

2m11.2917.4

Université de Montréal

Nouvelles approches pour la stérilisation des prions par des procédés oxydants, testées  
sur la protéine Sup35, de la levure *Saccharomyces cerevisiae*

Par

Karine Julien

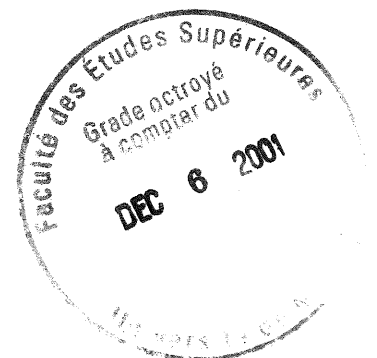
Programme de Sciences Biomédicales

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures  
en vue de l'obtention du grade de  
Maître ès Sciences (M.Sc.)  
en Sciences Biomédicales

Janvier, 2001

©Karine Julien, 2001



W  
H  
1158  
2001  
N. 198

**Université de Montréal  
Faculté des études supérieures**

**Ce mémoire intitulé :**

**Nouvelles approches pour la stérilisation des prions par des procédés oxydatifs,  
testées sur la protéine SUP35, de la levure *Saccharomyces cerevisiae***

**présenté par :**

**Karine Julien**

**a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :**

<b>Président-rapporteur :</b>	<b>Jean Barbeau</b>
<b>Directeur de recherche :</b>	<b>L'Hocine Yahia</b>
<b>Codirecteur :</b>	<b>Pierre Belhumeur</b>
<b>Codirecteur :</b>	<b>Richard Marchand</b>
<b>Membre du jury :</b>	<b>Sylvie Dufresne</b>

**Mémoire accepté le : .....**

*À mes parents que j'adore,  
et qui embellissent ma vie par leur amour*

## Sommaire

Les prions sont responsables du développement de maladies neurodégénératives, communément appelées encéphalopathies spongiformes transmissibles (EST). Un des plus grands défis est la stérilisation des instruments médicaux contaminés par les prions, puisqu'il s'avère que ces derniers sont résistants aux procédés de stérilisation couramment utilisés en milieu hospitalier, tel que la stérilisation par autoclave à 121°C, ou encore à l'oxyde d'éthylène 88%. Donc, afin d'éviter la propagation d'une contamination iatrogène, ayant déjà été observée et mentionnée auparavant dans la littérature, il est devenu primordial de valider l'utilisation de nouvelles techniques de stérilisation pour la dégradation des prions. Une des pistes possibles pour la dégradation des prions est l'utilisation de procédés oxydants, comme l'ozone ou le plasma, qui permettraient également la conservation de l'intégrité des biomatériaux qui entrent dans la fabrication des instruments médicaux d'aujourd'hui. En effet, les prions étant des protéines de conformation anormale, ils deviennent dès lors une cible de choix, car ils contiennent des acides aminés reconnus pour leur sensibilité à l'oxydation. Ces procédés stérilisants qui se déroulent à basse température minimisent, par conséquent, la déformation possible des instruments thermosensibles.

Donc, le but de ce mémoire est d'évaluer le potentiel de certains procédés stérilisants pour la dégradation des prions. Comme la manipulation des prions peut s'avérer dangereuse pour les techniciens, cette étude privilégie l'utilisation d'un modèle de prion, basé sur la protéine Sup35 de la levure *Saccharomyces cerevisiae*, qui possède des propriétés très similaires à celle des prions. Une fois cette protéine purifiée et caractérisée, il a été démontré qu'effectivement, l'autoclave à 121° et l'oxyde d'éthylène sont inefficaces pour la dégradation de Sup35. Cependant, le procédé de Sterrad, qui combine le peroxyde d'hydrogène et le gaz plasma comme agents stérilisants, peut efficacement dégrader la protéine, mais cela, dépendamment des tampons utilisés. Une résistance inusitée de la protéine à la stérilisation par Sterrad a été observée lorsque cette protéine était placée dans un tampon d'acide trifluoroacétique, indiquant une interaction possible du tampon avec les agents stérilisants. Même si l'efficacité du système a été observée avec les autres tampons

utilisés, des conditions particulières peuvent renforcer la résistance de la protéine à la stérilisation. Malgré tout, ceci ouvre une nouvelle voie, très prometteuse pour la destruction des prions. Cependant, il reste à valider ces procédés avec les prions eux-mêmes, pour renforcer ce modèle de prion de levure. Par contre, si ces techniques sont prouvées efficaces, elles favoriseraient la ré-utilisation des instruments précédemment considérés à usage unique, et des économies substantielles pourraient donc être réalisées dans le système de santé actuel.

Ce mémoire sera donc divisé en cinq chapitres distincts : premièrement, une revue de littérature des données actuelles concernant les techniques de stérilisation efficaces et inefficaces pour la dégradation des prions, suivie d'une brève description des prions, du modèle de levure utilisé pour les études effectuées, et de nouvelles techniques de stérilisation aujourd'hui disponibles. Le chapitre 2 contient l'article soumis pour fin de publication, contenant les divers résultats obtenus suite à l'exposition de la protéine Sup35 aux procédés de stérilisation tels que l'autoclave, l'oxyde d'éthylène et le Sterrad. Le chapitre 3, quant à lui, décrit les résultats encore non publiés sur la dégradation de la protéine Sup35 par l'ozone. Par la suite, le chapitre 4 soutient une discussion générale portant sur la justification du choix du modèle de Sup35p afin d'évaluer de nouveau procédés de stérilisation des prions. Il sera discuté également des résultats obtenus, principalement l'efficacité des principales techniques oxydantes pour la dégradation de la protéine Sup35, et des divers paramètres pouvant affecter l'efficacité de ces techniques. Finalement, le chapitre 5 conclut d'une façon globale sur les perspectives découlant de cette étude.

# TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE.....	II
TABLE DES SIGLES.....	VI
LISTE DES FIGURES .....	VIII
LISTE DES TABLEAUX .....	IX
CHAPITRE 1. REVUE DE LA LITTÉRATURE .....	1
1.1 STÉRILISATION DES INSTRUMENTS MÉDICAUX CONTAMINÉS PAR LES PRIONS .....	2
1.1.1 Destruction des prions par différentes techniques de stérilisation.....	2
1.1.2 Nécessité pour des protocoles plus adéquats pour la stérilisation des instruments contaminés par les prions .....	6
1.2 LES PRIONS.....	7
1.2.1 La protéine de prion.....	8
1.2.2 Caractérisation de la protéine de prion.....	10
1.2.3 Mécanismes de changement de conformation de la protéine de prion .....	14
1.2.4 Localisation de PrP <sup>C</sup> et corrélation avec les organes infectieux .....	15
1.2.5 Transmission des maladies prioniques .....	17
1.3 LA STÉRILISATION DES PRIONS .....	18
1.3.1 Procédés alkylants et autres .....	20
1.3.2 Procédés oxydants.....	21
1.3.2.1 Ozone.....	21
1.3.2.1.1 Sites d'action de l'ozone au niveau moléculaire.....	22
1.3.2.1.2 Mécanismes d'action de l'ozone .....	23
1.3.2.2 Le procédé de Sterrad® .....	25
1.3.2.2.1 Effets sur les cellules.....	26
1.4 UTILISATION DE MODÈLES POUR LA STÉRILISATION DES PRIONS .....	28
1.4.1 La protéine IFDO .....	29
1.4.2 La protéine Sup35.....	30
1.4.2.1 Structure de la protéine Sup35 (Sup35p).....	30
1.4.2.2 Propriétés de Sup35p.....	32
1.4.2.3 Homologie avec les prions.....	35
CHAPITRE 2. RÉSULTATS.....	38
ARTICLE 1. DEGRADATION OF PRION-LIKE PROTEINS BY OXIDATIVE STERILIZATION PROCESSES .....	39
CHAPITRE 3. RÉSULTATS ADDITIONNELS NON PUBLIÉS SUR L'OZONE .....	60
CHAPITRE 4. DISCUSSION GÉNÉRALE .....	63
4.1 CHOIX DU MODÈLE DE PRION SUP35 .....	63
4.2 JUSTIFICATION DES MÉTHODES UTILISÉES .....	63
4.3 DISCUSSION DES RÉSULTATS OBTENUS .....	66
4.4 AUTRES MODÈLES EXISTANTS DE PRIONS DE LEVURE.....	69
4.5 NÉCESSITÉ DE DÉVELOPPER DE NOUVEAUX INDICATEURS DE STÉRILISATION POUR LES PRIONS...70	
CHAPITRE 5. CONCLUSION.....	72
REMERCIEMENTS .....	74
BIBLIOGRAPHIE.....	75

**APPENDICE A .....96**  
ARTICLE 2. THE PROBLEMATIC OF PRIONS AND THE STERILIZATION OF MEDICAL DEVICES.....97



## Table des sigles

AmB	Amphotéricine B
BSE/ESB	Encéphalopathies spongiformes bovines
CD/DC	dichroïsme circulaire
CDJ/MCJ	maladie de Creutzfeld-Jakob
CNS/SNC	système nerveux central
CSF/FCS	fluide cérébro-spinal
DNA/ADN	acide déoxyribonucléique
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EEG	electroencéphalogramme
EF-1	elongation factor 1 (facteur d'élongation 1)
EtO	oxyde d'éthylène
fg	fentogramme
g	gramme
GPI	glycosylphosphatidylinositol
GTP	guanosine triphosphate
GuHCl	guanidinium hydrochloride
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peroxyde d'hydrogène
ID <sub>50</sub>	dose infectieuse causant la mort de 50% des organismes
IFDO	ileal fluid-dependent organism
IPTG	isopropyl- β-D-thiogalactopyranside
K <sub>d</sub>	constante de dissociation
kDa	kilo Dalton
LpH	désinfectant aqueux à base de phénol acide, contenant 12.6% d'acide glycolique, 3.0% d'amyphénol p-tertiaire, 6.1% de <i>o</i> -benzyl- <i>p</i> -chorophénol, 0.5% de #2-phenylphénol, < 5% hexylène glycol, et < 10% isopropapol (w/w)
μl	microlitre
mRNA/ARNm	acide ribonucléique messenger
NaOCl	hypochlorite de sodium

NaOH	hydroxyde de sodium
ng	nanogramme
nm	nanomètre
nM	nanomole
NMJ/JNM	jonction neuromusculaire
NvMCJ	nouvelle variante de la Maladie de Creutzfeld-Jakob
O <sub>3</sub>	ozone
PCR	polymerase chain reaction
PrP	protéine de prion
PrP <sup>C</sup>	protéine de prion (conformation normale)
PrP <sup>SC</sup>	protéine de prion (conformation anormale)
RNA/ARN	acide ribonucléique
ROS/ERO	Espèces réactives d'oxygène
PTA	pivaloyltrifluoroacetone
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis
Sup35p	protéine Sup25
TA	trifluoroacetic acid/acetonitrile
TE	Tris/EDTA
TEM/MET	microscopie électronique à transmission
TFA	trifluoroacetic acid
tRNA/ARNt	acide ribonucleique de transfert
TSE/EST	Encéphalopathies spongiformes transmissibles
UV	ultra-violet

## Liste des figures

<i>FIGURE 1. CONFORMATION NORMALE (A) ET ANORMALE (B) DE LA PROTÉINE PRP.....</i>	<b>9</b>
<i>FIGURE 2. FORMATION DE FILAMENTS DE TYPE AMYLOÏDE ET LEUR REGROUPEMENT.....</i>	<b>10</b>
<i>FIGURE 3. SÉQUENCE D'ACIDES AMINÉS DE LA PROTÉINE DE PRION.....</i>	<b>11</b>
<i>FIGURE 4. COURBES REPRÉSENTANT L'ELLIPTICITÉ MOLAIRES THÉORIQUES OBTENUES PAR DICHROÏSME CIRCULAIRE POUR CHACUN DES 3 TYPES DE STRUCTURES SECONDAIRES, I.E. HÉLICES, FEUILLETS ET COILS, PRÉSENTES DANS LES CHAÎNES POLYPEPTIDIQUES. ....</i>	<b>12</b>
<i>FIGURE 5. COLORATION AU ROUGE CONGO DE FILAMENTS DE TYPE AMYLOÏDE. (A) OBSERVÉ AU MICROSCOPE OPTIQUE; (B) OBSERVÉ EN LUMIÈRE POLARISÉE. ....</i>	<b>14</b>
<i>FIGURE 6. CYCLE DE STÉRILISATION DE STERRAD® 100.....</i>	<b>25</b>
<i>FIGURE 7. FILAMENTS DE SUP35 OBSERVÉS PAR MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE À TRANSMISSION. (TIRÉ DE KING ET AL., 1997). ....</i>	<b>31</b>
<i>FIGURE 8. FILAMENTS DE SUP35P COLORÉS AU ROUGE CONGO OBSERVÉS PAR (A) MICROSCOPIE OPTIQUE ET (B) MICROSCOPIE OPTIQUE POLARISÉE (TIRÉ DE KING ET AL., 1997). ....</i>	<b>33</b>
<i>FIGURE 9. RÉSISTANCE À LA DIGESTION PAR PROTÉINASE K SELON DIFFÉRENTES CONCENTRATIONS. ....</i>	<b>34</b>
<i>FIGURE 10. COLORATION AU BLEU DE COOMASSIE D'UN GEL DE SDS-PAGE.....</i>	<b>61</b>
<i>FIGURE 11. COLORATION AU NITRATE D'ARGENT D'UN GEL DE SDS-PAGE.....</i>	<b>61</b>
<i>FIGURE 12. MICROGRAPHIES ÉLECTRONIQUES SUITE À LA STÉRILISATION À L'OZONE.....</i>	<b>62</b>

## Liste des tableaux

<i>TABLEAU 1. POUVOIR INFECTIEUX ASSOCIÉ À CERTAINS TISSUS HUMAINS POUR LA CONTAMINATION IATROGÈNE DE LA MCJ. ....</i>	<b>16</b>
<i>TABLEAU 2. TECHNIQUES EFFICACES ET INEFFICACES POUR LA STÉRILISATION DES INSTRUMENTS MÉDICAUX CONTAMINÉS PAR LES PRIONS. ....</i>	<b>19</b>
<i>TABLEAU 3. SUSCEPTIBILITÉ DES MICROORGANISMES À L'IMMERSION DANS LE GLUTÉRALDEHYDE. ....</i>	<b>21</b>
<i>TABLEAU 4. RÉSULTATS DE STÉRILISATION DE CERTAINS MICROORGANISMES PAR STERRAD® 100. ....</i>	<b>26</b>
<i>TABLEAU 5. AVANTAGES ET DÉSAVANTAGES DE QUELQUES PROCÉDÉS DE STÉRILISATION AUJOURD'HUI DISPONIBLES. ....</i>	<b>28</b>

## Chapitre 1. Revue de la Littérature

Les prions sont la cause principale du développement d'Encéphalopathies Spongiformes Transmissibles (EST) chez les animaux et les humains. Parmi les maladies neurodégénératives les plus connues, mentionnons la maladie de Creutzfeld-Jakob (MCJ), qui cible les humains, et l'épidémie de la « vache folle », qui a affecté plus particulièrement les troupeaux de bovins en Grande-Bretagne à la fin des années 80. Cette épidémie a été provoquée par l'utilisation de produits alimentaires dérivés de moutons probablement contaminés par la tremblante (communément appelée scrapies). Un autre débat concernant cette contamination interspèce a été soulevé lorsqu'en 1996, 12 cas de la nouvelle variante de la maladie de Creutzfeld-Jakob (nvMCJ) ont été répertoriés. Cette contamination a pu être déclenchée suite à la consommation de produits bovins contaminés par les prions. Jusqu'à tout récemment, plusieurs pays avaient établi un blocus sur la viande bovine provenant d'Angleterre, démontrant l'ampleur et l'inquiétude que peut générer cette contamination.

