- 143 -
IV.3.3. <i>Interface BSA/Au</i> .....	- 150 -
IV.3.4. <i>Discussion</i> .....	- 155 -
IV.4. METALLISATION DE LA BSA .....	- 157 -
IV.4.1. <i>Matériel et méthode de travail</i> .....	- 157 -
IV.4.2. <i>Métallisation des protéines par le chrome métallique</i> .....	- 157 -
IV.4.3. <i>Métallisation des protéines par l'oxyde de chrome</i> .....	- 164 -
IV.4.4. <i>Métallisation des protéines par l'or sous atmosphère neutre</i> .....	- 167 -
IV.4.5. <i>Métallisation des protéines par l'or sous atmosphère réactive</i> .....	- 171 -
<b>V. MODELES D'ADSORPTION DES PROTEINES SUR LES SURFACES METALLIQUES .....</b>	<b>- 174 -</b>
<b>VI. CONCLUSIONS .....</b>	<b>- 176 -</b>
<b>VII. REFERENCES .....</b>	<b>- 176 -</b>



# CHAPITRE V

## INTERFACE BSA/MÉTAL

### I. INTRODUCTION

Dans les chapitres précédents, nous avons observé que les formulations détergentes permettent de réduire la quantité de protéines adsorbées sur les surfaces d'acier inoxydable et d'oxyde de chrome. Cependant, la désorption de ces protéines n'est jamais totale. Ceci est couramment rapporté dans la littérature [Chen, *et al.* 1999, Elwing et Golander 1990, Green, *et al.* 2001, Murray et Deshaies 2000, Wahlgren et Arnebrant 1991, 1992, You et Lowe 1996]. Les produits employés pour éliminer les protéines adsorbées sur les surfaces sont extrêmement drastiques. Il s'agit en particulier de l'acide sulfo-chromique, de solution Pirhana à base d'eau oxygénée et d'acide sulfurique concentré [Cosman, *et al.* 2005, Karlsson, *et al.* 1996]. Diniz *et al.* rapportent qu'un traitement à l'acide nitrique concentré n'est pas suffisant pour éliminer les protéines de leurs électrodes de platine et de ce fait, ils ont recours au polissage [Diniz et Ueta 2004]. La nécessité d'avoir recours à l'hypochlorite de sodium 2% ou à la soude 1 M pour inactiver la protéine prion est également un exemple de la ténacité des protéines adsorbées. Il semble qu'il soit nécessaire de modifier la chimie de la surface lorsque l'on veut éliminer intégralement les protéines des surfaces sur lesquelles elles sont adsorbées. Ceci préjuge donc de l'existence de très fortes interactions à l'interface protéines/surfaces métalliques.

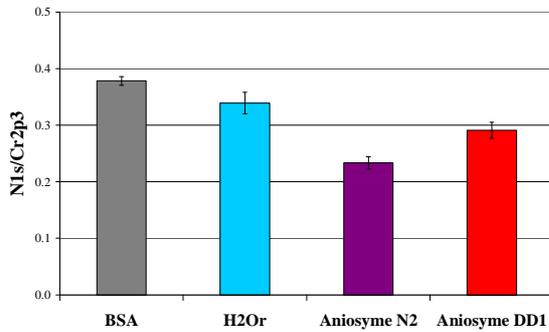
Il est souvent indiqué que les forces agissant à l'interface entre la surface et la protéine sont identiques à celles qui permettent de maintenir la structure tridimensionnelle des protéines. Les protéines seraient donc essentiellement physisorbées [Haynes et Norde 1994, Kidoaki et Matsuda 2002]. L'adsorption physique est typiquement caractérisée par des énergies de liaison inférieures à 40 kJ/mol et par sa réversibilité. Dans le cas de polymères adsorbés tels que les protéines, la multiplicité des interactions physiques contribue à une augmentation significative de l'énergie de liaison de la protéine sur la surface [Norde 1995].

Cependant, des exemples de chimisorption sont également rapportés dans la littérature et concernent l'adsorption des acides aminés soufrés et des protéines sur des surfaces d'or par l'intermédiaire d'une liaison covalente entre le soufre et l'or [Brizzolara, *et al.* 1997, Chi, *et al.* 2000, Ihs et Liedberg 1991, Petoral et Uvdal 2002, Schnyder, *et al.* 2002, Uvdal, *et al.* 1992].

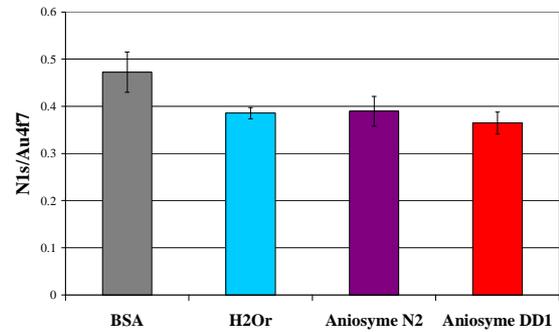
Compte tenu du fait que la chimisorption s'accompagne d'une profonde modification de la répartition des charges électriques sur les molécules adsorbées, il est possible de mettre en évidence de telles modifications par spectroscopie de photoélectrons [Chi, *et al.* 2000, Crispin, *et al.* 2002, Uvdal, *et al.* 1992]. Dans ce contexte, le but de cette étude est une meilleure compréhension de la nature des interactions gouvernant l'adsorption des protéines sur les surfaces métalliques. Pour cela, nous nous proposons d'étudier, par XPS, les interfaces formées entre le sérum albumine bovine (BSA) et les surfaces métalliques. Nous nous intéresserons en particulier aux surfaces de chrome et d'or qui sont connus pour interagir différemment avec divers types de polymères [Lachkar, *et al.* 1995, Lachkar, *et al.* 1994, Nguyen et deVos 1996, Shi, *et al.* 1994].

D'ailleurs, certains de nos travaux, menés dans le cadre du nettoyage des surfaces métalliques, nous conduisent également à penser que les mécanismes d'adsorption des protéines diffèrent entre l'or et

l'oxyde de chrome. Nous avons effectivement pu constater que les protéines adsorbées sur des surfaces d'oxyde de chrome pouvaient être plus ou moins désorbées suivant l'efficacité de la formulation utilisée (figure V-1). En revanche, les protéines adsorbées sur des surfaces d'or ne sont en rien affectées par les formulations de nettoyage qui, vis-à-vis de ce substrat, ne présentent pas d'efficacité supérieure à celle de l'eau du réseau (figure V-2).



**Figure V-1 :** Rapports N1s/Cr2p3 traduisant l'efficacité des formulations Aniosyme N2 et Aniosyme DD1 vis-à-vis de la BSA adsorbée sur des substrats d'oxyde de chrome, comparativement à l'eau du réseau (H<sub>2</sub>Or).



**Figure V-2 :** Rapports N1s/Au4f7 traduisant l'efficacité des formulations Aniosyme N2 et Aniosyme DD1 vis-à-vis de la BSA adsorbée sur des substrats d'or, comparativement à l'eau du réseau (H<sub>2</sub>Or).

Après un rappel succinct sur la structure des protéines et les interactions régissant leur stabilité conformationnelle, nous nous attacherons, dans un premier temps à caractériser les protéines et en particulier la BSA par XPS.

Dans un deuxième temps, nous nous consacrerons à l'étude des interfaces formées entre la BSA et les surfaces métalliques par XPS. Trois approches seront envisagées. La première consiste à construire l'interface en évaporant la BSA sous vide sur les différents substrats. Par la seconde approche, basée sur la notion de réversibilité de la physisorption, nous tenterons d'accéder à l'interface par désorption thermique de la BSA préalablement adsorbée. La dernière approche, inspirée des travaux de métallisation des polymères, consistera à déposer successivement de faibles quantités d'éléments métalliques et à suivre la formation de l'interface.

## II. STRUCTURE ET STABILITE CONFORMATIONNELLES DES PROTEINES

Les protéines sont des composés biologiques extrêmement importants. Elles remplissent de nombreuses fonctions biologiques :

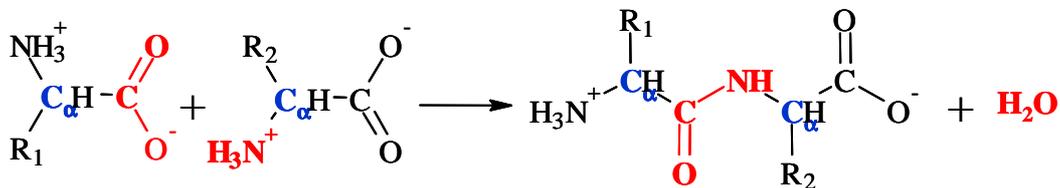
- Les enzymes catalysent la quasi-totalité des réactions chimiques de la cellule ;
- Les immunoglobulines sont largement impliquées dans les mécanismes de défense immunitaire ;
- Les hormones participent à la régulation des systèmes biologiques tels que les systèmes reproducteur, digestif, respiratoires... ;
- Les hémoglobines fixent et transportent l'oxygène et le dioxyde de carbone dans le sang ;
- L'actine et la myosine assurent la contraction musculaire et la mobilité.

Cette liste n'est pas exhaustive, mais montre le rôle primordial des protéines dans le processus de la vie.

Les protéines sont des polymères linéaires d'acides aminés. Chaque acide aminé est caractérisé par :

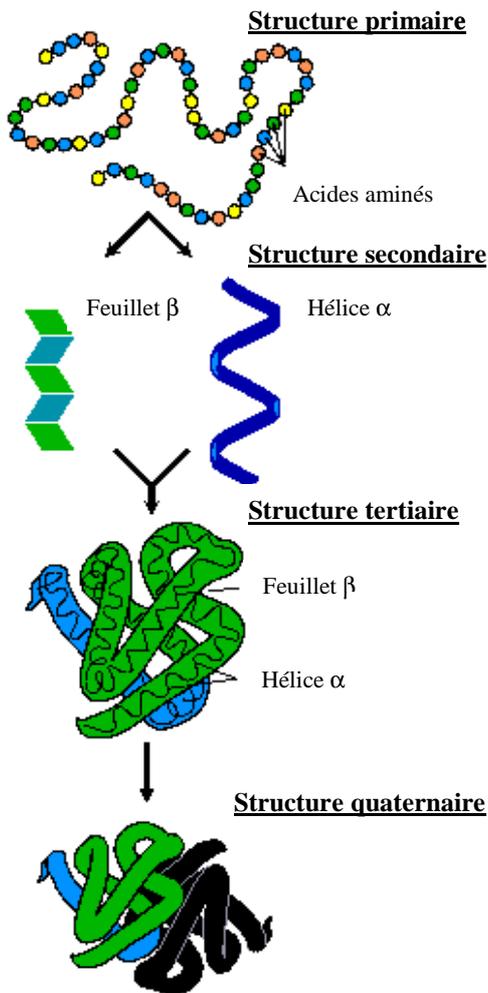
- Le  $C_{\alpha}$  : il s'agit du carbone central de l'acide aminé sur lequel sont attachés les quatre groupement suivants ;
  - Le groupement aminé ( $-NH_3^+$ ) ;
  - Le groupement carboxylate ( $-COO^-$ ) ;
  - Un atome d'hydrogène ( $-H$ ) ;
  - Un groupement appelé « chaîne latérale » et désigné généralement par ( $-R$ ), qui confère son identité à chaque acide aminé.

Dans les protéines, la liaison qui unie les acides aminés entre eux est la liaison peptidique. Cette liaison résulte d'une réaction de condensation entre la fonction carboxyle ( $-COO^-$ ) du premier acide aminé et la fonction amine ( $-NH_3^+$ ) du second. Cette réaction s'accompagne de la libération d'une molécule d'eau (figure V-3).



**Figure V-3** : Schéma de la liaison peptidique formée entre deux acides aminés.

Les protéines présentent quatre niveaux de structuration :



- La structure primaire : il s'agit de la séquence linéaire des acides aminés ;
- La structure secondaire : elle décrit la conformation des protéines c'est-à-dire l'organisation spatiale et locale de la séquence primaire. Deux conformations stabilisées par des liaisons hydrogènes sont connues. Ce sont les hélices  $\alpha$  et les structures  $\beta$  ;
- La structure tertiaire : elle décrit la conformation native des protéines dans l'espace tridimensionnel. Cette structure est considérée comme la forme biologiquement active des protéines. La stabilité conformationnelle de la structure tertiaire dépend des conditions environnementales telles que la force ionique, le pH, la concentration... ;
- La structure quaternaire : elle est rencontrée dans les protéines multimériques. Elle est obtenue par l'association d'au moins deux chaînes polypeptidiques, identiques ou différentes. L'hémoglobine, constituée de 4 sous-unités, est un exemple de structure quaternaire.

**Figure V-4 : Niveaux de structuration des protéines**

La stabilité conformationnelle des protéines est assurée par plusieurs interactions [Haynes et Norde 1994] :

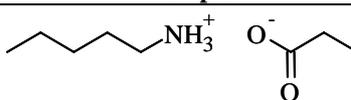
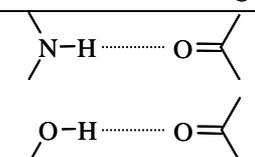
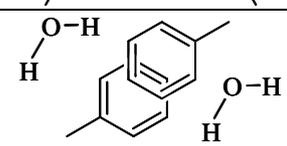
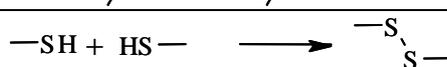
- Les interactions ioniques s'établissent entre les chaînes latérales chargées des acides aminés. Ces interactions sont attractives lorsque les charges sont de signes opposées et répulsives dans le cas de charges de même signe. Au point isoélectrique, les protéines portant autant de charges positives que de charges négatives ; les interactions ioniques sont nettement attractives et favorisent la structure compacte des protéines.
- Les liaisons hydrogène s'établissent par le partage d'un atome d'hydrogène entre deux atomes électronégatifs. La formation d'une liaison hydrogène nécessite :
  - Un atome électronégatif lié à l'atome d'hydrogène par une liaison covalente polarisée ;
  - Un second atome électronégatif possédant un doublet électronique libre.
 L'énergie de la liaison hydrogène (10 à 40 kJ/mol) est maximale lorsque l'atome d'hydrogène et ses deux partenaires électronégatifs sont colinéaires, comme dans le cas de l'eau et de la glace.
- Les interactions hydrophobes réfèrent à la déshydratation et l'assemblage consécutif des groupements apolaires dans un environnement aqueux ;

- Les interactions de Van der Waals sont des interactions électrostatiques transitoires et de faibles intensités (de 1 à 40 kJ/mol). Elles ont plusieurs origines :
  - Les forces de Keesom (interactions dipôle/dipôle) sont des interactions intermoléculaires entre dipôles permanents. Elles sont principalement liées à l'électronégativité. Deux molécules polaires possédant des moments dipolaires non nuls peuvent trouver des orientations favorables pour maximiser l'attraction entre elles.
  - Les forces de Debye (interactions dipôle/dipôle induit) sont des interactions intermoléculaires entre dipôle permanent et une molécule apolaire. Le champ électrique produit par le dipôle permanent déforme le nuage électronique de la molécule apolaire et provoque l'apparition d'un dipôle induit. Ce dernier peut alors subir une légère attraction de la part du dipôle permanent.
  - Les forces de London (interactions dipôle induit/dipôle induit) sont des interactions intermoléculaires entre des molécules apolaires. Etant donnée que la densité électronique des molécules est probabiliste, les électrons des molécules apolaires peuvent s'influencer mutuellement et produire transitoirement dans chacune d'elle, de faibles moments dipolaires.

Les forces d'attraction entre les dipôles sont proportionnelles à l'inverse de la 6<sup>ème</sup> puissance de la distance qui les sépare ( $1/d^6$ ). Ces interactions sont donc efficaces à courtes distances (0,3 – 0,4 nm).

Bien que les forces de Van de Waals au sein d'une protéine soient de faible valeur, la concentration importante des groupements non polaires favorise largement les attractions de Van der Waals. Ces interactions ont donc une part importante dans le maintien de la structure des protéines.
- Les ponts disulfures sont des liens covalents résultant de l'oxydation des groupements sulfhydriques (–SH) de deux cystéines.

**Tableau V-1 : Les interactions favorisant la stabilité conformationnelle des protéines. (Balme S )**

Interactions	Exemple	Energie (kJ/mol)
Interactions ioniques		35 à 90
Liaisons hydrogènes		8 à 40
Interactions hydrophobes		4 à 12
Interactions de Van der Waals		1 à 10
Liaisons covalentes		320 à 380

### III. CARACTERISATION DE LA BSA PAR XPS

Préalablement à l'étude des interfaces formées entre la BSA et les surfaces métalliques, la protéine est caractérisée par XPS. Nous présenterons la composition élémentaire et chimique de la BSA obtenue par l'analyse d'une couche épaisse de cette protéine et de la BSA adsorbée sur des surfaces métalliques de chrome et d'or.

#### III.1. Matériel et méthode de travail

##### Conditions d'analyse :

Les analyses XPS sont effectuées avec le spectromètre Escalab 220i (Thermo Electron Corporation) équipé d'une source non monochromatisée d'aluminium (Al K $\alpha$  1486,6 eV). La puissance du rayonnement est de 200 W avec une zone analysée d'environ 1 cm<sup>2</sup>. Les spectres haute résolution, centrés sur les niveaux de cœur C1s, O1s, N1s, S2p, Cr2p et Au4f, sont enregistrés avec une énergie de passage de 20 eV. L'angle de détection est de 90° par rapport à la surface de l'échantillon. Les analyses sont réalisées sous un vide de 10<sup>-7</sup> Pa. Les effets de charge sont corrigés par rapport à l'énergie de liaison du carbone aliphatique à 284,8 eV. La décomposition des spectres est réalisée grâce au logiciel Advantage (Thermo Electron Corporation). L'aire des pics est déterminée après soustraction du fond continu de type Shirley et les sections efficaces d'ionisation utilisées pour l'analyse quantitative sont celles calculées par Scofield.

##### Couche épaisse de BSA :

Afin d'obtenir les spectres de références XPS pour la BSA, une couche épaisse de protéine est préparée par évaporation successive à l'air et à température ambiante d'une solution de BSA à 1 mg/ml déposée sur un wafer de silicium. L'épaisseur de la couche ainsi constituée doit être supérieure à la profondeur d'analyse de l'XPS (10 nm).

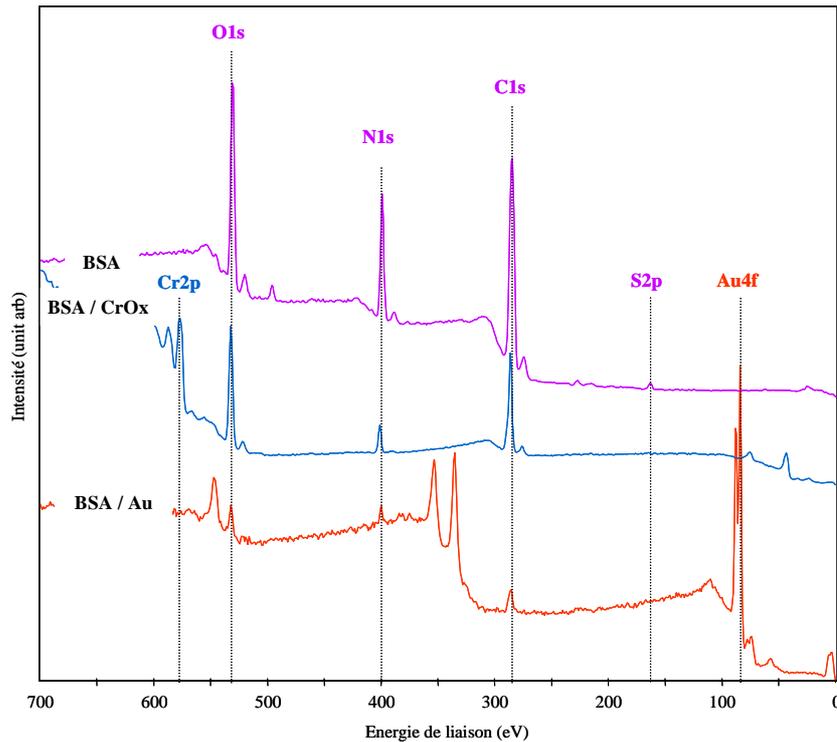
##### Adsorption de la BSA sur les substrats de chrome et d'or :

Les substrats de chrome nous ont été fournis par la société Sagem. Le chrome étant oxydé à l'air, il sera noté CrOx. Les dépôts d'or sont réalisés sur des wafers de silicium par pulvérisation cathodique magnétron sous 0,1 Pa d'argon.

L'adsorption de la BSA est réalisée par immersion des substrats dans une solution aqueuse de BSA à 1mg/ml pendant une heure à température ambiante. Les substrats sont ensuite rincés par dilution successive à l'eau distillée puis sont séchés sous un flux d'azote sec.

#### III.2. Résultats

Les analyses XPS réalisées sur la couche épaisse de BSA montre la présence d'oxygène, d'azote, de carbone et de soufre (figure V-5). Ceci est en parfait accord avec la composition élémentaire des protéines. Ces éléments sont également détectés sur les substrats d'oxyde de chrome (BSA/CrOx) et d'or (BSA/Au) après adsorption. Les éléments caractéristiques de ces substrats (Cr2p et Au4f) étant clairement observés, l'épaisseur moyenne de la couche de BSA adsorbée est inférieure à la profondeur d'analyse de l'XPS.



**Figure V-5 :** Spectres XPS de la BSA en couche épaisse, de la BSA adsorbée sur des substrats d'oxyde de chrome et d'or.

Les acquisitions centrées sur les éléments de la protéine sont réalisées afin d'identifier les différentes composantes chimiques (figure V-6) en accord avec les données disponibles dans la littérature [Lebugle, *et al.* 1995, Petoral et Uvdal 2002, Pradier, *et al.* 2002, Rouxhet L. et Bertrand 1999, Rouxhet P.G., *et al.* 1994, Rubio, *et al.* 2002, Schmidt et Steinemann 1991, Tidwell, *et al.* 2001, Xiao, *et al.* 1997].

La décomposition des pics du carbone obtenus sur la BSA et sur la BSA adsorbée révèle la présence de trois composantes identifiées à :

- 284,8 eV pour le carbone aliphatique C-(C,H) ;
- 286,3 eV pour les C<sub>α</sub> du squelette protéique et les liaisons C-N et C-O des chaînes latérales ;
- 288,0 eV pour les fonctions amides et carbonyles (N)-C=O.

La décomposition du niveau de cœur 1s de l'oxygène montre la présence de deux composantes à :

- 531,6 eV caractéristique des fonctions amides et carbonyles;
- 533,2 eV caractéristique des liaisons O-C ou O-H.

Une contribution supplémentaire pour l'oxygène est observée à 530,2 eV lorsque la BSA est adsorbée sur l'oxyde de chrome (BSA/CrOx). Cette contribution est attribuée à l'oxygène sous forme d'oxyde métallique, caractéristique du substrat CrOx.

Sur le substrat d'Au, seule la contribution O=C-(N) est observée, la contribution O-C étant probablement confondue dans le fond généré par le niveau de cœur 4p<sup>3/2</sup> de l'or à 546,3 eV.

Le niveau de cœur 1s de l'azote pour les différents substrats révèle une seule composante à 400,0 eV attribuée à l'azote sous forme amide (N-C=O).

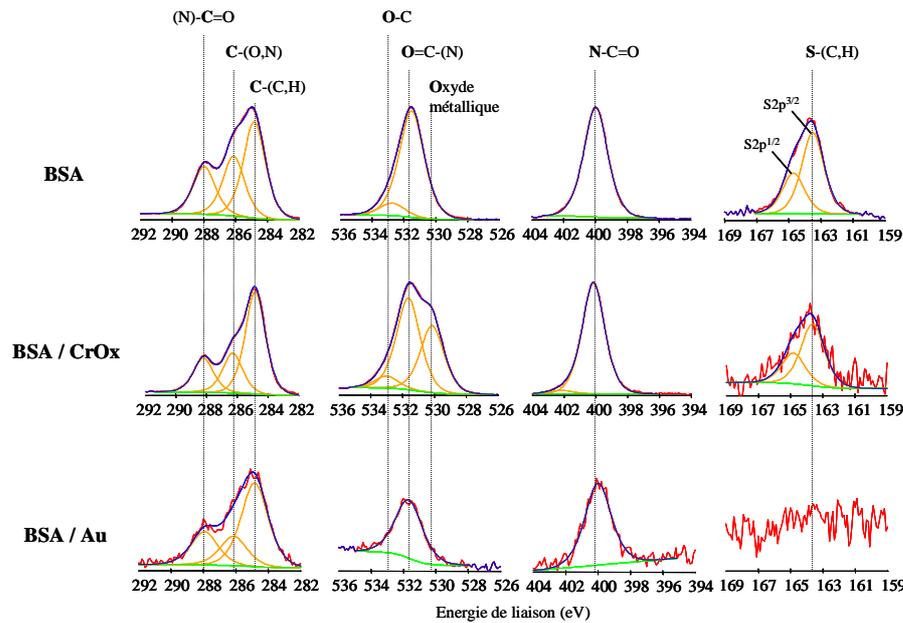
Enfin, les spectres XPS obtenus pour le soufre montrent une seule composante chimique représentée par deux niveaux électroniques (S2p<sup>1/2</sup> et S2p<sup>3/2</sup>). L'énergie de liaison du niveau électronique S2p<sup>3/2</sup> à 163,5 eV est représentative du groupement thiol (-SH) de la cystéine et de la fonction thioether (-S-CH<sub>3</sub>) de la

méthionine. Cette composante est observée lorsque la BSA est adsorbée sur l'oxyde de chrome, mais ne l'est pas sur l'or. Ceci peut être expliqué par le fond généré par les niveaux de cœur Au4f de l'or. Les différentes composantes du carbone, de l'oxygène, de l'azote et du soufre ainsi que leurs énergies de liaison sont récapitulées dans le tableau V-2.

**Tableau V-2 : Composantes des éléments identifiés par XPS sur la BSA et leurs énergies de liaison ( $E_L$ ) corrigées ( $E_L \pm 0,2$  eV)**

Liaisons	C1s			O1s			N1s	S2p <sup>3/2</sup>
	C-(C,H)	C-(O,N)	(N)-C=O	O <sub>Ox</sub> *	O=C-(N)	O-(C,H)	N-C=O	S-(C,H)
$E_L$ (eV)	284,8	286,3	288,0	530,2	531,5	533,2	400,0	163,5

\* L'oxyde métallique O<sub>Ox</sub> est spécifique du substrat d'oxyde de chrome



**Figure V-6 : Niveaux de cœur C1s, O1s, N1s et S2p de la BSA et de la BSA adsorbée sur des substrats d'oxyde de chrome (BSA/CrOx) et d'or (BSA/Au).**

Les données quantitatives obtenues par XPS sur la composition élémentaire de la BSA et de la BSA adsorbée sont présentées dans le tableau V-3.

**Tableau V-3 : Compositions élémentaires quantitatives obtenues par XPS pour la BSA et la BSA adsorbée sur des substrats d'oxyde de chrome (BSA/CrOx) et d'or (BSA/Au). Les résultats sont exprimés en % atomique.**

Eléments	% Théorique	BSA	BSA/CrOx	BSA/Au
C	63,6	64,2 ± 0,9	52,8 ± 3,2	43,5 ± 1,5
O <sub>BSA</sub>	19,2	18,3 ± 0,8	17,5 ± 1,0	12,9 ± 1,1
N	16,4	16,1 ± 0,4	8,0 ± 0,9	11,6 ± 1,3
S	0,8	1,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1	ND
Cr			9,9 ± 0,6	
O <sub>Ox</sub>			11,5 ± 0,7	
Au				32,0 ± 1,2

ND : Non Détecté

Les pourcentages expérimentaux des éléments de la BSA obtenus par XPS sont en parfait accord avec les pourcentages théoriques. Les données XPS sont donc représentatives à la fois de la composition qualitative et quantitative de la BSA.

L'ensemble des photoélectrons collectés représentant 100% des constituants de l'échantillon analysé, il est nécessaire, dans le cas de la BSA adsorbée, de procéder aux calculs des rapports entre les éléments de la protéine pour vérifier sa stoechiométrie lorsque les éléments du substrat sont détectés. Ces rapports sont présentés dans le tableau V-4.

**Tableau V-4 : Rapports théoriques et expérimentaux des éléments constitutifs des protéines pour la BSA et la BSA adsorbée sur des substrats d'oxyde de chrome (BSA/CrOx) et d'or (BSA/Au).**

Rapports	% Théorique	BSA	BSA/CrOx	BSA/Au
N/C	0,258	0,252	0,153	0,266
O <sub>BSA</sub> /C	0,301	0,285	0,331	0,296
N/O <sub>BSA</sub>	0,854	0,856	0,457	0,905
S/N	0,051	0,052	0,045	ND
N/(C <sub>286,3</sub> +C <sub>288,0</sub> )	/	0,502	0,422	0,551
C <sub>286,3</sub> /C <sub>288,0</sub>	/	1,29	1,20	1,40
N/Cr	/	/	0,807	/
N/Au	/	/	/	0,361

Essentiellement quatre rapports peuvent être calculés compte tenu de la composition élémentaire des protéines : les rapports N/C, O/C, N/O et S/N. En raison de la contamination carbonée qui contribue à l'intensité de la composante C-(C,H) du carbone, nous avons calculé le rapport N/(C<sub>286,3</sub>+C<sub>288,0</sub>) qui est relativement représentatif du squelette de la protéine. En effet, l'atome d'azote impliqué dans la liaison peptidique est lié à la fois au carbone  $\alpha$  (286,3 eV) et au carbone sous forme amide de la liaison peptidique (288,0 eV). Ces liaisons sont donc traduites de façon stoechiométrique par ce rapport, théoriquement égal à 0,5. Précisons cependant que les liaisons C-O et C-N des chaînes latérales influent sur sa valeur.

Dans le cas de la BSA/CrOx, les rapports calculés sont inférieurs aux rapports théoriques et expérimentaux de la BSA, à l'exception du rapport O<sub>BSA</sub>/C. Ces résultats peuvent s'expliquer d'une part par la présence d'une couche de contamination hydrocarbonée qui va augmenter la quantité de carbone détectée et donc réduire le rapport N/C [Gerin, *et al.* 1995, Lebugle, *et al.* 1995]. Compte tenu de l'existence d'une faible contribution C-O dans la couche de contamination, le rapport N/(C<sub>286,3</sub>+C<sub>288,0</sub>) est également légèrement diminué. D'autre part, la présence d'oxygène sous forme d'oxyde métallique peut entraîner une incertitude dans la décomposition des pics en raison du chevauchement des deux contributions organique et métallique. Ceci peut se répercuter sur les données quantitatives. Une surévaluation de la quantité d'oxyde métallique permettrait d'expliquer la valeur relativement faible du rapport N/O<sub>BSA</sub> et la valeur plus élevée du rapport O<sub>BSA</sub>/C. La décomposition des pics d'oxygène étant particulièrement délicate, nous ne porterons que peu d'attention aux données quantitatives obtenues pour cet élément.

Dans le cas de la BSA adsorbée sur l'or, les rapports calculés sont comparables aux rapports théoriques et expérimentaux de la BSA.