Suite à cette épidémie, beaucoup s'inquiètent maintenant de l'utilisation de produits bovins, non seulement dans l'industrie alimentaire, mais également dans l'industrie pharmaceutique, où très souvent ces dérivés sont à la base de produits commerciaux. De plus, la possibilité que d'autres produits alimentaires animaliers puissent propager cette maladie n'est toujours pas exclue (Marsh *et al.*, 1991). Un des problèmes d'actualité concernant ces encéphalopathies spongiformes transmissibles est la difficulté à détruire des prions. En effet, les principes de stérilisation en milieu hospitalier tiennent compte de l'efficacité des stérilisateurs basée sur leur capacité de détruire les spores bactériennes, qui étaient auparavant considérées comme les organismes les plus difficiles à dégrader. Cependant, depuis l'avènement des prions, cette validation ne tient plus, puisque ces derniers ne sont pas complètement détruits par les stérilisateur communément utilisés en milieu hospitalier, tel l'autoclave ou l'oxyde d'éthylène, qui néanmoins fonctionnent pour les spores. Ceci remet en question la définition même de stérilisation; puisque le terme « stérilisation »

implique la mort ou l'enlèvement de tous les types d'agents pathogènes, avec une probabilité infime (1 en un million) qu'un organisme survive au procédé. De plus, cette surprenante résistance donne lieu à beaucoup d'inquiétude, puisqu'elle peut mener à une contamination iatrogène accidentelle, propageant ainsi des maladies prioniques à certains individus particulièrement susceptibles. Il devient donc important de valider de nouvelles techniques de stérilisation qui permettraient la dégradation complète des prions.

### **1.1 Stérilisation des instruments médicaux contaminés par les prions**

Les prions sont résistants à l'inactivation par des techniques qui normalement dégraderaient les acides nucléiques, comme par exemple une incubation avec 5mM  $Mg^{2+}$  ou 2mM  $Zn^{2+}$ ; une digestion par DNase 1, RNase A ou T, nucléase micrococcalle, les psoralènes, et l'hydroxyalmine, de même que les radiations ultraviolettes et ionisantes (Prusiner, 1991; Kawahara *et al.*, 1987). Ces résultats concordent avec l'hypothèse de la « protéine seule », puisque la plupart des virus exposés (bactériophage M14, TMV, potato virus X et le potato spindle tuber viroid) ont été inactivés par ces procédés.

Donc, un des défis majeurs associés aux prions est leur dégradation afin d'assurer la stérilité en milieu hospitalier des instruments médicaux contaminés par les prions, et même des produits pharmaceutiques couramment utilisés en recherche. Par exemple, Doillon *et al.* ont tenté de stériliser le collagène bovin pour usage ultérieur en tant qu'implants biomédicaux. Cependant, les auteurs mettent l'accent sur le fait qu'aucun test pratique n'est encore capable de détecter les prions dans les matériaux (Doillon *et al.*, 1997).

#### ***1.1.1 Destruction des prions par différentes techniques de stérilisation***

Quelques études de stérilisation effectuées par Brown *et al.* en 1982 montrent que l'hypochlorite de sodium à 5,25%, par exemple, pourrait réduire le pouvoir infectieux des tissus cérébraux infectés (titres infectieux variant entre  $10^{10-11}$ - $10^{10-14}$  LD<sub>50</sub>/g de tissus) de 4 log LD<sub>50</sub> (99.99%). Ceci est de loin supérieur aux autres traitements chimiques testés, comme le métapériodate de sodium, le dioxyde de

chlore, le Lysol, l'iode, le permanganate de potassium, la formaldéhyde et le peroxyde d'hydrogène, qui pouvaient à peine atteindre le  $2 \log LD_{50}$  d'inactivation (Brown *et al.*, 1982). Pour ce qui est de l'autoclave standard, pour une heure à  $121^{\circ}\text{C}$ , elle peut réduire le pouvoir infectieux de  $10^{10-11}$  à  $10^{2-6} LD_{50}/\text{g}$  de tissus cérébraux. Dans tous les cas, l'inactivation observée se produisait rapidement, i.e. en moins d'une heure d'exposition, atteignant éventuellement un plateau. Cependant, malgré ces traitements relativement rigoureux, il est possible de détecter quelques protéines résiduelles, indiquant une stérilisation inefficace et donc une possibilité de contamination iatrogène.

Deux ans plus tard, Rohwer a effectué une autre série d'expériences, en modifiant cette fois le paramètre de température dans l'autoclave standard (Rowher, 1984). De nouveau, à  $100^{\circ}\text{C}$ , près de 97% du pouvoir infectieux est détruit, comparativement à  $121^{\circ}\text{C}$ , où 99.9999% de la protéine est dégradée, et ce, en 2 minutes. Ces deux études indiquent une sensibilité indéniable de  $\text{PrP}^{\text{SC}}$  à ces techniques de stérilisation. Cependant, quelques sous-populations infectieuses demeurent, prouvant de nouveau l'inefficacité de ces techniques pour une destruction complète des instruments médicaux. Cette résistance accrue à la chaleur démontre une fois de plus l'invalidité du modèle conventionnel de virus, implicitement prouvant l'hypothèse de la « protéine seule ».

Jarvis (1985) a mis l'accent sur la difficulté de décontaminer des instruments médicaux et a recommandé certains protocoles pour ceux qui sont particulièrement à risques, par exemple, ceux exposés à des matières cérébrales, au FCS ou au sang. En effet, certains cas de contamination iatrogène ont été observés suite à des chirurgies impliquant le cerveau ou les yeux, et suite à l'administration d'hormones de croissance prélevées sur des cadavres de patients de la MCJ. Les protocoles recommandés incluaient l'autoclave pour une heure à  $121^{\circ}\text{F}$ , l'immersion de l'instrument dans de l'hydroxyde de sodium 1N ou de l'hypochlorite de sodium 0.5% pour une heure à température ambiante, ou encore une combinaison d'autoclave et de phosphate de sodium dans le cas des instruments grossièrement contaminés, pour assurer une désinfection adéquate. Jarvis a également suggéré le désassemblage de l'équipement en suivant les directives du fabricant afin d'augmenter le

potentiel de désinfection. Ces techniques sont très efficaces, mais peuvent grandement endommager les instruments médicaux à cause de leur pouvoir déformant sur les matériaux thermosensibles ou à leur effet corrosif sur les instruments métalliques. Dans les deux cas, ces techniques altèrent grandement les propriétés intrinsèques des instruments.

D'autres voies possibles de contamination iatrogène de la MCJ ont été déterminées en 1986. La contamination d'animaux de laboratoire a été observée suite à une inoculation intracérébrale, intrapéritonéale, intraveineuse et souscutanée, ces deux dernières ne constituant pas, cependant, un procédé efficace de transmission de la maladie (Rosenberg *et al.*, 1986). Donc, en plus des instruments neurochirurgicaux et oculaires, tous les instruments entrant en contact avec des tissus à risque, le sang ou l'urine doivent être traités avec le plus grand soin parce qu'ils peuvent contenir une dose détectable du pathogène. Les procédés de stérilisation recommandés étaient en accord avec ceux précédemment mentionnés, c'est-à-dire, l'autoclave à vapeur à 132°C pour une heure et l'immersion dans l'hydroxyde de sodium 1N pour une heure, démontrant également que l'autoclave à 121°C pourrait laisser des particules infectieuses résiduelles. Selon Rosenberg *et al.* (1986), la diminution du temps d'exposition ou de la concentration des agents chimiques diminuerait proportionnellement l'efficacité de la technique. L'ébullition, l'irradiation UV, l'oxyde d'éthylène, la formaline, l'acétone, les détergents de propiolactone- $\beta$  et les composés d'ammonium quaternaire seraient complètement inefficaces pour l'inactivation des prions. De plus, la température de stérilisation est cruciale, puisqu'il a été observé que l'autoclave à 126°C, même pour 2 heures, ne peut complètement détruire le pouvoir infectieux des prions (Taylor, 1987).

Il faut également prendre en considération le fait que tous les comités ne s'entendent pas sur les techniques recommandées pour la stérilisation. En effet, Taylor (1987) a observé qu'il y a des différences entre les standards établis par les différents pays. La Grande-Bretagne a basé ses standards sur l'autoclave de type « porous-load », alors que les États-Unis utilisent l'autoclave à déplacement par gravité, qui semble moins efficace. Par conséquent, les recommandations anglaises d'autoclaver à 134°C pour 18 minutes seraient tout aussi efficaces que le protocole



américain indiquant qu'une inactivation complète de l'agent est obtenue à 132°C pour une heure.

Récemment, de nouvelles technologies ont été testées pour leur habileté à dégrader la protéine de prion. Le Steris® 20 (Steris) est un nouveau stérilisateur à base d'acide peracétique comme agent de stérilisation principal. Des résultats intéressants ont été obtenus en utilisant cette technique. Toutefois, des résidus de protéines demeuraient, suite au cycle de stérilisation, impliquant de nouveau la possibilité d'une contamination iatrogène. De plus, la validation du procédé par la digestion à la protéinase K afin de démontrer la perte de potentiel infectieux n'est pas justifié, puisque le pouvoir infectieux de la protéine a récemment été dissocié de la résistance à la digestion à la protéinase K. Ceci implique que l'acquisition de la résistance aux protéases par PrP<sup>C</sup> n'est pas suffisante pour la génération du pouvoir infectieux (Hill *et al.*, 1999).

Malgré tous les progrès technologiques en stérilisation, les techniques qui demeurent efficaces n'ont pas beaucoup évolué : l'immersion dans l'hydroxyde de sodium 1N, ou dans l'eau de javel 12.5%, ou l'autoclave à vapeur à 134-138°C pendant 18 minutes sont encore les procédés recommandés pour la stérilisation des instruments médicaux utilisés dans les chirurgies à haut risque, par ailleurs, la chaleur sèche, même à des températures élevées (360°) pendant une heure, demeure inefficace (Darbord, 1999). Il existerait également une dose infectieuse minimale, en deçà de laquelle l'organisme est capable d'éliminer spontanément PrP<sup>SC</sup>. Au-dessus de cette dose minimale, PrP<sup>SC</sup> changerait la conformation de PrP<sup>C</sup> et causerait le déclenchement de la maladie (Laurent, 1996). Dans son modèle, Laurent a établi que la dose infectieuse (ID<sub>50</sub>) est de 10<sup>4</sup>-10<sup>5</sup> molécules de PrP, ou encore de 0.5-5.0 fg, ce qui est en dessous de la limite de détection de la plupart des tests couramment utilisés, comme les gels de SDS-PAGE (Hill, 1999; Prusiner, 1991).

Ces divergences doivent absolument être prises en considération dans le choix du protocole approprié pour la stérilisation des prions.

### ***1.1.2 Nécessité pour des protocoles plus adéquats pour la stérilisation des instruments contaminés par les prions***

Il faudrait tenir compte de la composition des instruments médicaux pour la sélection d'une technique de décontamination impliquant ceux possiblement contaminés avec des protéines de prion. Par exemple, le NaOH 1N n'est pas corrosif pour le fer et les aciers martensitiques, et pourrait être utilisé, par conséquent, pour les instruments métalliques, tandis que le NaOCl 2.5% serait préférable pour les instruments non-métalliques et thermosensibles, comme ceux en aluminium (Estebe, 1997). Un rinçage approprié précédant la stérilisation à l'autoclave, devrait être effectué (Galtier, 1994). De plus, il a été prouvé que les prions sont résistants à tous les autres détergents et désinfectants utilisés en milieu hospitalier, tout comme à l'irradiation  $\gamma$  (même jusqu'à 20 Mrads), les méthodes alkylantes comme l'oxyde d'éthylène 88%, le formaldéhyde 10% et le glutéraldéhyde 5%, ce qui limite présentement les options pour la stérilisation. De nouveau, le choix de l'autoclave est primordial, puisqu'un traitement à 134°C pendant 18 minutes est efficace lorsqu'il utilise un cycle précédé par une mise à vide. Un traitement à 132°C pendant une heure est requis lors de l'utilisation d'une autoclave standard à gravité, à moins que le cycle de 132°C/30 minutes ne soit précédé d'un traitement décontaminant, comme le NaOH 1N à la température ambiante (Steelman, 1994). Malgré toutes ces précautions, l'efficacité de ces techniques est toujours basée sur une souche d'un modèle animal en particulier et sur le titre infectieux initial (Paul, 1995).

Un soin particulier doit être accordé à la manipulation des instruments médicaux en contact avec des patients de MCJ identifiés ou suspectés. Paul (1995) recommande l'incinération des matériaux thermosensibles ou corrodables dans le NaOH ou NaOCl. Le pouvoir infectieux potentiel des instruments peut être diminué en les immergeant dans une solution de SDSs 10% chauffée entre 60°C et 100°C à cause de la susceptibilité subséquente des prions à une digestion protéolytique, mais ces instruments ne devraient, en aucun cas, être considérés comme stériles. Lorsque c'est possible, l'utilisation d'instruments à usage unique devrait être préconisée. De plus, une attention spéciale devrait être portée à la protection du personnel exposé à toute électrode, ou instrument ophtalmologique, dentaire ou neurochirurgical utilisé.

La manipulation de certaines souches de MCJ pour la recherche est particulièrement dangereuse, puisque celles-ci possèdent une dose infectieuse élevée. Donc, une concentration élevée d'hydroxyde ou d'hypochlorite de sodium, ou un cycle prolongé d'autoclave à plus haute température (136°C pendant 90 minutes) devrait être utilisé pour la stérilisation de l'équipement médical.

Van Asten *et al* (1996) ont validé l'utilisation d'un cycle de 3 à 5 minutes d'autoclave à vapeur à 134°C, en assumant que le système d'échange d'air fonctionne correctement et que l'utilisation de tout type d'aldéhyde est évité, ce dernier protégeant les prions contre la dégradation. Seulement une décontamination alcaline devrait être préconisée.

Toutes ces mesures drastiques sont pertinentes dans le cas d'interventions impliquant des organes à risque et quand une MCJ est suspectée. Par exemple, l'incinération du matériel ou le nettoyage de l'instrument suivi d'une immersion dans le NaOH sont essentiels si un cas de MCJ a été diagnostiqué, ou si un des patients avec des cas familiaux de CJD est soumis à tout type d'intervention neurochirurgicale (Type 1) (Tableau 1). Lorsqu'un patient à haut risque est soumis à une chirurgie à risque potentiel, ou encore lorsqu'un patient à risque potentiel est soumis à une intervention à haut risque (Type 2), le nettoyage de l'instrument suivi par une stérilisation au NaOH ou à l'autoclave pourrait être suffisant (Decq, 1998). Dans tous les cas, le type d'intervention (i.e. le type de tissus avec lesquels l'instrument médical entrera en contact) et l'histoire médicale du patient doivent être pris en considération. De plus, le type d'instrument qui est utilisé et le type de contact avec les tissus sont importants dans la détermination du choix d'un protocole de stérilisation approprié (Conseil d'Évaluation des Technologies de la Santé du Québec, 1997).

## **1.2 Les prions**

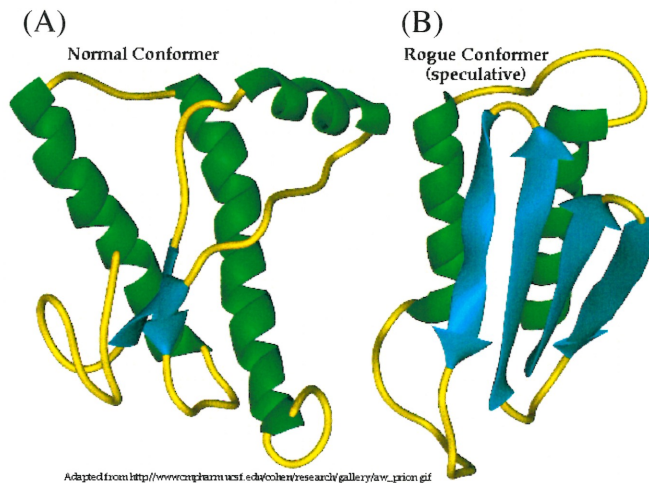
Afin de mieux saisir la complexité des problèmes découlant de la stérilisation des prions, il est important de comprendre leurs propriétés et leurs mécanismes de propagation. En effet, les prions diffèrent énormément des autres organismes infectieux, puisqu'ils ne contiennent pas d'acides nucléiques détectés à ce jour. Donc,

toutes les techniques s'attaquant à l'ADN viral, par exemple, pour la destruction des virus, sont inefficaces.

### ***1.2.1 La protéine de prion***

Les premiers cas de scrapies chez les animaux ont été rapportés, il y a près de deux cent ans, chez les moutons et les chèvres alors que les premiers cas de neurodégénération transmissible chez les humains ont été notés par Gajdusek et Zigaz en 1957. Une maladie, nommée Kuru et observée dans une tribu des Fores, en Nouvelle-Guinée, était apparemment causée par des rites canibalesques, où il y avait consommation de cerveaux humains contaminés (Laurent, 1996; Bessen, 1996). Cette maladie fut la première à prouver la possibilité d'une transmission orale. Le même phénomène est observé avec la nouvelle variante de la maladie de Creutzfeld-Jakob, puisque la cessation des rites cannibales a mené à l'extinction de la maladie du Kuru (Johnson and Gibbs, 1998; Prusiner, 1991). Les maladies humaines à prions incluent notamment la maladie de Creutzfeld-Jakob, le syndrome de Gerstmann-Straüssler-Scheinker (GSS) et l'insomnie fatale familiale (IFF) (Horwich and Weissman, 1997). Normalement, l'incidence des maladies prioniques humaines est de l'ordre de 1 par million et elle n'est pas plus prépondérante chez les hommes que chez les femmes (Wallace, 1993; Prusiner, 1996).

La protéine de prion (PrP<sup>C</sup>) humaine contient 253 acides aminés (Prusiner, 1991). Le ARNm de PrP est le produit d'un seul gène nucléaire de la cellule hôte, PRNP, sur le bras court du chromosome 20 (Horwich and Weissman, 1997). La particule de protéine infectieuse, communément appelée PrP<sup>SC</sup>, est un isoforme d'une sialoglycoprotéine présente dans la membrane normale de l'hôte, PrP<sup>C</sup>, et ayant une taille de 15 à 40 nm (Bodaghi and Hauw, 1998) (Figure 1).



**FIGURE 1. CONFORMATION NORMALE (A) ET ANORMALE (B) DE LA PROTÉINE PRP**

(Tiré de [www.cyber.dyne.com/~tom/mad\\_cow\\_disease.html](http://www.cyber.dyne.com/~tom/mad_cow_disease.html))

La protéine PrP est ancrée sur la surface de la cellule neuronale par un segment de glycosylphosphatidylinositol (GPI) situé dans le résidu de sérine 231, à la portion C-terminale de la protéine (Laurent, 1996; Katamine *et al.*, 1998; Adjour *et al.*, 1997). Même suivant un clivage de l'ancre GPI, PrP<sup>SC</sup> peut demeurer lié à la membrane, alors que la molécule PrP<sup>C</sup>, quant à elle, se retrouve dans le milieu environnant. PrP<sup>C</sup> est synthétisé à travers le réticulum endoplasmique et le Golgi, avant d'être exprimé sur la surface membranaire, où il s'ancre (Turner and Ironside, 1998). PrP<sup>SC</sup> s'accumule plutôt dans les vésicules cytoplasmiques qui sont, pour la plupart des liposomes secondaires (Prusiner, 1991). Ainsi, PrP<sup>SC</sup> serait pathogénique seulement lorsque produit à l'intérieur des cellule ou lorsqu'il est présenté de l'extérieur à une cellule exprimant PrP<sup>C</sup>, permettant ainsi une conversion à la surface de la cellule ou dans un compartiment interne (Horwich and Weissman, 1998).

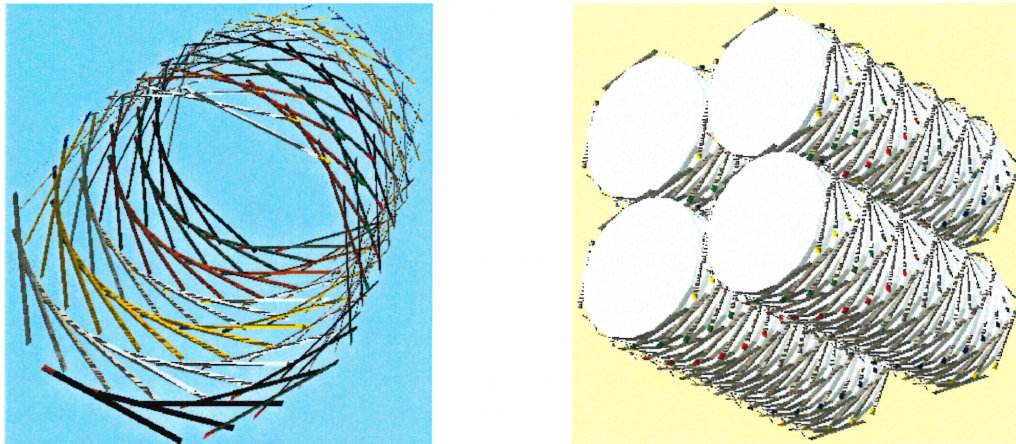
Cette particule infectieuse PrP<sup>SC</sup> serait donc dérivée de la protéine cellulaire PrP<sup>C</sup> suite à des procédés post-traductionnels tels que des changements de conformation, des N-glycosylations, ou l'ajout d'une ancre GPI. Le changement de conformation de PrP<sup>C</sup> en PrP<sup>SC</sup> pourrait donc se dérouler à la surface cellulaire ou

dans les endosomes, en quelques heures, durant le transport de PrP<sup>C</sup> à partir de la surface cellulaire vers le cytoplasme (Wille *et al.*, 1996; Lehmann, 1996; Lasmezas *et al.*, 1998). Il est possible de prévenir la conversion de PrP<sup>C</sup> en PrP<sup>SC</sup> en bloquant l'endocytose en abaissant la température à 18°C ou la biosynthèse du cholestérol en utilisant de la lovastatine (Horwich and Weissman, 1997).

De plus, un récepteur de PrP<sup>C</sup> ayant un poids moléculaire de 66kDa a été récemment découvert. Il causerait l'endocytose de PrP<sup>C</sup> et de PrP<sup>SC</sup> (Martins *et al.*, 1997) et serait un homodimère d'une protéine précurseur d'un récepteur de laminine (33kDa) précédemment identifiée (Turner and Ironside, 1998; Lasmezas *et al.*, 1998).

### ***1.2.2 Caractérisation de la protéine de prion***

La protéine PrP<sup>C</sup> possède un poids moléculaire de 33-35kDa, alors que la particule infectieuse elle-même, PrP<sup>SC</sup>, suite à une digestion protéolytique partielle produisant un fragment contenant la région N-terminale appelée PrP27-30, possède un poids moléculaire de 27-30kDa, perdant ainsi près de 67 acides aminés mais demeurant tout de même infectieuse. Ce fragment, lorsqu'il est soumis à une digestion protéolytique, et à des traitements chimiques et physiques avec les détergents appropriés, peut se polymériser et former des filaments de type amyloïde (Figure 2).



**FIGURE 2. FORMATION DE FILAMENTS DE TYPE AMYLOÏDE ET LEUR REGROUPEMENT**

(Tiré de [www.cyber.dyne.com/~tom/mad\\_cow\\_disease.html](http://www.cyber.dyne.com/~tom/mad_cow_disease.html))

Il a été démontré qu'il n'existe aucune différence dans la séquence d'acides aminés de ces deux protéines (PrP<sup>C</sup> et PrP<sup>SC</sup>), ni qu'aucune modification covalente ne semble se dérouler (Figure 3).

```
manlgcwmlvlfvatwsdlglckkrpkpggwntggstryppgqgspggnryppqggggwgqph  
gggwgqphgggwgqphgggwgqphgggwgqgggthsqwnkpskpktnmkhmagaaaa  
gavvgglggyvlgsamsrpiihfgsdyedryrenmhrypnqvyyrpmdeysnqnnfvhdcv  
nitikqrtvtttkgenftetdvmkmmervveqmcitqyeresqayyqrgssmvlfssppvillislfl  
ivg
```

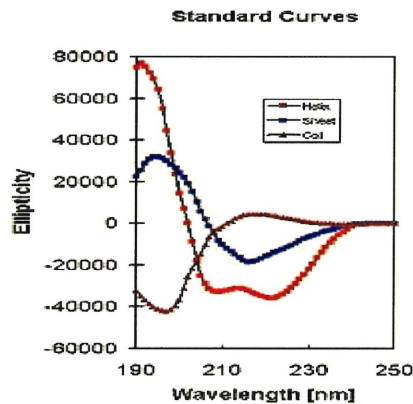
**FIGURE 3. SÉQUENCE D'ACIDES AMINÉS DE LA PROTÉINE DE PRION.**

Le seul exon présent dans le gène de PrP exclut également la possibilité d'un épissage alternatif de l'ARN, mais non de l'édition de l'ARN ni de l'épissage de la protéine (Prusiner, 1991). La diversité entre les souches de prions peut aussi être due à différentes modifications post-traductions, tels que différents motifs de glycosylations (Scott *et al.*, 1997). Par exemple, la forme prédominante de PrP dans la nvMCJ est diglycosylée, alors qu'elle est principalement monoglycosylée dans la MCJ sporadique. PrP<sup>SC</sup> serait le curseur requis pour le changement de conformation de PrP<sup>C</sup> en PrP<sup>SC</sup> et fournirait un mécanisme de répllication pour les souches de prions (Prusiner, 1996).

L'évidence de la " protéine seule " en tant qu'agent infectieux a été démontrée en soumettant la protéine du prion à divers procédés physiques et chimiques. Une sensibilité de la protéine à l'exposition aux rayons UV à 237nm, mais non pas à 254 nm, caractéristique des acides nucléiques, montre qu'aucun acide nucléique n'est présent. De plus, l'inactivation du pouvoir infectieux suite à des traitements comme la protéinase K, le diéthylpyrocarbonate, l'urée, les chaotropes, le phénol, le SDS mais

non pas les nucléases, indique clairement la présence de protéines et non d'acides nucléiques (Horwich and Weissman, 1997). De plus, l'amphotéricine B (AmB) peut également retarder le commencement de l'accumulation de PrP<sup>SC</sup> dans le cerveau (Adjou *et al.*, 1997). Il semble que la région hydrophobe 106-126 de PrP serait suffisante pour induire le processus neurodégénératif, puisqu'elle est considérée comme le site essentiel de nucléation pour la conversion de PrP<sup>C</sup> en PrP<sup>SC</sup> (Combs *et al.*, 1999; Horwich and Weissman, 1997). La région H1 de la protéine, correspondant aux acides aminés 109-122, peut convertir les acides aminés 129-141 en feuillets  $\beta$ , ce qui indique un rôle primordial de cette région pour la conversion de PrP<sup>C</sup> en PrP<sup>SC</sup> et serait déterminante dans la barrière interspèce (Kuznetsov *et al.*, 1997).

Des études moléculaires ont indiqué que la portion C-terminale de la protéine PrP<sup>C</sup> comprend trois chaînes  $\alpha$  et un seul feuillet plissé  $\beta$ , formant une structure globulaire stable, tandis que la partie N-terminale serait d'une conformation aléatoire. La protéine PrP<sup>C</sup> est principalement constituée de 42% d'hélices  $\alpha$  et de pratiquement aucun feuillet  $\beta$ , alors que la protéine PrP<sup>SC</sup> est composée de 43% de feuillets  $\beta$  et d'une quantité moindre d'hélices  $\alpha$  (20-30%). Ceci a été confirmé par spectroscopie par dichroïsme circulaire, où un minimum à 205nm et un épaulement à 222nm ont été observés, indiquant qu'une ou plusieurs hélices  $\alpha$  étaient présentes dans PrP<sup>C</sup> (Pan *et al.*, 1993) (Figure 4).