**En résumé :**

**La composition élémentaire et chimique de la BSA déterminée par XPS est qualitativement et quantitativement en bon accord avec les données théoriques. Nous n'observons pas de dégradation de la protéine au cours de l'irradiation de photons X pendant la durée de l'analyse. L'XPS est donc bien adaptée pour suivre les modifications stœchiométriques et chimiques de la BSA dans l'interface.**

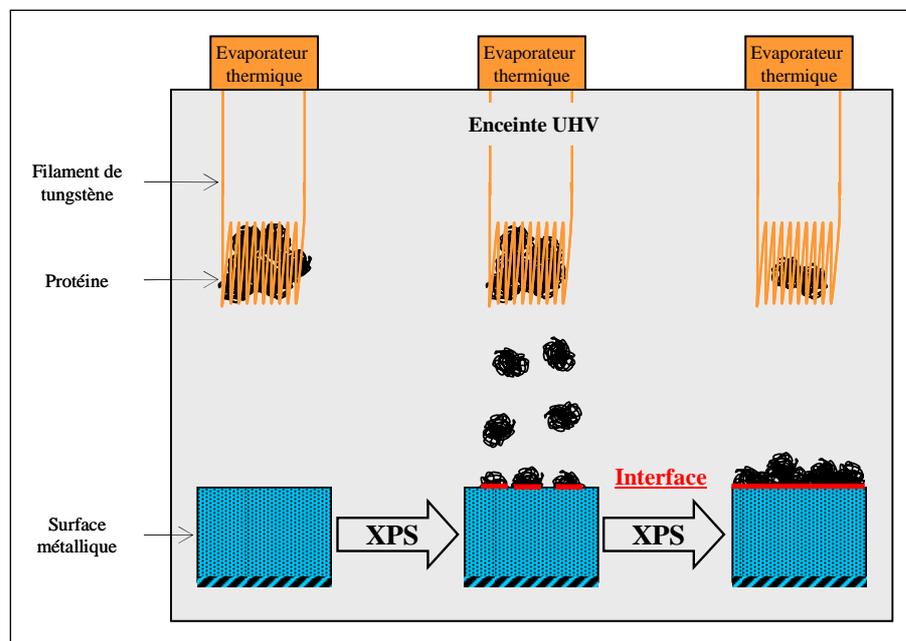
## IV. ETUDE XPS DE L'INTERFACE BSA/MÉTAL

### IV.1. Trois approches pour accéder à l'interface

Accéder à l'interface formée entre les protéines et les surfaces métalliques est l'objectif de cette étude. Dans l'hypothèse d'une chimisorption des protéines, les modifications chimiques générées devraient en principe pouvoir être mises en évidence par XPS. Nous avons donc envisagé trois stratégies, couplées aux analyses XPS, pour avoir accès à l'interface.

#### Construction de l'interface protéines/métal par sublimation de la BSA sur les surfaces métalliques

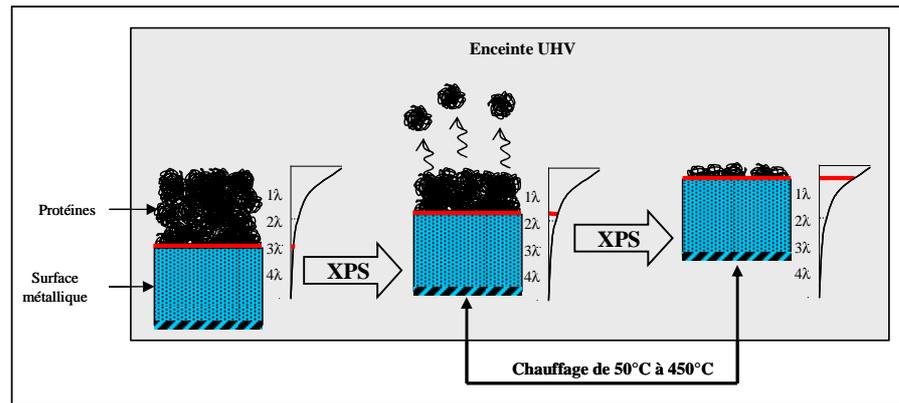
Notre première approche consiste à construire l'interface par sublimation progressive de la BSA sur les substrats d'oxyde de chrome et d'or. Réalisées entre chaque sublimation, les analyses XPS devraient nous permettre de suivre l'évolution des différentes composantes des éléments caractéristiques de la protéine au fur et à mesure de la croissance de la couche de BSA déposée (figure V-7).



**Figure V-7 :** Illustration de l'étude de l'interface protéine/surface métallique par sublimation des protéines sous vide.

#### Accession à l'interface protéines/métal par désorption thermique de la BSA

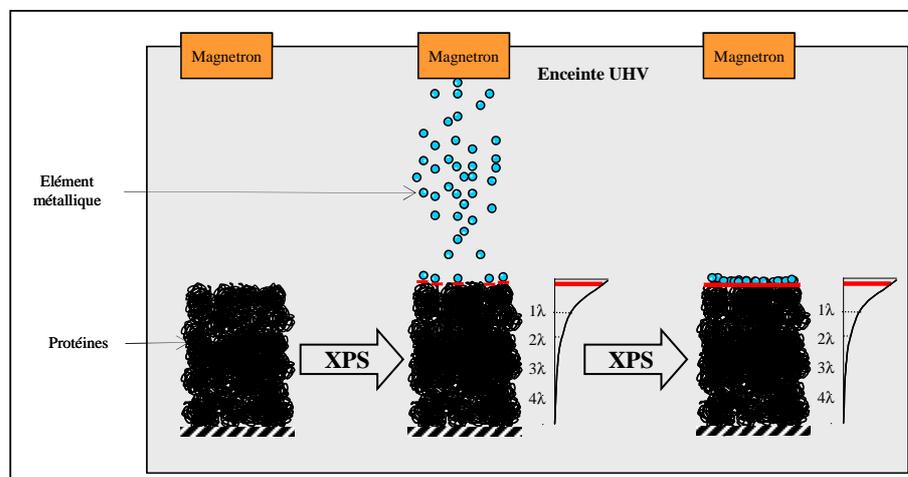
Notre seconde approche est le chemin inverse de la précédente et consiste à désorber thermiquement la BSA qui aura été préalablement déposée sur les substrats. L'intérêt de cette approche réside dans sa plus grande sensibilité à l'interface. En effet, le transfert des électrons dans la matière subit une loi d'absorption exponentielle et il est établi que 63% du signal provient d'une profondeur approximativement égale au libre parcours moyen. Ainsi, en réduisant l'épaisseur de la couche de BSA adsorbée, nous aurons une plus grande sensibilité à l'interface (figure V-8).



**Figure V-8 :** Illustration de l'étude de l'interface protéine/surface métallique par désorption thermique de la BSA préalablement adsorbée.

### **Construction de l'interface métal/protéines par métallisation de la BSA**

Les interfaces étudiées par les deux précédentes approches sont celles formées par l'adsorption des protéines sur les surfaces métalliques. Cependant, en raison de la faible profondeur d'analyse de l'XPS et de l'épaisseur non négligeable d'une monocouche de protéine adsorbée, l'interface formée au cours de l'adsorption est enfouie et plus difficilement accessible. La dernière approche est totalement opposée aux précédentes et est inspirée d'études portant sur la métallisation des polymères [Bebin et Prud'homme 2002, Bou, *et al.* 1991, Chenite et Selmani 1994, Wagner, *et al.* 2003]. L'épaisseur d'une monocouche de métal étant nettement inférieure à celle des protéines, nous avons construit l'interface en déposant de très fines couches de métal sur la BSA. Les modifications chimiques au cours de la formation de l'interface ont été suivies par XPS (figure V-9).



**Figure V-9 :** Illustration de l'étude de l'interface métal/protéine par pulvérisation cathodique magnétron d'éléments métalliques sur les protéines.

Les résultats des analyses XPS obtenues pour chacune de ces approches sont présentés et discutés successivement.

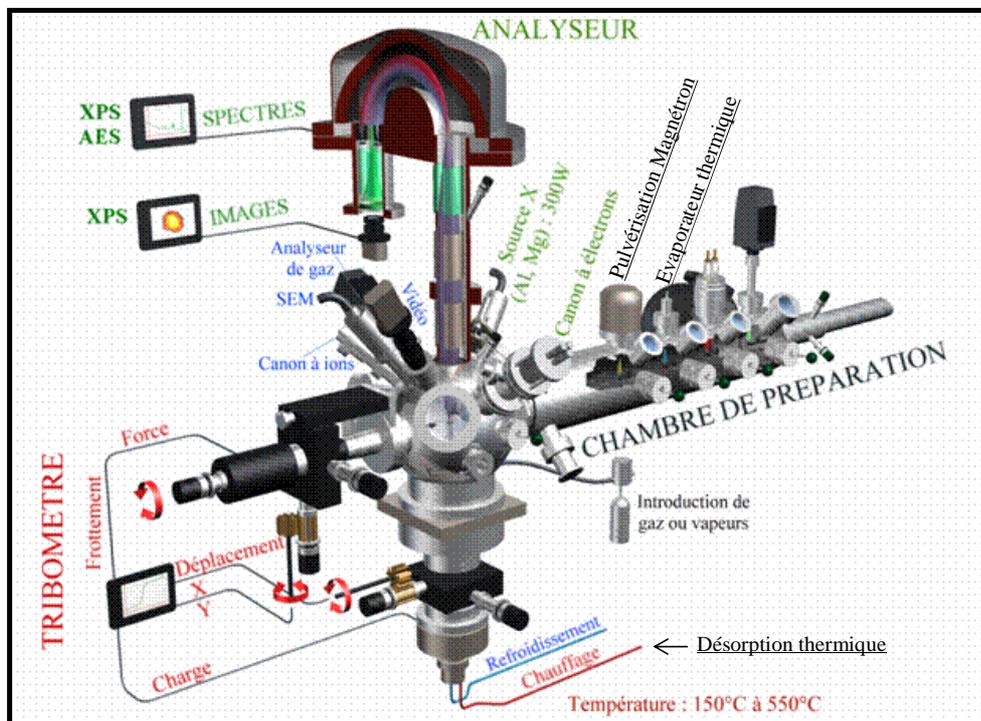
## IV.2. Construction de l'interface BSA/métal par sublimation de la BSA

### IV.2.1. Matériel et méthode de travail

#### Préparation des échantillons et sublimation de la BSA:

Préalablement à la sublimation des protéines, les substrats d'oxyde de chrome et d'or sont débarrassés de la couche de contamination carbonée par abrasion ionique à l'argon. La sublimation des protéines sous vide est réalisée à partir de BSA sous forme de poudre (Albumin Fraction V, Merck). Celle-ci est déposée dans un creuset de tantale logé dans un filament hélicoïdal de tungstène. Le montage est adapté sur l'évaporateur thermique dans la chambre de préparation (figure V-10). La distance entre la source (BSA) et le substrat est de l'ordre de 7 cm.

Pour procéder à la sublimation de la BSA, les substrats sont positionnés sous le filament de tungstène qui est chauffé par effet joule (10 V, 8 A) jusqu'à ce que la pression dans la chambre de préparation augmente de  $10^{-6}$  Pa à  $2 \cdot 10^{-3}$  Pa. A cette pression, la température du filament de tungstène est évaluée à 245°C environ, par un thermocouple Chromel/Alumel.



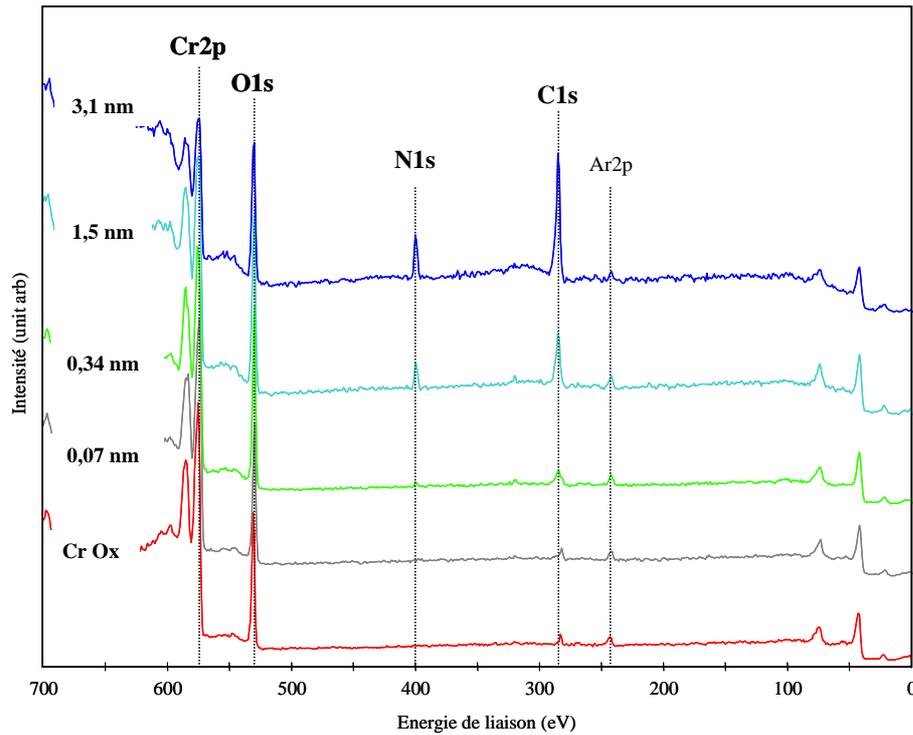
**Figure V-10 :** Schématisation de l'appareillage sous UHV et des différents éléments le constituant.

#### Calcul d'épaisseur équivalente :

La variation d'intensité des pics du substrat étant due à l'atténuation du signal par la couche de protéine déposée, son épaisseur peut être évaluée en faisant l'hypothèse que la couche est homogène (Annexe 5-I).

### IV.2.2. Etude de l'interface BSA/CrOx

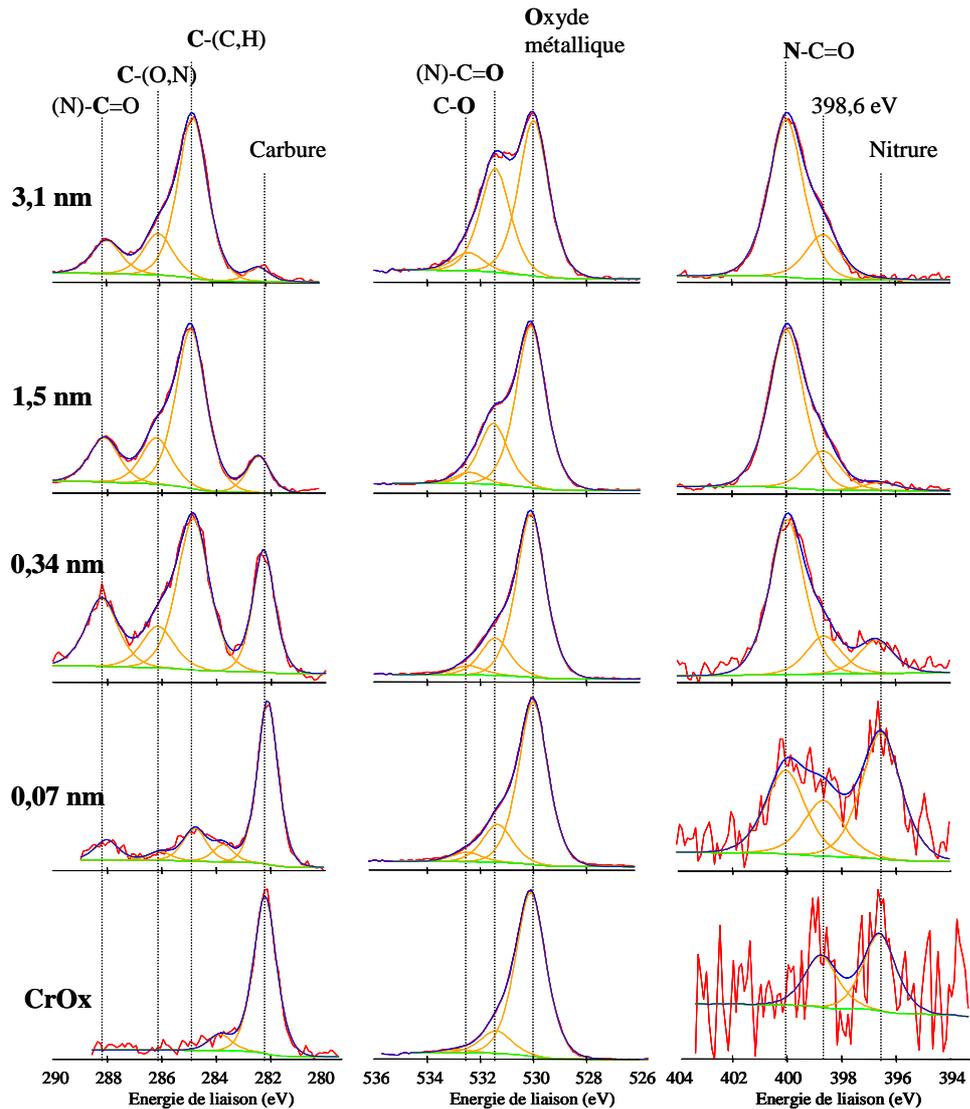
La figure V-11 présente les spectres du substrat CrOx en fonction de l'épaisseur évaluée de la BSA adsorbée. Les intensités des pics C1s, O1s et N1s, caractéristiques de la protéine augmentent avec l'épaisseur de la couche évaporée alors que l'intensité du pic Cr2p du substrat diminue.



**Figure V-11** : Spectres XPS du substrat CrOx en fonction de l'épaisseur de la couche de BSA évaporée. Les pics C1s, N1s et O1s, caractéristiques de la protéine augmentent avec l'atténuation du pic Cr2p caractéristique du substrat.

On peut également observer une augmentation du niveau du fond continu après les pics du niveau 2p du chrome couplée à la croissance de la couche de BSA. Ceci confirme bien que les électrons du chrome proviennent d'une profondeur de plus en plus importante. L'épaisseur de la couche de protéines reste néanmoins insuffisante pour masquer le signal du chrome.

Afin de suivre l'évolution des composantes des éléments constitutifs de la BSA, les acquisitions centrées sur les niveaux de cœur C1s, O1s et N1s sont présentés sur la figure V-12.



**Figure V-12 :** Niveaux de cœur C1s, O1s et N1s suivant l'épaisseur de la couche de BSA évaporée sur le substrat CrOx.

Préalablement à l'évaporation des protéines, le substrat CrOx a subi une abrasion ionique pour éliminer la couche de contamination carbonée présente sur les surfaces métalliques exposées à l'air. Le substrat abrasé est alors analysé afin d'identifier les composantes éventuelles du carbone, de l'oxygène et de l'azote (figure V-12 : CrOx) :

- La composante du carbone identifiée à 282,3 eV est attribuée au carbone sous forme de carbure [Jordan, *et al.* 1986] ;
- La composante majoritaire du pic O1s à 530,0 eV correspond à l'O<sup>2-</sup> dans les oxydes métalliques du chrome [Marcus et Galtayries 2003]. La seconde composante observée à 531,4 eV est probablement associée aux OH des espèces hydroxydes résiduelles après abrasion [Marcus et Galtayries 2003, Milosev et Strehblow 2003];
- Deux composantes, de très faibles intensités, sont observées dans la gamme des énergies de liaisons de l'azote à 396,6 et 398,6 eV.

Les composantes identifiées pour le carbone et l'azote mettent en évidence la présence d'impuretés dans la couche de chrome qui constitue un artefact important pour l'étude de la chimisorption des protéines.

Ensuite, les évaporations successives de BSA sur ce substrat font apparaître les contributions du carbone et de l'oxygène caractéristiques des protéines. L'intensité de ces contributions augmente avec l'atténuation des composantes du substrat (carbure et oxyde en particulier).

Dans le cas de l'azote, une contribution supplémentaire à celle de la fonction amide est observée à 398,6 eV. Pour l'heure, cette composante de l'azote n'est pas attribuée. Quant au soufre, il n'est pas détecté quelle que soit l'épaisseur de la couche de BSA évaporée. Bien que cet élément soit faiblement représenté dans la BSA, il est habituellement observé sur CrOx lorsque la BSA est adsorbée à partir d'une solution aqueuse. Il est donc probable que les liaisons chimiques des chaînes latérales de la BSA ne restent pas intactes au cours de la sublimation.

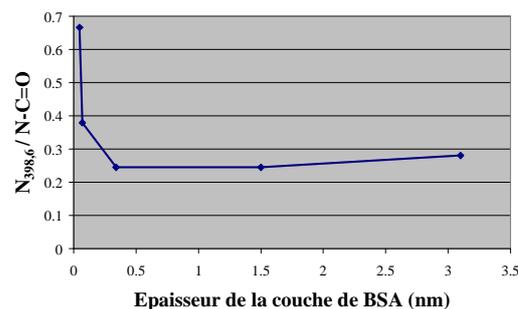
Les rapports N/C ont été calculés pour chaque épaisseur de BSA (tableau V-5). La valeur de ces rapports, relativement constante et en accord avec la référence théorique, suggère que la stoechiométrie du carbone et de l'azote dans la protéine est conservée au cours des évaporations. Ceci ne préjuge pas de la conservation de l'oxygène de la protéine. Compte tenu de l'absence de contamination carbonée du fait de la sublimation *in situ* de la couche protéique, le rapport calculé est supérieur à celui obtenu sur le substrat CrOx/BSA de référence.

**Tableau V-5 : Rapports N/C calculés en fonction de l'épaisseur de la couche de BSA évaporée sur le substrat CrOx.**

	0,07 nm	0,34 nm	1,5 nm	3,1 nm	Référence BSA/CrOx	Référence théorique
N/C <sub>BSA</sub>	0,280	0,214	0,242	0,221	0,153	0,258

D'un point de vue chimique, il est difficile de savoir si le carbone subit des modifications dans son environnement électronique à l'interface. En effet, la présence du carbure dans le substrat minimise considérablement la sensibilité de l'analyse. La modification majeure observée est donc la composante supplémentaire de l'azote, qui n'est habituellement pas observée lorsque la BSA est adsorbée à partir d'une solution aqueuse de protéines. Compte tenu du fait que le rapport C/N est constant, cette nouvelle composante est issue de l'azote de la protéine évaporée, une contamination azotée est donc exclue.

Si l'on suit la variation du rapport  $N_{398,6}/N-C=O$  en fonction de l'épaisseur de la couche de BSA (figure V-13), ce rapport diminue jusqu'à 0,34 nm puis reste constant quelque soit l'épaisseur de la couche.



**Figure V-13 : Evolution du rapport  $N_{398,6}/N-C=O$  en fonction de l'épaisseur de la couche de BSA sur le substrat CrOx.**

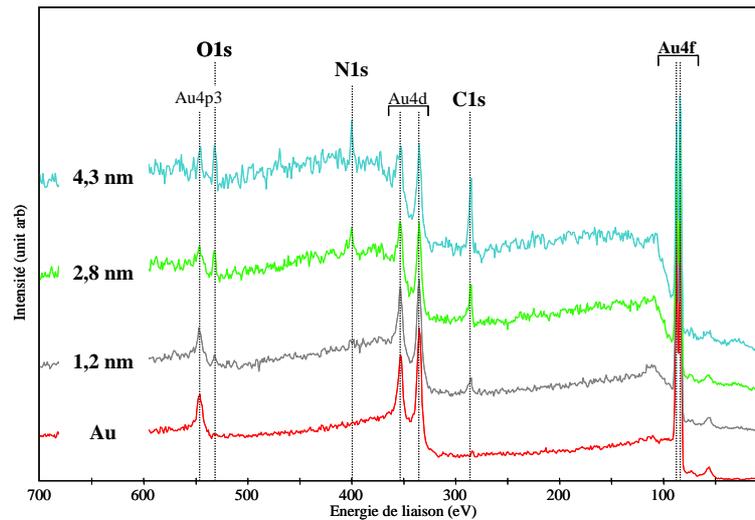
La composante  $N_{398,6}$  est donc majoritairement observée dans les premiers angströms de l'interface formée. Cependant, si cette contribution était spécifiquement associée à une modification de l'environnement électronique de l'azote à l'interface, son intensité devrait décroître puis disparaître avec l'augmentation de l'épaisseur de la couche de protéine. La présence des contaminants azotés du substrat peut entraîner des biais importants dans les analyses quantitatives, notamment lors des premières

évaporations où le rapport signal sur bruit est faible. L'interprétation est donc difficile compte tenu de la contamination de la couche d'oxyde de chrome.

Néanmoins, nous remarquons avec intérêt que le carbone et l'azote de la protéine masquent pratiquement les composantes carbures et nitrures du substrat pour une couche de BSA estimée à 3,1 nm. Si de telles liaisons devaient exister lorsque la protéine interagit avec le substrat, cette méthode ne nous permettrait pas de les identifier.

### IV.2.3. Interface BSA/Au

La sublimation de la BSA a également été réalisée sur un substrat d'or (figure V-14 et figure V-15).



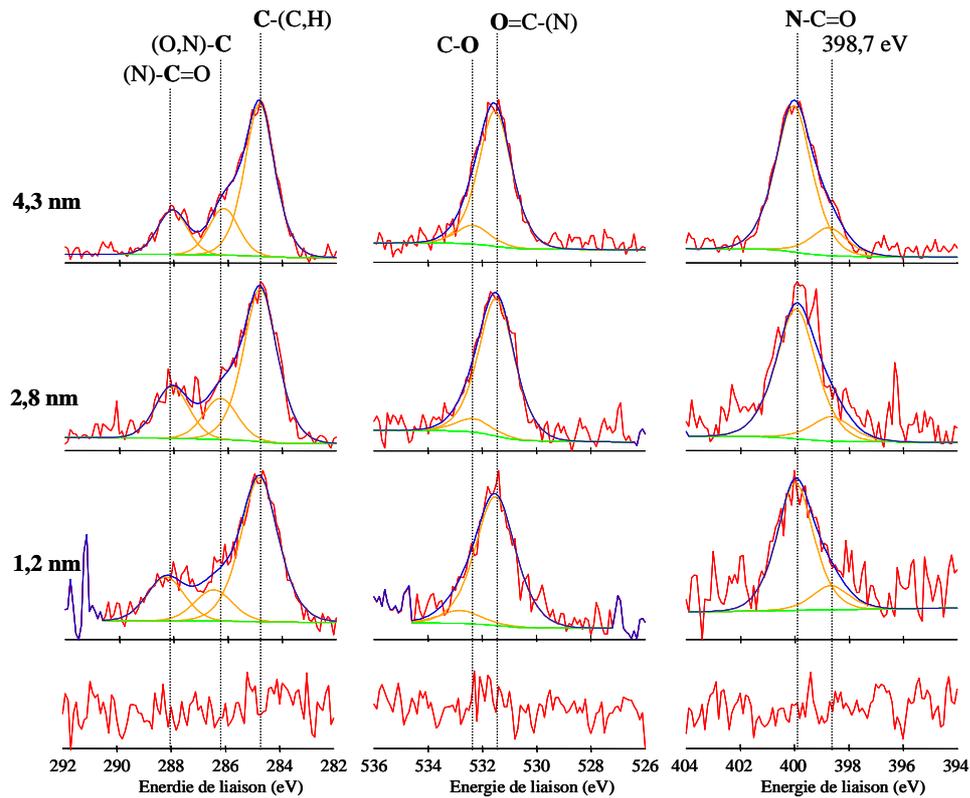
**Figure V-14** : Spectres XPS du substrat d'or en fonction de l'épaisseur de la couche de BSA évaporée. Les pics C1s, N1s et O1s, caractéristiques de la protéine augmentent avec l'atténuation des pics d'or caractéristiques du substrat.

Comme dans le cas du substrat CrOx, l'augmentation de l'épaisseur de la couche de protéine évaporée s'accompagne d'une atténuation des pics du substrat Au 4f et d'une augmentation du fond (figure V-14). La stoechiométrie de la protéine est également conservée pour le carbone et l'azote. En revanche l'oxygène diminue (tableau V-6).

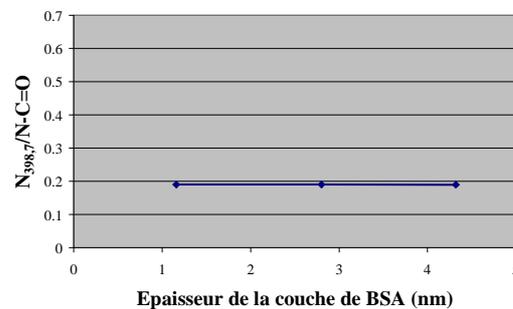
**Tableau V-6** : Rapports N/C calculés en fonction de l'épaisseur de la couche de BSA évaporée sur le substrat d'or.

	1,2 nm	2,8 nm	4,3 nm	Référence BSA/Au	Référence théorique
N/C	0,300	0,265	0,268	0,221	0,258
O/C	0,286	0,209	0,198	0,296	0,285

Sur le plan des modifications chimiques, c'est également l'azote qui présente une contribution supplémentaire identifiée à 398,7 eV (figure V-15) et le rapport calculé  $N_{398,7}/N-C=O$  est constant quelle que soit l'épaisseur de la couche de BSA évaporée (figure V-16).



**Figure V-15 :** Niveaux de cœur C1s, O1s et N1s suivant l'épaisseur de la couche de BSA évaporée sur le substrat d'Or.



**Figure V-16 :** Evolution du rapport  $N_{398,6}/N-C=O$  en fonction de l'épaisseur de la couche de BSA sur le substrat d'or

N'ayant pas la maîtrise de la vitesse de sublimation des protéines dans notre dispositif expérimental et compte tenu de la sensibilité de l'or aux photons incidents, nous n'avons pu accéder aux premiers angströms de l'interface.

#### IV.2.4. Discussion

La sublimation des protéines est réalisée sous vide à partir de poudre de BSA chauffée par effet joule via un filament de tungstène. La température pour laquelle l'évaporation des protéines augmente la pression dans l'enceinte UHV est d'environ 245°C. La BSA évaporée à cette température, et analysée par XPS, présente les mêmes contributions que celles qui ont été identifiées lors de l'adsorption de la BSA à partir d'une solution aqueuse. Il faut cependant noter que la quantité d'oxygène normalement présente dans la protéine n'est pas constante au cours des sublimations et que le soufre n'est jamais détecté, quel que soit le substrat analysé. Ceci suggère donc que certaines liaisons chimiques peuvent se détériorer à cette

température, contrairement à ce qui est suggéré par les travaux de Glavin portant sur la sublimation des acides aminés sous vide partiel de 30 Pa à 450°C [Glavin et Bada 1998].

Les acquisitions centrées sur le niveau de cœur 1s de l'azote ont mis en évidence, sur le substrat CrOx et Au, la présence d'une nouvelle composante à plus faible énergie de liaison. Bien que cette composante soit particulièrement observée dans les premiers angströms de l'interface BSA/CrOx, elle n'est pas totalement atténuée par la croissance de la couche de BSA, le rapport  $N_{398,6}/N-C=O$  devenant constant dès 0,3 nm. La constance de ce rapport est également observée dans le cas de l'or. Il est donc probable que cette composante soit une caractéristique de la BSA sublimée sous vide à 245°C. Cette contribution, à plus faible énergie de liaison, représente approximativement 20% et 16% de l'azote détecté respectivement sur CrOx et Au. Or, l'analyse théorique de la structure chimique de la BSA indique que l'azote contenu dans cette protéine est impliqué à environ 80% dans les fonctions amides du squelette carboné. On retrouve donc 20% d'azote dans les chaînes latérales de la protéine. Il est donc possible que la sublimation génère une déstructuration des liaisons chimiques azotées des chaînes latérales qui se traduirait par une légère augmentation de la densité électronique autour de l'azote.

Cette première approche met en exergue la difficulté d'accéder à la formation de l'interface entre les protéines et les surfaces métalliques. La BSA est une protéine de 68kDa dont les dimensions sont environ 4 x 4 x 14 nm [Terashima et Tusuji 2002]. On peut donc supposer que l'épaisseur minimale d'une monocouche de protéines adsorbées soit du même ordre de grandeur que son axe le plus court [Blomberg, *et al.* 1998]. Sachant que les interactions que nous cherchons à observer s'établissent sur des distances inférieures à 0,3 nm, et que 63% de l'intensité du signal provient d'une profondeur de l'ordre de grandeur du libre parcours moyen ( $\lambda$ ), la dimension de la protéine apparaît donc comme un facteur limitant fortement l'accès à l'interface.

#### **En résumé :**

**La stœchiométrie du carbone et de l'azote de la BSA est conservée au cours de sa sublimation. Cependant, la quantité d'oxygène semble diminuer et le soufre n'est pas détecté. La principale modification chimique observée concerne une augmentation de la densité électronique autour de l'azote qui se traduit par l'apparition d'une nouvelle composante à plus faible énergie de liaison : 398,6 eV. Il est probable que cette contribution soit associée à une dégradation partielle des liaisons impliquant l'azote dans les chaînes latérales de la protéine.**

### **IV.3. Analyse de l'interface BSA/métal par désorption thermique sous vide**

Afin d'augmenter la sensibilité des analyses XPS à l'interface BSA/surfaces métalliques, nous avons envisagé l'approche inverse de la précédente et procéder à la désorption thermique de la BSA pour accéder à l'interface préalablement formée avec la surface métallique.

#### ***IV.3.1. Matériel et méthode de travail***

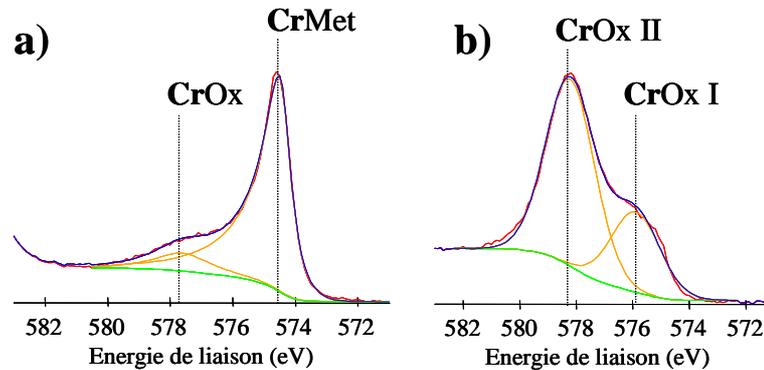
##### **Les substrats :**

Les dépôts de chrome et d'or sont réalisés par nos soins sur des wafers de silicium par pulvérisation cathodique magnétron en atmosphère neutre d'argon (0,1 Pa).

Un second dépôt de chrome est cependant réalisé par pulvérisation cathodique magnétron en atmosphère réactive d'oxygène (0,1 Pa). Les atomes éjectés (pulvérisés) de la cathode métallique vont se combiner avec les molécules gazeuses d'oxygène et ainsi former un oxyde métallique à la surface du wafer de silicium.

Nous disposons donc de deux substrats de chrome chimiquement différents :

- Un substrat de chrome essentiellement métallique, une faible composante oxyde étant cependant observée (figure V-17 a) ;
- Un substrat d'oxyde de chrome dont la composition semble complexe puisque deux états d'oxydation sont mis en évidence par XPS (figure V-17 b). Les énergies de liaison de 575,8 eV et 578,2 eV pourraient correspondre respectivement aux états d'oxydation +3 et +6 du chrome [deVos, *et al.* 2001].



**Figure V-17 :** Niveau de cœur  $2p^{3/2}$  du chrome a) du substrat de chrome métallique ; b) du substrat d'oxyde de chrome.

Avant de procéder à l'adsorption de la BSA, les substrats sont dégazés sous vide à 400°C.

#### Dépôt de la BSA et désorption thermique :

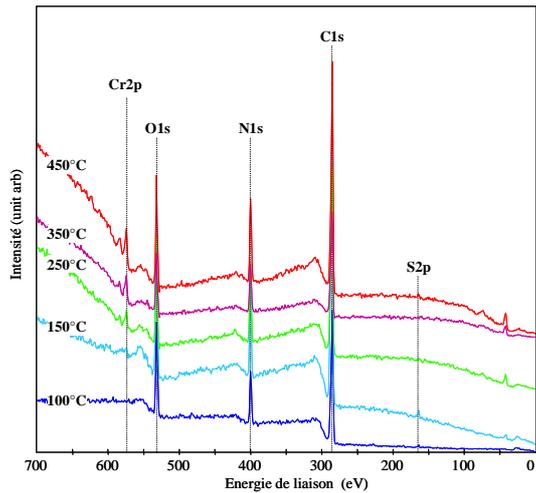
Afin de limiter la contamination carbonée des substrats au moment de l'adsorption de la BSA, celle-ci est réalisée dans le sas d'introduction de l'appareillage UHV. Pour cela, le vide primaire est cassé à l'azote sec et une goutte d'une solution aqueuse de BSA à 1 mg/ml est directement déposée sur chaque substrat dans le sas d'introduction. L'eau de la solution est évaporée sous vide par le pompage primaire.

Les substrats sont alors transférés dans la chambre d'analyse et sont chauffés de 50°C à 450°C par effet joule via la tige du porte échantillon. La désorption thermique de la BSA est suivie par XPS pour chaque élévation de 50°C de la température.

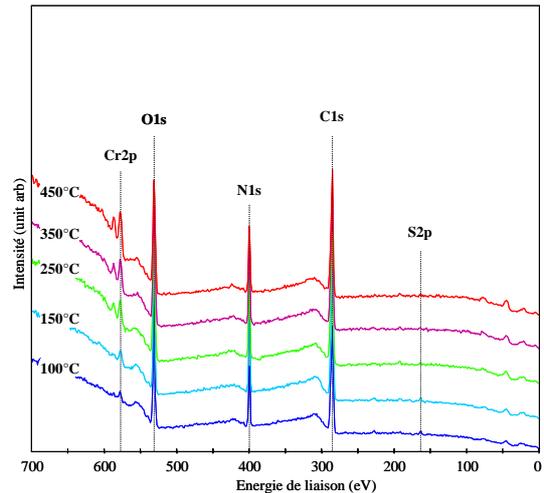
#### **IV.3.2. Interfaces BSA/CrMet et BSA/CrOx**

Les résultats obtenus sur la désorption thermique de la BSA adsorbée sur les substrats de chrome métallique (CrMet) et d'oxyde de chrome (CrOx) sont présentés en parallèle. Les figures V-18 et V-19 montrent l'allure générale des spectres XPS obtenus respectivement sur les substrats CrMet et CrOx en fonction de l'élévation de la température.

L'intensité des pics Cr2p augmente avec la température ce qui traduit une diminution de l'épaisseur de la couche de BSA adsorbée. La protéine semble donc se désorber sous l'influence d'une élévation de la température.



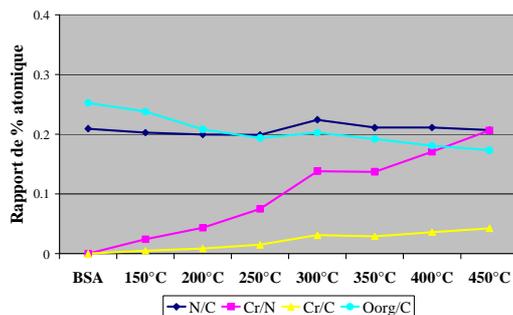
**Figure V-18 :** Spectres XPS réalisés sur le substrat de chrome métallique en fonction de l'augmentation de la température.



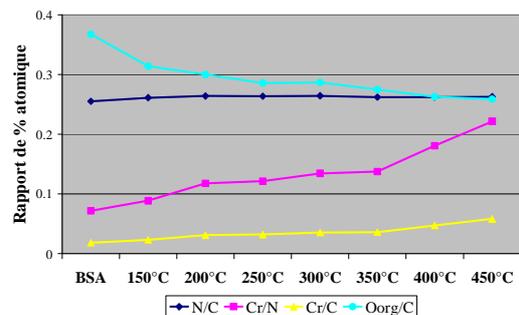
**Figure V-19 :** Spectres XPS réalisés sur le substrat de oxyde de chrome en fonction de l'augmentation de la température.

La couche de protéine déposée sur le substrat CrMet (figure V-18) est initialement supérieure à la profondeur d'analyse de l'XPS puisque le chrome n'est pas détecté. Il faut atteindre 150°C pour commencer à voir apparaître l'élément du substrat. L'épaisseur de la couche de BSA adsorbée sur le substrat CrOx permet de détecter l'élément chrome avant même de procéder à la désorption thermique de la protéine.

L'évolution des éléments carbone, azote, oxygène (organique) et chrome pour chaque substrat, aux différentes étapes de la désorption des protéines est illustrée sur les figures V-20 et V-21 représentant les courbes de variations des rapports de pourcentages atomiques en fonction de la température.



**Figure V-20 :** Evolution des rapports N/C, Oorg/C, Cr/N et Cr/C du substrat de chrome métallique en fonction de la température de désorption.



**Figure V-21 :** Evolution des rapports N/C, Oorg/C, Cr/N et Cr/C du substrat d'oxyde de chrome en fonction de la température de désorption.

Les variations des rapports N/C, Oorg/C, Cr/N et Cr/C sont similaires pour les deux substrats. Les rapports N/C sont constants quelle que soit la température alors que les rapports Oorg/C diminuent. La variation de ces rapports conforte donc l'idée d'une modification de la stoechiométrie de la protéine sous l'influence de la température. La quantité d'azote et de carbone est constante alors que la quantité d'oxygène diminue. Il peut néanmoins exister un biais sur la valeur du rapport Oorg/C en raison de la présence d'oxyde métallique et de la complexité de la décomposition du pic d'oxygène. Quant à

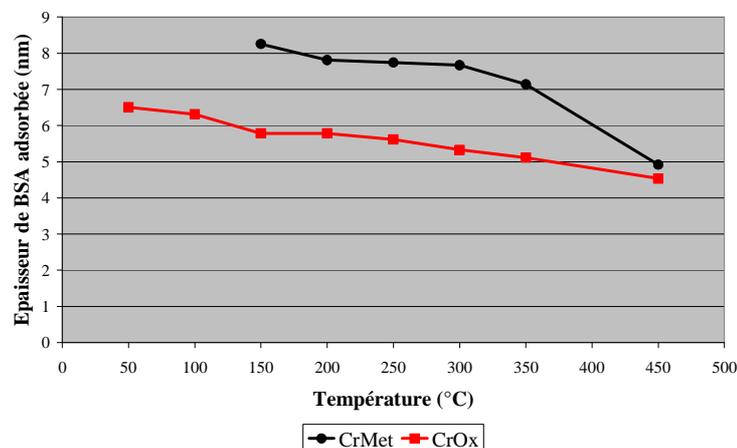
l'augmentation des rapports Cr/N et Cr/C, elle confirme que l'épaisseur de la couche de protéine diminue avec la température. Il est intéressant de constater que le rapport Cr/N présente des valeurs très proches pour les deux substrats aux températures finales de notre expérience.

Une différence est néanmoins remarquée et concerne les valeurs du rapport N/C caractéristique de la protéine. Ce rapport est de  $0,205 \pm 0,005$  pour la BSA adsorbée sur le chrome métallique et de  $0,262 \pm 0,003$  sur l'oxyde de chrome. Rappelons que le rapport expérimental calculé à partir des données présentées dans le paragraphe III de ce chapitre est de 0,252. La composition protéique étant invariable, cette différence pourrait traduire une orientation de la protéine propre à chaque substrat avec une orientation des atomes d'azotes en direction de l'interface formée avec le chrome métallique. De la même façon, le rapport Oorg/C obtenu sur le substrat CrMet, égale à 0,252 est inférieur à la valeur expérimentale (0,285). Celui calculé sur le substrat CrOx est en revanche particulièrement élevé (0,367). On peut néanmoins observer sur la figure V-21 que ce rapport diminue relativement rapidement avec l'élévation de la température et se stabilise entre 200°C et 300°C à une valeur proche de la valeur expérimentale. Nous pouvons donc supposer que cette variation initiale du rapport est liée au dégazage de la couche de protéine.

En faisant l'hypothèse que la couche de BSA adsorbée est homogène, nous avons estimé l'épaisseur des couches de BSA pour les températures auxquelles ont été effectuées les analyses XPS (tableau V-7 et figure V-22).

**Tableau V-7 : Evaluation de l'épaisseur des couches de protéines sur les substrats de chrome métallique et d'oxyde de chrome pour chaque température d'analyses avec  $\lambda_{Cr} = 2,4$  nm.**

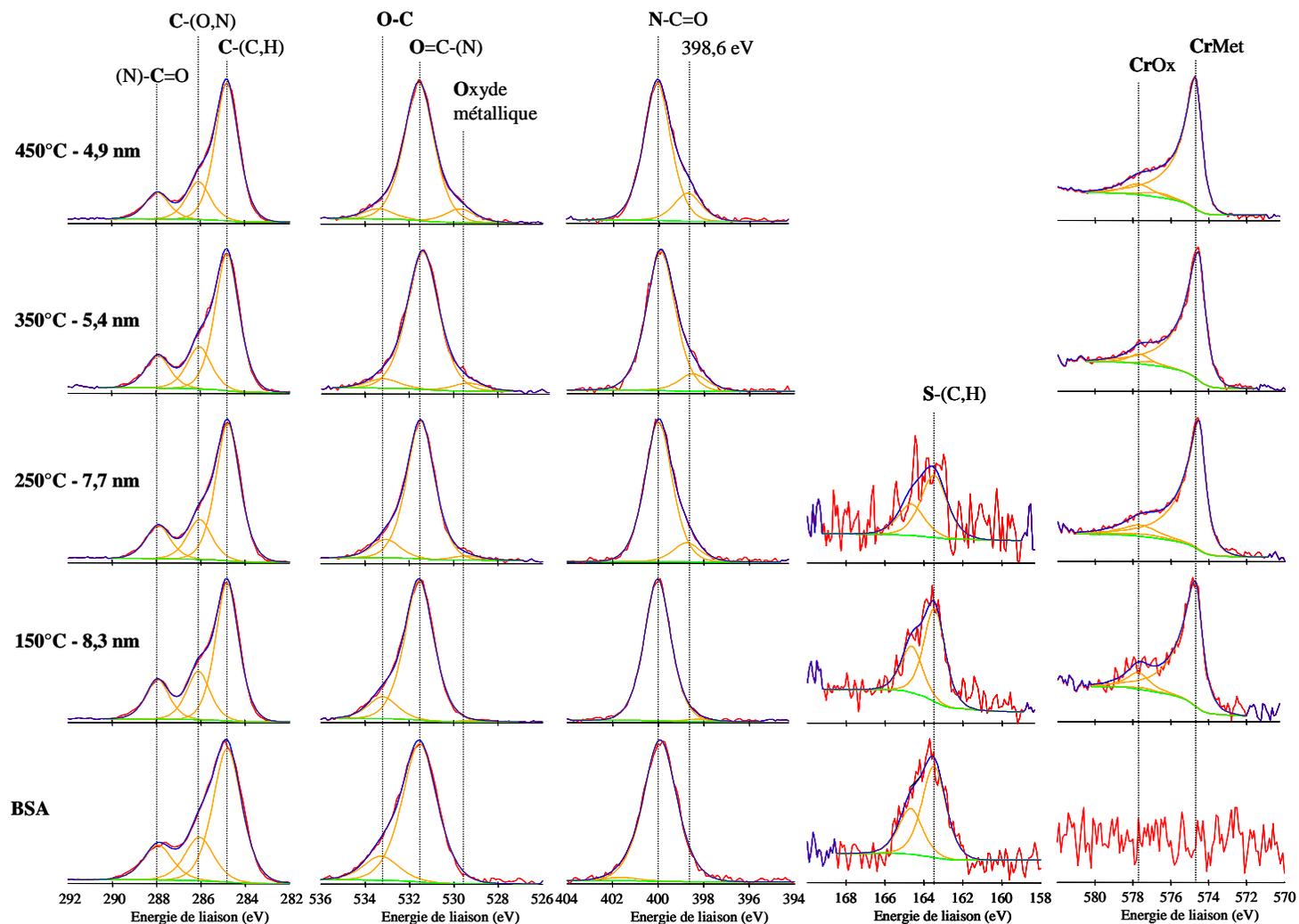
Température	50°C	100°C	150°C	200°C	250°C	300°C	350°C	400°C	450°C
Sur CrMet (nm)	/	/	8,3	7,8	7,7	7,6	5,4	/	4,9
Sur CrOx (nm)	6,5	6,3	5,8	5,7	5,6	5,3	5,1	4,8	4,5



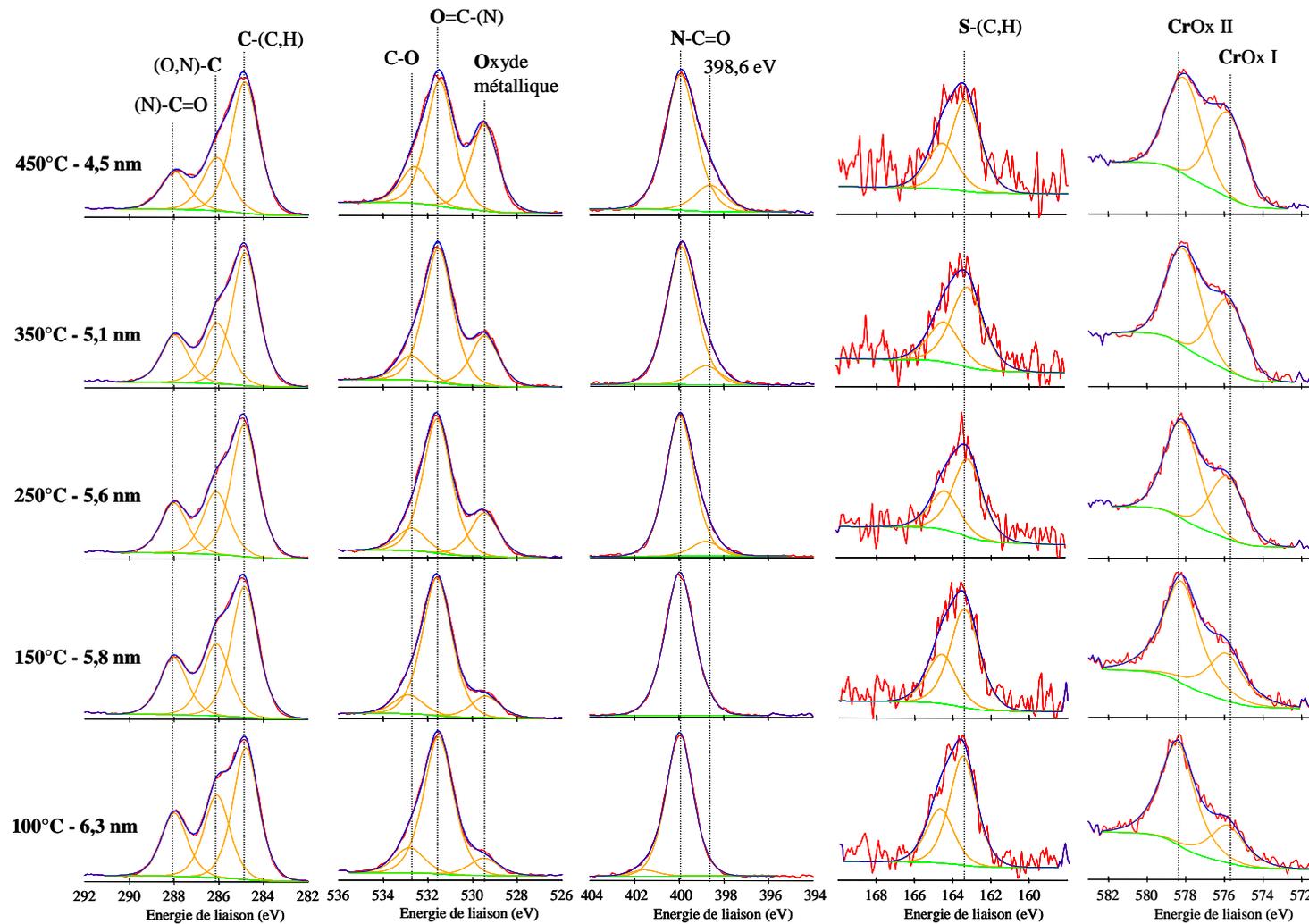
**Figure V-22 : Variation de l'épaisseur de la couche de BSA adsorbée sur les substrats de chrome métallique (CrMet) et d'oxyde de chrome (CrOx) en fonction de la température de désorption.**

L'épaisseur de la couche de protéines diminue en fonction de l'élévation de la température de façon quasi linéaire, notamment sur le substrat CrOx. Une désorption plus brutale est observée sur le substrat métallique à partir de 300°C. A 450°C, les épaisseurs des couches de protéines estimées sont pratiquement identiques pour les deux substrats.

Afin de mettre en évidence d'éventuelles modifications chimiques au cours de la désorption, les acquisitions centrées sur les éléments de la protéine et du chrome sont présentées sur les figures V-23 et V-24, respectivement pour le substrat CrMet et CrOx.

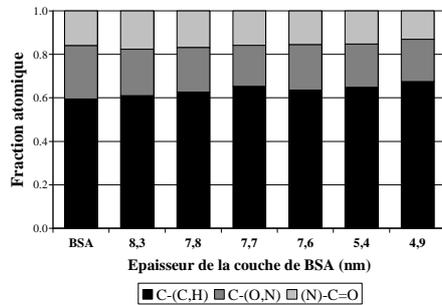


**Figure V-23 :** Niveaux de cœur C1s, O1s, N1s, S2p et Cr2p<sup>3/2</sup> obtenus sur le substrat de chrome métallique en fonction de la température de désorption et de l'épaisseur de la couche résiduelle de BSA

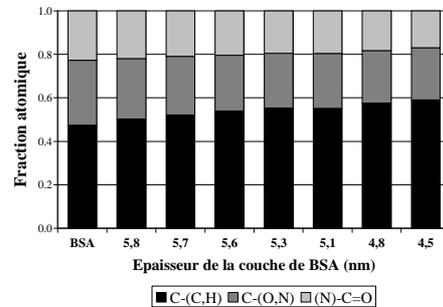


**Figure V-24 :** Niveaux de cœur C1s, O1s, N1s, S2p et Cr2p<sup>3/2</sup> obtenus sur le substrat de d'oxyde de chrome en fonction de la température de désorption et de l'épaisseur de la couche résiduelle de BSA.

Concernant les composantes du pic C1s, trois contributions sont observées et correspondent aux différentes formes chimiques du carbone dans la protéine qui ont précédemment été identifiées (tableau V-2). Les figures V-25 et V-26 présentent respectivement l'évolution des fractions atomiques de chaque composante de C1s sur le chrome métallique et l'oxyde de chrome en fonction de l'épaisseur de la couche de BSA.



**Figure V-25 :** Fractions atomiques des composantes de C1s de la BSA adsorbée sur le substrat de chrome métallique en fonction de l'épaisseur de la couche de BSA.



**Figure V-26 :** Fractions atomiques des composantes de C1s de la BSA adsorbée sur le substrat d'oxyde de chrome en fonction de l'épaisseur de la couche de BSA.

Pour les deux substrats, on observe une légère augmentation de la composante C-(C,H) au détriment de la composante C-(O,N), puis de la composante (N)-C=O. Si l'on tient compte de la diminution de la quantité d'oxygène organique, les variations observées sur le carbone sont cohérentes et préjugent d'une atteinte des liaisons C-(O,N).

Ces données nous permettent également d'observer une différence quantitative dans la répartition des espèces de C1s selon le substrat sur lequel la BSA est adsorbée (tableau V-8).

**Tableau V-8 :** Valeurs des fractions atomiques des composantes de C1s pour la BSA adsorbée sur les substrats de chrome métallique (CrMet) et d'oxyde de chrome (CrOx) avant désorption. Les références expérimentales sont indiquées pour comparaison.

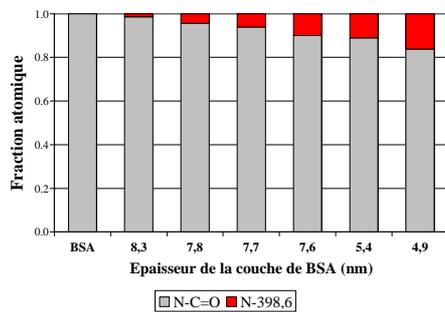
C1s	CrMet	CrOx	Références expérimentales
C-(C,H)	0,594	0,474	0,497 ± 0,007
C-(O,N)	0,246	0,298	0,283 ± 0,008
(N)-C=O	0,160	0,228	0,220 ± 0,003

Ces observations confortent la tendance observée précédemment sur les figures V-20 et V-21 concernant l'orientation des protéines selon le substrat. Il semble en effet que les groupements polaires soient enfouis vers l'interface formée avec le chrome métallique puisque les valeurs des fractions atomiques pour les liaisons C-(O,N) et (N)-C=O sont plus faibles comparativement aux références expérimentales. La répartition des composantes de C1s sur l'oxyde de chrome n'est en revanche pas significativement différente des données expérimentales.

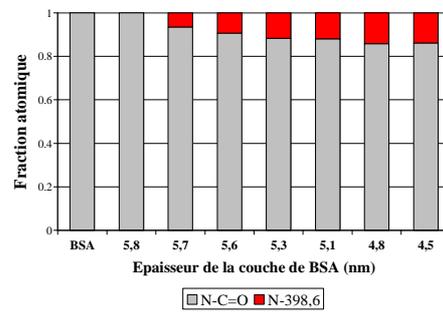
En ce qui concerne les composantes de l'oxygène, les deux contributions que nous avons attribuées à la protéine sont observées. Sur le substrat CrMet, une nouvelle contribution de l'oxygène est détectée dès 250°C, pour une épaisseur évaluée de la couche de BSA de 7,7 nm. Cette composante présente une énergie de liaison de 529,5 eV attribuée à la présence d'oxyde métallique. Nous avons préalablement observé la présence d'une faible quantité d'oxyde dans notre dépôt de chrome métallique (figure V-17a).

De plus, bien que nous ayons procédé au dépôt de la BSA en présence d'une surpression en azote dans la chambre d'introduction, il est possible que le substrat se soit oxydé lors de la préparation de l'échantillon. Comme attendue, la contribution oxyde de l'oxygène est largement détectée sur le substrat CrOx. L'intensité de cette composante augmente alors que les composantes organiques de l'oxygène diminuent.

L'analyse des acquisitions centrées sur le niveau de cœur 1s de l'azote, pour les deux substrats, met en évidence la présence d'azote sous forme amide à 400,0 eV avant de procéder à la désorption thermique de la protéine (BSA). Lorsque l'on élève la température, dès 150°C – 200°C, une nouvelle composante apparaît à 398,6 eV (8,3 nm sur CrMet et 5,7 nm pour CrOx) et son intensité augmente au fur et à mesure que la protéine est désorbée. A la température finale de notre expérience, cette composante représente respectivement 16% et 14% de l'azote détecté sur les substrats CrMet et CrOx pour des épaisseurs respectives de 4,9 nm et 4,6 nm de BSA.



**Figure V-27 :** Fractions atomiques des composantes de N1s de la BSA adsorbée sur le substrat de chrome métallique en fonction de l'épaisseur de la couche de BSA.



**Figure V-28 :** Fractions atomiques des composantes de N1s de la BSA adsorbée sur le substrat d'oxyde de chrome en fonction de l'épaisseur de la couche de BSA.

L'apparition de cette composante vers les plus basses énergies de liaison traduit une augmentation de la densité électronique autour de l'atome d'azote.

En ce qui concerne le soufre, une seule composante est observée à 163,5 eV. Il s'agit du groupement thiol ou thioether présent dans les chaînes latérales de la protéine. Il est intéressant d'observer que cet élément n'est plus détecté sur le substrat CrMet après 250°C alors qu'il est encore observé à 450°C sur le substrat CrOx.

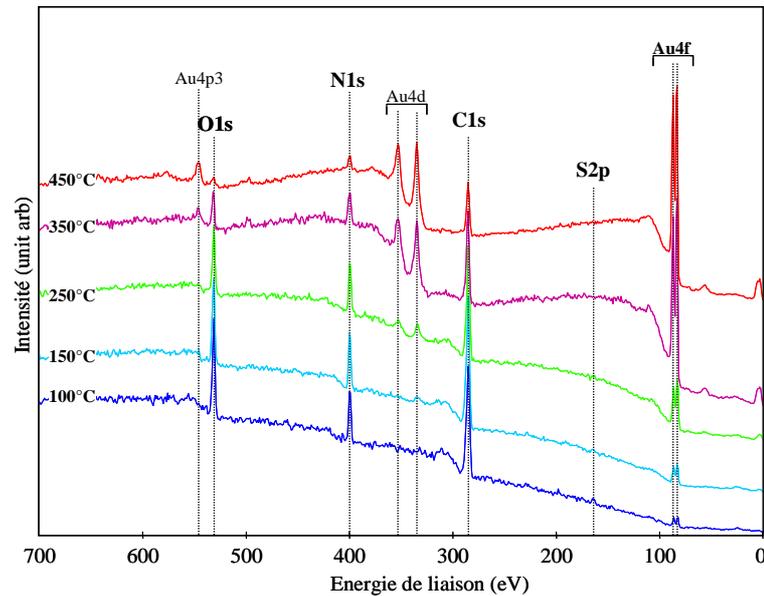
Enfin, les composantes des éléments du substrat ne montrent pas de modification particulière de leur environnement chimique. Leurs intensités augmentent avec la température compte tenu de la désorption des protéines. On observe cependant sur le substrat d'oxyde de chrome une augmentation de la composante oxyde de plus faible énergie. Cette variation est très probablement liée à l'élévation de la température puisque un phénomène similaire a été observé lors du dégazage du substrat CrOx à 400°C.

Ainsi, cette étude de la désorption thermique de la BSA à partir des substrats de CrMet et de CrOx nous a permis d'observer la désorption de la BSA en fonction de l'élévation de la température. La principale modification chimique observée consiste en une augmentation de la densité électronique autour de l'atome d'azote.

### IV.3.3. Interface BSA/Au

La désorption thermique a également été conduite sur un substrat d'or. La figure V-29 présente l'allure des spectres XPS obtenus en fonction de la température de désorption. L'intensité des pics des différents

niveaux de coeur de l'or augmente alors que l'intensité des pics des éléments caractéristiques des protéines diminue simultanément.

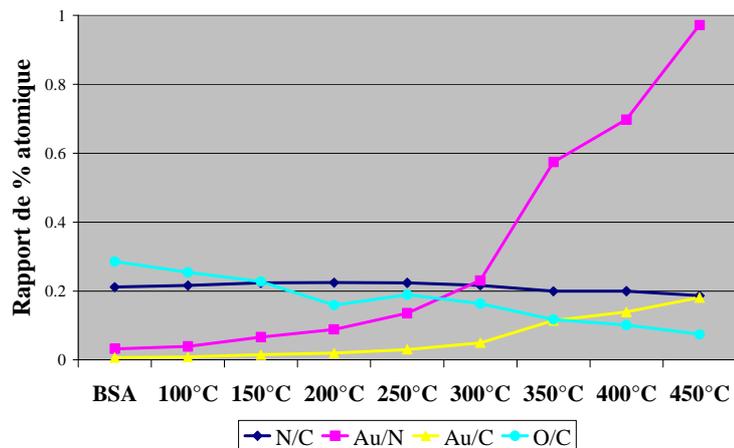


**Figure V-29** : Spectres XPS réalisés sur le substrat d'or en fonction de la température de désorption.

L'évolution des éléments carbone, azote, oxygène et or est représentée par les courbes de variations des rapports de pourcentages atomiques de ces éléments en fonction de la température (figure V-30).

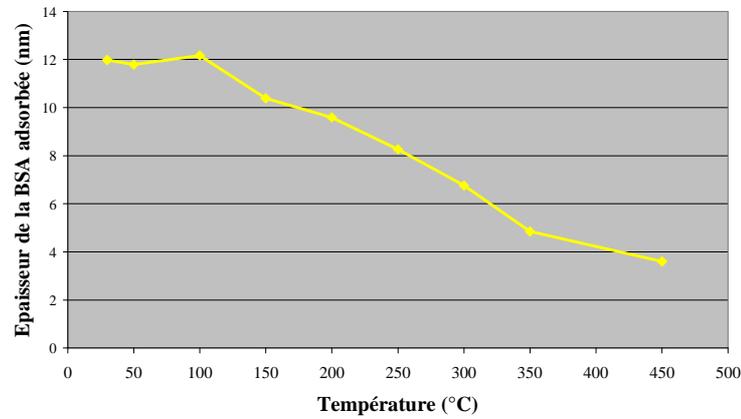
L'évolution de ces différents rapports est semblable à ce que nous avons observé pour la desorption thermique de la BSA sur les substrats de chrome :

- Le rapport N/C est constant et sa valeur ( $N/C = 0,21 \pm 0,01$ ) suggère une orientation des atomes d'azotes vers l'interface formée avec l'or ;
- Le rapport O/C diminue ;
- Les rapports Au/N et Au/C augmentent.