**FIGURE 4. COURBES REPRÉSENTANT L'ELLIPTICITÉ MOLAIRE THÉORIQUE OBTENUE PAR DICHROÏSME CIRCULAIRE POUR CHACUN DES 3 TYPES DE STRUCTURES SECONDAIRES, I.E. HÉLICES, FEUILLETS ET COILS, PRÉSENTES DANS LES CHAÎNES POLYPEPTIDIQUES.**

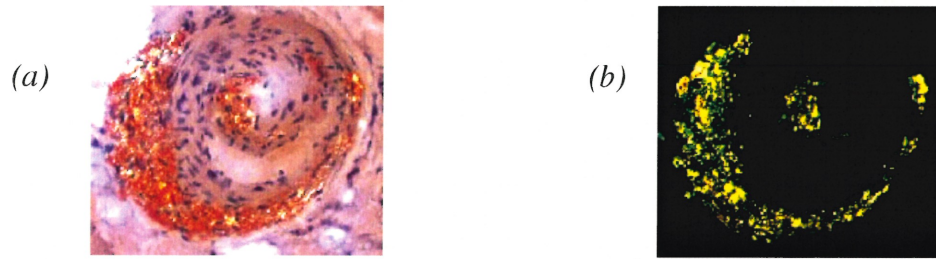
(Tiré de [www.-structure.llnl.gov/cd/cdtutorial.htm](http://www.-structure.llnl.gov/cd/cdtutorial.htm))



Simultanément, une nouvelle augmentation en feuillets  $\beta$  et une diminution de la quantité d'hélices  $\alpha$  ont été observées lors d'une digestion protéolytique partielle de PrP<sup>SC</sup> engendrant le fragment PrP27-30. En effet, ce fragment contient 47-54% de feuillets  $\beta$  et 21% d'hélices  $\alpha$ , et d'autres composés avec une structure modifiée (Pan *et al.*, 1993). Le changement d'hélices  $\alpha$  en feuillets  $\beta$  précède l'agrégation de PrP (Post *et al.*, 1998) et est considéré comme étant le processus essentiel pour la multiplication des maladies neurodégénératives (Lehmann, 1996). La protéine infectieuse PrP<sup>SC</sup> peut donc catalyser la conversion de la forme normale vers la forme anormale. PrP<sup>SC</sup> diffère également de PrP<sup>C</sup> physiquement par sa grande résistance aux protéases et sa propensité à s'agréger. Cette différence résulte de l'altération conformationnelle de PrP<sup>SC</sup>, plutôt que d'une modification covalente : PrP<sup>SC</sup> est riche en feuillets  $\beta$ , tandis que PrP<sup>C</sup> n'en possède pratiquement pas (Kushnirov *et al.*, 1997).

L'hydrophobicité de ces interactions rend ces filaments de type amyloïde insolubles (Prusiner, 1991). A part leurs conformations, PrP<sup>SC</sup> et PrP<sup>C</sup> se différencient de plusieurs façons. PrP<sup>SC</sup> est insoluble dans les détergents non-ioniques (Nemoto *et al.*, 1999), alors que PrP<sup>C</sup> est soluble dans des conditions dénaturantes. PrP<sup>C</sup>, lorsque soumis à un procédé protéolytique, est complètement dégradé, alors que PrP<sup>SC</sup> produit un fragment de 27-30kDa. PrP<sup>SC</sup> peut s'accumuler dans les cellules, tandis que PrP<sup>C</sup> se transforme rapidement. Finalement, le schéma d'accumulation de PrP<sup>SC</sup> est complètement différent du motif de distribution de PrP<sup>C</sup> dans le cerveau (Pan *et al.*, 1993). De plus, il semble que la digestion protéolytique partielle et la présence d'agents dénaturants soient toutes les deux requises pour l'induction de la formation de filaments *in vitro*. Leur utilisation combinée convertit toutes les molécules PrP<sup>SC</sup> présentes en PrP27-30 en induisant la formation de filaments (McKinley *et al.*, 1991).

Une des principales caractéristiques des filaments de type amyloïde observés dans les maladies à prions est leur capacité de se lier au Rouge Congo, et d'émettre une biréfringence verte en lumière polarisée (Carrell and Gooptu, 1998) (Figure 5).



**FIGURE 5. COLORATION AU ROUGE CONGO DE FILAMENTS DE TYPE AMYLOÏDE. (A) OBSERVÉ AU MICROSCOPE OPTIQUE; (B) OBSERVÉ EN LUMIÈRE POLARISÉE.**

(Tiré de [www.cyber.dyne.com/~tom/mad\\_cow\\_disease.html](http://www.cyber.dyne.com/~tom/mad_cow_disease.html))

En présence de filaments de prions, le spectre d'absorption du Rouge Congo passe d'une absorption maximale à 504nm à une absorption minimale à 450nm. Cependant, un manque de coloration au Rouge Congo n'indique pas nécessairement une perte du pouvoir infectieux. Le Rouge Congo seul, en présence de glycosaminoglycanes très sulfatés comme le sulfate de pentosane, peut inhiber la conversion de PrP<sup>C</sup> en PrP<sup>SC</sup>, en augmentant le temps d'incubation et la dose minimale requise pour l'infectivité (Priola and Caughey, 1994; Caspi *et al.*, 1998).

### ***1.2.3 Mécanismes de changement de conformation de la protéine de prion***

Deux hypothèses concernant le mécanisme de changement de conformation de PrP<sup>C</sup> en présence de PrP<sup>SC</sup> ont été émises. Le premier modèle, le "template assistance model", est basé sur la probabilité que le PrP<sup>C</sup> natif peut se déplier partiellement et se replier dans la conformation de PrP<sup>SC</sup> lorsqu'il est exposé à ce dernier. L'autre modèle, le processus de nucléation, suggère l'assemblage de monomères de PrP<sup>SC</sup> afin de former un noyau auquel PrP<sup>C</sup> pourrait s'agréger, causant ainsi un changement de conformation irréversible de PrP<sup>C</sup> en PrP<sup>SC</sup>. Ces deux modèles sont de type catalytique, puisque PrP<sup>SC</sup> pourrait générer sa propre agrégation (Laurent, 1996; Horwich and Weissman, 1997).

PrP<sup>C</sup> semble pouvoir se lier à une protéine "X" via différents acides aminés situés dans la portion C-terminale de la protéine. Cette protéine serait une molécule chaperone normale qui lierait PrP<sup>C</sup> et qui aurait un rôle dans le changement de

conformation en PrP<sup>SC</sup> (Horwich and Weissman, 1997; Kaneko *et al.*, 1997; Carrell and Gooptu, 1998).

#### ***1.2.4 Localisation de PrP<sup>C</sup> et corrélation avec les organes infectieux***

Jusqu'à présent, il a été prouvé que PrP<sup>C</sup> est requis pour le développement de la maladie et la propagation des prions. Les souris «knock-out» en PRNP (le gène codant pour PrP<sup>C</sup>) ont eu une croissance normale, mais ont démontré éventuellement des signes d'ataxie. Il a été démontré, dans des études avec des animaux transgéniques, que la barrière d'espèces peut être abolie, mais avec une durée d'incubation et des symptômes anatomiques spécifiques à l'espèce contaminée (Prusiner, 1996). La barrière inter-espèce module le temps de latence, mais ne modifie en rien le déclenchement de la maladie (Paul, 1995). Il va sans dire que la base moléculaire de la barrière inter-espèce résiderait dans le degré de différence entre la séquence de PrP<sup>C</sup> et le PrP<sup>SC</sup> infectieux (Lehmann, 1996). Une seule mutation en acide aminé de PrP<sup>C</sup> peut prévenir la transmission. Le gène codant pour PrP<sup>C</sup> est présent chez les mammifères, et la protéine PrP<sup>C</sup> est exprimée de façon constitutive sur les cellules nerveuses du cerveau. Une expression plus faible de cette protéine a aussi été détectée dans le cœur, les poumons, les reins, le foie et la rate. Il est également possible de la retrouver dans les tissus non-nerveux durant l'embryogénèse, et dans le plasma sanguin. Cette dernière considération indique un rôle possible de PrP<sup>C</sup> dans l'embryogénèse et dans les cellules nerveuses. Cette protéine est également requise pour une fonction synaptique normale. De plus, le manque de PrP<sup>C</sup> peut causer des troubles du sommeil et du rythme circadien.

Il est donc important de mentionner le risque inérent associé à certains tissus et fluides humains. Ces derniers sont résumés dans le Tableau 1.

**Tableau 1. Pouvoir infectieux associé à certains tissus humains pour la contamination iatrogène de la MCJ.**

<i>Catégorie</i>	<i>Pouvoir infectieux</i>	<i>Tissus</i>
Type I	Haute	Cerveau, moëlle épinière, yeux
Type II	Moyenne	Rate, ganglions lymphatiques, amygdales, iléon et colon proximal, placenta, dure-mère
Type III	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Faible</li> <li>• Minime</li> </ul>	<p>Nerf sciatique, colon distal, glande surrénale et pituitaires, muqueuse nasale, hypophyse (disséquée)</p> <p>Thymus, moëlle osseuse, foie, poumons, pancréas, liquide céphalorachidien</p>
Type IV	Non détectable	Caillot sanguin, sérum, lait, colostrum, glande mammaire, muscles squelettiques, coeur, rein, thyroïde, glande salivaire, salive, ovaire, utérus, testicule, vésicule séminale, fecès, les tissus foetaux, la bile, l'urine, les tissus fibreux, cartilagineux et osseux, et la peau

Tiré de : « Report of a WHP consultation on public health issues related to animal and human spongiform encephalopathies. WHO. 12-14 Nov 1991. WHO/CDS/VPH/92.104.

Cependant, chez des modèles animaux, les maladies à prions peuvent être transmises par transfusion de lymphocytes. La transmission de ces maladies par l'urine a également été observée (Tableau 1). Un cas de transmission à l'humain par contamination au placenta de mouton a été rapporté (Paul, 1995). Donc, ceci est une indication très nette que la plupart des tissus et fluides humains peuvent possiblement

transmettre les maladies, indépendamment du niveau de pouvoir infectieux associé à ces tissus (Paul, 1995). Précédemment, il a été démontré que les transfusions sanguines et les produits sanguins n'étaient pas un facteur à risque pour la transmission de la MCJ traditionnelle (Yap *et al.*, 1998).

### ***1.2.5 Transmission des maladies prioniques***

Il y a trois principaux mécanismes de transmission des maladies à prions. Les Encéphalopathies Spongiformes Transmissibles peuvent être transmises génétiquement, sporadiquement ou iatrogéniquement. Par exemple, la MCJ sporadique, c'est-à-dire celle qui n'est pas associée à des mutations du gène PRNP, représente près de 87% des cas répertoriés, alors que 8% seulement des cas sont génétiques et 5% résultent d'une contamination iatrogène (Turner and Ironside, 1998). Bien que les deux premiers mécanismes de transmission soient très importants dans ce travail, seul la transmission iatrogène sera décrite, car il est possible de la contrôler par des mesures préventives.

Une transmission liée à l'activité médicale peut s'effectuer suite à une transplantation de cornée, à l'utilisation d'électrodes intracérébrales, à l'administration d'hormones de croissance provenant de la glande pituitaire. L'ESB peut aussi être contractée par la consommation de produits provenant de boeufs ou de moutons contaminés (Wallace, 1993). Une quantité aussi minime que 1g de viande infectée peut transmettre oralement la maladie à d'autres troupeaux (Turner and Ironside, 1998). Même l'utilisation de tonomètres pour évaluer la pression intraoculaire, la suture de traumatismes craniens ou cervicaux, ou tout genre de chirurgie oculaire, crânienne cardiovasculaire et neurologique peut poser un problème potentiel de contamination iatrogène. Jusqu'en 1997, 142 cas de contamination iatrogène ont été rapportés, incluant (a) 4 cas suite à des neurochirurgies, (b) 2 suivant l'utilisation d'électrodes stéréostatiques, (c) 2 après des transplantations cornéennes, (d) 1 suite à une transplantation de membrane tympanique, (e) 53 suite à des transplantations de dure-mère et (f) 80 suite à l'injection d'hormones de croissance contaminées (Trabacchi, 1997). Cinq autres cas de contamination, suite à l'administration de gonadotrophine pituitaire humaine, ont été relevés en 1998 (Yap *et*

*al.*, 1998). Il a été établi que l'infection de 23 personnes en Grande-Bretagne et de 1 personne en France a été causée par la consommation de produits bovins contaminés (Trabacchi, 1997). Jusqu'à ce jour, il n'y a eu aucun cas rapporté de transmission transplacentaire. De plus, aucune prédominance n'a été observée chez les hémophiles, étant le groupe le plus à risque de contamination par le sang. Ceci suggère que le risque de transmission de la MCJ par le sang est minime (Johnson and Gibbs, 1998). Chez les souris, une inoculation intracérébrale de sang contaminé par la MCJ ou par la nvMCJ a causé le développement de la maladie, ce qui remet en question le risque de contamination par le sang (Manuelidis *et al.*, 1985; Tateichi, 1985). À la lumière de nouveaux résultats obtenus, tels que des concentrations significatives de PrP<sup>SC</sup> dans les tissus lymphoïdes des patients atteints de la nvMCJ, et du rôle des lymphocytes B matures dans la pathogenèse des prions, il est impossible d'exclure la possibilité d'une contamination iatrogène par le sang ou ses dérivés provenant de ces patients. Le pouvoir infectieux des composantes sanguines étant malgré tout de loin inférieur à celle des tissus nerveux, il semble exister peu de risques associés à la contamination de la MCJ sporadique, mais non de la nvMCJ, par le sang (Turner and Ironside, 1998). Par exemple, les produits sanguins (lymphocytes, monocytes et plaquettes) (Cashman *et al.*, 1990; Dodelet and Cashman, 1998; Perini, Vidal *et al.*, 1996; Perini, Frangione *et al.*, 1996) pourraient transmettre la nvMCJ (Turner and Ironside, 1998). Il semble que des défauts dans les cellules T ne diminuent en rien la susceptibilité aux prions, mais que les cellules dont la maturité dépend des cellules B, tels que les cellules dentritiques folliculaires, pourraient être responsables de l'accumulation des prions et, par le fait même, de leur neuroinvasion. Un autre rôle hypothétique des lymphocytes B dans la pathogenèse des prions pourrait inclure le transport direct des prions au système nerveux, ou la sécrétion de facteurs qui pourraient se lier aux prions et faciliter leur accès au système nerveux (Klein *et al.*, 1998).

### **1.3 La stérilisation des prions**

Il a donc été mentionné précédemment que les techniques de stérilisation couramment utilisées s'avéraient inefficaces pour l'éradication des prions. Malgré

une certaine sensibilité des prions à ces méthodes, cela n'élimine pas complètement le risque de contamination iatrogène, pouvant ainsi causer une épidémie de grande ampleur. D'où le besoin de développer de nouvelles stratégies de stérilisation. L'utilisation possible des procédés oxydants est possiblement le meilleur choix, puisque les prions, constitués d'acides aminés, sont particulièrement sensibles au dommage oxydatif. L'utilisation de procédés alkylants doit être soigneusement évitée, car ceux-ci protègent la protéine plutôt que de permettre sa dégradation (van Asten *et al.*, 1996). Malgré le pouvoir physique de dégradation de l'autoclave, le cycle généralement utilisé en milieu hospitalier ne permet pas la destruction des prions. Des solutions plus drastiques étant de mise, une étude d'un procédé de stérilisation potentiel pour les prions a été effectuée.

Avant tout, il est important à cette étape-ci de résumer brièvement les techniques de stérilisation évaluées jusqu'à ce jour pour la dégradation des prions (Tableau 2).

**Tableau 2. Techniques efficaces et inefficaces pour la stérilisation des instruments médicaux contaminés par les prions.**

Techniques	Inefficaces	Efficaces
<b>CHIMIQUE</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Éthanol</li> <li>• Iodophore</li> <li>• Peroxyde d'hydrogène</li> <li>• Oxyde d'éthylène</li> <li>• Permanganate de potassium</li> <li>• Urée</li> <li>• Acide peracétique</li> <li>• Gluteraldéhyde</li> <li>• Formaldéhyde</li> <li>• Ébullition</li> <li>• Acétone</li> <li>• Lysol</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1N NaOCl</li> <li>• 1N NaOH, à température ambiante</li> </ul>

## PHYSIQUE

- Irradiation UV
- Irradiation gamma
- Chaleur sèche
- Autoclave de type « gravity displacement », 132°C, 1hr
- Autoclave de type « porous charge », 134-138°C 18 min

(Tiré de R. Marchand, communication personnelle)

### 1.3.1 Procédés alkylants et autres

L'oxyde d'éthylène (EtO) est l'un des stérilisants le plus couramment employé en milieu hospitalier. C'est un agent alkylant (un atome d'hydrogène est remplacé par un groupe hydroxy -CH saturé) qui modifie directement et irréversiblement les groupements -COOH, -NH<sub>2</sub>, -SH, et -OH dans les microorganismes. De plus, il réagit avec les anneaux d'azote dans les bases de purine et pyrimidine, et dans les groupes amines des acides aminés et des protéines. Ces dernières se trouvent donc, dès lors, protégées de la dégradation par l'oxydation (Glaser, 1977).

Les sous-produits ou les résidus (glycols et chlorohydrine) demeurant sur les matériaux peuvent être formés par deux réactions distinctes. Premièrement, par la combinaison lente de l'oxyde d'éthylène et de l'eau pour former des glycols, ou encore par la combinaison du EtO avec des ions de chlore en présence d'eau, formant ainsi de la chlorohydrine. Ces résidus peuvent être absorbés par les matériaux, exerçant de cette façon un effet toxique sur les tissus vivants. Ou encore, l'EtO lui-même peut avoir un effet physique et chimique direct sur les matériaux, qui en altèrent les propriétés. L'oxyde d'éthylène peut causer l'hémolyse, l'érythème et l'œdème des tissus (O'Leary and Guess, 1968). Ce procédé nécessite donc un long temps d'aération afin d'assurer la sécurité dans l'utilisation des instruments stérilisés par cette technique.

Parmi les autres procédés chimiques utilisés, notons également le glutéraldéhyde, qui est considéré comme un décontaminant puisqu'il ne peut venir à bout de toutes les espèces de spores bactériennes. La susceptibilité des microorganismes vis-à-vis cet agent est résumée dans le Tableau 3. Il requiert



également une immersion pour un minimum de 4 heures, préférablement 24 heures, et nécessite un lavage de l'instrument préalablement à son utilisation.

**Tableau 3. Susceptibilité des microorganismes à l'immersion dans le glutéraldéhyde.**

Microorganisme	Susceptibilité
<b>Bactéries gram +</b>	Très susceptibles
<b>Bactéries gram -</b>	Très susceptibles
<b>Bactéries « acid-fast »</b>	Modérément susceptibles
<b>Spores Bactériennes</b>	Susceptibles (selon l'espèce)
<b>Virus lipophiles</b>	Susceptibles
<b>Virus hydrophiles</b>	Modérément susceptibles
<b>Champignons</b>	Fongistatique ou fongicide

(Tiré de [www.indiaorth.org/orth/cases/harsh/default.htm](http://www.indiaorth.org/orth/cases/harsh/default.htm))

### **1.3.2 Procédés oxydants**

Pour la destruction des protéines prioniques, le choix des techniques d'ozone et de plasma gazeux/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de Sterrad<sup>®</sup> 100 est grandement justifié. En effet, plusieurs articles scientifiques démontrent l'évidence d'une sensibilité des protéines aux procédés oxydants. Les prions sont des protéines de conformation anormale, soit, mais tout de même des protéines. Donc, il apparaît évident que ces techniques puissent avoir un potentiel énorme pour leur dégradation.

#### **1.3.2.1 Ozone**

L'ozone est un allotrope triatomique instable de l'oxygène formé suite à l'excitation de l'oxygène moléculaire en oxygène atomique dans un environnement énergisé permettant la recombinaison des atomes en O<sub>3</sub>. L'ozone absorbe les rayons ultraviolets sur une vaste étendue de longueurs d'onde dont le maximum se situe à 253,7 nm. Il est un agent oxydant puissant ayant un potentiel d'oxydo-réduction de +2.7 volts, seul le fluor étant plus électronégatif. Cette propriété lui confère la capacité d'oxyder la plupart des matériaux chimiques ou biologiques. De plus, il réagit particulièrement bien avec les composés organiques non saturés ou aminés (Drapeau et Paquin, 1977a). L'ozone a été reconnu premièrement en tant qu'agent

stérilisant chimique pour le traitement de l'eau potable en 1893 à Oudshoorn, aux Pays-Bas (Rice *et al.*, 1981). De façon naturelle, l'ozone est formé par les décharges à haut voltage qui se produisent au cours des orages ou par l'action photodissociatrice des radiations ultraviolettes solaires de courtes longueurs d'onde sur les molécules d'oxygène dans la basse stratosphère (Jaffe, 1967). En laboratoire, l'ozone est généralement généré par la méthode de décharge corona, où l'air sec (ou l'oxygène) est passé entre deux électrodes séparées par un médium diélectrique en céramique. Le procédé de génération de l'ozone est plus efficace à basse température. L'ozone lui-même est plus stable en phase gazeuse qu'aqueuse. Sa solubilité dans l'eau est dix fois supérieure à celle de l'oxygène (Stokinger, 1954), et le taux de décomposition de l'ozone en solution aqueuse augmente avec l'agitation, la température, le pH et la concentration d'ozone. Il est impossible de conserver l'ozone pour un usage ultérieur, car l'ozone est très instable et se décompose en intermédiaires plus réactifs comme les radicaux hydroxyls (OH) (Taube and Bray, 1940; Alder and Hill, 1950; Forchheimer and Taube, 1954). Il est donc important que l'ozone soit produit sur place. De plus, l'ozone est un agent bactéricide (Farooq and Akhlaque, 1983), virucide (Harakeh and Bulter, 1985) et fongicide (Kawamura *et al.*, 1986) très efficace.

#### 1.3.2.1.1 Sites d'action de l'ozone au niveau moléculaire

L'ozone peut se retrouver dans l'organisme suite à l'inhalation de gas présents dans la pollution atmosphérique, par exemple (Cross *et al.*, 1992). Une variation du spectre d'absorption des acides nucléiques (Christensen and Giese, 1954) et des modifications des bases pyrimidiques (Pratt *et al.*, 1968) ont été enregistrées suite à l'action de l'ozone *in vitro*. Cet agent produit également des aberrations chromosomiques. Étant donné que les produits d'oxydation de l'ozone peuvent être transportés dans tout l'organisme par la circulation sanguine, ces aberrations du matériel génétique peuvent avoir lieu dans tous les types de cellules exposées (Brinkman and Lamberts, 1958). L'ozone peut aussi induire des mutations dans une grande variété de gènes chez *E. coli* (Hamelin and Chung, 1975a,b; id, 1974b).

Certains mécanismes de réparation de l'ADN peuvent créer une résistance à l'ozone (L'Hérault, 1978).

Par ailleurs, l'effet de l'ozone sur les composantes subcellulaires a été déterminé. Par exemple, la cause majeure d'inactivation de tout organisme viral lorsqu'il est exposé à l'ozone est le dommage induit à son acide nucléique et à son ARN (Roy *et al.*, 1981). L'ozone peut également altérer deux des quatre chaînes polypeptidiques présentes dans la couche virale. L'une des découvertes importantes par Kim *et al.* (1980) est que les composantes subcellulaires peuvent être plus résistantes que l'organisme entier, et que l'inactivation d'un microorganisme n'implique pas nécessairement la dénaturation du matériel génétique qu'il contient. L'ozone catalyse également l'oxydation rapide des acides gras non-saturés par une attaque directe sur leurs doubles liaisons (Rochm *et al.*, 1971). La toxicité de l'ozone est accrue par le peroxyde (Svirbely *et al.*, 1961), qui peut cependant être contrée par la vitamine E, un antioxydant des lipides, capable de fournir une protection contre l'ozone (Goldstein *et al.*, 1969; id, 1970). Pour ce qui est des membranes cellulaires et subcellulaires, l'ozone altère leur perméabilité en oxydant les groupements hydrosulfurés nécessaires pour l'activité enzymatique ou en oxydant les lipides et autres constituants membranaires (Marx, 1975). Il perturbe ainsi l'équilibre des électrolytes et des substances nutritives, menant ainsi à la mort cellulaire.

#### 1.3.2.1.2 Mécanismes d'action de l'ozone

L'ozone réagit avec les doubles liaisons des lipoprotéines, ce qui entraîne une augmentation de perméabilité membranaire, parfois même la lyse cellulaire (Giese and Christensen, 1954). Pour ce qui est des protéines et des enzymes, leur spectre d'absorption est modifié par l'ozone (Giese *et al.*, 1952), car il interagit avec les groupements hydrosulfurés (-SH) et les convertit en partie en groupements -S-S- pour produire des radicaux libres, ce qui cause leur inactivation (Menzel, 1971). Toutefois, certaines activités enzymatiques, comme celles de la glutathion peroxydase, la glutathion réductase et la glucose-phosphate déshydrogénase, peuvent être augmentées suite au stress causé par la production de peroxydes à partir des lipides par l'ozone (Chow and Tappel, 1972).

Certaines études rapportent la production de composés carbonyles suite à un traitement des protéines à l'ozone (King, 1969; Buell *et al.*, 1965). C'est ainsi que Mudd *et al.* (1969) ont établi un ordre de susceptibilité des acides aminés au pouvoir oxydant de l'ozone aqueux et de leurs produits de dégradation oxydés respectifs : cystéine [acide cystéique et cystine], méthionine [sulfoxyde méthionique, kynurénine N-formylique (Previero and Bordignon, 1964; Previero *et al.*, 1967; Previero *et al.*, 1963; Previero and Scoffone, 1963), kynurénine, ammoniacque et un mélange de matériaux positifs en ninhydrine acidique et neutre], tyrosine [dihydroxyphénylalanine], histidine [ammoniacque], cystine [acide cystéique] et phénylalanine. L'ozone peut également altérer le spectre d'absorption du tryptophane et de la tyrosine dans certaines protéines pures telles que l'albumine sérique (Giese *et al.*, 1952). Tous les autres acides aminés ne semblent pas être affectés par l'exposition à l'ozone, même si Cross *et al.* (1992) ont ajouté à la liste la proline, l'arginine et la lysine (Stadtman, 1990). Les constantes de réactions de l'ozone avec ces acides aminés sont de 2 à 6 fois plus grands qu'avec la leucine, la valine et des acides aminés similaires (Pryor et Uppu, 1993). Dans les solutions aqueuses, l'oxydation de la tyrosine et de l'histidine est dépendante du pH, étant beaucoup plus grande dans des conditions alcalines qu'acides. Les composés sulfhydryls sont les plus susceptibles à l'oxydation par l'ozone (Mudd *et al.*, 1969). Cependant, Pryor et Uppu (1993) ont suggéré que le produit d'oxydation du tryptophane serait un ozonide Criegee ou un tautomère d'un ozonide Criegee plutôt que la N-formylkynurénine. Il n'y a aucun effet observable des dommages causés par l'oxydation des acides aminés sur la structure protéique. Ce dommage peut par contre être analysé selon la concentration ou selon l'apparition des produits de dégradation oxydés provenant d'un seul acide aminé, le tryptophane (Pryor and Uppu, 1993). Il peut aussi être évalué selon la quantification de la formation de carbonyles, qui est utilisée pour déterminer le dommage induit aux protéines et à leur chaîne peptidique (Stadtman, 1990; Oliver *et al.*, 1990; Murphy and Kehrer, 1989). L'exposition à l'ozone cause une augmentation graduelle de la formation de carbonyle, qui n'est pas inhibée par l'ajout de mannitol (un inhibiteur de radicaux hydroxyles), EDTA, ou deferroxamine (un inhibiteur l'oxydation dépendante des ions de cuivre ou de fer) (Cross *et al.*,

1992), ce qui indique que l'ozone peut directement oxyder les protéines plutôt qu'indirectement via la formation de radicaux hydroxyles.

### 1.3.2.2 Le procédé de Sterrad®

Le Sterrad® est un système qui utilise à la fois le peroxyde d'hydrogène et le plasma gazeux à basse température pour inactiver les microorganismes et éliminer les résidus toxiques. Ce procédé est particulièrement intéressant pour les instruments thermosensibles, puisque la température lors du cycle de stérilisation ne dépasse pas les 50°C. Le cycle dure environ 75 minutes et se déroule en 5 phases successives : (a) le vide (10 min), (b) l'injection de peroxyde d'hydrogène dans la chambre à une pression très basse, (c) sa diffusion, ce qui lui permet d'entrer en contact avec les dispositifs (60 minutes), (d) la phase plasma (10 minutes), et (e) le retour à la pression atmosphérique (5 minutes) (Figure 6).

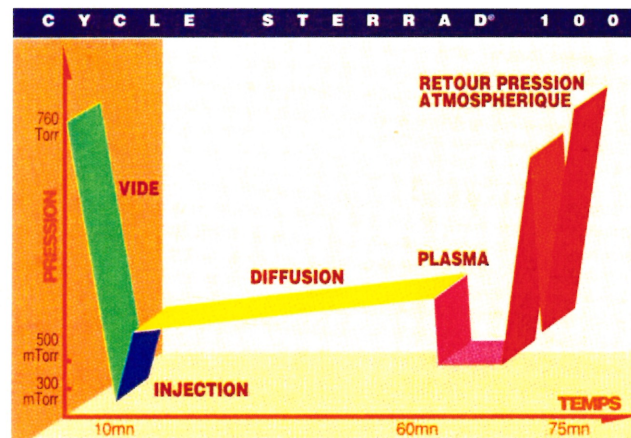


FIGURE 6. CYCLE DE STÉRILISATION DE STERRAD® 100

Le procédé de stérilisation débute par une phase de vide, afin enlever l'air et l'humidité. Par la suite un volume de 2ml de peroxyde d'hydrogène (58 wt %), reconnu pour ses effets bactéricides et virucides (Kyi *et al.*, 1995), est injecté dans la chambre. Le plasma est généré par une radio fréquence (RF) de 13-56 MHz, créant ainsi un champ d'énergie électrique responsable de la transformation du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de l'état de vapeur à celui de plasma gazeux. Les vapeurs du peroxyde d'hydrogène sous forme de plasma sont décomposées en espèces réactives qui entrent en collision avec

les microorganismes, et réagissent avec certaines molécules essentielles au métabolisme et à la reproduction, comme l'ADN, l'ARN et les enzymes par exemple. Suite à cette interaction, les éléments réactifs perdent leur énergie et se recombinent pour former de l'oxygène, de l'eau et d'autres espèces secondaires non toxiques.