**Figure V-30** : Evolution des rapports N/C, O/C, Au/N et Au/C pour la BSA adsorbée sur le substrat d'or en fonction de la température.

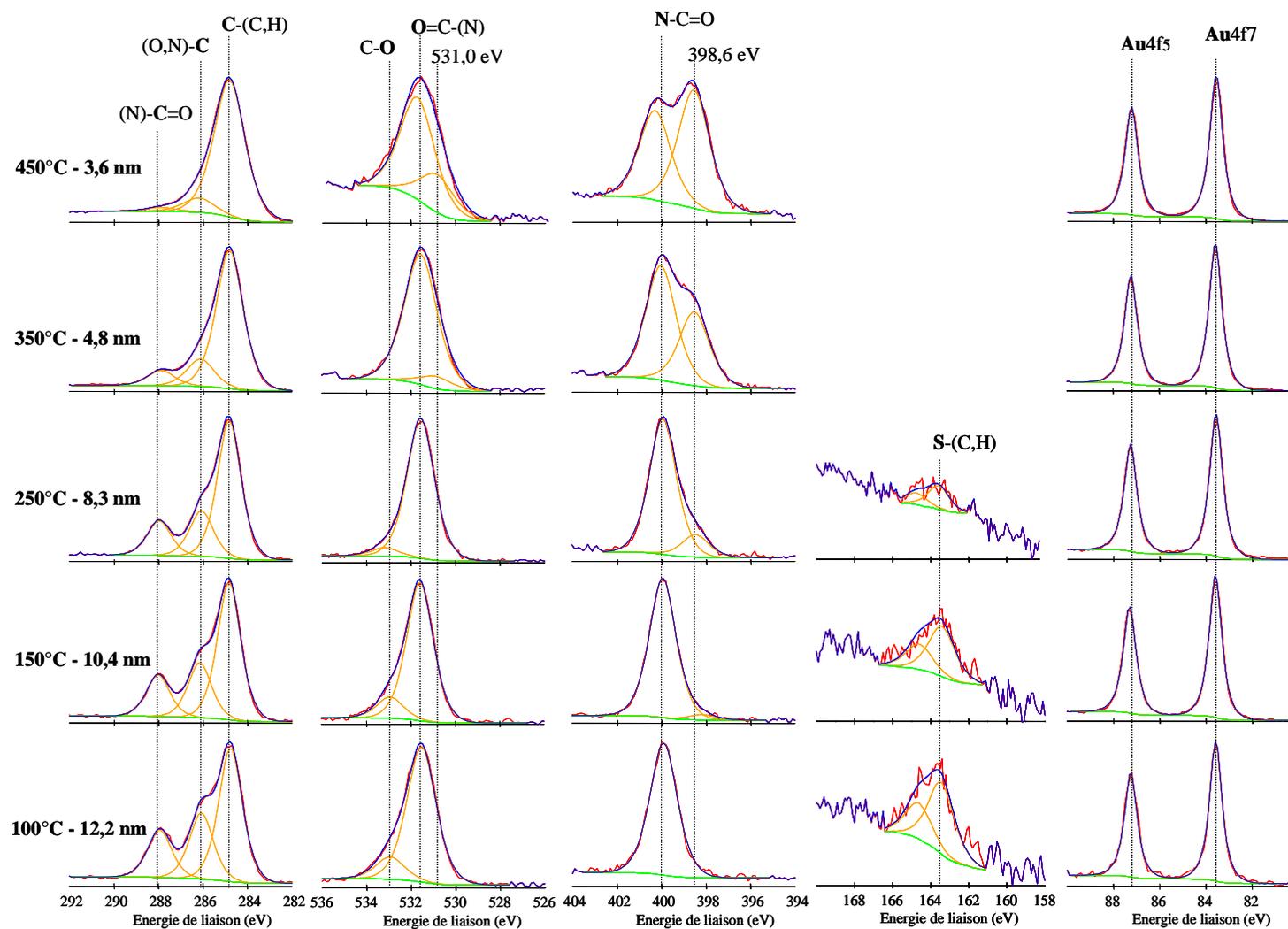
L'épaisseur de la couche de BSA a également été estimée pour les températures auxquelles ont été réalisées les analyses XPS (figure V-31). La valeur du libre parcours moyen des photoélectrons de Au4f dans une couche de protéine a précédemment été évaluée à 2,9 nm.



**Figure V-31** : Variation de l'épaisseur de la couche de BSA adsorbée sur le substrat d'or en fonction de la température de désorption.

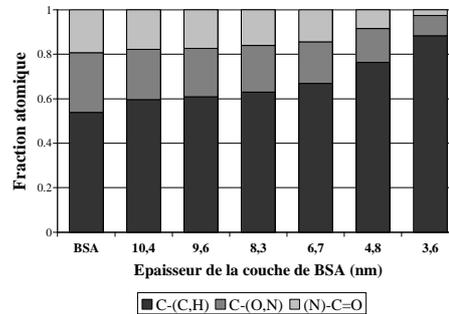
De la température ambiante de la chambre d'analyse jusqu'à 100°C, la protéine n'est pas affectée par la température. A partir de 100°C, l'épaisseur de la couche de BSA diminue. L'épaisseur évaluée de la couche à la fin de notre expérience est de 3,6 nm.

Afin de suivre les modifications chimiques au cours de la désorption, les acquisitions centrées sur les éléments de la protéine et sur le niveau de cœur 4f7 de l'or sont présentées sur la figure V-32.



**Figure V-32** : Niveaux de cœur C1s, O1s, N1s, S2p et Au4f obtenus sur le substrat d'or en fonction de la température de désorption et de l'épaisseur de la couche résiduelle de BSA.

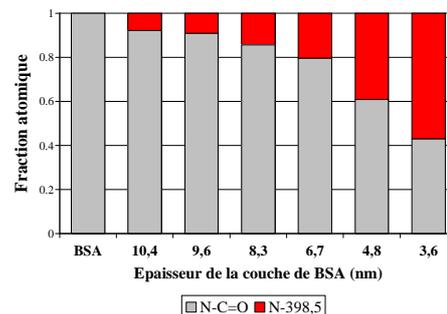
L'analyse de la figure V-32 permet d'observer un profond bouleversement de la structure chimique de la protéine lorsqu'on approche de l'interface. Les évolutions des fractions atomiques de chaque composante de C1s est présentée sur la figure V-33 et montrent la disparition des liaisons C-(O,N) puis (N)-C=O au profit des liaisons C-(C,H) au fur et à mesure que l'on s'approche de l'interface.



**Figure V-33** : Fractions atomiques des composantes C1s de la BSA adsorbée sur le substrat d'or en fonction de l'épaisseur de la couche de BSA.

L'observation des pics d'oxygène sur la figure V-32 montre également la disparition des liaisons O-C et l'apparition d'une nouvelle composante à plus faible énergie de liaison : 531,0 eV.

Concernant l'azote, la composante de plus faible énergie à 398,6 eV, précédemment observée sur les substrats CrMet et CrOx, apparaît également sur l'or (figure V-32). Cette composante peut être attribuée aux atomes d'azotes en interaction avec le substrat d'or. En effet, l'interaction N – Au pourrait résulter de la déprotonation de l'atome d'azote de la fonction amide, comme cela a été précédemment observé pour des molécules azotées telles que la 2-pyrrolidone, la 3 méthyl 2-pyrrolidone [Xie, *et al.* 2000] et le polyamide-6,6 [Charlier 2003]. De plus, l'augmentation de la polarisation négative de l'azote induite par une telle interaction se traduit effectivement par une diminution de l'énergie de liaison de l'azote. Enfin, les énergies de liaison de l'azote pour les interactions N – Au rapportées dans la littérature (398,3 eV [Xie, *et al.* 2000] et 398,6 eV [Charlier 2003]) sont en parfait accord avec nos résultats. L'intensité de cette composante croît aux dépens de celle de la fonction amide avec la diminution de l'épaisseur de la couche de BSA. Ceci est indiqué sur la figure V-34 présentant l'évolution des fractions atomiques des composantes de N1s suivant l'épaisseur de la couche de BSA. A la fin de notre expérience et pour une épaisseur de BSA estimée à 3,6 nm, 57% de l'azote de la protéine est réduite.



**Figure V-34** : Fractions atomiques des composantes N1s de la BSA adsorbée sur le substrat d'or en fonction de l'épaisseur de la couche de BSA.

La forme chimique du soufre détectée correspond à celle présente dans les chaînes latérales de la protéine et aucune modification n'est observée dans son environnement électronique. L'intensité du pic diminue avec l'épaisseur de la couche de protéine. Au-delà de 250°C et pour une épaisseur de BSA inférieure à 8,3 nm, le soufre n'est plus détecté.

Les acquisitions centrées sur le niveau de cœur 4f de l'or ne montre aucun déplacement chimique.

#### IV.3.4. Discussion

Dans cette étude, notre objectif était d'accéder à l'interface formée entre la BSA et la surface métallique par désorption thermique de la protéine préalablement adsorbée. Préalablement à la désorption thermique de la BSA, les données quantitatives extraites des analyses XPS permettent d'observer une différence d'orientation des protéines en fonction du substrat. Sur le substrat CrMet et Au, il semble que les groupements polaires soient moins exposés à la surface de la couche de BSA déposée. En effet, les rapports N/C et les fractions atomiques des composantes C-(O,N) et (N)-C=O sont inférieures aux valeurs théoriques. Les groupements polaires sont préférentiellement orientés en direction de l'interface formée avec le métal. L'orientation préférentielle des acides aminés et des protéines en fonction de la nature du substrat est couramment rapportée dans la littérature [Lhoest, *et al.* 1998, Liedberg, *et al.* 1985, Tidwell, *et al.* 2001, Uvdal, *et al.* 1992, Xia, *et al.* 2002].

L'élévation de la température permet de diminuer progressivement l'épaisseur de la couche de BSA. Néanmoins, à la fin de notre expérience (450°C), la désorption de la BSA n'est pas complète. Il semble que la température ait une incidence sur la désorption des protéines en fonction du substrat sur lequel elles sont déposées. En effet, pour les mêmes gradients de température, la BSA désorbe et se décompose beaucoup plus rapidement sur le substrat Au que sur les substrats CrMet et CrOx. Nous avons également observé que le soufre de la BSA n'était plus détecté sur les substrats CrMet et Au au-delà d'une température de 250°C. Au cours de l'étude de la sublimation de la BSA (paragraphe IV.2.2), nous avons constaté que le soufre n'était pas détecté lorsque la protéine était sublimée à 245°C. Ces deux résultats sont consistants avec une destruction de liaisons dans les chaînes latérales contenant du soufre. Cependant, sur le substrat CrOx, le soufre est détecté indépendamment de la température. Ce résultat pose la question de la stabilité de la BSA sur le substrat de CrOx par rapport au substrat CrMet. De façon plus précise, et compte tenu du fait que le substrat CrMet présente également une composante oxyde en surface, nous pouvons nous demander si la nature de l'oxyde ou l'épaisseur de la couche d'oxyde sont impliqués dans la stabilité de la protéine adsorbée. Ces interrogations sont soulevées en raison de certains travaux mettant en évidence l'incidence des oxydes sur l'adsorption ou la désorption des protéines. Il est par exemple montré que la Concanavaline A présente une forte affinité pour les surfaces oxydées et que la quantité de protéines adsorbées est fonction de l'épaisseur de la couche d'oxyde [Diniz et Ueta 2004]. Les travaux de Karlsson montrent que l'efficacité de la détergence des protéines adsorbées sur acier inoxydable est fonction de la nature de l'oxyde formé en surface. Les protéines adsorbées sur un inox passivé par l'acide nitrique sont clairement résistantes au nettoyage comparativement à un inox prétraité par un mélange NH<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O à chaud [Karlsson, *et al.* 1999]. Ces travaux suggèrent donc que les interactions protéines/surfaces sont d'autant plus importantes que la surface est oxydée.

Pour les trois substrats étudiés, nous observons l'apparition d'une nouvelle composante à plus faible énergie de liaison. Il est difficile d'identifier l'origine de cette contribution. Est-elle liée à une destruction partielle de la protéine sous l'effet de l'élévation de la température ou est-elle une caractéristique de l'interface formée ? L'apparition de cette composante semble essentiellement liée à la température puisque dans les trois cas, elle apparaît entre 150°C et 200°C quelle que soit l'épaisseur de la couche de BSA. De plus, en raison de l'épaisseur des couches résiduelles (non désorbées) à la fin de notre expérience, il semble peu probable que nous ayons accès à l'interface formée. Le contre-argument repose sur la signification réelle des épaisseurs que nous avons calculées puisque nous n'avons pas d'information sur la répartition de la BSA à la surface des substrats. Une analyse de l'extrême surface en distribution angulaire par exemple permettrait d'obtenir un élément de réponse. En effet, une diminution du rapport N<sub>398,6</sub>/N-C=O couplée à l'augmentation de l'angle d'analyse par rapport à la normale pourrait confirmer l'interaction Au – N à l'interface.

**En résumé :**

L'élévation de la température permet de désorber une certaine quantité de protéines et d'approcher l'interface formée entre la surface métallique et les protéines. Le gradient de température altère peu les protéines adsorbées sur les substrats CrMet et CrOx alors que sur l'or, la BSA est nettement déstructurée. Ceci suggère des stabilités plus ou moins importantes des protéines en fonction du substrat sur lequel elles sont adsorbées.

D'un point de vue chimique, les analyses XPS montrent un déplacement chimique de l'azote vers les basses énergies de liaisons. L'origine de cette contribution n'a pu être clairement établie compte tenu du fait que cette composante augmente à l'approche de l'interface mais également en fonction de l'élévation de la température. Ainsi cette composante pourrait apparaître suite à une altération de la protéine par l'énergie thermique apportée.

Cette approche souffre donc essentiellement du même inconvénient que l'approche précédente qui concerne les effets de la température sur la dégradation thermique de la protéine.

Il n'est pas possible de mettre clairement en évidence les liaisons chimiques entre les atomes de la protéine et ceux du substrat. Même si ces liaisons existent, il est probable que l'épaisseur de la protéine nous empêcherait de les observer.

## IV.4. Métallisation de la BSA

Nous avons dans un premier temps construit l'interface métal/BSA par pulvérisation cathodique magnétron sous atmosphère neutre d'argon. Ceci nous a permis de suivre la formation de l'interface entre le chrome sous forme métallique et les protéines. Compte tenu du fait que le chrome est oxydé à la pression atmosphérique, nous avons dans un deuxième temps construit les interfaces métal/BSA par pulvérisation cathodique magnétron sous atmosphère réactive d'oxygène. Les atomes de chrome se combinent avec les molécules d'oxygène gazeuses pour former un oxyde de chrome. Ainsi, nous avons pu suivre la formation de l'interface entre l'oxyde de chrome et la protéine. Dans ces mêmes conditions expérimentales, les interfaces Au/BSA ont été étudiées.

### IV.4.1. Matériel et méthode de travail

#### Couche épaisse de BSA :

Les couches épaisses de protéine sont préparées par évaporation successive à l'air d'une solution de BSA à 1 mg/ml sur un wafer de silicium. L'épaisseur de la couche ainsi constituée doit être supérieure à la profondeur d'analyse de l'XPS (10 nm).

#### Pulvérisation cathodique magnétron :

Les éléments métalliques chrome et or sont déposés sur les couches épaisses de BSA par pulvérisation cathodique magnétron soit sous atmosphère neutre d'argon soit sous atmosphère réactive d'oxygène. Dans les deux cas, les dépôts sont réalisés sous une pression constante des gaz de 0,1 Pa. Le magnétron fonctionne sous courant continu et à puissance constante de 15 W. La distance entre la cible de l'élément métallique à pulvériser et le substrat est de 13 cm.

Les vitesses de pulvérisation du chrome et de l'or ont été évaluées pour les différentes conditions de pulvérisation et sont indiquées dans le tableau V-9.

**Tableau V-9 : Vitesse de pulvérisation des atomes de chrome et d'or suivant la nature du gaz de décharge.**

Vitesse de pulvérisation	Cr	Au
Sous Argon (nm.s <sup>-1</sup> )	0,040 ± 0,003	0,16 ± 0,030
Sous Oxygène (nm.s <sup>-1</sup> )	0,009 ± 0,002	0,031 ± 0,006

Les vitesses de pulvérisation du chrome et de l'or sous atmosphère réactive (oxygène) sont respectivement 4,4 et 5,2 fois plus lente que sous atmosphère neutre (argon). Ceci est dû au collage des espèces oxygénées à la surface de la cathode réduisant le rendement de pulvérisation de l'élément métallique [Thornton et Lamb 1984].

#### Calcul des épaisseurs des couches métalliques :

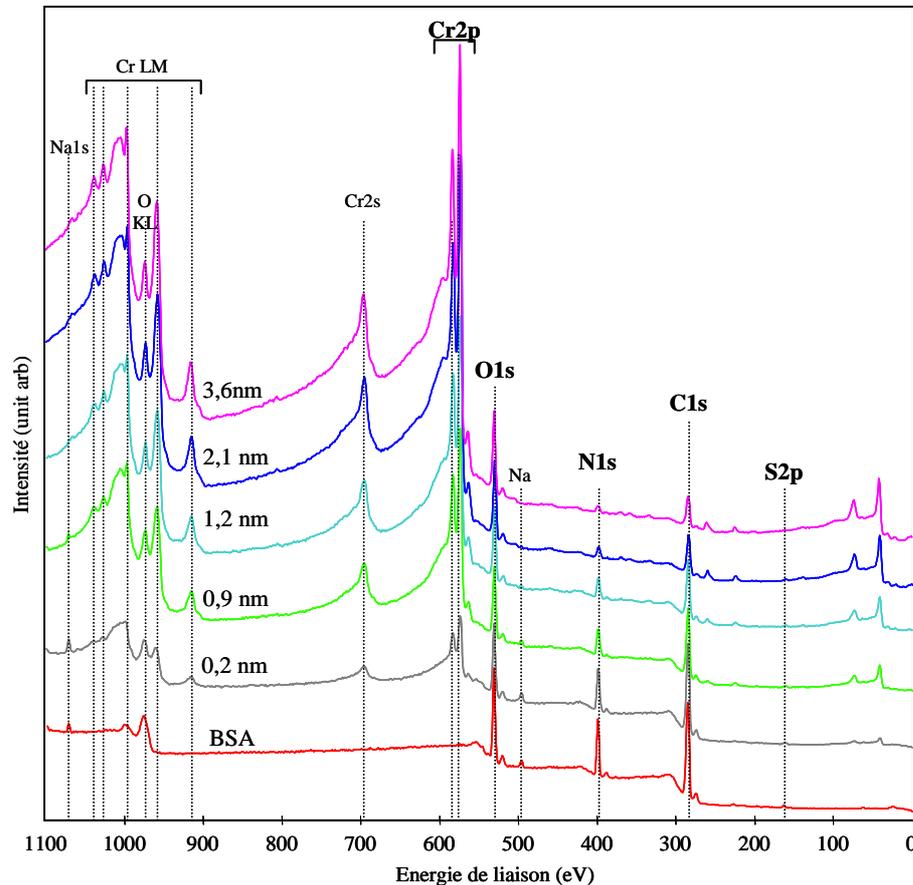
Bien que ces vitesses nous permettent d'approximer l'épaisseur du dépôt réalisé en fonction du temps de pulvérisation, l'épaisseur des couches métalliques est évaluée suivant la variation d'intensité du pic N1s due à l'atténuation du signal par la couche de métal déposée (Annexe 5-II).

### IV.4.2. Métallisation des protéines par le chrome métallique

Des dépôts successifs de chrome métallique (CrMet) ont été réalisés par pulvérisation cathodique magnétron sous atmosphère d'argon. Entre chaque dépôt, les analyses XPS nous permettent de suivre les

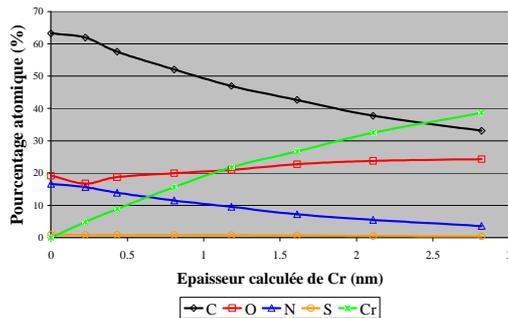
modifications chimiques au cours de la formation de l'interface. En admettant l'homogénéité des dépôts, l'épaisseur des couches de CrMet est estimée pour  $\lambda_{\text{Ni}1s} = 1,48 \text{ nm}$ .

L'allure générale des spectres XPS obtenus sur la BSA au cours de la métallisation est illustrée sur la figure V-35 en fonction de l'épaisseur croissante de la couche de CrMet. Les intensités des pics des éléments caractéristiques de la BSA diminuent alors que les signaux émis par le chrome augmentent lorsque l'épaisseur de la couche de CrMet croît.

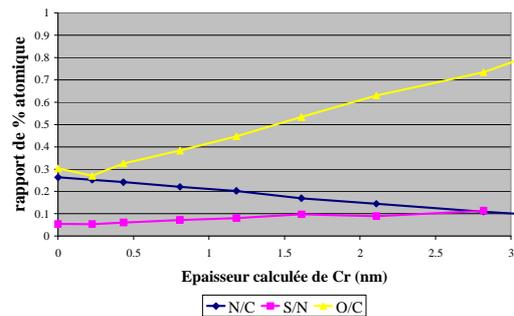


**Figure V-35 :** Spectres XPS obtenus au cours de la métallisation de la BSA en fonction de l'épaisseur croissante de la couche de chrome métallique.

Une analyse quantitative de la composition élémentaire de la surface analysée en fonction de l'épaisseur croissante de la couche de CrMet est présentée sur la figure V-36. Cette analyse montre effectivement une diminution des pourcentages atomiques du carbone, de l'azote et du soufre simultanément à l'augmentation du pourcentage atomique de chrome, ce qui indique un effet d'écrantage du carbone, de l'azote et du soufre par le chrome. En revanche, la quantité d'oxygène augmente avec l'épaisseur de la couche. Cette augmentation est liée à un apport extérieur d'oxygène, comme le montre l'augmentation du rapport O/C de la figure V-37.



**Figure V-36 :** Evolution des pourcentages atomiques des éléments de la BSA et du chrome métallique en fonction de l'épaisseur de la couche de chrome calculée.



**Figure V-37 :** Evolution des rapports N/C, S/N et O/C en fonction de l'épaisseur de la couche de chrome

Les acquisitions centrées sur les éléments caractéristiques de la protéine et sur l'élément métallique déposé sont présentées sur la figure V-39.

La décomposition des pics C1s permet d'observer les trois composantes caractéristiques de la protéine ainsi que l'apparition d'une nouvelle composante à 282,8 eV qui croît avec l'épaisseur de la couche de chrome déposée. Cette composante étant située à plus faible énergie de liaison, elle peut être attribuée à la formation d'un carbure de chrome (Lackhar 1995, Shi 1994, Jordan 1987, deVos 2001, Chenite 1994).

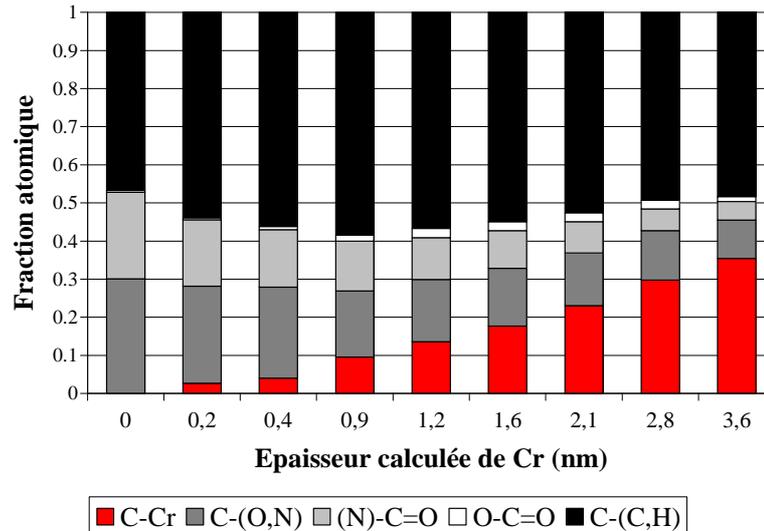
La figure V-38, présentant les variations des fractions atomiques du carbone en fonction de l'épaisseur de la couche de chrome déposée, nous permet d'observer deux étapes dans la formation de cette interface :

- La première étape est observée sur les 9 premiers angströms de l'interface et concerne le mécanisme réactionnel.
- La seconde étape est observée pour une épaisseur de dépôt supérieure à 0,9 nm et correspond à l'effet d'écrantage des composantes de la protéine en raison de l'augmentation de l'épaisseur de la couche de chrome.

Dès les premiers dépôts de chrome, les composantes C-(O,N) et (N)-C=O diminuent essentiellement au profit de la composante C-(C,H) puis au profit de celle du carbure (C-Cr). En effet, l'augmentation de la composante C-(C,H) est plus importante comparativement à celle de C-Cr. La formation d'un film carboné a précédemment été observée lors de travaux concernant la métallisation du nylon 6 par le fer (Wagner 2003). L'auteur explique la formation de ce film par la formation de liaisons C-C entre les radicaux carbonés résultant du clivage des liaisons C-N, N-H et C=O généré par la métallisation du polymère. Il est donc probable que le carbure se forme à partir de cette contribution du carbone, probablement générée par une attaque simultanée du chrome sur les groupements carbonyles (C=O). La formation de carbure serait donc un événement secondaire à l'attaque du chrome sur les groupements C=O et C-N.

Au-delà de ces premiers angströms, la composante C-(C,H) n'augmente plus, mais diminue de concert avec les composantes C-(O,N) et (N)-C=O caractéristiques de la protéine et simultanément à l'augmentation du carbure. Ceci indiquerait donc une atténuation des signaux provenant de la protéine et de l'interface formée en raison de l'augmentation de l'épaisseur de la couche de chrome.

Une précision, concernant la composante carboxyle (O-C=O), mérite d'être apportée. Lors de la décomposition des pics du carbone, nous avons observé un élargissement des pics vers les plus hautes énergies de liaison. Compte tenu de l'existence de telles fonctions dans la protéine, nous avons ajouté une contribution supplémentaire. Néanmoins, nous pensons que cet élargissement pourrait être associé à l'augmentation du fond généré par les photoélectrons qui sont issus d'une zone plus profonde.



**Figure V-38** : Fraction atomique des composantes de C1s de la BSA en fonction de l'épaisseur de chrome déposée.

Les spectres du niveau de cœur 1s de l'oxygène (figure V-39) montrent l'apparition d'une composante supplémentaire à plus faible énergie de liaison que nous attribuons à la formation d'un oxyde de chrome. Cependant, compte tenu de l'apport extérieur d'oxygène et par conséquent de l'oxydation du chrome, nous ne discuterons pas de la formation de cette composante. Notons cependant que l'éventualité d'une oxydation du chrome par l'oxygène de la protéine n'est pas exclue.

Les spectres du niveau de cœur 1s de l'azote (figure V-39) montrent d'importantes modifications de son environnement électronique. En effet, deux nouvelles composantes apparaissent dès le premier dépôt de chrome. La composante située aux plus faibles énergies de liaison (397,2 eV) présente un déplacement chimique de 2,8 eV par rapport à la fonction amide de la protéine. Ce déplacement est suffisamment important pour être attribué à la forme nitrure de l'azote. De plus, cette énergie de liaison est en accord avec les données de la littérature pour les nitrure de chrome [Chenite et Selmani 1994, Chenite, *et al.* 1994, Goldberg, *et al.* 1988, Iucci, *et al.* 1999] mais également pour d'autres métaux [Bebin et Prud'homme 2002, Wagner, *et al.* 2003]. La seconde composante observée est située à 398,6 eV, soit à 1,4 eV de la forme amide de la protéine vers les plus faibles énergies de liaison. L'origine de cette contribution n'est pas claire. Si l'on se réfère aux données disponibles dans la littérature concernant la métallisation des polymères, nous pouvons expliquer la présence de cette contribution par une perturbation de l'environnement électronique de l'azote par le transfert d'électron du chrome au carbone carbonyl via l'oxygène. Ce transfert d'électron augmentait la densité électronique de l'azote adjacent [Chenite et Selmani 1994, Haight, *et al.* 1988, Ho, *et al.* 1988].

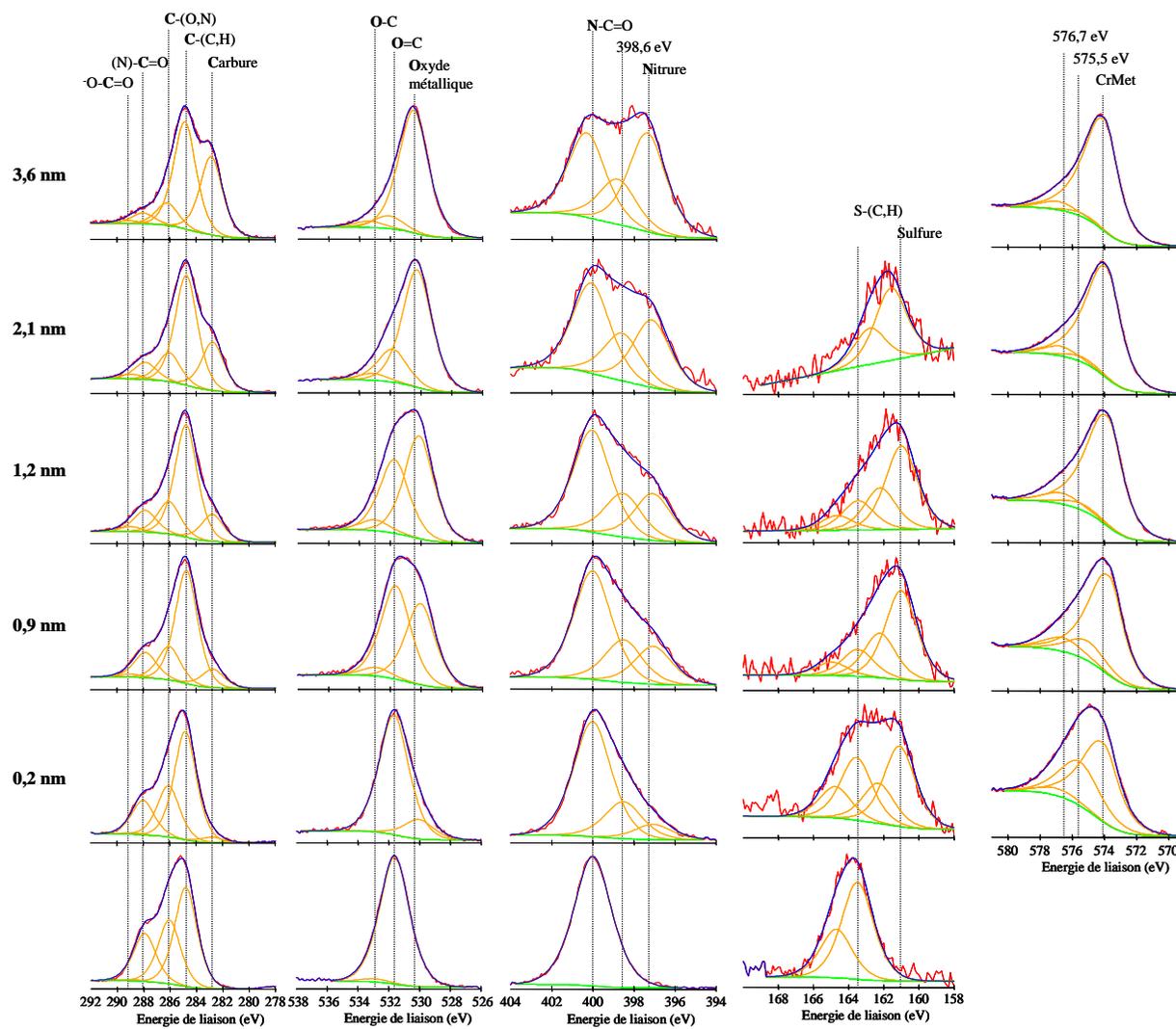


Figure V-39 : Niveaux de cœur C1s, O1s, N1s, S2p et Cr2p<sup>3/2</sup> obtenus sur la BSA métallisée par le chrome sous atmosphère neutre d'argon.