Les radicaux libres formés dans le plasma peuvent également avoir des effets sur les propriétés physiques des dispositifs médicaux. Par exemple, les radiations-r, à haute énergie, peuvent traverser les matières non métalliques et altérer ces dernières. Cependant, le plasma à basse température ne traverse qu'une mince couche d'atomes de la surface, ce qui n'altère pas leurs propriétés générales.

#### 1.3.2.2.1 Effets sur les cellules

En stérilisation, il est important de démontrer que les procédés de stérilisation garantissent un niveau d'assurance de la stérilité (NAS) d'au moins  $10^{-6}$ . Ceci a été démontré par l'exposition de diverses espèces au procédé de Sterrad®. (Tableau 4).

**Tableau 4. Résultats de stérilisation de certains microorganismes par Sterrad® 100.**

<i>Microorganisme</i>	<i>Type</i>	<i>Intérêt du test</i>	<i>Contrôle</i>	<i>Résultats</i>
<i>B. stearothermophilus</i>	Spore bactérienne	Résistance Vapeur	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /ind. 2,04x10 <sup>6</sup>	0/9
<i>B. subtilis var. niger</i>	Spore bactérienne	Résistance H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> / ind. OE	2,69x10 <sup>6</sup>	0/9
<i>B. pumilus</i>	Spore bactérienne	Résistance rad. ionisantes/ ind. Radiations	1,82x10 <sup>6</sup>	0/9
<i>Staphylococcus aureus</i>	Gram positif	Résistance H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	2,82x10 <sup>6</sup>	0/9
<i>Deinococcus radiodurans</i>	Gram positif	Résistance rad. Ionisantes	3,10x10 <sup>6</sup>	0/9
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Gram négatif		1,32x10 <sup>6</sup>	0/9
<i>Escherichia coli</i>	Gram négatif		9,23x10 <sup>6</sup>	0/9
<i>Serratia marescens</i>	Gram négatif	Résistance H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1,85x10 <sup>6</sup>	0/9
<i>Moroxlia osloensis</i>	Gram négatif	Résistance rad. Ionisantes	3,14x10 <sup>6</sup>	0/9
<i>Mycobacterium bovis</i>	Acidorésistant	Résistance chimique	4,20x10 <sup>6</sup>	0/9

<i>Candida albicans</i>	Levure	Résistance H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	3,95x10 <sup>6</sup>	0/9
<i>Candida parapsilosis</i>	Levure	Résistance H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1,07x10 <sup>6</sup>	0/9
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Champignon filamenteux		1,25x10 <sup>6</sup>	0/9
<i>Aspergillus niger</i>	Champignon filamenteux	Résistance H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1,46x10 <sup>6</sup>	0/9
Virus de l'herpès Type 1	Lipophile		Titre du lysat log <sup>10</sup> ≥ 3,20	Virulence non détectée
Virus de polio Type 1	Hydrophile	Résistance chimique	Titre du lysat log <sup>10</sup> ≥ 3,98	Virulence non détectée

Légende : ind. : indicateur; OE : oxyde d'éthylène; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : peroxyde d'hydrogène.

(Tiré de Jacobs, P.T., 1995)

Les radicaux libres, engendrés dans le plasma, peuvent interagir avec les molécules essentielles au métabolisme normal et à la reproduction des cellules vivantes comme l'ADN, l'ARN, les enzymes, les phospholipides et autres. Les spores de *B. stearothermophilus* ATCC 7953 (utilisés comme indicateurs dans la stérilisation au peroxyde et de la vapeur), *B subtilis* var. *niger* ATCC 9372 (utilisés comme indicateurs dans la stérilisation à la chaleur sèche et à l'oxyde d'éthylène) et *B. pumilus* ATCC 27142 (utilisés comme indicateurs dans la stérilisation à l'irradiation) ont été exposés à un cycle de stérilisation dans le Sterrad 100 afin d'évaluer l'effet sporicide. Il a été déterminé que la phase de diffusion du peroxyde d'hydrogène a un effet sporicide alors que la phase de plasma gazeux n'a pas cet effet (Krebs *et al.*, 1998). En effet, le principal mécanisme d'action du peroxyde d'hydrogène est l'oxydation. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> agit sur les sulphydryls et les liaisons doubles des protéines, les lipides et les membranes de surface. Il réagit avec le O<sub>2</sub><sup>-</sup> pour produire des radicaux hydroxyles, qui sont eux-mêmes des oxydants très forts et attaquent les composantes cellulaires. Les radicaux libres du peroxyde d'hydrogène favorisent l'oxydation des acides aminés présents dans les chaînes latérales, induisent la formation de réticulations protéine-protéine et causent l'oxydation du corps de la

protéine résultant en sa fragmentation. Néanmoins, la phase de gaz plasma demeure essentielle afin d'éliminer tous les radicaux de peroxyde et les résidus toxiques, qui pourraient souiller les instruments médicaux suite à la stérilisation (rôle détoxifiant) (Krebs *et al.*, 1998). Cependant, l'effet du procédé Sterrad sur les protéines n'a toujours pas été déterminé. Mais en se basant sur son pouvoir oxydant, il pourrait être une alternative intéressante pour la stérilisation des prions.

Finalement, les avantages et désavantages associés à ces techniques oxydatives, comparativement aux procédés stérilisants déjà en vigueur sont discutés dans le Tableau 5.

**Tableau 5. Avantages et désavantages de quelques procédés de stérilisation aujourd'hui disponibles.**

Techniques de stérilisation	Oxyde d'éthylène	Sterrad®	Ozone
<b>Température</b>	Basse	Basse	Basse
<b>Effet sur biomatériaux</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• non corrosif</li> <li>• non recommandé pour certains caoutchouc</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• non corrosif</li> </ul>	N/C
<b>Durée du cycle</b>	Min. 16 heures	Max. 1h30	Variable
<b>Résidus toxique</b>	Oui	Non	N/C
<b>Effet sur les protéines</b>	Pas de dégradation	Dégradation	Dégradation
<b>Potentiel pour la dégradation des prions</b>	Nul	Prometteur	Prometteur

*Légende : N/C : non connu*

#### 1.4 Utilisation de modèles pour la stérilisation des prions

En raison des difficultés et des dangers présents lors de la manipulation des prions, plusieurs modèles ont été utilisés (ex : IFDO, Sup35, etc.). Dans les sections suivantes, deux d'entre eux seront décrits. Cependant, l'emphase a été mise sur la protéine Sup35, utilisée comme modèle pour la stérilisation des prions dans notre travail.



#### ***1.4.1 La protéine IFDO***

Un modèle pour la stérilisation des prions qui a été établi par Dyas et Burdon, est basé sur la résistance à la stérilisation d'une autre protéine, le « ileal fluid-dependant organism » (IFDO) (Dyas and Burdon, 1990). Cet organisme possède une caractéristique similaire aux prions, c'est-à-dire sa résistance aux techniques courantes de stérilisation. L'autoclave à vapeur, soit à 134°C pour 2 heures, soit à 140°C pour 105 minutes, était complètement inefficace pour la dégradation de la protéine IFDO. Seule la chaleur sèche (160°C, 1 heure), l'immersion dans l'hypochlorite de sodium, ou la combinaison de Stéricol 10% et de l'autoclave à 134°C pendant une heure ont permis la destruction complète. En se basant sur ces conclusions, Dyas et Burdon présumant, grâce à la ressemblance entre les deux protéines, que les deux techniques de stérilisation couramment utilisées pour les prions sont inadéquates lorsqu'elles sont utilisées indépendamment l'une de l'autre. Ils recommandent donc la combinaison d'un prétraitement avec un désinfectant puissant, suivi de l'autoclave. Ce travail est en conformité avec les résultats de Tagushi *et al.* (1991) qui confirment que la combinaison de l'immersion dans du NaOH 1N à la température de la pièce et l'autoclave dégrade complètement jusqu'à  $10^{5-8}$  ID<sub>50</sub> de l'agent de la MCJ dans les tissus cérébraux murins. Par contre, puisque les titres infectieux de la MCJ sont généralement plus élevés *in vivo*, ces techniques pourraient s'avérer inefficaces. Malgré tout, Ernst et Race (1993) ont démontré premièrement que l'autoclave seul, à 132°C pendant 90 minutes mais pas pendant 60 minutes, éliminait complètement le pouvoir infectieux de  $10^{7.4}$  ID<sub>50</sub>/50µl d'homogénat du cerveau; deuxièmement, que la combinaison de l'autoclave à 121°C et le NaOH, ou le LpH, un dérivé phénolique, mentionné précédemment par Chesebro (1990), était également efficace. L'effet du LpH peut être causé par l'acide glycolique qui est un agent efficace pour la dégradation des protéines. Néanmoins, une certaine toxicité est associée au LpH, et donc ne peut être utilisé sur les objets stationnaires, tels que les tables de travail par exemple, à cause du potentiel de toxicité du phénol (Ernst and Race, 1993).

### 1.4.2 La protéine Sup35

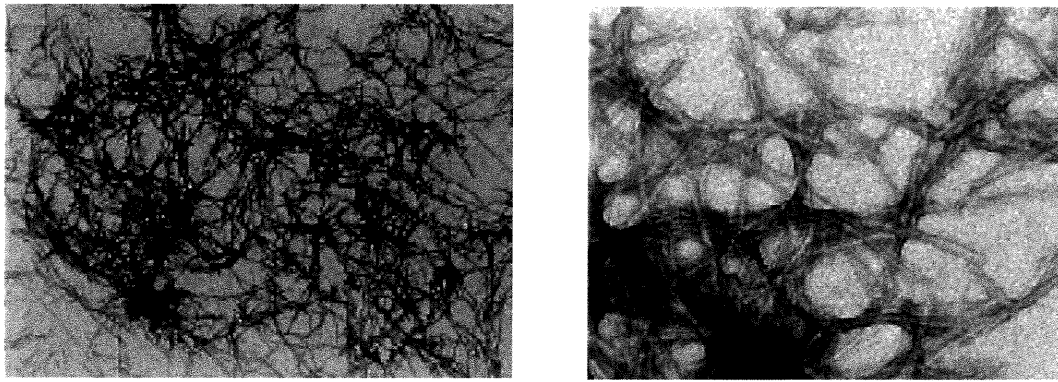
La protéine Sup35 de la levure *Saccharomyces cerevisiae*, qui présente plusieurs avantages, dont principalement une facilité de manipulation similaire à celle des bactéries, tout en maintenant la complexité eukaryote.

L'élément génétique non-mendélien [PSI+] a été pour la première fois décrit par Brian Cox en 1965 (Wickner *et al.*, 1995). [PSI+] est un élément génétique retrouvé dans la levure *Saccharomyces cerevisiae* qui est transmis de façon cytoplasmique dominante (Cox *et al.*, 1988). Par exemple, dans un croisement génétique [PSI+] x [psi-], tous les diploïdes et spores résultant d'une méiose unique sont [PSI+] à condition que le diploïde ait subi 7 ou 8 générations de croissance avant la sporulation (Tuite and Lindquist, 1996). La transmission cytosomale du phénotype altéré [PSI+] est basée sur la transmission d'une structure de protéine elle-même altérée, Sup35p, plutôt que sur des acides nucléiques modifiés (Glover *et al.*, 1997). [PSI+] est constitué uniquement de protéine, ce qui produit un changement transmis dans le phénotype, résultant en une forme structurale altérée et autopropagatrice (Wickner, 1994; Lindquist, 1997). Le facteur [PSI+] de la levure cause une augmentation dans la suppression des mutations non sens, une augmentation de la tendance des ribosomes à lire au-delà des codons stop.

#### 1.4.2.1 Structure de la protéine Sup35 (Sup35p)

La protéine Sup35 est un homologue en levure du facteur de terminaison traductionnelle eRF3 présent chez les eucaryotes supérieurs (Wickner, 1994; Stansfield *et al.*, 1995; Zhourvleva *et al.*, 1995) composé de trois régions de séquences très distinctes (Kushnirov *et al.*, 1990; Ter-Avanesyan *et al.*, 1993; Paushkin *et al.*, 1997). Toutes ces régions, sauf la portion N-terminale, possèdent une homologie très élevée avec le facteur d'élongation de levure EF-1  $\alpha$ . Elles contiennent des sites consensus de liaison GTP extrêmement conservés et des domaines de liaison d'acidoacyl ARNt (Kushnirov *et al.*, 1988). Le domaine C-terminal contenant les acides aminés 254-685 est responsable de la fonction de terminaison de la traduction de la protéine Sup35 et de la viabilité cellulaire

(Kochneva-Pervukhova *et al.*, 1998). Cette protéine a également la capacité de se lier à Sup45p, un homologue de eRF1, en formant ainsi un complexe de terminaison traductionnel. Cependant, cette région à elle seule peut bloquer les effets phénotypiques de [PSI] en fournissant une forme résistante à l'agrégation (anti-supresseur) du facteur de terminaison traductionnel (Ter-Avanesyan *et al.*, 1993; Patino *et al.*, 1996). Dans les cellules [PSI+], la protéine Sup35 peut s'agréger par son domaine N-terminal, ce qui réduit l'efficacité de la terminaison de la traduction et cause le phénotype de supresseur non sens (Figure 7).



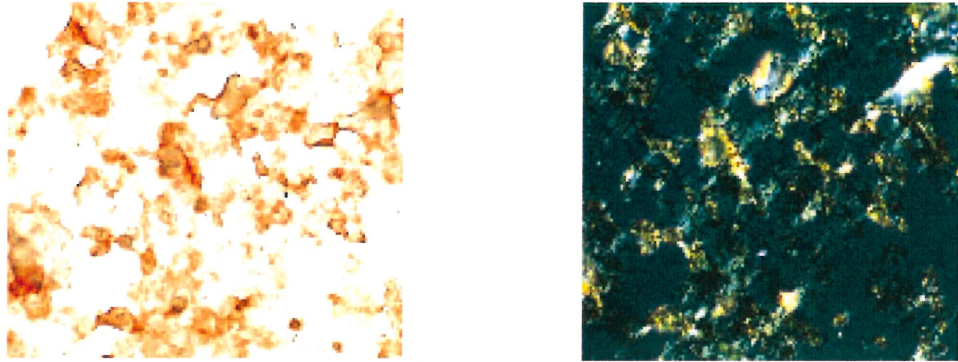
**FIGURE 7. FILAMENTS DE SUP35 OBSERVÉS PAR MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE À TRANSMISSION. (TIRÉ DE KING ET AL., 1997).**

D'un autre côté, les séquences des régions N-terminale et du milieu sont beaucoup moins conservées que celle de la région C-terminale, et peuvent se distinguer par leur composition en acides aminés inhabituelle. La région du milieu est hautement chargée et sa fonction demeure encore vague, malgré le fait qu'elle semble interagir également avec la protéine Sup45 (Paushkin *et al.*, 1997). La région N-terminale est propre à Sup35p (Kushnirov *et al.*, 1998). Elle est très riche en glutamine (28%), en glycine (17%), en asparagine (16%) et en tyrosine (16%) (Kushnirov *et al.*, 1988), et contient quelques répétitions imparfaites de la séquence nonapeptidique PQGGYQQYN (Glover *et al.*, 1997). Cette région démontre également une résistance à la digestion protéolytique dans les cellules [PSI+].

Dans les souches normales de levure, Sup35p se retrouve sous forme soluble. Cependant, dans les cellules [PSI+] , la majeure partie du Sup35p présent est insoluble et ceci est transmis de génération en génération (Patino *et al.*, 1996; Paushkin *et al.*, 1996). La région C-terminale, quant à elle, s'accumule sous forme soluble dans *E. coli*, même lorsqu'exprimé à des taux élevés, tout comme la région du milieu (Paushkin *et al.*, 1996). Des expériences ont appuyé l'hypothèse de la protéine seule pour la transmission de [PSI+], puisque la présence d'une forme alternative insoluble de Sup35p dans les cellules [PSI+] facilite la conversion du Sup35p nouvellement synthétisé à ce même état insoluble (Glover *et al.*, 1997). Ces filaments peuvent avoir au moins deux structures différentes. Une fois qu'une de ces structures est initiée, ce procédé devient autopropagatif, continuant sur toute la longueur du filament. Le temps de formation des filaments indique que ce procédé est autocatalytique (Glover *et al.*, 1997).

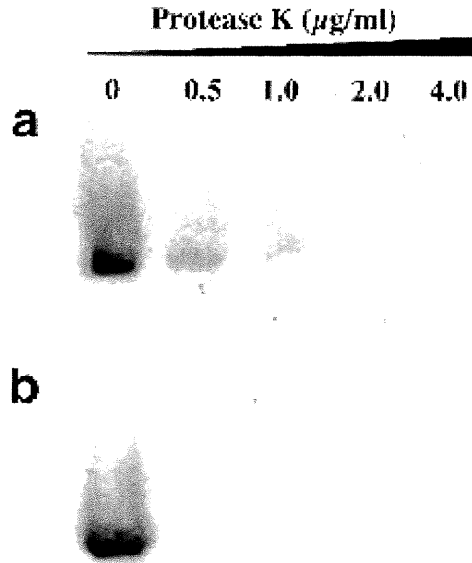
#### 1.4.2.2 Propriétés de Sup35p

Les propriétés de type amyloïde de Sup35p comprennent la coloration au Rouge Congo (Glover *et al.*, 1997; King *et al.*, 1997; DePace *et al.*, 1998), où l'on peut voir les échantillons montrer une coloration rouge au microscope optique et une birefringence verte en microscopie optique polarisée (King *et al.*, 1997) (Figure 8). Le rouge Congo lié démontre un changement spectral avec une différence maximale à 540nm (Glover *et al.*, 1997), ce qui est similaire aux protéines de type amyloïde (Klunk *et al.*, 1989).



**FIGURE 8. FILAMENTS DE SUP35P COLORÉS AU ROUGE CONGO OBSERVÉS PAR (A) MICROSCOPIE OPTIQUE ET (B) MICROSCOPIE OPTIQUE POLARISÉE (TIRÉ DE KING ET AL., 1997).**

Une analyse Scatchard de la liaison du Rouge Congo aux filaments préformés indique une moyenne de 4.4 sites de liaison par monomère, avec un  $K_d$  de 250nM (Glover *et al.*, 1997). La formation de filaments possédant un contenu élevé en feuillets  $\beta$  est une autre méthode d'identification des protéines de type amyloïde. Le spectre de dichroïsme circulaire des filaments matures montre un minimum à 218 nm, ce qui est caractéristique des structures riches en feuillets  $\beta$ . Finalement, une résistance accrue des agrégats à la digestion par la protéinase K a été observée lorsqu'elle est comparée à un contrôle ne contenant pas d'agrégats (King *et al.*, 1997) (Figure 9).



**FIGURE 9. RÉSISTANCE À LA DIGESTION PAR PROTÉINASE K SELON DIFFÉRENTES CONCENTRATIONS.**

*En (a), filament insoluble formant des agrégats et en (b), filament soluble ne formant pas d'agrégat (tiré de King et al. 1997)*

Cette capacité des filaments préformés à induire la formation de nouveaux filaments et de réduire le temps de latence d'agrégation, est une indication d'un processus nucléaire de formation des filaments. L'ajout d'une solution ayant des filaments de Sup35p à une solution contenant du Sup35p soluble peut causer le recrutement de ce dernier, en augmentant ainsi la formation de filaments. La cinétique peut fournir une explication pour la transmission de [PSI+], puisque la réversion spontanée de [PSI+] en [psi-] est rare. En effet, il est difficile de former de nouveaux sites de nucléation. Une fois formée, la propagation du déterminant [PSI+] peut, par la suite, recruter des peptides nouvellement synthétisés pour former des filaments. De nouveaux sites de nucléation sont ainsi créés et ainsi de suite. Ce même mécanisme de propagation a été suggéré pour la propagation des prions (Caughey *et al.*, 1995; Brown *et al.*, 1991). Bref, le domaine C-terminal serait essentiel pour la

viabilité cellulaire, alors que le domaine N-terminal serait essentiel pour la viabilité de [PSI+] (Ter-Avanesyan *et al.*, 1994).

La preuve que la propagation de [PSI+] est causée par un changement de conformation de Sup35p plutôt qu'à une mutation est démontrée par l'observation de la protéine Hsp104 (Hsp104p). C'est une protéine dont une des fonctions connues est d'altérer l'état conformationnel des autres protéines et qui joue un rôle déterminant dans la transmission de [PSI+] (Parsell *et al.*, 1994; Chernoff *et al.*, 1995). Hsp104 est une protéine chaperone induite par un stress environnemental (Patino *et al.*, 1996). Elle est impliquée dans la thermotolérance. Elle permet une augmentation du taux de survie jusqu'à 1000x suite à une exposition à des températures extrêmes (Sanchez and Lindquist, 1993) en favorisant la réactivation des protéines endommagées par la température et qui ont commencé à s'agréger (Parsell *et al.*, 1994). Les cellules [PSI+] peuvent également se convertir en cellules [psi-] lorsque l'expression de Hsp104 est éliminée par la délétion du gène *hsp104*, causant ainsi la solubilité de Sup35p (Patino *et al.*, 1996). Il a été démontré que la protéine de levure Hsp104 peut directement interagir avec Sup35p, PrP et le peptide  $\beta$ -amyloïde 1-42 (Schirmer and Lindquist, 1997). Elle favoriserait même la conversion prionique de PrP (DeBurman *et al.*, 1997). Ceci indique que les analogues de Hsp104p chez les mammifères pourraient également interagir avec ces protéines et participer à la formation de prions. DeBurman *et al.* (1997) ont montré qu'en présence de la forme infectieuse de PrP (PrP<sup>SC</sup>), Hsp104p accélère le taux auquel PrP<sup>C</sup> devient résistant à la protéase, ce qui est une des caractéristiques des prions.

#### 1.4.2.3 Homologie avec les prions

L'utilisation de Sup35p comme modèle pour les prions est basée sur plusieurs analogies entre les deux protéines. PrP<sup>SC</sup> interagit avec les molécules PrP<sup>C</sup> et induit ces derniers à changer de conformation. Les maladies à prions se propagent par un changement se perpétuant indéfiniment dans la structure de la protéine cellulaire normale, sans vecteur d'acide nucléique présent. Avec le prion de levure [PSI+], un processus semblable produit un nouvel état métabolique transmissible, de nouveau sans participation d'acide nucléique. Il y a également une protéine chaperone, la

protéine X, qui serait impliquée dans le développement des maladies à prions, jouant possiblement un rôle similaire à celui de Hsp104p (Telling *et al.*, 1995). Les propriétés de Sup35p dans les cellules [PSI+] sont altérées et similaires à celles de PrP<sup>SC</sup>. Sup35p démontre une augmentation de la résistance aux protéases. De plus, elle est principalement retrouvée sous forme de filaments, en plus de sa capacité à lier le Rouge Congo, spécifique aux filaments de type amyloïde (Patino *et al.*, 1996; Paushkin *et al.*, 1996).

Il n'y a, par contre, aucune homologie de séquence entre Sup35p et les PrP des eukaryotes supérieurs. Néanmoins, certaines caractéristiques de séquences primaires sont communes aux deux. Premièrement, ils ont une composition inusitée d'acides aminés. D'ailleurs, des programmes prédisant les structures secondaires suggèrent que ces régions possèderaient un très haut degré de flexibilité. Deuxièmement, PrP et Sup35p possèdent, à répétitions, de petits peptides dans leur région N-terminale respective (Prusiner, 1994; Weissman, 1994; Wilson and Culbertson, 1988; Kushnirov *et al.*, 1988). Dans Sup35p, les répétitions sont PQQYQQYN et chez les prions de mammifères, ces octapeptides sont PHGGGWGQ. Cependant, ces répétitions ne sont pas nécessaires au pouvoir infectieux des prions (Prusiner, 1994). La délétion de cette séquence dans le PrP mammifère ne prévient pas la formation de PrP<sup>SC</sup>, mais sa présence est une caractéristique de plusieurs EST (Prusiner, 1994; Weissman, 1994). Les similarités fondamentales entre [PSI+] et PrP résident principalement dans leurs mécanismes de propagation. D'ailleurs, comme il y a un temps de latence dans la formation de filaments, ceci indiquerait que Sup35p aurait une cinétique similaire à celle des filaments de type amyloïde comme les prions (Jarret and Lansbury, 1993; Lomkin *et al.*, 1993; Jarret and Lansbury, 1992; Come *et al.*, 1993; Colon and Kelly, 1992; Wood *et al.*, 1996). En principe, toute protéine pouvant se modifier et se transmettre de façon autocatalytique pourrait devenir un prion (Wickner, 1995).

En résumé, beaucoup d'intérêt a été accordé récemment à la dégradation des prions à cause des multiples possibilités de contamination iatrogène en milieu hospitalier. Les recherches effectuées en ce sens dans notre laboratoire permettront



peut-être d'ouvrir une nouvelle voie afin d'assurer la sécurité des patients exposés, à leur insu, à des instruments chirurgicaux potentiellement contaminés.

## **Chapitre 2. Résultats**

Article 1. Degradation of Prion-like proteins by oxidative sterilization processes

## Article 1. Degradation of Prion-like proteins by oxidative sterilization processes

Julien, K., Tabrizian, M., Marchand, R., Belhumeur, P. and Yahia, L'H.

### ABSTRACT

Transmissible Spongiform Encephalopathies have become a great concern, particularly after the revelation that iatrogenic contamination can occur, following the use of contaminated surgical instruments and grafts of various types. The issue addressed in this article is the sterilization of a prion model, the Sup35 protein of *Saccharomyces cerevisiae*, by oxidative processes, such as Sterrad® 100 (Johnson and Johnson), in order to assess the potential of these techniques for the degradation of prions. It was observed that autoclaving and exposure to ethylene oxide had little effect on Sup35, results that are similar to those obtained following the exposure of prions to these processes. However, exposure to Sterrad® 100 caused a substantial degradation of the Sup35 protein, which leads to believe that these techniques could be quite effective against prions themselves.

### INTRODUCTION

Transmissible Spongiform Encephalopathies, such as scrapies and bovine spongiform encephalopathy (BSE) in animals and Creutzfeld-Jakob disease in humans, are provoked by the intracellular accumulation of an abnormal isoform of a membrane sialoglycoprotein, called PrP<sup>SC</sup> or prion. This pathogenic protein, PrP<sup>SC</sup>, is an isoform of a normal host protein, PrP<sup>C</sup>, encoded by the PRNP gene on the short arm of chromosome 20. The PrP<sup>SC</sup> infectious particle is derived from the cellular PrP<sup>C</sup> following a post-translational process where PrP<sup>C</sup> undergoes a change of conformation<sup>1,2</sup>. They have an increased resistance to nucleic acid degrading techniques, such as proteases and ultraviolet irradiation, which emphasizes the “protein-alone” hypothesis. Pathogenesis can arise from genetic inheritance of mutations in the *PRNP* gene encoding PrP<sup>C</sup>, as a sporadic disease where susceptibility is determined by homozygosity (met/met or val/val) for a naturally occurring polymorphism at codon 129, and finally by iatrogenic transmission. For

instance, sporadic CJD represents 87% of the recorded cases, while 8% are genetic and 5% results from iatrogenic contamination<sup>3</sup>.

The sterilization of prions presents a great challenge due to their increased resistance to commonly used sterilization techniques, thereby increasing the possibilities of iatrogenic contamination following the use of contaminated neurosurgical instruments, for example. Resistance of prions to autoclaving at 121°C or alkylating agents such as ethylene oxide has been clearly demonstrated. Indeed, at 121°C, 99.9999% of the protein is degraded within two minutes<sup>4</sup>. This indicates a certain sensitivity of prions to this method; however, this does not completely eliminate the risk of iatrogenic contamination. Moreover, the use of 88% ethylene oxide appears completely inefficient for the destruction of prions<sup>5</sup>.

A steam autoclave cycle of 1 hour at 132°C or immersion in 1N sodium hydroxide or hypochlorite for 1 hour at room temperature are the actual recommended procedures to insure complete degradation of the prions<sup>6</sup>. However, these techniques present major inconvenients such as the deformation of thermosensitive polymers or the corrosion of metals entering in the fabrication of the medical devices.

Therefore, it has become imperative to develop new sterilization techniques that would maintain the integrity of the instruments while completely degrading the protein. One of the alternative techniques could be the use of oxidizing agents, such as plasma-based sterilizers, for the degradation of prions. It is known that certain amino acids, such as cysteine, methionine, tryptophan, tyrosine, histidine and phenylalanine are sensitive to oxidative damage, such as an exposition to aqueous ozone in a pH-dependant manner<sup>7</sup>. Moreover, the use of gas plasma, having a strong oxidizing power itself, could have a comparable effect to that of ozone. However, little has been reported on the effect of gas plasma on proteins, and more particularly prions.