Une seconde hypothèse, pour expliquer la présence de cette composante à 398,6 eV, serait la formation d'un oxynitride de chrome, qui se trouverait effectivement à plus haute énergie de liaison comparativement au nitride de chrome. La formation d'un oxynitride de chrome a précédemment été observée au cours d'une étude des interfaces formées entre le chrome et le 4-4'-bis(4-diméthylaminostyryl)benzène (DMASB). Les auteurs mettent en évidence la formation de l'oxynitride dans les interfaces formées par métallisation du polymère DMASB et par évaporation du polymère sur le chrome [deVos, *et al.* 2001].

Les spectres S2p montrent également l'apparition d'une nouvelle contribution à 161,1 eV attribuée à la formation d'une liaison entre le soufre et le chrome [Biesinger, *et al.* 2004, Lachkar, *et al.* 1995, Roberts et Friend 1988].

Enfin, la décomposition des pics de l'élément métallique de la couche déposée indique la présence de trois composantes pour une épaisseur de 0,2 nm de chrome. L'énergie de liaison de la composante majoritaire des pics Cr2p<sup>3/2</sup> à 574,0 eV correspond à l'énergie de liaison du chrome métallique. La composante identifiée à 575,5 eV est attribuée à la présence de carbures, nitrures et sulfures, l'oxyde étant observé sur la dernière composante à 576,7 eV. L'intensité de ces deux dernières composantes diminue avec l'épaisseur de la couche métallique déposée. La composante oxyde reste néanmoins visible en raison de l'oxydation du chrome par l'apport extérieur d'oxygène.

La confrontation de ces résultats met en évidence l'existence de deux sites réactifs privilégiés du chrome sur la protéine. Il s'agit des fonctions amides et des groupements thiols. Au niveau de la fonction amide, il est difficile de savoir laquelle des liaisons C=O ou C-N est la cible privilégiée du chrome. En effet, la présence de la contribution à 398,6 eV sur l'azote suggère que l'augmentation de la densité électronique autour de l'azote soit générée par un transfert d'électrons lors de l'attaque de la liaison C=O par le chrome. Cependant, la formation de nitride implique également une attaque directe de l'azote par l'élément métallique. L'oxydation de la couche de chrome liée à l'apport d'oxygène extérieur limite considérablement l'étude de l'interaction entre le chrome et l'oxygène de la fonction amide. Les travaux portant sur la métallisation des polyimides ont montré que les sites carbonyles sont les sites privilégiés pour interagir avec le chrome en raison d'un déplacement chimique précoce de l'oxygène vers les plus faibles énergies de liaisons et d'une relative stabilité de la liaison C-N pour les faibles taux de couvertures [Chenite et Selmani 1994, Haight, *et al.* 1988]. En revanche, une étude portant sur la métallisation de polymères azotés, en particulier le nylon 6, montre la formation d'espèces nitrures en l'absence de formation d'oxyde. Ainsi il est suggéré que l'apparente stabilité de la liaison C-N dans les polyimides soit le résultat d'une délocalisation des électrons sur les groupements aromatiques et qu'en l'absence d'une telle stabilisation, les liaisons C-N sont fragilisées [Wagner, *et al.* 2003].

Compte tenu de la profonde modification observée dans l'environnement chimique du soufre dès les premiers angströms de chrome déposé, cet élément peut être également considéré comme un site particulièrement réactif pour le chrome. Le soufre est présent au niveau des groupements sulfhydryls et/ou thioéthers des chaînes latérales des acides aminés soufrés. Les travaux concernant la métallisation des polythiophènes ont également montré la formation de sulfure de chrome [Elfeninat, *et al.* 1995, Lachkar, *et al.* 1995].

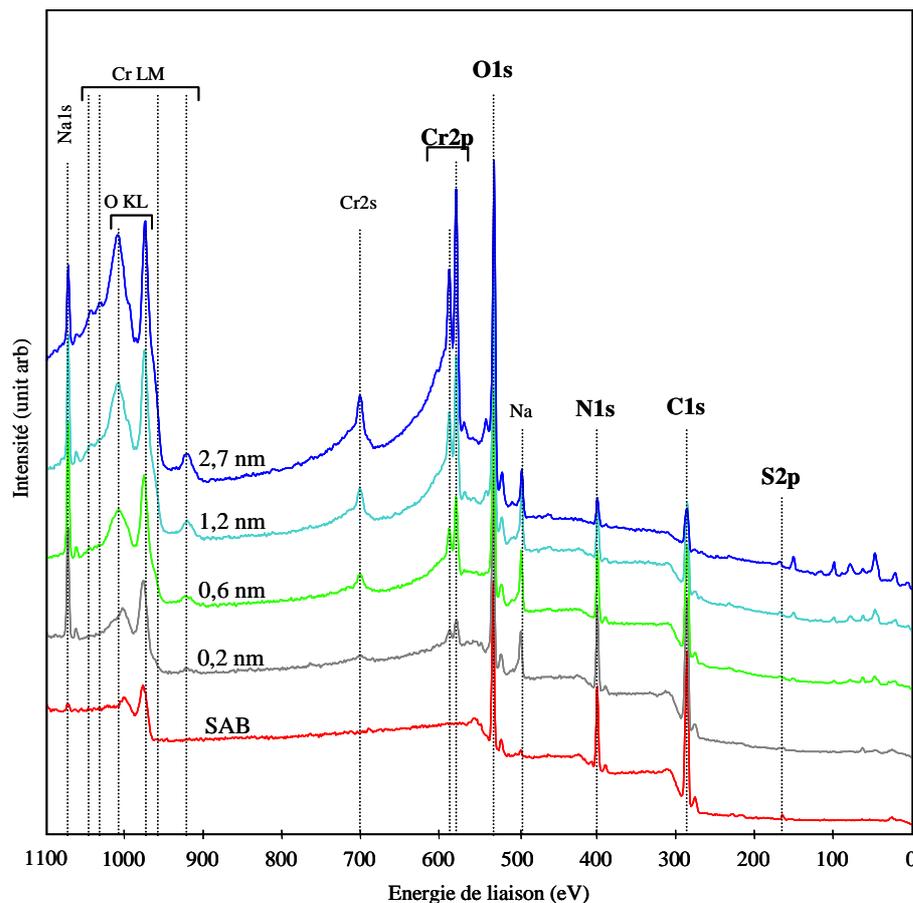
**En résumé :**

La métallisation des protéines par le chrome sous atmosphère argon montre d'importantes modifications de l'environnement chimique des éléments de la protéine en contact avec le métal naissant. De nouvelles liaisons chimiques sont observées vers les plus faibles énergies de liaisons. Elles sont donc générées par une augmentation de la densité électronique autour de l'élément considéré. Ainsi la formation d'oxyde, de nitrure, de sulfure et de carbure est constatée. Les résultats présentés, confrontés aux données disponibles dans la littérature sur la métallisation des polymères, nous permettent de proposer un mécanisme réactionnel en deux étapes. Les atomes d'oxygènes, d'azote et de soufre sont initialement réduits par leur interaction avec le chrome. Cette première étape est suivie de la formation du carbure de chrome. L'interface formée entre le métal et la protéine détruit donc certaines liaisons chimiques de la protéine, ce qui a pour conséquence une augmentation des forces d'adhérence entre la protéine et le métal.

#### IV.4.3. Métallisation des protéines par l'oxyde de chrome

En raison des phénomènes physico-chimiques que nous avons observés au cours de la formation de l'interface chrome métallique/BSA et compte tenu du fait que dans les conditions normales de pression, le chrome est oxydé, nous avons souhaité étudier l'interface formée par l'oxyde de chrome et la BSA. L'oxyde de chrome est produit par pulvérisation cathodique magnétron sous atmosphère d'oxygène (0,1 Pa).

L'allure générale des spectres XPS obtenus sur la BSA au cours de sa métallisation par l'oxyde de chrome (CrOx) sont présentés sur la figure V-40 en fonction de l'épaisseur croissante de la couche. Comme précédemment, les épaisseurs des couches sont estimées en admettant leurs homogénéités.

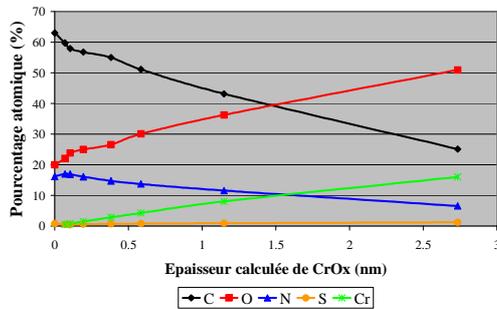


**Figure V-40 :** Spectres XPS obtenus au cours de la métallisation de la BSA en fonction de l'épaisseur croissante de la couche d'oxyde de chrome.

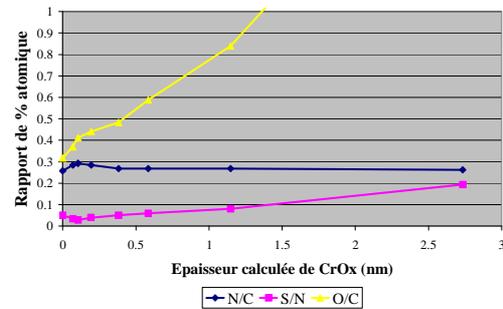
L'intensité des pics de C1s et N1s de la BSA diminue alors que les signaux de l'oxygène et du chrome augmentent lorsque l'épaisseur de la couche croît. On peut également observer la présence de sodium dont l'intensité augmente avec l'épaisseur de la couche de chrome. Ce sodium est initialement présent dans la poudre de BSA que nous utilisons pour préparer nos solutions aqueuses. Il semble donc que le sodium ait la particularité de migrer à l'interface sous atmosphère oxydante. La présence du sodium n'est pas considérée dans le cadre des analyses quantitatives.

Une analyse quantitative de la composition élémentaire de la surface analysée en fonction de l'épaisseur croissante de la couche CrOx est présentée sur la figure V-41 et montre une diminution des pourcentages atomiques du carbone et de l'azote simultanément à l'augmentation de la quantité d'oxygène et de

chrome. L'augmentation de l'oxygène est ici attendue compte tenu de l'introduction d'oxygène gazeux au cours de la pulvérisation pour la formation de CrOx. L'évolution des rapports N/C, S/N et C/O, présentée sur la figure V-42, nous permettent de confirmer l'apport d'oxygène et de montrer la conservation de la stoechiométrie de l'azote et du carbone en fonction de l'épaisseur croissante de la couche de CrOx. Nous pouvons également observer une augmentation du rapport S/N pouvant indiquer une migration du soufre à l'interface.



**Figure V-41 :** Evolution des pourcentages atomiques des éléments de la BSA et du chrome en fonction de l'épaisseur de la couche de d'oxyde de chrome calculée.



**Figure V-42 :** Evolution des rapports N/C, S/N et O/C en fonction de l'épaisseur de la couche d'oxyde de chrome calculée.

Les acquisitions centrées sur les éléments de la protéine et sur le chrome oxydé sont présentées sur la figure V-43.

La décomposition des pics C1s permet d'observer un élargissement du pic du côté des plus hautes énergies de liaisons. Une composante supplémentaire est donc ajoutée et nous l'avons attribuée au groupement carboxylate à 289,0 eV en raison du caractère plus oxydé de ce carbone. En effet, l'intensité des composantes C-(O,N) et (N)-C=O augmentent alors que celle de C-(C,H) diminue avec l'augmentation de l'épaisseur de la couche. La tendance observée correspondrait donc à une oxydation des composantes du carbone. Cette oxydation peut être liée à des interactions avec le chrome oxydé ou au plasma oxygène formé pour la pulvérisation. La dernière hypothèse semble assez peu probable puisque le plasma est confiné à proximité de la cible par l'effet magnétron. Ceci sera par ailleurs conforté par l'étude de l'interface Au/BSA en présence d'oxygène.

Les spectres O1s de l'oxygène montre la présence d'une composante supplémentaire à 530,4 eV dont l'intensité augmente avec l'épaisseur de la couche d'oxyde de chrome et aux dépens de l'oxygène de la protéine. Cette composante est attribuée à l'oxygène de l'oxyde de chrome déposé.

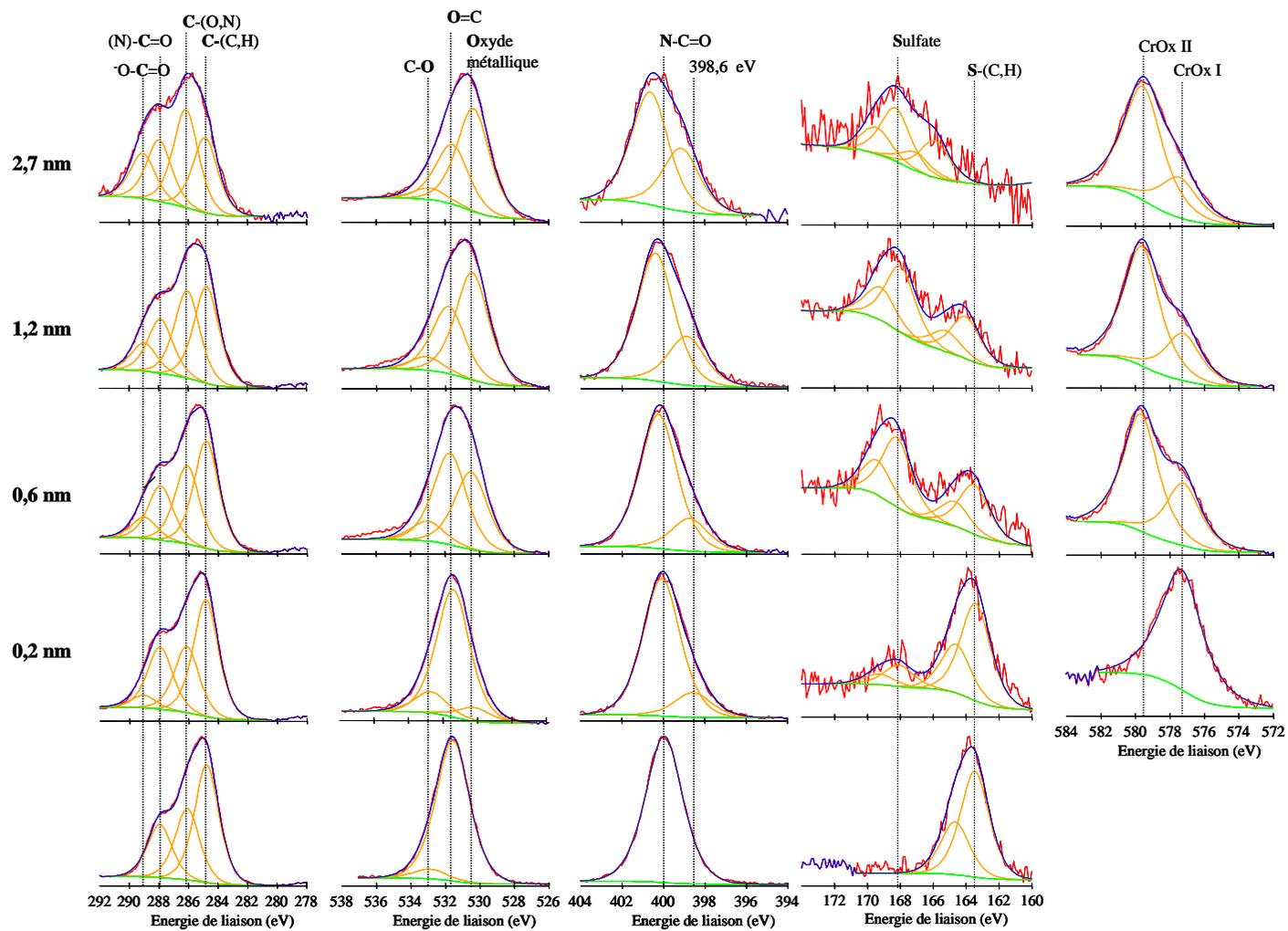


Figure V-43 : Niveaux de cœur C1s, O1s, N1s, S2p et Cr2p<sup>3/2</sup> obtenus sur la BSA métallisée par le chrome sous atmosphère réactive d'oxygène.

L'azote présente également une composante supplémentaire à plus faible énergie de liaison. Cette composante apparaît dès le premier dépôt d'oxyde de chrome et son intensité augmente avec l'augmentation de l'épaisseur de la couche de chrome alors que l'intensité de la composante amide diminue. L'énergie de liaison de cette composante (398,6 eV) est évocatrice d'une augmentation de sa densité électronique dans un environnement oxydant et pourrait donc être attribuée à la formation d'un oxynitride de chrome. Bien que les énergies de liaison des oxynitrides soient en règle générale plus faible (396,4 eV), la différence des énergies de liaison entre le nitride et l'oxynitride est relativement respectée par rapport aux données de la littérature et compte tenu du fait que les stoechiométries de  $Cr_xN_yO_z$  ne sont pas connues [Agouram 2003, Milosev et Strehblow 2003].

Les spectres S2p du soufre montrent que la composante S-(C,H) à 163,5 eV se déplace vers les plus hautes énergies de liaison traduisant une oxydation du soufre. La composante sulfate est observée à 168,1 eV.

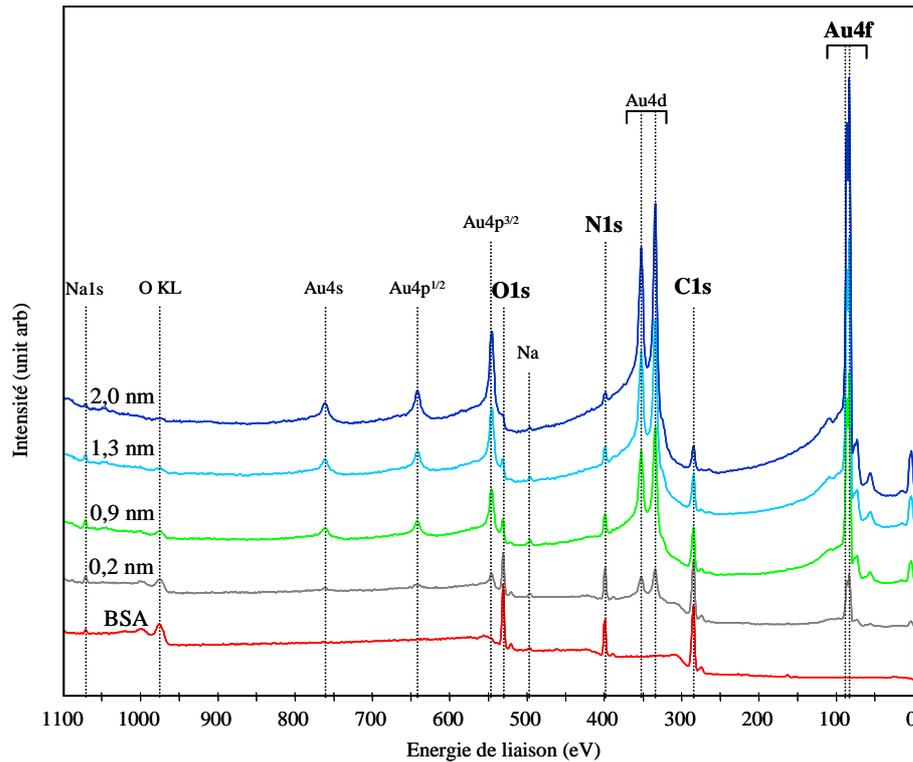
Enfin, les spectres Cr2p<sup>3/2</sup> montrent une évolution chimique de la couche de chrome avec l'augmentation de son épaisseur. Une première composante est observée à une énergie de liaison de 577,3 eV lors du premier dépôt d'oxyde de chrome. Une seconde composante apparaît au cours des dépôts ultérieurs à une énergie de liaison de 579,5 eV. L'intensité de cette deuxième composante augmente avec l'épaisseur de la couche d'oxyde de chrome et aux dépens de la première composante. Ceci suppose que la première composante observée à plus faible énergie de liaison est caractéristique de l'interface formée et non pas de la couche d'oxyde de chrome, qui elle est caractérisée par la composante de plus haute énergie. Ainsi, la composante de Cr2p à 577,3 eV pourrait correspondre au chrome impliqué dans la formation de l'oxynitride.

**En résumé :**

**La métallisation des protéines par le chrome sous atmosphère réactive d'oxygène met en évidence une oxydation des composantes du carbone et du soufre de la protéine alors que le déplacement chimique observé pour l'azote traduit une augmentation de sa densité électronique. En accord avec l'apparition d'une composante du chrome représentative de la chimie de l'interface formée et d'une modification notable de l'environnement électronique de l'azote, les modifications observées sont compatibles avec la formation d'un oxynitride de chrome.**

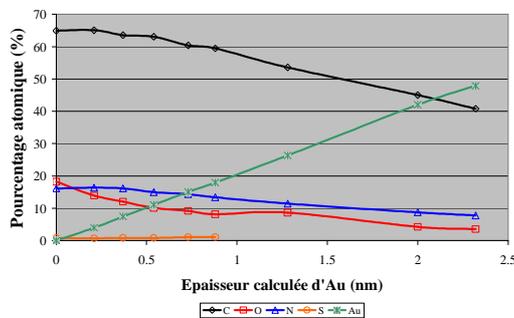
#### *IV.4.4. Métallisation des protéines par l'or sous atmosphère neutre*

La formation de l'interface Au/BSA a également été suivie afin d'observer d'éventuelles modifications chimiques pouvant expliquer les fortes interactions observées entre ce métal et les protéines. Les résultats obtenus pourront également être comparés à ceux de la métallisation de la BSA par le chrome afin d'apporter des éléments de réponse sur la chimisorption des protéines sur ces deux substrats métalliques. Les spectres généraux obtenus sur la BSA au cours de sa métallisation par l'or sont présentés sur la figure V-44 en fonction de l'épaisseur croissante de la couche déposée. Les épaisseurs sont estimées pour  $\lambda_{NiS} = 1,76$  nm et en supposant que la couche déposée est homogène.

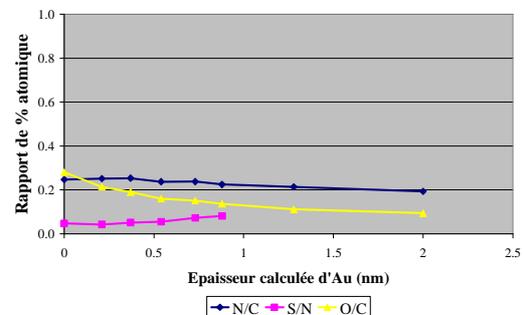


**Figure V-44 :** Spectres XPS obtenus au cours de la métallisation de la BSA en fonction de l'épaisseur croissante de la couche d'or déposée.

L'intensité des pics des éléments caractéristiques de la protéine diminue lorsque que l'épaisseur de la couche d'or augmente. Ceci est confirmé par les données quantitatives de la composition élémentaire de l'interface formée en fonction de l'épaisseur de la couche déposée (figure V-45). L'évolution des rapports N/C, S/N et O/C (figure V-46) montre que le rapport N/C est relativement constant jusqu'à 0,9 nm. Au-delà, le rapport diminue légèrement. On observe également une diminution du rapport O/C. Nous expliquons ces variations de rapport par les biais introduits dans les données quantitatives au cours de la décomposition des pics d'azote et d'oxygène. En effet, l'intensité des pics des différents niveaux énergétiques de l'or augmente avec l'épaisseur de la couche déposée. Le fond de l'oxygène se trouve donc confondu dans celui du pic  $Au4p^{3/2}$  de l'or et ceci dès les premières couches déposées. De la même façon, le fond généré par le pic  $Au4d$  gêne la décomposition du pic d'azote pour des épaisseurs de couche plus importantes. Cela est parfaitement visible sur les acquisitions centrées sur les éléments de la BSA présentées sur la figure V-47. Dans ce contexte, nous considérons que la stoechiométrie de la protéine est conservée.



**Figure V-45 :** Evolution des pourcentages atomiques des éléments de la BSA et de l'or en fonction de l'épaisseur de la couche d'or déposée sous argon.



**Figure V-46 :** Evolution des rapports N/C, S/N et O/C en fonction de l'épaisseur de la couche d'or déposée sous argon.

La décomposition des spectres XPS du carbone C1s (figure V-47) nous permet d'observer un élargissement du pic vers les plus faibles énergies de liaison. Cet élargissement peut être la conséquence d'une perturbation de la répartition des charges autour du carbone induite par les atomes d'or incidents [Bou 1991]. Une autre hypothèse peut être émise selon laquelle la raie du carbone pourrait être déformée au cours du processus de métallisation en raison du clivage de certaines liaisons carbonées sous l'impact des atomes incidents générant ainsi du carbone « amorphe » [Bebin et Prud'homme 2002, 2002]. Dans ce contexte incertain, nous avons privilégié l'addition d'une composante supplémentaire à 283,5 eV.

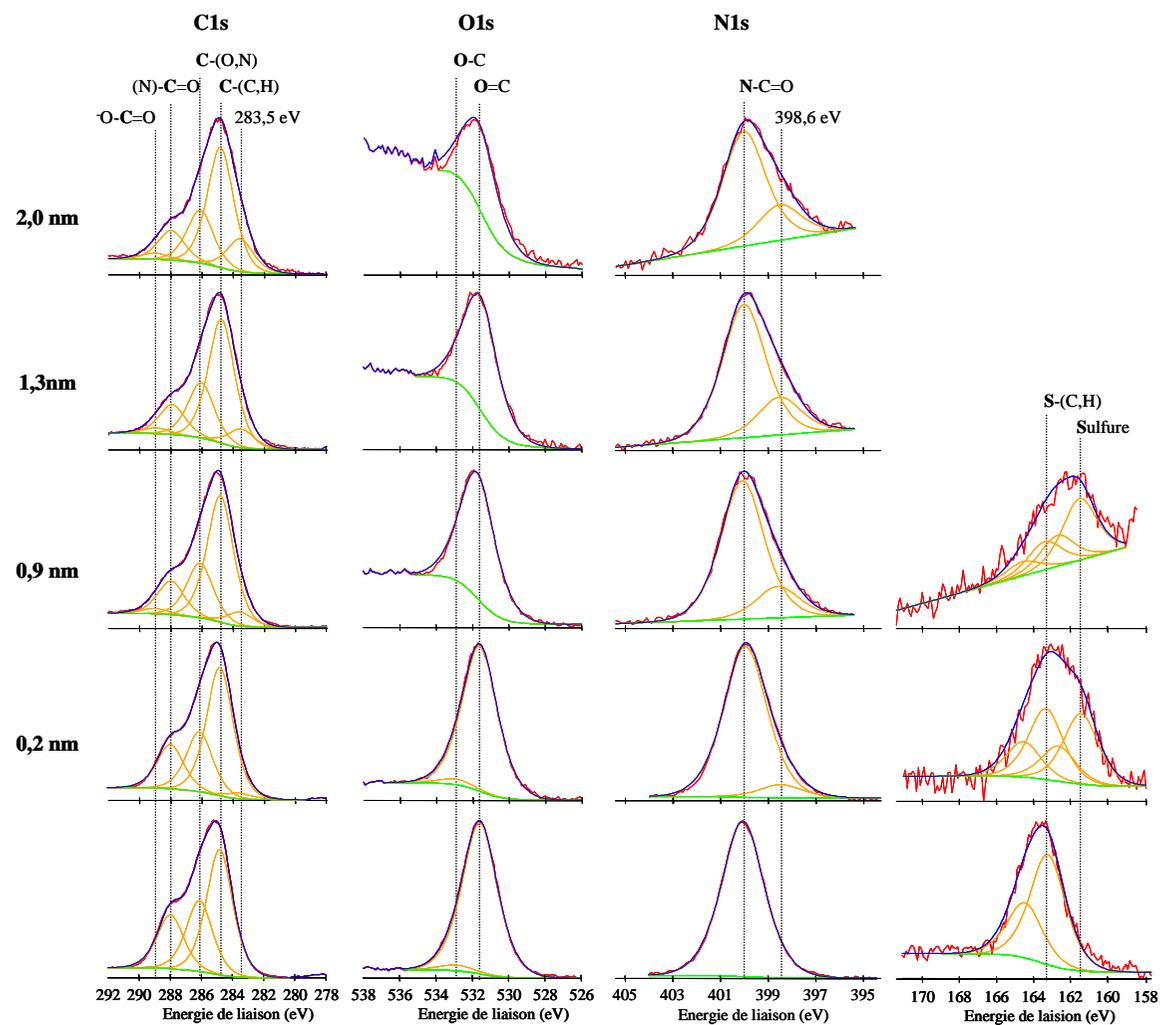
Les spectres O1s présentés montrent que l'intensité du pic d'oxygène est atténuée avec l'augmentation de l'épaisseur de la couche d'or. Aucune modification chimique n'est observée. L'or ne réagit pas avec l'oxygène de la protéine.

Les spectres N1s obtenus en fonction de l'épaisseur croissante de la couche d'or montrent l'apparition d'une nouvelle composante à 398,6 eV. L'intensité de cette composante de plus faible énergie augmente alors que l'intensité de la composante amide diminue lorsque l'épaisseur de la couche d'or croît. Comme nous l'avons vu au cours de l'étude de la désorption thermique des protéines, cette composante située à 398,6 eV peut être attribuée aux atomes d'azote en interaction avec l'or [Charlier 2003, Xie, *et al.* 2000].

Les spectres XPS obtenus sur le niveau de cœur 2p du soufre montrent très nettement, dès le premier dépôt, la formation d'un sulfure d'or. La formation des liaisons entre le soufre et l'or est bien connue. Cette propriété est couramment utilisée pour la préparation des monocouches auto-assemblées [Castner et Ratner 2002, Ferretti, *et al.* 2000]. La chimisorption des protéines sur les surfaces d'or par l'intermédiaire du soufre est également rapportée [Brizzolara, *et al.* 1997, Chi, *et al.* 2000].

**En résumé :**

**La métallisation des protéines par l'or sous atmosphère neutre d'argon montre l'existence de fortes interactions entre l'azote et le soufre de la protéine et l'or. Aucune interaction n'est observée entre l'oxygène de la protéine et l'or.**

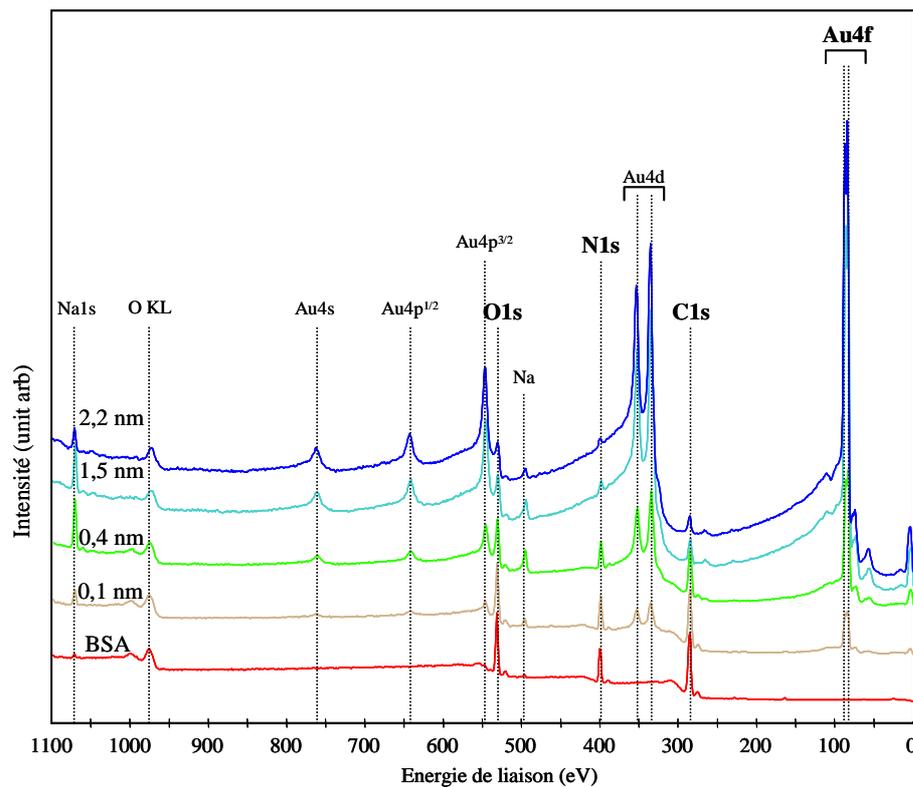


**Figure V-47 :** Niveaux de cœur C1s, O1s, N1s et S2p obtenus sur la BSA métallisée par l'or sous atmosphère neutre d'argon

#### IV.4.5. Métallisation des protéines par l'or sous atmosphère réactive

L'interface Au/BSA a également été formée sous atmosphère réactive. L'or étant chimiquement inerte, cette analyse nous permet d'apprécier l'incidence de l'atmosphère réactive sur les modifications chimiques observées précédemment. Les résultats obtenus pourront également être comparés à ceux de la métallisation de la BSA par l'oxyde de chrome.

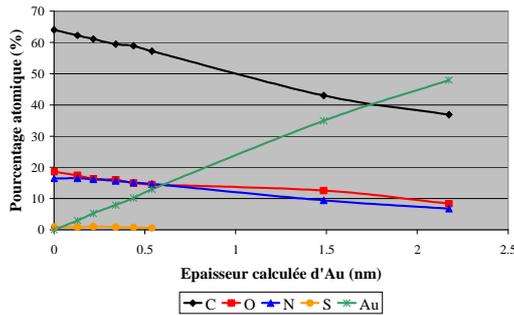
Les spectres généraux obtenus sur la BSA au cours de sa métallisation par l'or sous atmosphère d'oxygène sont présentés sur la figure V-48 en fonction de l'épaisseur croissante de la couche déposée. Comme précédemment, les épaisseurs sont estimées pour  $\lambda_{\text{N1s}} = 1,76 \text{ nm}$ , en supposant la couche d'or déposée homogène.



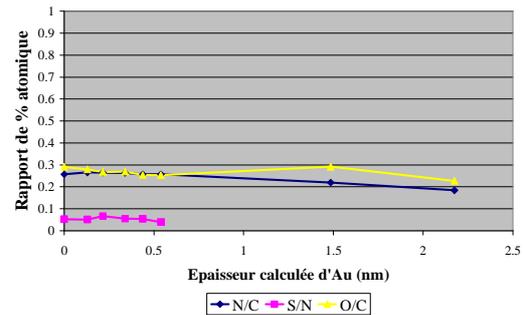
**Figure V-48** : Spectres XPS obtenus au cours de la métallisation de la BSA en fonction de l'épaisseur croissante de la couche d'or déposée sous atmosphère réactive.

L'intensité des pics des éléments caractéristiques de la protéine diminue lorsque que l'épaisseur de la couche d'or augmente. Comme nous l'avons précédemment observé au cours de la métallisation de la BSA par le chrome en présence d'oxygène, le sodium initialement présent dans notre solution aqueuse de protéines, migre à l'interface. Cet élément n'est pas pris en compte pour l'analyse quantitative de la composition élémentaire au cours de la formation de l'interface.

Cette analyse est présentée sur la figure V-49 et montre un profil comparable à celui obtenu sous atmosphère neutre d'argon. Une différence est néanmoins observée et concerne la quantité d'oxygène qui est légèrement plus importante comparativement à l'interface formée en présence d'argon. Une très faible quantité d'oxygène introduit a donc dû participer à la formation de l'interface BSA/Au.



**Figure V-49 :** Evolution des pourcentages atomiques des éléments de la BSA et de l'or en fonction de l'épaisseur de la couche d'or déposée sous oxygène.



**Figure V-50 :** Evolution des rapports N/C, S/N et O/C en fonction de l'épaisseur de la couche d'or déposée sous oxygène.

L'évolution des rapports N/C, S/N et O/C (figure V-50) est interprétée de façon similaire à la métallisation sous argon. Néanmoins, la stabilité du rapport C/O conforte l'idée d'une intervention de l'oxygène introduit dans la formation de l'interface.

Les modifications chimiques observées sur les niveaux de cœur des éléments de la BSA en fonction de l'épaisseur croissante de la couche d'or, sont peu différentes de celles observées sous argon (figure V-51). Les différences concernent exclusivement l'oxygène et le soufre.

Les spectres du niveau de cœur 1s de l'oxygène montrent la présence d'une nouvelle contribution identifiée à 529,2 eV. Nous attribuons cette contribution à la formation d'un oxyde. Les données de la littérature portant sur les études XPS des oxydes d'or identifient la composante oxyde à 530,0 ( $\pm 0,1$ ) eV [Juodkasz, *et al.* 2000, Krozer et Rodahl 1997].

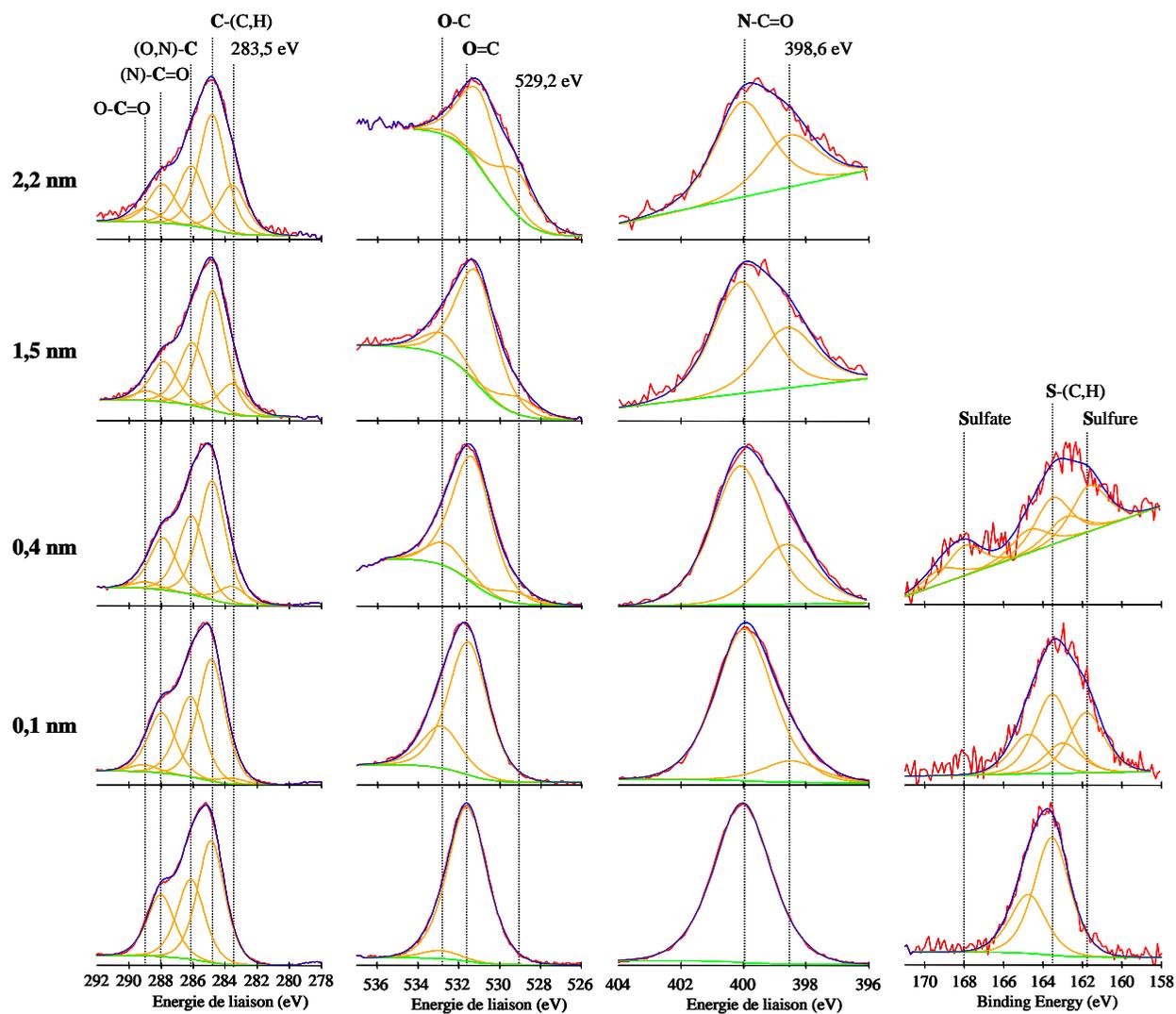
Les spectres XPS du soufre 2p mettent en évidence une évolution de la forme chimique du soufre sous atmosphère oxygène en deux étapes. Comme nous l'avons précédemment observé sous atmosphère neutre d'argon, l'analyse XPS réalisée après le premier dépôt d'or (0,1 nm) montre le déplacement chimique du soufre vers les sulfures. Les analyses réalisées par la suite montrent l'apparition de la composante sulfate également observée lors de la métallisation de la BSA par le chrome sous atmosphère réactive d'oxygène. Le soufre étant particulièrement sensible à l'oxydation, il est probable que ce soit la présence d'oxygène qui conditionne la formation du sulfate.

Les spectres XPS des niveaux de cœur 1s du carbone et de l'azote présentent les mêmes caractéristiques chimiques que celles observées lors de la formation de l'interface Au/BSA en présence d'argon.

Comparativement à la formation de l'interface CrO<sub>x</sub>/BSA, les composantes du carbone ne sont pas oxydées. Ceci conforte donc l'idée que le plasma oxygène, à lui seul, ne modifie pas la chimie de la protéine.

#### **En résumé :**

**La métallisation des protéines par l'or sous atmosphère réactive d'oxygène montre l'existence de fortes interactions entre l'azote et le soufre de la protéine et l'or.**



**Figure V-51** : Niveaux de cœur C1s, O1s, N1s et S2p obtenus sur la BSA métallisée par l'or sous atmosphère réactive d'oxygène.

## V. MODELES D'ADSORPTION DES PROTEINES SUR LES SURFACES METALLIQUES

Les données théoriques et expérimentales sur les interactions moléculaires aux interfaces protéines/surfaces métalliques sont rares. Ceci est dû à la complexité et à la difficulté d'étudier ces interfaces *in vivo*.

L'objectif de notre travail consistait à proposer une approche nous permettant d'accéder à ces interfaces afin d'observer les interactions physico-chimiques qui nous permettraient d'apporter un certain nombre d'arguments en faveur de la chimisorption des protéines sur les surfaces métalliques. La spectroscopie de photoélectrons est particulièrement bien adaptée à l'étude de ces interactions physico-chimiques puisqu'elle permet de suivre les modifications de la répartition des charges autour des éléments considérés. Les conditions environnementales de notre étude sont donc différentes des conditions physiologiques dans lesquelles se forment les interfaces (l'XPS nécessitant de travailler sous UHV) mais peuvent néanmoins contribuer à la compréhension des mécanismes d'adsorption [Langel et Menken 2003, Uvdal, *et al.* 1992].

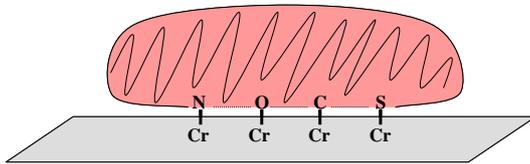
Trois approches ont été envisagées pour accéder aux interfaces protéines/surfaces métalliques. Les deux premières approches ont été réalisées afin d'accéder aux interfaces formées lorsque les protéines viennent au contact d'une surface solide. A l'opposé, la dernière approche permet de suivre la formation de l'interface lorsque les éléments métalliques rencontrent les protéines.

La première approche consistait à sublimer la protéine sous vide sur les surfaces métalliques. Cette approche n'est pas concluante puisque nous ne pouvons pas expliquer les modifications chimiques observées. En effet, nous ne disposons pas d'informations sur l'incidence de la température de sublimation sur la structure de la protéine sous UHV. Une analyse des gaz au cours de la sublimation pourrait apporter quelques éléments de réponse.

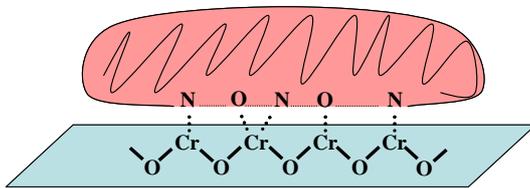
Pour les mêmes raisons, la seconde approche qui consistait à désorber thermiquement la protéine sous UHV, n'est pas particulièrement adaptée pour sonder la chimie de l'interface. Bien que nous ayons effectivement observé une désorption de la BSA en chauffant le substrat, les modifications chimiques observées ne peuvent être interprétées simplement en raison des observations faites à propos de l'incidence de la température sur la déstructuration protéique. Rappelons que les déplacements chimiques observés sur l'azote sont identiques dans le cas de la sublimation et de la désorption thermique. D'autre part, les estimations faites sur l'épaisseur des couches de protéines ne peuvent être considérées comme exactes puisque l'homogénéité de la couche de protéine avant et au cours de la désorption n'est pas démontrée. Néanmoins, nous avons pu observer une différence de stabilité structurale de la BSA en fonction du substrat sur lequel elle était adsorbée. Ces observations suggèrent donc que les forces d'interactions régissant l'adsorption des protéines sur les surfaces ne sont pas les mêmes pour les oxydes de chrome et pour l'or. Des observations similaires concernant l'adsorption de la glycine sur des substrats d'oxyde de titane, de cuivre et d'or ont été rapportées [Uvdal, *et al.* 1990].

Bien que peu informatives, ces deux premières approches nous ont permis de montrer la difficulté d'accéder à la formation de l'interface en raison de la taille importante des protéines au regard de la profondeur d'analyse de l'XPS. Dans ce contexte, la troisième approche que nous proposons est de loin la plus appropriée puisqu'elle offre une sensibilité particulièrement importante à l'interface compte tenu de l'épaisseur d'une monocouche d'un élément métallique. Depuis longtemps appliquée à l'étude des interfaces métal/polymères, cette approche a grandement participé à la compréhension des mécanismes d'adhésion [Bou, *et al.* 1991, Iucci, *et al.* 1999]. Au cours de notre étude, certaines des liaisons chimiques formées entre les métaux et la protéine par la mise en œuvre de cette approche ont également été observées lors de l'adsorption de protéines, d'acides aminés ou de molécules azotées à partir de solutions aqueuses [Brizzolara, *et al.* 1997, Charlier 2003, Chi, *et al.* 2000, Uvdal, *et al.* 1992, Xie, *et al.* 2000]. La métallisation des protéines apparaît donc comme une approche tout à fait pertinente et fiable dans la problématique qui est la nôtre.

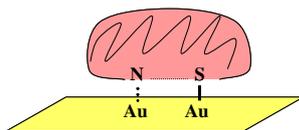
La formation des interfaces CrMet/BSA, CrOx/BSA et Au/BSA par métallisation des protéines nous a permis de mettre en évidence des sites réactifs de la protéine impliqués dans sa chimisorption sur les surfaces.



**Figure V-52 :** Vue schématique des liaisons chimiques potentielles formées par l'adsorption des protéines sur une surface de chrome métallique.



**Figure V-53 :** Vue schématique des liaisons chimiques potentielles formées par l'adsorption des protéines sur une surface d'oxyde de chrome.



**Figure V-54 :** Vue schématique des liaisons chimiques potentielles formées par l'adsorption des protéines sur une surface d'or.

Vis-à-vis d'une surface de chrome métallique, ce sont principalement les fonctions amides et thiols qui initieraient à la formation de liaisons chimiques entre la protéine et la surface. Compte tenu des liaisons chimiques formées au cours de la métallisation de la BSA, la chimisorption des protéines se traduirait par la formation de liaisons nitrures, oxydes, carbures et sulfures (figure V-52). Ce scénario a néanmoins peu de chance de se produire compte tenu du fait que les premières couches atomiques d'une surface de chrome sont oxydées.

Cependant, les modifications chimiques que nous avons observées au cours de la métallisation des protéines par le chrome en présence d'oxygène montrent clairement une augmentation de la densité électronique autour de l'azote. Pour expliquer ce déplacement chimique, nous avons émis l'hypothèse de la formation d'un oxynitride de chrome (figure V-53). La formation de telles liaisons au cours de l'adsorption des protéines pourrait expliquer la forte adhésion des protéines sur les surfaces oxydées. Indépendamment de l'identification exacte de la liaison formée, le déplacement chimique observé est à lui seul évocateur d'un transfert de charge et donc de la chimisorption des protéines, les interactions de Van der Waals ne s'accompagnant pas de tels déplacements.

Vis-à-vis d'une surface d'or, la chimisorption des protéines via la formation de liaisons entre le soufre et l'or ne fait plus de doute. Notre étude portant sur la métallisation de la BSA par l'or met effectivement en évidence la formation d'une telle liaison. Cette étude suggère également la formation d'une liaison N-Au (figure V-54) qui résulterait de la déprotonation de l'azote de la fonction amide [Charlier 2003].

D'un point de vue conformationnel, il est couramment proposé que les interactions de Van der Waals, électrostatiques et hydrophobes induiraient une modification de la structure des protéines. Ce comportement pourrait également dépendre d'interactions plus spécifiques entre des sites réactifs de la surface et des groupements fonctionnelles de la protéine, comme celles que nous avons mises en évidence.

Cependant, et afin de rester particulièrement critique et précautionneux sur l'interprétation des modifications chimiques observées, le facteur énergétique doit être pris en considération. Sans entrer dans le détail du procédé de dépôts par pulvérisation cathodique magnétron [Billard et Perry], on peut le définir comme étant l'éjection d'atomes superficiels d'une cible de l'élément à déposer (il s'agit de la cathode) par des atomes ionisés d'un gaz. Les atomes de la cible ainsi éjectés se déposent sur le substrat (l'anode). L'énergie cinétique des atomes éjectés n'est pas nulle. Cette énergie est en moyenne de l'ordre de 5 à 20 eV (16 eV/atom pour Cr [Thornton et Lamb 1984]). Toutefois, suivant leur trajectoire entre la cible et le substrat, certains de ces atomes peuvent subir des collisions avec les particules du plasma et ainsi perdre de l'énergie, ils sont dits thermalisés. Ainsi, les atomes incidents atteignent le substrat avec des énergies comprises entre l'énergie initiale à l'éjection et l'énergie thermalisée (de l'ordre de 0,1 eV) [Albenge, Billard et Perry]. Dans ce contexte, l'intégrité chimique des protéines ne peut être garantie. Afin de vérifier l'incidence de ce facteur énergétique sur les modifications chimiques observées, il serait intéressant de procéder à la métallisation des protéines par évaporation thermique, ce procédé étant 10 à 100 fois moins énergétique que la pulvérisation.

## VI. CONCLUSIONS

Pour l'étude de la chimisorption des protéines sur les surfaces métalliques, l'XPS est une technique particulièrement bien adaptée pour mettre en évidence les modifications dans la répartition des charges électroniques des molécules adsorbées. Trois approches, couplées à cette technique, ont été proposées pour accéder aux interfaces formées entre les protéines et les surfaces métalliques. Compte tenu de l'épaisseur d'une monocouche de protéine et de la profondeur d'analyse de l'XPS, seule l'étude des interfaces par métallisation des protéines s'est avérée être particulièrement sensible et pertinente. L'étude de l'interface protéine/chrome métallique montre clairement la formation de liaison chimique entre le chrome et les quatre éléments constitutifs de la protéine. Cependant, la formation de telles liaisons est improbable dans les conditions réelles de l'adsorption. En revanche, la formation d'un oxynitride ou d'une interaction compatible avec une augmentation de la densité électronique de l'azote est observée au cours de la formation de l'interface protéine/oxyde de chrome. Ces données témoignent de la nature chimique des interactions protéines/oxydes métalliques. Enfin, l'étude de l'interface protéine/or met en évidence la formation de liaisons entre l'élément métallique et les éléments soufre et azote de la protéine. Ces dernières, ayant été précédemment décrites dans les conditions réelles de l'adsorption constituent un argument en faveur de la fiabilité des modifications chimiques observées. Cependant, le procédé de métallisation par pulvérisation cathodique magnétron peut s'avérer particulièrement énergétique. De ce fait, certains doutes persistent sur l'intégrité chimique des protéines et donc sur les modifications chimiques observées, en particulier sur le niveau de cœur 1s de l'azote. Nos résultats devront donc être confirmés par un procédé de métallisation moins énergétique telle que l'évaporation.

## VII. REFERENCES

**AGOURAM, S.** Caractérisation de couches minces d'oxynitrides de chrome produites par pulvérisation cathodique réactive en présence d'air: influence de la pression de vapeur d'eau contenue dans le plasma (2003) PhD FUNDP Namur

ALBENGE, O. [http://perso.orange.fr/olivier.albenge/page\\_site/Site\\_mat/cm/cm-acceuil.htm](http://perso.orange.fr/olivier.albenge/page_site/Site_mat/cm/cm-acceuil.htm).

BEBIN, P. and PRUD'HOMME, R.E. (2002). X-ray photoelectron spectroscopy study of two-nitrogen-containing polymer surfaces metallization by nickel. *Journal of Vacuum Science Technology A*. **20**: 1611-1620

BEBIN, P. and PRUD'HOMME, R.E. (2002). X-ray photoelectron spectroscopy study of oxygen-containing polymer surfaces metalized by vacuum-deposited nickel. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*. **40**: 82-94

BIESINGER, M.C., BROWN, C., MYCROFT, J.R., DAVIDSON, R.D. and MCINTYRE, N.S. (2004). X-ray photoelectron spectroscopy studies of chromium compounds. *Surface and Interface Analysis*. **36**: 1550-1563

BILLARD, A. and PERRY, F. Pulvérisation cathodique magnétron. *Techniques de l'Ingénieur*. **M1654**: 1-17

BLOMBERG, E., CLEASSON, P.M. and FRÖBERG, J.C. (1998). Surfaces coated with protein layers: a surface force and ESCA study. *Biomaterials*. **19**: 371-386

BOU, M. Adhesion polyéthylène-téréphtalate/Aluminium (1991) p123 Ph D Thesis Ecole Centrale de Lyon

BOU, M., MARTIN, J.-M., LE MOGNE, T. and VOVELLE, L. (1991). Chemistry of the interface between aluminium and polyethyleneterephtalate by XPS. *Applied Surface Science*. **47**: 149-161

BRIZZOLARA, R.A., BOYD, J.L. and TATE, A.E. (1997). Evidence for covalent attachment of purple membrane to a gold surface via genetic modification of the bacteriorhodopsin. *Journal of Vacuum Science Technology A*. **15**: 773-778

CASTNER, D.G. and RATNER, B.D. (2002). Biomedical surface science: Foundations to frontiers. *Surface Science*. **500**: 28-60

CHARLIER, J. Liaison Organique - Métal, Pourquoi, Comment? (2003) PhD CEA-Saclay

CHEN, Y., ZHANG, X., GONG, Y., ZHAO, N., ZENG, T. and SONG, X. (1999). Conformational changes of fibrinogen adsorption onto hydroxyapatite and titanium oxide nanoparticles. *Journal of Colloid and Interface Science*. **214**: 38-45

CHENITE, A. and SELMANI, A. (1994). Cr/phthalimide system: XPS study of interfacial reactions. *Surface Science*. **301**: 197-202

CHENITE, A., SELMANI, A. and YELON, A. (1994). X-Ray photoelectron spectroscopy investigation of interfacial interactions in the Cr/BPDA-PDA and Ti/BPDA-PDA systems. *Journal of Vacuum Science Technology A*. **12**: 513-522

CHI, Q., ZHANG, J., NIELSON, J.U., FRIIS, E.P., CHORKENDORFF, I., CANTERS, G.W., ANDERSEN, J.E.T. and ULSTRUP, J. (2000). Molecular monolayers and interfacial electron transfer of *Pseudomonas aeruginosa* Azurin on Au(111). *Journal of American Chemical Society*. **122**: 4047-4055

COSMAN, N.P., FATIH, K. and ROSCOE, S.G. (2005). Electrochemical impedance spectroscopy study of the adsorption behaviour of  $\alpha$ -lactalbumin and b-casein at stainless steel. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. **574**: 261-271

CRISPIN, X., GESKIN, V., CRISPIN, A., CORNIL, J., LAZZARONI, R., SALANEK, W.R. and BREDAS, J.L. (2002). Characterization of the interface dipole at organic/metal interfaces. *Journal of American Chemical Society*. **124**: 8131-8141

- DEVOS, S.A., NGUYEN, T.P., IP, J., LE RENDU, P. and TRAN, V.H. (2001). X-ray photoelectron spectroscopy study of the interface formed between chromium and 4,4'-bis(4-dimethylaminostyryl) benzene. *Surface and Interface Analysis*. **31**: 1050-1055
- DINIZ, F.B. and UETA, R.R. (2004). Platinum oxydation and its effect on concanavalin A adsorption. *Electrochimica Acta*. **49**: 4281-4286
- ELFENINAT, F., FREDRIKSSON, C., SACHER, E. and SELMANI, A. (1995). A theoretical investigation of the interactions between thiophene and vanadium, chromium, cooper and gold. *Journal of Chemical Physics*. **102**: 6153-6158
- ELWING, H. and GOLANDER, C.G. (1990). Protein and detergent interaction phenomena on solid surfaces with gradients in chemical composition. *Advanced in Colloidal and Interface Science*. **32**: 317-339
- FERRETTI, S., PAYTNER, S., RUSSEL, D.A., SAPSFORD, K.E. and RICHARDSON, D.J. (2000). Self-assembled monolayers: a versatile tool for the formulation of bio-surfaces. *Trends in Analytical Chemistry*. **19**: 530-540
- GERIN, P.A., DENGIS, P.B. and ROUXHET, P.G. (1995). Performance of XPS analysis of model biochemical compounds. *Journal de Chimie Physique*. **92**: 1043-1065
- GLAVIN, D.P. and BADA, J.L. (1998). Isolation of amino acids from natural samples using sublimation. *Analytical Chemistry*. **70**: 3119-3122
- GOLDBERG, M.J., CLABES, J.G. and KOVAC, C.A. (1988). Metal-polymer chemistry. II. Chromium-polyimide interface reactions and relate organometallic chemistry. *Journal of Vacuum Science Technology A*. **6**: 991-996
- GREEN, R.J., SU, T.J. and LU, J.R. (2001). The displacement of preadsorbed protein with a cationic surfactant at the hydrophilic SiO<sub>2</sub>-water interface. *Journal of Physical Chemistry B*. **105**: 9331-9338
- HAIGHT, R., WHITE, B.D. and HO, P.S. (1988). Complex formation and growth at the Cr- and Cu-polyimide interface. *Journal of Vacuum Science Technology A*. **6**: 2188-2199
- HAYNES, C.A. and NORDE, W. (1994). Globular proteins at solid/liquid interfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. **2**: 517-566
- HAYNES, C.A. and NORDE, W. (1994). Globular proteins at solid/liquid interfaces. *Colloid and Surfaces B: Biointerfaces*. **2**: 517-566
- HO, P.S., SILVERMAN, B.D., HAIGHT, R., WHITE, B.D., SANDA, P.N. and ROSSI, A.R. (1988). Delocalized bonding at the metal-polymer interface. *IBM Journal of research Development*. **32**: 658-668
- IHS, A. and LIEBERG, B. (1991). Chemisorption of L-cysteine and 3-mercaptopropionic acid on gold and copper surfaces: an infrared reflection-adsorption study. *Journal of Colloid and Interface Science*. **144**: 282-292
- IUCCI, G., POLZONETTI, G., ALTAMURA, P., PAOLUCCI, G., GOLDONI, A., D'AMATO, R. and RUSSO, M.V. (1999). Reactivity of the nitro-group of a pi-conjugated polymer upon the interface formation with chromium: a photoelectron spectroscopy investigation. *Applied Surface Science*. **153**: 10-18
- JORDAN, J.L., SANDA, P.N., MORAR, J.F., KOVAC, C.A., HIMPSEL, F.J. and POLLAK, R.A. (1986). Synchrotron-radiation excited carbon 1s photoemission study of Cr/organic polymer interfaces. *Journal of Vacuum Science Technology A*. **4**: 1046-1048
- JUODKASIZ, K., JUODKAZYTE, J., JASULAITIENE, V., LUKINSKAS, A. and SEEBKA, B. (2000). XPS studies on gold oxide surface layer formation. *Electrochemistry Communications*. **2**: 503-507

- KARLSSON, C.A.-C., WAHLGREN, M.C. and TRÄGARDH, A.C.** (1996). Beta-lactoglobulin fouling and its removal upon rinsing and by SDS as influenced by surface characteristics, temperature and adsorption time. *Journal of Food Engineering*. **30**: 43-60
- KARLSSON, C.A.-C., WAHLGREN, M.C., OLSSON, C.-O.A. and TRÄGARDH, A.C.** (1999). Detergent-induced removal of  $\beta$ -lactoglobulin from stainless steel surfaces as influenced by surface pretreatment. *Journal of Colloid and Interface Science*. **220**: 471-473
- KIDOAKI, S. and MATSUDA, T.** (2002). Mechanistic aspects of protein/material interactions probed by atomistic force microscopy. *Colloid and Surfaces B: Biointerfaces*. **23**: 153-163
- KROZER, A. and RODAHL, M.** (1997). X-ray photoelectron spectroscopy study of UV/ozone oxidation of Au under ultrahigh vacuum conditions. *Journal of Vacuum Science Technology A*. **15**: 1704-1709
- LACHKAR, A., SELMANI, A., SACHER, E., LECLERC, M. and MOKHLISS, R.** (1994). Metallization of polythiophenes. I. Interaction of vapor-deposited Cu, Ag and Au with poly(3-hexylthiophene). *Synthetic Metals*. **66**: 209-215
- LACHKAR, A., SELMANI, A. and SACHER, E.** (1995). Metallization of polythiophenes II. Interaction of vapor-deposited Cr, V and Ti with poly(3-hexylthiophene) (P3HT). *Synthetic Metals*. **72**: 73-80
- LANGEL, W. and MENKEN, L.** (2003). Simulation of the interface between titanium oxide and amino acids in solution by first principles MD. *Surface Science*. **538**: 1-9
- LEBUGLE, A., SUBIRADE, M. and GUEGUEN, J.** (1995). Structural characteristics of a globular protein investigated by X-ray photoelectron spectroscopy: comparaison between a legumin film and a powdered legumin. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1248**: 107-114
- LEBUGLE, A., SUBIRADE, M. and GUEGUEN, J.** (1995). Structural characteristics of a globular protein investigated by XPS: comparison between legumin film and a powdered legumin. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1248**: 107-114
- LHOEST, J.-B., DETRAIT, E., VAN DEN BOSCH DE AGUILAR, P. and BERTRAND, P.** (1998). Fibronectin adsorption, conformation, and orientation on polystyrene substrates studied by radiolabeling, XPS and ToF-SIMS. *Journal of Biomedical and Materials Research*. **41**: 95-103
- LIEDBERG, B., LUNDSTRÖM, I., WU, C.R. and SALANECK, W.R.** (1985). Adsorption of glycine on hydrophilic gold. *Journal of Colloid and Interface Science*. **108**:
- MARCUS, P. and GALTAYRIES, A.** (2003). XPS et surfaces métalliques: surfaces d'alliages, oxydation, corrosion et traitements de surface. *Le Vide*. **308**: 230-255
- MILOSEV, I. and STREHLOW, H.H.** (2003). The composition of the surface passive film formed on CoCrMo alloy in simulated physiological solution. *Electrochimica Acta*. **48**: 2767-2774
- MURRAY, B.S. and DESHAIRES, C.** (2000). Monitoring protein fouling of metal surface via a quartz crystal microbalance. *Journal of Colloid and Interface Science*. **227**: 32-41
- NGUYEN, T.P. and DEVOS, S.A.** (1996). Interfacial effects in poly(p-phenylene-vinylene)-metal systems. *Vacuum*. **47**: 1153-1158
- NORDE, W.** (1995). Adsorption of proteins at solid-liquid interfaces. *Cells and Materials*. **5**: 97-112
- PETORAL, R.M. and UVDAL, K.** (2002). Arg-Cys and Arg-cysteamine adsorbed on gold and the G-protein-adsorbate interaction. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. **25**: 335-346
- PRADIER, C.M., COSTA, D., RUBIO, C., COMPÈRE, C. and MARCUS, P.** (2002). Role of salts on BSA adsorption on stainless steel in aqueous solutions. I. FT-IRRAS and XSP characterization. *Surface and Interface Analysis*. **34**: 50-54

- ROBERTS, J.T. and FRIEND, C.M.** (1988). Spectroscopic identification of surface phenyl thiolate and benzyne on Mo(110). *Journal of Chemical Physics*. **88**: 7172-7180
- ROUXHET, P.G., MOZES, N., DENGIS, P.B., DUFRÊNE, Y.F., GERIN, P.A. and GENET, M.J.** (1994). Application of X-ray photoelectron spectroscopy to microorganisms. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. **2**:
- RUBIO, C., COSTA, D., BELLON-FONTAINE, M.N., RELKIN, P., PRADIER, C.M. and MARCUS, P.** (2002). Characterization of bovine serum albumin adsorption on chromium and AISI 304 stainless steel, consequences for the *Pseudomonas fragi* K1 adhesion. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. **24**: 193-205
- SCHMIDT, M. and STEINEMANN, S.G.** (1991). XPS studies of amino acids adsorbed on titanium dioxide surfaces. *Fresenius' Journal Of Analytical Chemistry*. **341**: 412-415
- SCHNYDER, B., KÖTZ, R., ALLIATA, D. and FACCI, P.** (2002). Comparaison of the self chemisorption of azurin on gold and on functionalized oxide surfaces. *Surface and Interface Analysis*. **34**: 40-44
- SHI, M.K., LAMONTAGNE, B., SELMANI, A. and MARTINU, L.** (1994). X-ray photoelectron spectroscopy study of X-ray irradiated metal-fluoropolymer interfaces. *Journal of Vacuum Science Technology A*. **12**: 44-50
- TERASHIMA, H. and TUSUJI, T.** (2002). Adsorption of bovine serum albumin onto mica surfaces studied by direct weighing technique. *Colloid and Surfaces B: Biointerfaces*. **27**: 115-122
- THORNTON, J.A. and LAMB, J.L.** (1984). Substrate heating rates for planar and cylindrical-post magnetron sputtering sources. *Thin Solid Films*. **119**: 87-95
- TIDWELL, C.D., CASTNER, D.G., GOLLEDGE, S.L., RATNER, B.D., MEYER, K., HAGENHOFF, B. and BENNINGHOVEN, A.** (2001). Static ToF-SIMS and XPS characterization of adsorbed albumin and fibronectin films. *Surface and Interface Analysis*. **31**: 724-733
- UVDAL, K., BODÖ, P., IHS, A., LIEBERG, B. and SALANECK, W.R.** (1990). X-ray photoelectron and infra-red spectroscopy of glycine adsorbed upon copper. *Journal of Colloid and Interface Science*. **140**: 207-216
- UVDAL, K., BODÖ, P. and LIEBERG, B.** (1992). L-cysteine adsorbed on gold and copper: an X-ray photoelectron spectroscopy study. *Journal of Colloid and Interface Science*. **149**: 162-173
- WAGNER, A.J., WOLFE, G.M. and FAIRBROTHER, D.H.** (2003). Reactivity of vapor-deposited metals atoms with nitrogen-containing polymers and organic surfaces studied by in situ XPS. *Applied Surface Science*. **219**: 317-328
- WAHLGREN, M.C. and ARNEBRANT, T.** (1991). Interaction of cetyltrimethylammonium bromide and sodium dodecyl sulfate with  $\beta$ -lactoglobulin and lysozyme at solid surface. *Journal of Colloid and Interface Science*. **142**: 503-511
- WAHLGREN, M.C. and ARNEBRANT, T.** (1992). The concentration dependence of adsorption from a mixture of  $\beta$ -lactoglobulin and sodium dodecyl sulfate onto methylated silica surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science*. **148**: 201-206
- XIA, N., MAY, C.J., MCARTHUR, S.L. and CASTNER, D.** (2002). ToF-SIMS analysis of conformational changes in adsorbed protein films. *Langmuir*. **18**: 4090-4097
- XIAO, S.J., TEXTOR, M., SPENCER, N.D., WIELAND, M., BKELLER, B. and SIGRIST, H.** (1997). Immobilization of cell-adhesive peptide Arg-Gly-Asp-Cys (RGDC) on titanium surfaces by covalent chemical attachment. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. **8**: 867-872

**XIE, Z.X., CHARLIER, J. and COUSTY, J.** (2000). Molecular structure of self-assembled pyrrolidone monolayers on the Au (111) surface: formation of hydrogen bond-stabilized hexamers. *Surface Science*. **448**: 201-211

**YOU, H.X. and LOWE, C.R.** (1996). AFM studied of protein adsorption. *Journal of Colloid and Interface Science*. **182**: 586-601



## CONCLUSION GENERALE

Au terme de ces trois années d'une collaboration étroite entre les Laboratoires ANIOS de Lille, l'Hôpital Neurologique de Lyon et l'Ecole Centrale de Lyon, nous sommes parvenus à proposer un procédé de nettoyage efficace à l'encontre du risque prion. Son efficacité a été établie *in vitro* vis-à-vis de salissures cérébrales lipidiques contenant de la protéine prion d'origine humaine et animale. Ce procédé consiste à employer successivement une formulation nettoyante puis une formulation nettoyante/pré-désinfectante au cours de l'étape du double nettoyage. L'efficacité de ce procédé devant être démontrée *in vivo*, la preuve finale de son efficacité ne sera établie qu'après les essais d'inoculation à l'animal.

Au cours de la validation *in vitro* de ce procédé, nous avons montré la pertinence du double nettoyage recommandé par la circulaire 138 du 14 mars 2001. Nous avons néanmoins mis en évidence la nécessité de privilégier, en première intention, l'utilisation de formulations dont l'activité est exclusivement détergente, la présence de principes actifs anti-microbiens minimisant l'efficacité globale du procédé. Ainsi, le procédé proposé permet de garantir successivement l'efficacité du nettoyage, vis-à-vis des ATNC en particulier, puis celle de la pré-désinfection à l'encontre des agents pathogènes conventionnels. La démarche expérimentale mise en œuvre pour parvenir à la validation de ce procédé s'est avérée particulièrement adaptée compte tenu de la complexité de la problématique et des contraintes liées à la manipulation des prions. En effet, évaluer l'efficacité du nettoyage (ou la performance des formulations) nécessite de définir à la fois le niveau de propreté attendu et la nature de la contamination à éliminer. Du niveau de propreté requis dépend la sensibilité de la technique mise en œuvre. Vis-à-vis du risque prion, le seuil de propreté attendu nécessite d'augmenter la sensibilité des méthodes d'évaluation puisque la dose minimale infectieuse n'est pas connue. Ainsi, les techniques proposées, la spectroscopie de photoélectrons (XPS) et le radiomarquage des protéines à l'iode 125, sont particulièrement adaptées. Elles présentent des sensibilités inférieures à la monocouche de protéines adsorbées et mettent en évidence la présence de protéines résiduelles directement sur la surface. L'XPS permet également d'établir la compatibilité chimique entre les formulations détergentes et le matériau ainsi que la rinçabilité des produits chimiques entrant dans la composition des formulations. Les principaux inconvénients de l'XPS sont palliés par la méthode isotopique qui est à la fois quantitative et spécifique des protéines. Ces techniques sont de ce fait complémentaires. Leur mise en œuvre nous a initialement permis de hiérarchiser les formulations en fonction de leur capacité à éliminer les protéines adsorbées. Ultérieurement, leur utilisation conjointe a largement participé à la compréhension des interactions existant entre les protéines, les surfaces et les molécules entrant dans la composition des formulations que sont les enzymes et les principes actifs anti-microbiens. Nous avons effectivement montré que les enzymes sont des composants particulièrement actifs dans la définition d'une formulation performante. Elles participent à l'élimination des salissures qui leur sont spécifiques et agissent non seulement dans la solution de nettoyage mais également à la surface des matériaux. Associée à de bonnes performances détergentes, il est probable que l'activité surfacique des enzymes permettrait de réduire significativement l'infectiosité de la protéine prion. Les effets négatifs des principes actifs anti-microbiens et en particulier du PHMB sur l'activité détergente ont également été mis en évidence. Nos travaux montrent que ces effets sont la conséquence d'un antagonisme entre les mécanismes de la détergence et de la désinfection. Bien que la technique XPS et la méthode isotopique permettent d'évaluer les performances des formulations et l'efficacité du nettoyage, elles ne peuvent être spécifiquement appliquées au risque prion. Nous avons donc développé une méthode de détection indirecte de la protéine prion (PrP) sur fils d'acier inoxydable afin d'évaluer *in vitro* l'efficacité des procédés de nettoyage et de désinfection vis-à-vis de la PrP adsorbée. Cette méthode nous a permis d'abaisser les limites de détection de la protéine prion

résiduelle, comparativement aux méthodes *in vitro* proposées jusqu'à présent. Sa mise en œuvre nous a également permis d'étudier le comportement respectif des souches de prion dans la phase de nettoyage et de montrer que la nature de la salissure contenant la protéine prion conditionne l'efficacité du procédé. En effet, les procédés performants vis-à-vis d'une salissure complexe s'avèrent partiellement inefficaces sur une salissure de nature protéique, modélisant par conséquent le pire des scénarios. Ce facteur est particulièrement important et doit être pris en considération dans l'élaboration des critères d'efficacité des procédés.

Pour expliquer la résistance accrue des protéines aux procédés de nettoyage, nous avons émis l'hypothèse d'une adsorption chimique des protéines sur les surfaces métalliques. Dans ce contexte, nous proposons une approche à la fois originale et pertinente permettant d'accéder aux interfaces formées entre les protéines et les surfaces métalliques qui consiste à construire l'interface par métallisation des protéines. Les déplacements chimiques dans l'environnement électronique des éléments constitutifs des protéines, mis en évidence par XPS, sont en faveur de la formation de liaisons chimiques entre le métal et les protéines, corroborant ainsi leur chimisorption. Les sites réactifs de la protéine impliqués dans ces interactions physico-chimiques avec les surfaces métalliques sont principalement l'azote et le soufre.

La pulvérisation cathodique magnétron mise en œuvre dans le cadre de l'étude de l'interface protéines/métal étant particulièrement énergétique, il serait intéressant de confirmer nos résultats en procédant à la métallisation des protéines par évaporation. Cette dernière technique étant peu énergétique, elle s'avère être une alternative particulièrement intéressante.

Les perspectives de ce travail concernent également la validation *in vivo*, par inoculation à l'animal, du procédé de nettoyage et de désinfection mis au point. Ces essais nous permettront de comparer la sensibilité de notre méthode *in vitro* aux sensibilités offertes par les essais *in vivo*. Compte tenu de l'incidence de la nature de la salissure sur l'efficacité des procédés, ces essais nous permettront également de savoir quelle salissure, protéique ou complexe, est la plus représentative de l'efficacité des procédés.

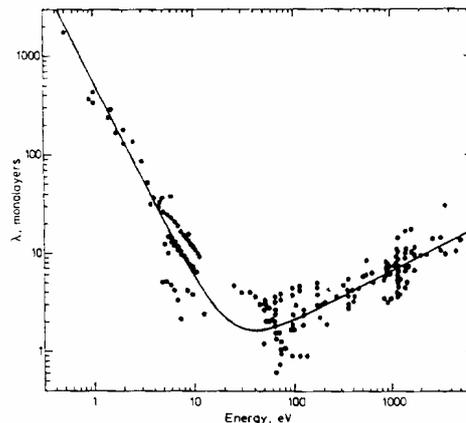
## **ANNEXES**



**ANNEXE 1\*****LA SPECTROSCOPIE DE PHOTOELECTRONS****XPS****I. PRINCIPE**

Beaucoup de techniques d'analyse reposent sur le principe des interactions entre les particules et la matière. Ainsi, des particules (photons, électrons, ions, neutrons, etc.) sont envoyées sur l'objet à analyser et interagissent avec celui-ci. Cela conduit à des transferts d'énergie ou à la formation de nouvelles particules qui vont être caractéristiques de l'objet cible et vont permettre de l'analyser. La détection consiste en règle générale à mesurer l'énergie des particules ou les pertes d'énergie. Il s'agit d'une spectroscopie si l'intensité du phénomène est étudiée en fonction de l'énergie des particules. La nature des particules incidentes et celle des particules détectées vont conditionner les caractéristiques de la technique d'analyse. Il est souvent possible d'effectuer différents types d'analyses à partir du même appareillage.

Dans cette étude, nous avons utilisé la spectroscopie de photoélectrons (XPS). Cette technique consiste à mesurer l'énergie cinétique d'électrons émis par un atome excité : le photoélectron. Les énergies des niveaux électroniques étant discrètes, l'énergie cinétique de ces électrons est caractéristique de l'atome irradié. Cette technique permet donc l'analyse chimique élémentaire. Comme le libre parcours moyen dans la matière des électrons émis par les atomes est très petit (inférieur à environ 4 nm) et que 95% du signal provient d'une zone de profondeur équivalente à trois fois le libre parcours moyen, cette technique n'est sensible qu'aux 10 premiers nanomètres des échantillons ; il s'agit donc d'une technique d'analyse de surfaces. La figure A1-1 montre l'évolution du libre parcours moyen des électrons en fonction de leur énergie.



**Figure A1-1 : Evolution du libre parcours moyen avec l'énergie cinétique des photoélectrons**

Dans la pratique l'analyse spectroscopique consiste à réaliser un spectre, c'est à dire, à enregistrer l'intensité du phénomène (le nombre d'électrons émis par les atomes de la surface) en fonction de l'énergie. Il y a donc, sur ces spectres, un certain nombre de pics qui sont liés à la structure

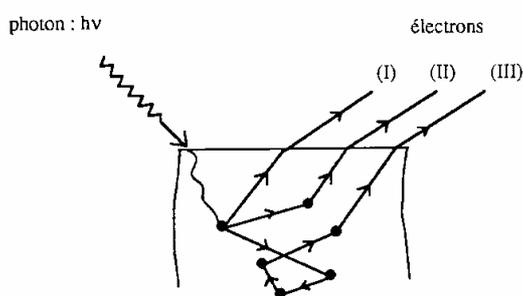
\* D'après BOEHM Matthieu (1998) Approche physico-chimique de l'action des additifs de lubrification lors du laminage à froid. Ph D Ecole Centrale de Lyon.

électronique des atomes (effet Auger ou photoémission). De ce fait, l'identification de ces pics au travers de leur position en énergie permet d'accéder à la composition élémentaire de l'échantillon.

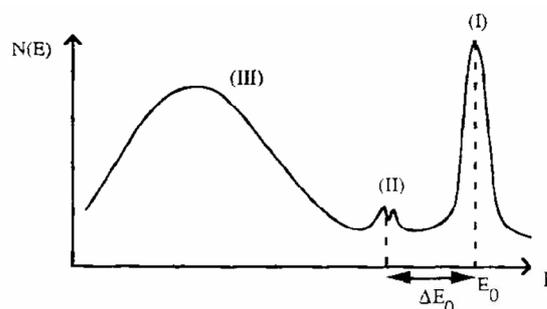
## II. CARACTERISTIQUES DE L'XPS

### II.1. Généralités

L'absorption du rayonnement X conduit à la photoionisation de l'atome, c'est-à-dire à l'extraction d'un électron des couches profondes. Le système se trouve alors dans un état excité. Plusieurs processus de désexcitation sont possibles: la fluorescence X et l'effet Auger. Sous l'action du faisceau incident, l'électron est excité vers un état d'énergie  $E_0$ . S'il arrive à la surface sans subir de chocs inélastiques, il conserve son énergie  $E_0$  qui correspond au pic principal de photoémission (I). L'électron peut subir un choc inélastique et perdre une quantité d'énergie  $\Delta E_0$  (II) ou subir plusieurs chocs et devenir un électron secondaire (III).



**Figure A1-2 : Photoémission des électrons**



**Figure A1-3 : Distribution des photoélectrons**

Après absorption d'un photon d'énergie  $h\nu$ , la conservation de l'énergie et la mesure de l'énergie cinétique des électrons émis ( $E_C$ ), permettent d'accéder à l'énergie de liaison  $E_B$ , caractéristique de l'atome émetteur. Les spectres sont présentés en fonction de  $E_B$ .

$$h\nu = E_C + E_B + \phi_A$$

$E_C$  : énergie cinétique de l'électron émis dans le vide.  
 $E_B$  : énergie de liaison de l'électron émis (*binding energy*).  
 $\phi_A$  : travail de sortie de l'analyseur.

**Equation A1-1 : Conservation de l'énergie lors de la photoémission d'un électron.**

### II.2. Quantitatif

Cette technique permet d'avoir accès à l'état de valence de l'atome qui traduit son environnement chimique. La bonne modélisation du phénomène de photoémission permet l'analyse quantitative. Cette méthode permet donc une analyse quantitative élémentaire et chimique. L'intensité du pic photoélectrique d'un élément pour une couche d'épaisseur  $z$  et homogène en composition est fonction de sa concentration:

$$I = n\sigma\Phi T \int_0^z \exp\left(-\frac{x}{\lambda \sin(\theta)}\right) dx$$

soit

$$I = n\sigma\Phi T \lambda \sin(\theta) \left[ 1 - \exp\left(-\frac{z}{\lambda \sin(\theta)}\right) \right]$$

n : nombre d'atomes par unité de volume.

$\sigma$  : section efficace de photoionisation.

$\Phi$  : flux total de photons incidents.

$\lambda$  : libre parcours moyen des électrons.

Z : profondeur analysée.

$\theta$  : angle d'émission des photoélectrons par rapport à la surface.

T : fonction de transmission du spectromètre.

**Equation A1-2 : Intensité du pic photoélectrique d'un élément pour une couche d'épaisseur z et homogène en composition.**

D'après l'équation A1-2, pour une profondeur infinie, le signal total intégré est :  $I = \lambda\sigma n\Phi T$ . L'intensité relative de deux pics photoélectriques différents d'un même échantillon est

$$\alpha = \frac{I_i}{I_j} = \frac{\lambda_i n_i \sigma_i T_i}{\lambda_j n_j \sigma_j T_j}$$

deux éléments s'écrit simplement:  $\frac{n_1}{n_2} = \frac{f_1}{f_2} \frac{I_1}{I_2}$ .

Cette approche peut être considérée comme une méthode semi-quantitative. Lorsque nous comparons les surfaces d'échantillons de composition chimique similaire, il est possible d'espérer une erreur inférieure à 5 %. La spectroscopie XPS peut alors devenir une méthode quantitative.

### II.3. Sources

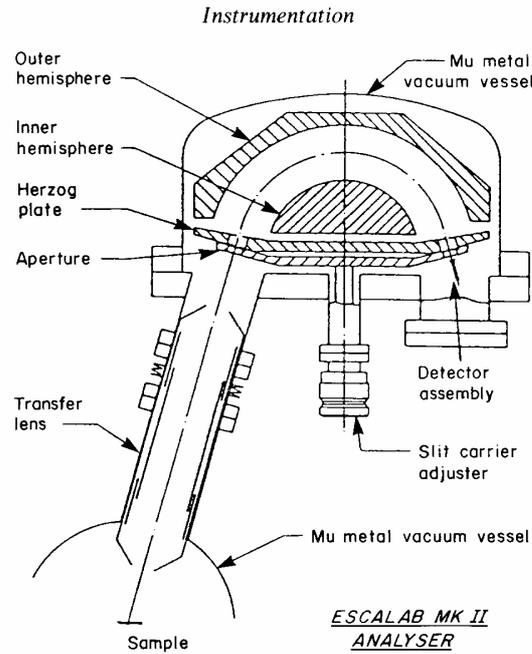
Il s'agit d'un tube à rayons X composé d'une cathode en tungstène (filament) et d'une anode comportant deux faces de matériaux différents délivrant des spectres de photons qui permettent l'accès à une gamme étendue d'énergies de liaison. Chaque spectre de photon comporte une raie principale utilisée pour la photoionisation. Le tableau A2-1 résume les énergies des raies principales disponibles avec notre anode.

**Tableau A1-1 : Source de rayons X disponibles**

Matériau	Raie	énergie (eV)
Mg	K $_{\alpha}$	1253.6
Al	K $_{\alpha}$	1486.6

### II.4. Détection

Les spectromètres ou analyseurs sont généralement des appareils électrostatiques de type dispersif. Nous avons utilisé un analyseur de type hémisphérique: le spectromètre VG 220I (figure A1-4). Le vide dans la chambre d'analyse est de l'ordre de  $10^{-7}$  à  $10^{-8}$  Pa.



**Figure A1-4 : Analyseur hémisphérique**

Un système de lentilles permet de focaliser les photoélectrons. Une tension retardatrice permet de les ralentir. Ils sont ensuite sélectionnés en énergie par un spectromètre hémisphérique. C'est la variation de la tension retardatrice qui permet de balayer la gamme d'énergie étudiée, le spectromètre ne voyant que les électrons d'énergie proche d'une valeur constante dite énergie de passage. Lorsqu'ils sont sélectionnés, les électrons sont réaccélérés pour être comptés sous forme de courant. L'énergie de passage va conditionner la sélectivité en énergie d'un spectre et le nombre de coups. Il y a donc un compromis à trouver entre la précision sur les spectres et le nombre de coups. En règle générale, pour l'analyse élémentaire nous utilisons une grande énergie de passage ce qui facilite la détection des éléments au détriment de la précision sur les pics. Par contre, pour l'analyse chimique, il est préférable d'utiliser une énergie de passage beaucoup plus faible pour essayer de séparer les différentes composantes.

## ANNEXE 2

# MARQUAGE DES PROTEINES PAR L'IODE 125

### I. PRINCIPE

La protéine est marquée à l'iode 125 par la méthode à la Chloramine T puis purifiée par chromatographie sur colonne de Sephadex G50f.

### II. REACTIFS

- Iodure de NaI 125 IMS30 (Amersham)
- Protéines HSA (Sérum Albumine Humaine) et HFN (Fibrinogène Humain)
- Dihydrogénophosphate de potassium  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- Chloramine T
- Pyrosulfite de sodium  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$
- Iodure de potassium KI
- NaOH 5M
- Azoture de sodium  $\text{NaN}_3$
- Hydrogénophosphate de sodium  $\text{Na}_2\text{HPO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$
- Colonne de Séphadex G50f (Pharmacia) H = 20 cm,  $\varnothing = 1$  cm

### III. MATERIELS

- Tubes plastiques 5 et 10 ml avec bouchons
- Pipettes graduées de 5 ou 10 ml
- Pipettes de 2, 10, 20, 50 et 200  $\mu\text{l}$
- Pompe péristaltique
- Chronomètre
- pHmètre
- Bechers
- Activimètre
- Compteur gamma (WALLAC 1261 Multigamma counter)

### IV. PREPARATION DES TAMPONS ET SOLUTIONS

Tampon phosphate 0,25M :

34 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  par litre d'eau permutée de qualité MilliQ  
Ajusté le pH à 7,4 avec NaOH 5M

Tampon phosphate 0,05M :

6,8 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  par litre d'eau permutée de qualité MilliQ  
Ajusté le pH à 7,4 avec NaOH 5M

Tampon phosphate/BSA :

- 1,3 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- 7,2 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
- 5 g de BSA (sérum albumine bovine)
- 1 g de  $\text{NaN}_3$
- Qsp 1 litre d'eau permutée

Solution de Chloramine T (CAT) à 2 mg/ml en tampon phosphate 0,05M

Solution de pyrosulfite (MBS) à 3 mg/ml en tampon phosphate 0,05M

Solution de KI à 10 mg/ml en tampon phosphate 0,05M

Préparation des la colonne Séphadex :

Equilibrer la colonne avec 50 ml de tampon phosphate/BSA avec un débit de 1ml/min. Eliminer ensuite l'excès de tampon à la surface du gel après avoir arrêter la pompe. Le gel est prêt.

**V. MARQUAGE DES PROTEINES**

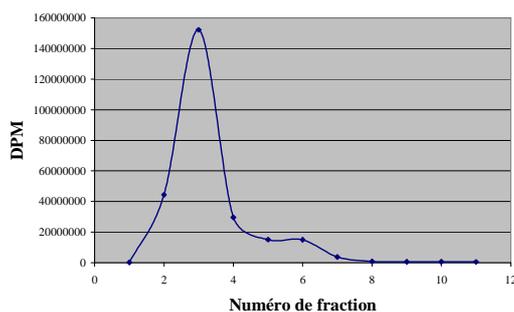
Dans un tube de 5 ml, ajouter rapidement :

- 5  $\mu\text{l}$  de  $\text{NaI}^{125}\text{IMS30}$  (# 100  $\mu\text{Ci}$  pour HSA et 90  $\mu\text{Ci}$  pour HFN)
- 10  $\mu\text{l}$  de tampon phosphate 0,25M
- 2  $\mu\text{g}$  d'HSA ou 10  $\mu\text{g}$  d'HFN
- 10  $\mu\text{l}$  de CAT

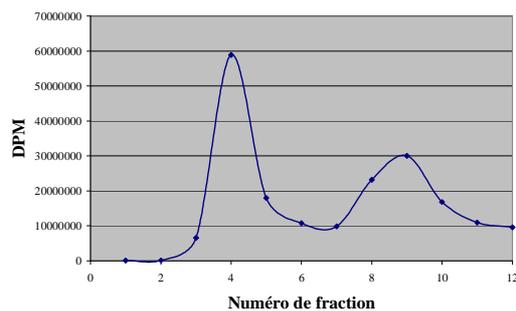
Agiter pendant 20 secondes

- 50  $\mu\text{l}$  de MBS
- 10  $\mu\text{l}$  de KI
- 1 ml de tampon phosphate/BSA

Déposer délicatement le contenu du tube à la surface du gel de Séphadex. Faire pénétrer la solution dans le gel en évitant de le laisser sécher. Eluer en tampon phosphate/BSA à 1 ml/min. Recueillir les fractions toutes les minutes dans des tubes de 5 ml bouchés. Compter l'activité du tube de marquage et des fractions d'élution sur un Bioscan QC 2000. Pooler les 3 premières fractions contenant le plus d'activité.



**Figure A2-55 :** Séparation par perméation sur gel de l'HSA- $^{125}\text{I}$  des iodures



**Figure A2-56 :** Séparation par perméation sur gel de l'HFN- $^{125}\text{I}$  des iodures

## **ANNEXE 3**

# **LE WESTERN BLOT**

Le Western blot est une technique de protéomique utilisée pour détecter spécifiquement une protéine dans un échantillon à l'aide d'un anticorps qui lui est spécifique. Cette technique se déroule en trois étapes : l'électrophorèse, le transfert sur membrane et l'immunorévélation.

### **I. ELECTROPHORESE**

La première étape du Western blot est l'électrophorèse sur gel. L'électrophorèse est la migration de particules chargées placées sous l'influence d'un champ électrique au travers d'un gel, généralement de polyacrylamide. Lorsque les particules chargées sont des protéines, et qu'elles sont séparées en fonction de leur poids moléculaire, l'électrophorèse est réalisée en conditions dénaturantes, en présence de Sodium Dodécyl Sulfate (SDS). Cette électrophorèse est plus connue sous le nom de SDS-PAGE : SDS-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis.

Le système utilisé pour le Western blot comprend deux modes successifs de migration électrophorétique, une isotachophorèse (les protéines sont soumises à un gradient de champ électrique) dans un gel dit de concentration, puis une électrophorèse de zone monophasique (les protéines sont soumises à un champ électrique uniforme) dans un gel de séparation. Le passage de l'une à l'autre se fait avec un changement de pH et par une augmentation de concentration en acrylamide du gel. L'objectif du gel d'électrophorèse en deux parties est de limiter les problèmes liés aux faibles quantités de protéines contenues parfois dans des volumes non négligeables déposés dans les puits. On réalise donc une étape de concentration des échantillons jusqu'à l'obtention de zones protéiques très fines dans le gel de concentration (isotachophorèse), qui migreront dans le gel de séparation (électrophorèse de zone). Le gel possède plusieurs puits de sorte qu'il soit possible d'analyser plusieurs échantillons simultanément.

Les protéines, dénaturées par le SDS, sont très fortement chargées négativement. Les charges négatives du SDS masquent totalement les charges propres des protéines. La charge de l'ensemble molécule dénaturée/SDS (et donc sa vitesse de migration) ne dépend alors que de la longueur de la chaîne protéique. Le gel réticulé de polyacrylamide permet alors de ralentir la migration électrophorétique des grosses protéines, laissant migrer les petites molécules plus rapidement. Les protéines vont donc être séparées en fonction de leur poids moléculaire.

### **II. TRANSFERT SUR MEMBRANE**

Une fois l'électrophorèse terminée, les protéines contenues dans le gel sont alors transférées sur une membrane de nitrocellulose ou de PVDF, par pression (transfert passif) ou par application d'un courant (transfert actif). Ce processus est nécessaire pour permettre une détection des protéines par les anticorps qui leur sont spécifiques. La membrane retient les protéines par des interactions non spécifiques de nature hydrophobe et électrostatique.

Le principe du transfert est le même que l'électrophorèse de zone. Les protéines dénaturées par le SDS sont chargées négativement et donc, sous l'influence d'un champ électrique, elles vont migrer de l'anode vers la cathode. Notons que pour le transfert, les électrodes sont de part et d'autre du gel et non pas dans le plan du gel comme pour l'électrophorèse.

Le tampon utilisé pour le transfert contient du méthanol. Celui-ci va permettre d'éliminer le SDS des protéines et favoriser la liaison des protéines à la membrane.

### **III. L'IMMUNOMARQUAGE**

Avant de procéder à l'immunomarquage, tous les sites de fixation potentiels non utilisés de la membrane doivent être bloqués.

#### **III.1. Blocage ou saturation**

Cette opération est importante car elle assure la spécificité de la technique. Sans blocage, les anticorps appliqués lors de l'étape suivante s'adsorbent de façon non spécifique sur la membrane. La saturation est effectuée en trempant la membrane dans une solution d'agent bloquant souvent constituée de protéines inertes telles que le sérum albumine bovine, la gélatine ou la caséine. Des solutions de lait écrémé peuvent également être utilisées.

#### **III.2. Immunomarquage**

Le principe est simple. Il nécessite l'utilisation d'un anticorps spécifique dirigé contre la protéine à détecter (l'antigène). La membrane est donc incubée en présence d'une solution de cet anticorps, qui va reconnaître et se fixer spécifiquement sur la protéine. L'excès d'anticorps non fixé est ensuite éliminé et la membrane est soigneusement rincée. Cet anticorps pourrait être couplé à un marqueur pour être directement détecté. Il s'agirait d'une méthode directe d'immunorévélation. Cependant, les techniques d'immunomarquages ont souvent recours à la méthode indirecte, nécessitant un second anticorps appelé anticorps secondaire. Celui-ci est généralement sélectionné en fonction de sa capacité à reconnaître une classe spécifique d'immunoglobuline (souvent les IgG) de l'espèce animale dont est issu le premier anticorps. Par exemple, si l'anticorps primaire est une IgG de souris, l'anticorps secondaire pourrait être une IgG de cheval anti-IgG de souris.

Afin de pouvoir visualiser la formation des complexes antigène-anticorps, l'anticorps secondaire est couplé de manière covalente à une enzyme, telle que la peroxydase et c'est l'activité de l'enzyme, en présence de son substrat, qui sera détectée.

### **IV. MODE OPERATOIRE**

#### **IV.1. Préparation des gels**

Le gel de polyacrylamide est formé par la polymérisation du monomère d'acrylamide et de son comonomère le bisacrylamide. Il est constitué d'un gel de concentration à 4% et d'un gel de séparation à 16%. Le tableau A2-1 présente la composition pour deux gels de 1,5 mm d'épaisseur.

**Tableau A3-10 : Préparation des gels pour l'électrophorèse en condition dénaturante.**

Réactifs	Gel de Séparation 16%	Gel de concentration 4%
Solution d'Acryl/Bisacryl	6 ml	0,5 ml
1,5 M Tris/HCl pH 8,8	3,75 ml	/
0,5 M Tris/HCl pH 6,8	/	1,25 ml
H <sub>2</sub> OΔ	5 ml	3,15 ml
SDS 10%	150 µl	50 µl
Persulfate d'ammonium 10%	100 µl	25 µl
TEMED	10 µl	5 µl
Volume final	15 ml	5 ml

Le gel de séparation à 16% est coulé en entre deux plaques sur une hauteur de 6 cm. Il est ensuite recouvert d'alcool iso-butylque pour niveler la surface et empêcher le contact avec l'O<sub>2</sub> qui inhibe la polymérisation. Après polymérisation (20 à 30 minutes), l'alcool isobutylique est éliminé et la surface du gel est rincée à l'eau distillée. Le gel de concentration à 4% est coulé et un peigne est immédiatement introduit pour la formation des puits de dépôts. La polymérisation du gel est obtenue en 15 minutes. Le peigne est enlevé et les puits sont rincés avec le tampon de migration Tris Glycine SDS (Biorad).

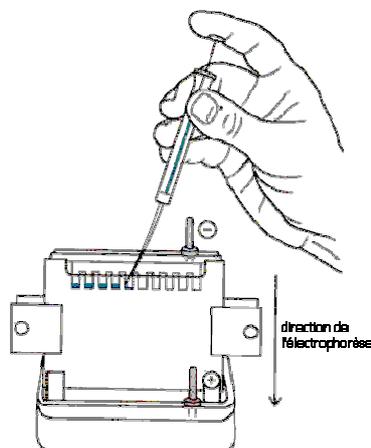
## IV.2. Préparations des échantillons

Les échantillons à séparer doivent être préparé dans une solution de dénaturation :

SDS 4% .....	2g
Glycine 192 mM .....	0,72g
Saccharose 5% .....	2,5g
Tris-HCl 25 Mm.....	0,2 g
H <sub>2</sub> O UP .....	30 ml
BBP .....	qq grains
Mercaptoéthanol 2% .....	1ml
H <sub>2</sub> O UPqsp.....	30 ml

## IV.3. Migration

Un volume prédéfini des échantillons à analyser est déposé dans chaque puit du gel. Les échantillons sont alors soumis à l'influence d'un champ électrique.

**Figure A3-2 : Dépôt des échantillons pour l'électrophorèse.**

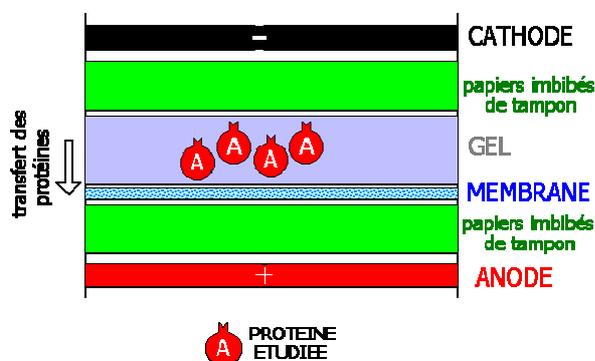
Les conditions de migration sont les suivantes :

**Tableau A3-11 : Conditions de migration électrophorétique.**

Etape	Voltage	Intensité	Puissance	Durée
Concentration	90 V	100 mA	30 W	0h10
Migration	200 V	100 mA	30 W	1h30

#### IV.4. Transfert sur membrane de PVDF

Les membranes de PVDF hydrophobes sont hydratées successivement par de l'éthanol 95° et de l'eau ultra pure jusqu'à ce qu'elles deviennent parfaitement hydrophiles. Elles sont conservées dans le tampon de transfert (Tris Glycine à 20% de méthanol). Sont également immergés dans ce tampon, les papiers filtres servant d'intercalaires entre les électrodes, le gel et la membrane, comme illustré sur la figure A2-2.

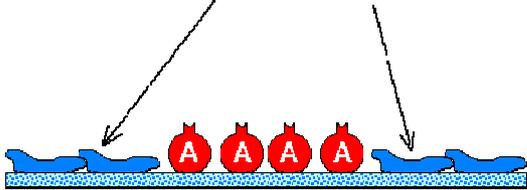
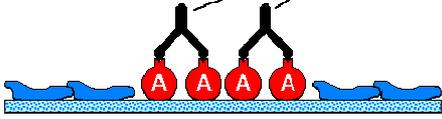
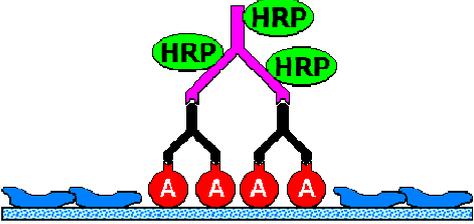
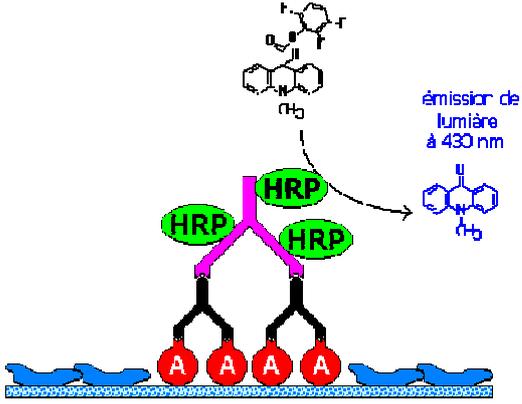


**Figure A3-357 : Schéma du montage pour le transfert des protéines du gel vers la membrane de PVDF.**

Les conditions de transfert sont les suivantes : 20 V 300 mA 30 min

### IV.5. Immunodétection

Les différentes étapes décrites dans le paragraphe III.2 sont illustrées pour l'immunodétection par l'Ac 3F4.

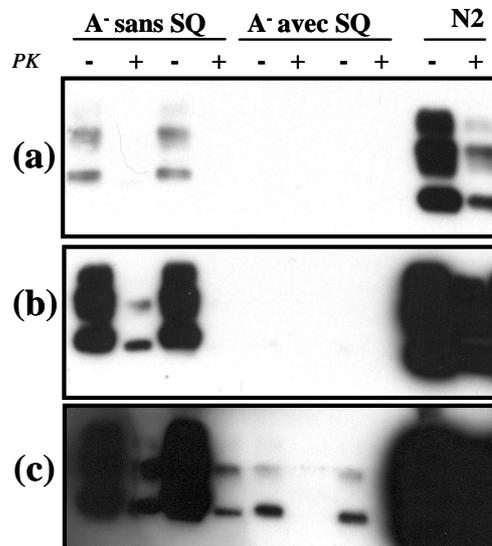
<p><b>Blocage</b></p> <p>PBS lait écrémé 5% 1h</p>	<p>LA MEMBRANE EST BLOQUEE AVEC DES PROTEINES "INERTES"</p> 
<p><b>Anticorps Primaire</b></p> <p>Ac 3F4 1/10 000° en PBS Tween 0,1% 1h</p>	<p>ANTICORPS LIES A L'ANTIGENE</p> 
<p><b>Rinçage</b></p>	<p>PBS Tween 0,1%</p>
<p><b>Anticorps Secondaire</b></p> <p>Ac Anti-IgG de souris-HRP 1/20 000° en PBS Tween 0,1% 30 min</p>	<p>ANTICORPS SECONDAIRE LIES A L'ANTICORPS PRIMAIRE</p> 
<p><b>Rinçage</b></p>	<p>PBS Tween 0,1% PBS</p>
<p><b>Chimiluminescence</b></p> <p>SuperSignal (Pierce) ECL Plus (Amersham)</p> <p>Temps d'exposition fonction de l'intensité du signal (de 30 sec à une heure)</p>	
<p><b>Développement</b></p>	<p>Film photo Kodak Révélateur / Rinçage / Fixateur 45 sec / 30 sec / 45 sec</p>



**ANNEXE 4****LES BIAIS INTRODUICTS PAR LA  
METHODOLOGIE****INHIBITION ENZYMATIQUE ET PRECIPITATION DES PROTEINES**

Cette annexe fait suite au chapitre 3 pour présenter les biais méthodologiques rencontrés dans le cadre de l'optimisation de l'activité enzymatique de la formulation Aniosyme N2.

Les tensioactifs non ioniques et amphotères de l'Aniosyme N2 ont été substitué par un tensioactif anionique (A<sup>-</sup>) : le lauryléthersulfate à 3 moles d'oxyde d'éthylène. L'HC est traité par la formulation « A<sup>-</sup> » avec ou sans séquestrant (SQ). L'activité enzymatique est inhibée par la chaleur et la protéine prion est précipitée par l'acide phosphotungstique. Les résultats sont présentés sur la figure A3-1 pour des temps d'exposition croissants en chimiluminescence. Chaque essai est réalisé en duplicats.



**Figure A4-1** : Western blot de la PrP traitée par l'Aniosyme N2 et sa variante anionique (A<sup>-</sup>) avec ou sans séquestrant (SQ). L'activité enzymatique est inhibée par la chaleur et la PrP est précipitée par l'acide phosphotungstique. N2 : Aniosyme N2 ; PK : protéinase K. (a) révélation Dura 2 min ; (b) révélation SuperSignal Dura 16 min et (c) révélation SuperSignal Femto 12 min.

En présence du tensioactif anionique, on observe une importante diminution du signal, comparativement à la formulation de référence Aniosyme N2 (N2). Cette diminution du signal est encore plus significative en présence de séquestrant.

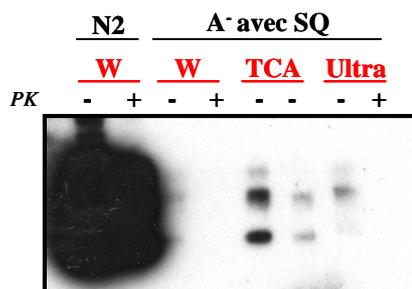
Comment expliquer de tels résultats ? Etant donné la tendance des tensioactifs anioniques à dénaturer les protéines avec lesquelles ils interagissent, il semble peu évident que ce tensioactif puisse optimiser l'activité de la protéase au point qu'elle puisse dégrader la quasi-totalité de la PrPsc en 15 minutes. Il est donc nécessaire de s'assurer que ces résultats ne sont pas la conséquence d'artéfacts méthodologiques.

## I. INCIDENCE DES TECHNIQUES DE PRÉCIPITATION OU DE CONCENTRATION DE LA PROTÉINE PRION

Nous avons souhaité vérifier la fiabilité de la technique de précipitation de la protéine prion par l'acide phosphotungstique. En effet, il n'est pas exclu que cette technique puisse être incompatible avec la présence du tensioactif anionique. Ainsi, après inhibition de l'activité enzymatique par la chaleur, nous avons mis en œuvre deux nouvelles techniques permettant de précipiter ou de concentrer les protéines. Il s'agit de la technique de précipitation des protéines totales par l'acide trichloracétique (TCA) et de la technique de concentration de la protéine prion par ultracentrifugation (Ultra). En parallèle, la technique de précipitation par l'acide phosphotungstique (W) est réalisée sur la formulation de référence et pour la formulation « A<sup>-</sup> avec SQ ». Ces deux essais contrôles permettent :

- de comparer les techniques de précipitation et de concentration de la PrP vis-à-vis de la formulation « A<sup>-</sup> » ;
- de confirmer l'efficacité de cette formulation comparativement à l'Aniosyme N2.

Les résultats sont présentés sur la figure A3-2.



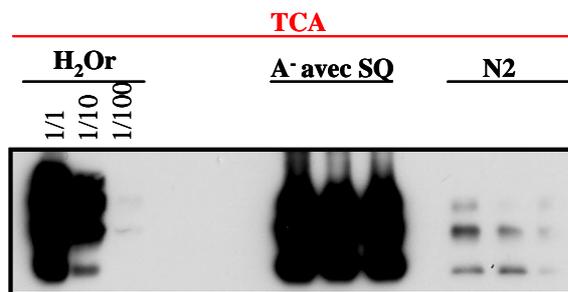
**Figure A4-2 : Comparaison des techniques de précipitation et de concentration de la PrP à partir de la formulation anionique en présence de séquestrant « A<sup>-</sup> avec SQ ». W : précipitation par l'acide phosphotungstique ; TCA : précipitation par l'acide trichloracétique ; Ultra : technique de concentration par ultracentrifugation ; PK : protéinase K. La formulation de référence est l'Aniosyme N2 (N2).**

NB : Après la précipitation au TCA, le traitement à la protéinase K ne peut être réalisé en raison de l'acidité du pH.

Les résultats obtenus par la précipitation à l'acide phosphotungstique (W) sur la formulation de référence et sur la formulation « A<sup>-</sup> avec SQ » confirment les précédents résultats. La présence du tensioactif anionique modifie considérablement l'efficacité de la formulation sur l'inactivation de la protéine prion. Si l'on compare à présent, les trois techniques de précipitation et concentration mises en œuvre, la précipitation au TCA et l'ultracentrifugation (Ultra) permettent de confirmer les résultats obtenus par la technique de précipitation à l'acide phosphotungstique. Ces résultats vont donc à l'encontre d'une incompatibilité entre la technique de précipitation à l'acide phosphotungstique et le tensioactif anionique.

## II. INCIDENCE DU MODE D'INHIBITION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE

Le second facteur qu'il convient de vérifier avant de conclure à une réelle incidence du tensioactif anionique sur l'inactivation de la protéine prion est le mode d'inhibition de l'activité enzymatique. Jusqu'à présent, les enzymes étaient inhibées par la chaleur. L'activité enzymatique étant particulièrement sensible au pH, nous aurons recours aux pH acides. La précipitation des protéines à l'acide trichloracétique est particulièrement intéressante dans ce contexte. En effet, la solution de trichloracétique est une solution acide de pH 2 qui va donc simultanément inhiber l'activité enzymatique et précipiter les protéines. Cette technique de précipitation est donc à nouveau mise en œuvre sur la formulation de référence Aniosyme N2 et sur la formulation « A<sup>-</sup> avec SQ », sans que celles-ci soient préalablement chauffées. L'essai contrôle consiste à précipiter les protéines à partir de l'eau du réseau (H<sub>2</sub>Or). Les résultats obtenus sont présentés sur la figure A3-3.



**Figure A4-3:** Précipitation des protéines par l'acide trichloracétique (TCA) à partir de la formulation Aniosyme N2 (N2) et de la formulation « A<sup>-</sup> avec SQ ».

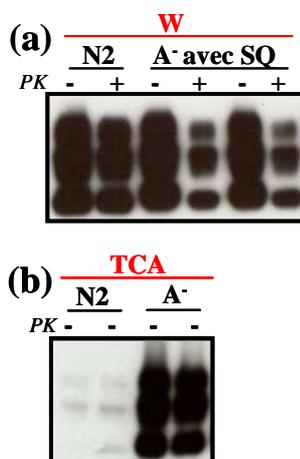
NB : Après la précipitation au TCA, le traitement à la protéinase K ne peut être réalisé en raison de l'acidité du pH.

Lorsque la protéine prion est précipitée par l'acide trichloracétique à partir de la formulation « A<sup>-</sup> avec SQ », celle-ci est clairement mise en évidence, contrairement aux résultats obtenus jusqu'à présent. En effet, bien qu'il s'agisse essentiellement de PrPres, l'intensité du signal détectée pour la formulation « A<sup>-</sup> avec SQ », n'est pas significativement différente de celle observée pour l'eau du réseau avant dilution (1/1). En revanche, dans le cas de la formulation Aniosyme N2 (N2), l'intensité du signal est nettement diminuée. Cette diminution du signal est pratiquement de 2 log comparativement à la gamme de dilution réalisée sur l'eau du réseau.

Associés aux données précédemment obtenues par la précipitation au TCA après chauffage des formulations, ces résultats montrent que l'inhibition des enzymes par la chaleur introduit un risque de faux résultats positifs concernant l'inactivation de la protéine prion en présence du tensioactif anionique (le laurylthérsulfate). Dans ce contexte, l'acidité du pH semble plus appropriée pour l'inhibition enzymatique. Cependant, si la précipitation au TCA est particulièrement adaptée dans le cas de la formulation anionique, il n'en est pas ainsi vis-à-vis de la formulation Aniosyme N2.

Compte tenu que la précipitation au TCA permet à la fois d'inhiber l'activité enzymatique et de précipiter les protéines, il convient de déterminer laquelle de ces deux fonctions est source de faux résultats positifs vis-à-vis de l'Aniosyme N2. Pour répondre à cette question, nous avons donc conservé le mode d'inhibition par l'acidité du pH et modifié la technique de précipitation des protéines. Nous avons donc eu recours à la précipitation des protéines par l'acide phosphotungstique, les enzymes ayant préalablement été inhibées par l'addition d'acide chlorhydrique 1M, jusqu'à l'obtention d'un pH 3. Les résultats obtenus par cette méthode pour les formulations Aniosyme N2 et « A<sup>-</sup> avec SQ » sont présentés

sur la figure A3-4(a) et sont comparés aux essais contrôles précipités par l'acide trichloracétique et présentés sur la figure A3-4(b).

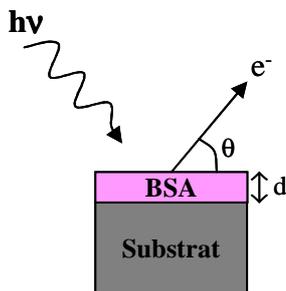


**Figure A4-4** : Comparaison des techniques de précipitation des protéines associées à l'inhibition des enzymes par l'acidité du pH. (a) Précipitation par l'Acide phosphotungstique (**W**), (b) Précipitation par l'acide trichloracétique (**TCA**).

La comparaison des résultats obtenus pour la formulation Aniosyme N2 par la précipitation à l'acide phosphotungstique (figure A3-4(a-N2)) et par l'acide trichloracétique (figure A3-4 (b-N2)) suggèrent que la fonction de précipitation de l'acide trichloracétique est responsable des faux résultats positifs obtenus. Dans les deux cas, l'activité enzymatique est inhibée par l'acidité du pH.

Les résultats obtenus pour la formulation « A<sup>-</sup> avec SQ » par ces deux techniques de précipitation ne sont pas de différents. Ceux-ci suggèrent que l'inhibition enzymatique par l'acidité du pH, en présence de tensioactif anionique, n'introduit pas de biais dans la méthodologie et ce quelle que soit la technique de précipitation mise en œuvre.

Les résultats présentés ont mis en évidence les problèmes méthodologiques rencontrés. Il est extrêmement compliqué de s'intéresser à la triade prion-enzymes-tensioactifs. Etudier l'activité enzymatique vis-à-vis de la protéine prion en présence de tensioactifs constitue un véritable challenge. En effet, en présence du tensioactif anionique (le lauryléthersulfate), l'inhibition de l'activité enzymatique par la chaleur introduit des risques de faux résultats positifs quelle soit la technique de précipitation ou de concentration utilisée. En présence des tensioactifs de l'Aniosyme N2, c'est la technique de précipitation par l'acide trichloracétique qui génère de tels risques et ce indépendamment du mode d'inhibition de l'activité enzymatique. Au regard de ces données, l'inhibition de l'activité enzymatique par l'acidité du pH associée à la technique de précipitation par l'acide phosphotungstique offre donc les meilleurs compromis méthodologique.

**ANNEXE 5****CALCULS DES EPAISSEURS EQUIVALENTES****III. EPAISSEUR DE LA COUCHE DE BSA : INTERFACE PROTEINE/METAL**

Si l'on admet que la couche de BSA déposée est homogène, nous pouvons évaluer son épaisseur. En effet, la variation d'intensité des pics du substrat est due à l'atténuation du signal par la couche de protéine déposée et son épaisseur peut être estimée par la relation suivante :

$$I_s = I_{s\infty} \times e^{\left(\frac{-d}{\lambda \sin \theta}\right)}$$

Avec :

$I_{s\infty}$  et  $I_s$  : l'intensité des pics du substrat avant et après évaporation de la BSA ;

$d$  : l'épaisseur de la couche (en nm)

$\lambda$  : le libre parcours moyen de l'électron du substrat émis à travers la couche de protéine (en nm) ;

$\theta$  : angle de détection des photoélectrons.

Pour  $\theta = 90^\circ$  :

$$d = -\lambda \ln \frac{I_s}{I_{s\infty}}$$

Le libre parcours moyen  $\lambda$ , généralement considéré comme étant égale à la racine carré de l'énergie cinétique ( $E_c$ ) du photoélectrons émis, peut être calculé plus précisément selon la formule de Seah [Seah et Dench 1979] appliquée aux polymères organiques :

$$\lambda_d = \frac{49}{E_c^2} + 0,11\sqrt{E_c}$$

$$\lambda_d = 10^{-3} \rho \lambda_n$$

Avec :

$\lambda_d$  : le libre parcours moyen exprimé en  $\text{mg}/\text{m}^2$  ;

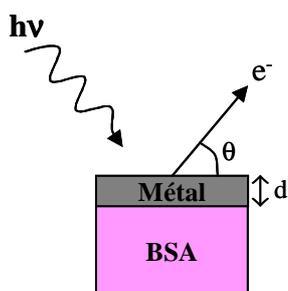
$E_c$  : l'énergie cinétique des photoélectrons émis ;

$\lambda_n$  : le libre parcours moyen exprimé en nm

$\rho$  : la densité volumique exprimée en  $\text{kg}/\text{m}^3$ .

Ainsi, les libres parcours moyens des photoélectrons du chrome et de l'or dans la couche de protéine sont estimés respectivement à 2,4 nm et 2,9 nm [Liedberg, *et al.* 1985] pour  $\rho = 1400 \text{ kg/m}^3$  [Lhoest, *et al.* 1998].

#### IV. ÉPAISSEUR DE LA COUCHE METALLIQUE : INTERFACE METAL/PROTEINE



Les épaisseurs des couches métalliques sont évaluées suivant la variation d'intensité du pic N1s due à l'atténuation du signal par la couche de métal déposée selon la relation présentée précédemment. Nous faisons l'hypothèse que la couche de métal déposée est homogène.

Le libre parcours moyen des photoélectrons N1s est calculé selon la formule de Seah [Seah et Dench 1979] qui tient compte de la nature du matériau traversé par les photoélectrons (tableau A4-1).

**Tableau A5-1 : Equations qui relient le libre parcours moyen à l'énergie cinétique des électrons et à la nature du matériau traversé, selon Seah**

Pour les éléments simples	$\lambda_m = \frac{538}{E_c^2} + 0,41\sqrt{aE_c}$
Pour les composés inorganiques	$\lambda_m = \frac{2170}{E_c^2} + 0,7\sqrt{aE_c}$

Avec :  $\lambda_m$  : le libre parcours moyen exprimé en monocouche;  
 $E_c$  : l'énergie cinétique des photoélectrons émis ;  
 $a$  : l'épaisseur d'une monocouche exprimée en nm par :

$$a^3 = \frac{A}{\rho n N} \times 10^{27}$$

$A$  : la masse atomique ou moléculaire du matériau déposé ;  
 $\rho$  : la densité volumique exprimée en  $\text{kg/m}^3$  ;  
 $n$  : le nombre d'atome par molécule  
 $N$  : le nombre d'Avogadro.

Le libre parcours moyen peut être exprimé en nm ( $\lambda_n$ ) selon la relation :

$$\lambda_n = a \lambda_m$$

Le libre parcours moyen des photoélectrons de N1s dans les différentes couches métalliques traversées a donc été estimé par ces formules. Leurs valeurs sont regroupées dans le tableau A4-2.

**Tableau A5-212 : Libre parcours moyen des photoélectrons de N1s dans les couches métalliques de chrome, d'oxyde de chrome et d'or.**

	<b>CrMet</b>	<b>CrOx</b>	<b>Au</b>
<b><math>\lambda_{N1s}</math> (nm)</b>	1,48	2,34	1,76

## V. REFERENCES

**LHOEST, J.-B., DETRAIT, E., VAN DEN BOSCH DE AGUILAR, P. and BERTRAND, P.** (1998). Fibronectin adsorption, conformation, and orientation on polystyrene substrates studied by radiolabeling, XPS and ToF-SIMS. *Journal of Biomedical and Materials Research*. **41**: 95-103

**LIEDBERG, B., LUNDSTRÖM, I., WU, C.R. and SALANECK, W.R.** (1985). Adsorption of glycine on hydrophilic gold. *Journal of Colloid and Interface Science*. **108**:

**SEAH, M.P. and DENCH, W.A.** (1979). Quantitative electron spectroscopy of surfaces: a standard data base for electron inelastic mean free path in solids. *Surface and Interface Analysis*. **1**: 2-10



**ECOLE CENTRALE DE LYON**  
**DIRECTION DE LA RECHERCHE**

*liste des personnes Habilitées à Diriger des Recherches en poste à l'Ecole Centrale de Lyon*

Nom-Prénom	Corps grade	Laboratoire ou à défaut département ECL	Etablissement
AURIOL Philippe	professeur	CEGELY	ECL
BEROUAL Abderrahmane	professeur	CEGELY	ECL
JAFFREZIC-RENAULT Nicole	directeur de recherche	CEGELY	CNRS/ECL
KRÄHENBÜHL Laurent	directeur de recherche	CEGELY	CNRS/ECL
MARTELET Claude	professeur	CEGELY	ECL
NICOLAS Alain	professeur	CEGELY	ECL
NICOLAS Laurent	directeur de recherche	CEGELY	CNRS/ECL
SIMONET Pascal	chargé de recherche	CEGELY	CNRS/ECL
THOMAS Gérard	professeur	CEGELY	ECL
VOLLAIRE Christian	maître de conférences	CEGELY	ECL

**Nbre Cégely 10**

HELLOUIN Yves	maître de conférences	DER EEA	ECL
LE HELLEY Michel	professeur	DER EEA	ECL

**Nbre DER EEA 2**

GUIRALDENQ Pierre	professeur émérite	DER STMS	ECL
VINCENT Léo	professeur	DER STMS	ECL

**Nbre DER STMS 2**

LOHEAC Jean-Pierre	maître de conférences	ICJ	ECL
MAITRE Jean-François	professeur émérite	ICJ	ECL
MARION Martine	professeur	ICJ	ECL
MOUSSAOUI Mohand	professeur	ICJ	ECL
MUSY François	maître de conférences	ICJ	ECL
ROUY MIRONESCU Elisabeth	professeur	ICJ	ECL
ZINE Abdel-Malek	maître de conférences	ICJ	ECL

**Nbre ICJ 7**

DAVID Bertrand	professeur	ICTT	ECL
----------------	------------	------	-----

**Nbre ICTT 1**

CLOAREC Jean-Pierre	maître de conférences	LEOM	ECL
GAFFIOT Frédéric	professeur	LEOM	ECL
GAGNAIRE Alain	maître de conférences	LEOM	ECL
GARRIGUES Michel	directeur de recherche	LEOM	CNRS/ECL
GENDRY Michel	directeur de recherche	LEOM	CNRS/ECL
GRENET Geneviève	directeur de recherche	LEOM	CNRS/ECL
HOLLINGER Guy	directeur de recherche	LEOM	CNRS/ECL
JOSEPH Jacques	professeur	LEOM	ECL
KRAWCZYK Stanislas	directeur de recherche	LEOM	CNRS/ECL
MARTIN Jean-René	professeur émérite	LEOM	ECL
O'CONNOR Ian	maître de conférences	LEOM	ECL

PHANER-GOUTORBE Magali	professeur	LEOM	ECL
ROBACH Yves	professeur	LEOM	ECL
SOUTEYRAND Eliane	directeur de recherche	LEOM	CNRS/ECL
TARDY Jacques	directeur de recherche	LEOM	CNRS/ECL
VIKTOROVITCH Pierre	directeur de recherche	LEOM	CNRS/ECL

**Nbre LEOM 16**

CHEN Liming	professeur	LIRIS	ECL
-------------	------------	-------	-----

**Nbre LIRIS 1**

BAILLY Christophe	professeur	LMFA	ECL
BERTOGLIO Jean-Pierre	directeur de recherche	LMFA	CNRS/ECL
BLANC-BENON Philippe	directeur de recherche	LMFA	CNRS/ECL
CAMBON Claude	directeur de recherche	LMFA	CNRS/ECL
CARRIERE Philippe	chargé de recherche	LMFA	CNRS/ECL
CHAMPOUSSIN J-Claude	professeur émérite	LMFA	ECL
COMTE-BELLOT geneviève	professeur émérite	LMFA	ECL
FERRAND Pascal	directeur de recherche	LMFA	CNRS/ECL
GALLAND Marie-Annick	maître de conférences	LMFA	ECL
GODEFERD Fabien	chargé de recherche	LMFA	CNRS/ECL
HENRY Daniel	directeur de recherche	LMFA	CNRS/ECL
JEANDEL Denis	professeur	LMFA	ECL
JUVE Daniel	professeur	LMFA	ECL
LE RIBAUT Catherine	chargée de recherche	LMFA	CNRS/ECL
LEBOEUF Francis	professeur	LMFA	ECL
PERKINS Richard	professeur	LMFA	ECL
ROGER Michel	professeur	LMFA	ECL
SCOTT Julian	professeur	LMFA	ECL
SIMOENS Serge	chargé de recherche	LMFA	CNRS/ECL
TREBINJAC Isabelle	maître de conférences	LMFA	ECL

**Nbre LMFA 20**

BENAYOUN Stéphane	professeur	LTDS	ECL
CAMBOU Bernard	professeur	LTDS	ECL
COQUILLET Bernard	maître de conférences	LTDS	ECL
DANESCU Alexandre	maître de conférences	LTDS	ECL
FOUVRY Siegfried	chargé de recherche	LTDS	CNRS/ECL
GEORGES Jean-Marie	professeur émérite	LTDS	ECL
GUERRET Chrystelle	chargé de recherche	LTDS	CNRS/ECL
HERTZ Dominique	past	LTDS	ECL
ICHCHOU Mohamed	maître de conférences	LTDS	ECL
JEZEQUEL Louis	professeur	LTDS	ECL
JUVE Denyse	ingénieur de recherche	LTDS	ECL
KAPSA Philippe	directeur de recherche	LTDS	CNRS/ECL
LE BOT Alain	chargé de recherche	LTDS	CNRS/ECL
LOUBET Jean-Luc	directeur de recherche	LTDS	CNRS/ECL
MARTIN Jean-Michel	professeur	LTDS	ECL
MATHIA Thomas	directeur de recherche	LTDS	CNRS/ECL
MAZUYER Denis	professeur	LTDS	ECL
PERRET-LIAUDET Joël	maître de conférences	LTDS	ECL
SALVIA Michelle	maître de conférences	LTDS	ECL
SIDOROFF François	professeur	LTDS	ECL
STREMSDOERFER Guy	professeur	LTDS	ECL
THOUVEREZ Fabrice	professeur	LTDS	ECL
TREHEUX Daniel	professeur	LTDS	ECL
VANNES André-Bernard	professeur émérite	LTDS	ECL

**Nbre LTDS 24**

Total HdR ECL

91

## AUTORISATION DE SOUTENANCE

Vu les dispositions de l'arrêté du 25 avril 2002,

Vu la demande du Directeur de Thèse

Monsieur J-M. MARTIN

et les rapports de

Monsieur P. ROUXHET  
Professeur - Université Catholique de Louvain - Unité de Chimie des Interfaces - Croix du Sud 2/18 -  
1348 Louvain-la-Neuve - Belgique

et de

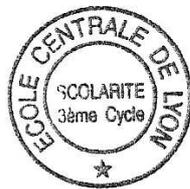
Monsieur J-C. DARBORD  
Professeur - Etablissement Pharmaceutique de l'AP-HP - 7, rue du Fer à Moulin - 75005 PARIS

**Mademoiselle RICHARD Marlène**

est autorisé à soutenir une thèse pour l'obtention du grade de **DOCTEUR**

**Ecole doctorale MATERIAUX**

Fait à Ecully, le 29 juin 2006



P/Le Directeur de l'E.C.L.  
Le Directeur des Etudes

A handwritten signature in black ink, appearing to be "J. JOSEPH".

J. JOSEPH