Another problematic aspect is the direct manipulation of prions. Using prions can pose a danger for the researcher performing the experiments, since several cases of occupational transmission of CJD have been reported<sup>8</sup>. An interesting protein model to assess various properties of prions is the budding yeast *Saccharomyces*

*cerevisiae* protein, Sup35 (Sup35p). Indeed, the N-terminal portion of Sup35p has the ability *in vitro* to switch to an alternate “abnormal” conformation, and presents striking similarities to prions, such as its insolubility, its high resistance to proteolysis, and its ability to form amyloid-like filaments mostly constituted of  $\beta$ -sheets rather than  $\alpha$ -helices<sup>9</sup>. It also appears that the N-terminal region of Sup35p is sufficient to produce these highly ordered aggregates in the form of long, rigid fibers that can bind Congo red and have substantial  $\beta$ -sheet structure<sup>10</sup>, both diagnostic of the amyloid fibers associated with transmissible spongiform encephalopathies<sup>11,12</sup>. This conformational change induces and maintains propagation of [PSI+], a non-Mendelian genetic factor responsible for the prion-like characteristics of Sup35p. This [PSI+] phenotype increases the suppression of nonsense mutations<sup>13</sup> and is a yeast homologue of the eukaryotic translation termination factor eRF3.

Overall, our objectives were to purify this Sup35 protein, which would constitute an interesting model for studying the effects of oxidative sterilization techniques on prions, due to its striking similarities to the latter. This was followed by characterization assays, such as Transmission Electron Microscopy (TEM) and Circular Dichroism spectroscopy (CD), to insure that Sup35p did indeed change conformation into a prion-like protein. The protein does spontaneously convert itself *in vitro* into its filamentous conformation when placed into the appropriate buffers. After confirming this, we finally evaluated the efficacy of various sterilization techniques for the degradation of Sup35p.

## *MATERIALS AND METHODS*

### **Bacterial strains**

For cloning experiments, the *Escherichia coli* SURE strain was routinely used (InVitrogen). For protein expression and purification, expression plasmid was transformed into the *E. coli* BL21(pRep4) strain (Novagen).

### **DNA manipulations and protein purification**

Standard DNA techniques have been described previously<sup>14</sup>. DNA sequencing was performed at Institut Armand Frappier DNA sequencing facilities (Montreal,

Canada). Protein expression/purification procedures were performed as described by the manufacturer (Clontech).

### **Cloning of the aggregating N-terminal domain of Sup35 in a bacterial expression vector**

Plasmid pRS316 containing the *sup35* gene were obtained from Dr. Ter-Avanesyan (Institute of Experimental Cardiology, Cardiology Research Center, Russia). The N-terminal fragment (1-759bp) of the gene was amplified by PCR using the following primers: (a) 5'- AGTGGATCCTCGGATTCAAACCAAGGCAA – 3' (introducing a BamHI restriction enzyme site, underlined), and (b) 5' - CGCGTCGACATCGTTAACACCTCCGTC – 3' (introducing a Sall restriction enzyme site, underlined), as indicated in Glover *et al.* (1997). The fragment was then cloned into pT7Blue3 (Perfectly Blunt Cloning Kit - Novagen) into the SURE *E. coli* strain (Invitrogen) and positive clones were sequenced to assess any mutation or deletion in the gene. The *Sup35* insert was then excised using the BamHI and Sall restriction enzymes, and the fragment was then inserted into the pQE30 vector (Qiagen) using these same sites and overexpressed in BL21[pREP4] for protein purification.

Induction of a 1L of bacterial culture (OD<sub>600</sub> of 0.8) was done using IPTG (final concentration of 1mM) for an hour at room temperature. The cells were harvested, resuspended in 50ml of Buffer B (8M urea, 0.1M Na-phosphate, 0.01M Tris HCl pH 8.0), sonicated and centrifuged at 10 000xg for 15 min at 4°C. The supernatant was then collected and loaded onto a Ni<sup>2+</sup>-NTA column (TALON metal affinity resin; Clontech) for affinity chromatography using a pH gradient with the denaturing 8M urea purification protocol from Qiagen. The samples were analyzed by SDS-PAGE (gel electrophoresis technique used to estimate the size and amount of the protein) and by Western Blot using a mouse anti-histidine antibody (Qiagen) against the 6-histidine tail present in the pQE30 vector, in order to specifically detect the protein. After separation of the proteins on SDS-PAGE and electroblotting onto nitrocellulose, the membrane was incubated with the primary antibody (anti-HIS RGS, from Qiagen, 1:2000) in 10 mM Tris pH 7.5, 100 mM NaCl (TBS) with 5% Non fat milk, 0.1% Tween 20 for an hour. There were then 3 washes (10 minutes

each) with TBS 0.1% Tween20. Detection was performed with the BM Chemiluminescence Kit using an anti-mouse antibody coupled to horseradish peroxidase (1:4000) (Roche Diagnostics). Membranes were finally exposed onto radiographic films and developed.

### **Filament induction and analysis**

To induce the formation of the filaments, a 6- to 12-hour dialysis of the protein (9  $\mu$ M, in 8M urea solution) at room temperature against either a 2M urea, 30mM Tris-HCl pH 8.0, 300mM NaCl (referred to as “2M urea”) solution or 0.1% Trifluoroacetic acid, 40% acetonitrile solution (referred to as “TA”) or a Tris/EDTA solution (10 mM Tris pH 8,0 EDTA 1mM, “TE”) was performed.

### **Transmission Electron Microscopy (TEM)**

Samples (50  $\mu$ l) of the filament suspension were sedimented by ultracentrifugation (178000 $\times$ g, 20min, Beckman Airfuge) onto a carbon-formvar coated copper grids (3mm diameter, 200 mesh). These grids were then negatively stained by 3% (wt/vol) PTA (Phosphotungstic acid) and by 2% (wt/vol) uranyl acetate for 1 minute each. The samples were then observed using a Transmission Electron Microscope Hitachi H-7100 at 75 kV.

### **Circular Dichroism (CD) Spectroscopy**

CD spectra of a 9  $\mu$ M filament suspension (2M urea) were recorded on a Jasco J710 Spectropolarimeter at room temperature using a 0.05cm pathlength cell. Samples were scanned with the following settings: scan speed: 100nm/min; response time: 0.25 sec; accumulations: 3 (empty cell), 5 (buffer alone) and 10 (protein samples); sensitivity: 50mdeg; starting wavelength: 260nm; ending wavelength: 200nm

### **Sterilization assays**

We used autoclaving at 121°C for an hour and Sterivac® (ethylene oxide) as negative controls; Sterrad® 100, which uses a combination of hydrogen peroxide and gas plasma as sterilizing agents was used as our experimental process. The samples were submitted to one entire cycle of each process. Following this, the degradation of Sup35p was evaluated.

10  $\mu$ g of protein was placed in glass tubes and exposed to the sterilization processes described in Table 1. Degradation of the protein was assayed by SDS-

PAGE using Silver Nitrate and Coomassie Blue coloration as well as TEM micrographs (filament formation). Immunological detection using chemiluminescence (described above) was also used, following the sterilization processes.

Table 1. Sterilization cycles used for the evaluation of the degradation of Sup35p.

<i>Sterilization process</i>	<i>Sterilizing agent</i>	<i>Cycle</i>	<i>Time required for complete cycle</i>
<b>Autoclave</b>	Water Vapor and Heat	Temperature:121°C Pressure: 1 atm	1 hour
<b>Sterivac<sup>®</sup>, 3M</b>	Ethylene Oxide (EO)	(a) Temperature:56.6°C (b) Preheating time:30 min. (c) Sterilization time:2h10 (d) Ventilation time:12 h	Approx. 16 hours
<b>Sterrad<sup>®</sup> 100, Johnson and Johnson</b>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> and gas plasma	(a) vacuum (0.3 torr) : 5-20min (b) injection of H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 58% + H <sub>2</sub> O : 6min (c) diffusion (0.5 torr) : 44min (d) plasma : 15min (e) ventilation : 5min.	Approx. 75-95 min.

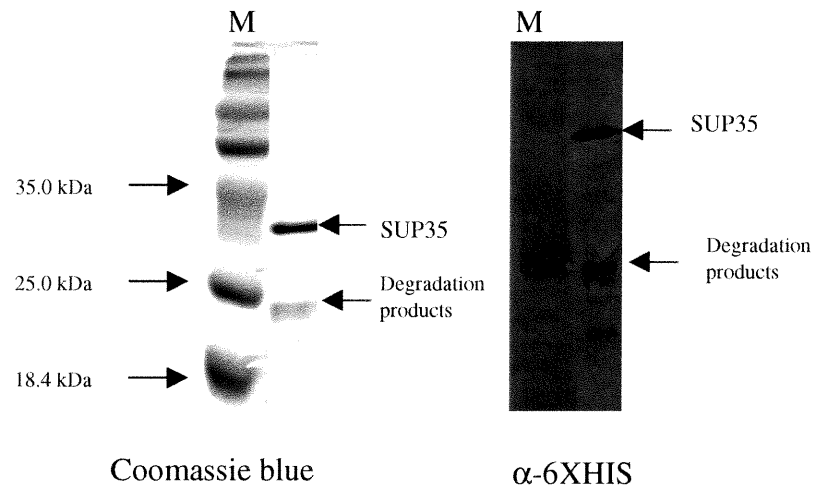


## RESULTS

### *Purification and Characterisation of SUP35 N-protein*

The *sup35* gene encodes a 76.5 kDa ribosome-associated protein. However, it has previously been demonstrated that the maintenance or the *de novo* appearance of [PSI<sup>+</sup>] only requires the N-terminal region of the Sup35 protein<sup>15,16,17,18</sup> more particularly the first 114 amino acids<sup>19,20,21</sup>. DNA primers, similar to those already described to amplify the first 639 nucleotides including and from the initiation codon, using a genomic clone provided by Dr. Ter-Avanesyan<sup>22</sup>, were used. The expressed protein, purified under denaturing conditions, has an apparent molecular weight of 30 kDa, as estimated by SDS-PAGE analysis (Fig. 1, left-hand panel). Identity of the protein observed by Coomassie staining of the gel was confirmed, using an antibody raised against the 6XHIS tag, which is present in the bacterially-expressed protein due to its incorporation in frame at the N-terminus of the peptide (Fig. 1, right-hand panel).

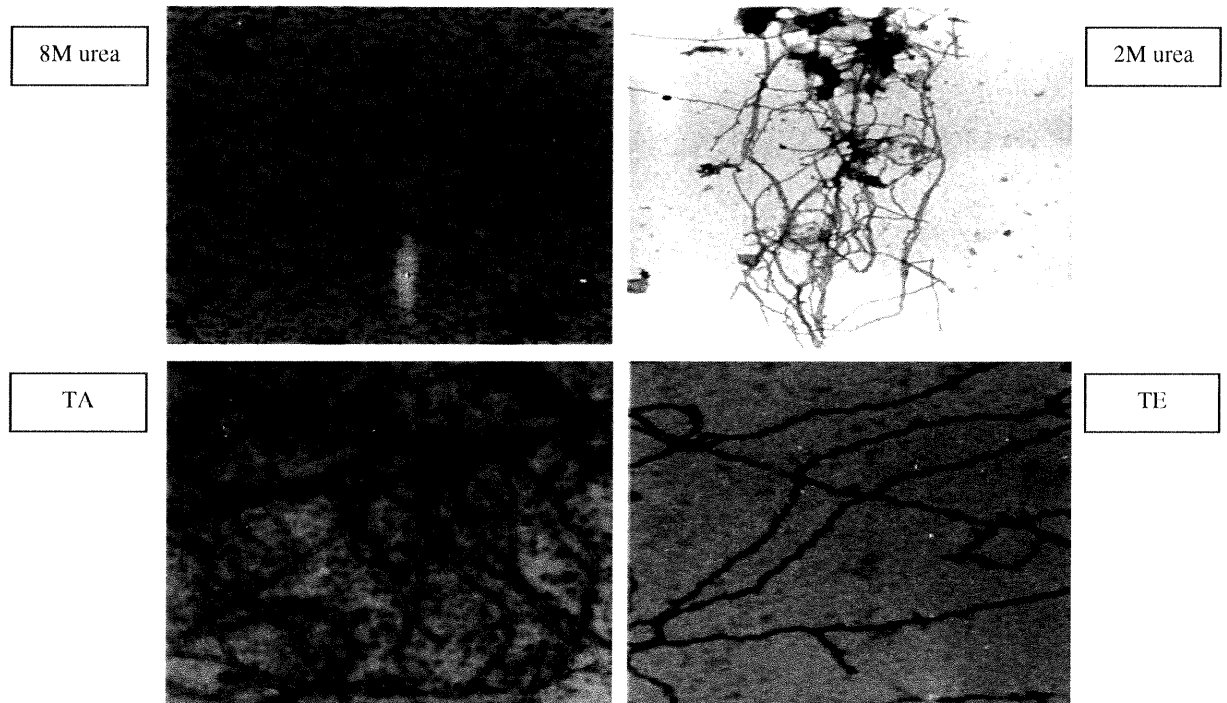
FIGURE 1. Production of the SUP35 N-terminal segment. Bacterially-expressed protein from purified through nickel chromatography (Materials and Methods) and protein samples were analyzed by 12% SDS-PAGE and Coomassie Blue staining (left-hand panel) and Western blotting with an antibody against the 6XHIS tag (right-hand panel).



To ensure that the purified Sup35p N-protein was behaving similarly to prions, we then investigated its ability to undergo ordered aggregation, forming amyloid-like filaments. Those can be observed by transmission electronic microscopy (TEM). TEM images of protein suspension in 8M urea or slowly dialyzed against 2M

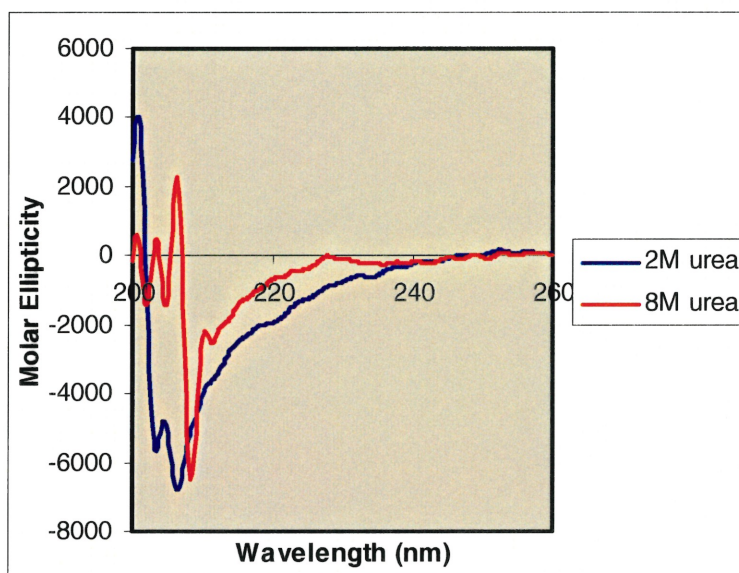
urea, Trifluoroacetic acid/acetonitrile 0.1%/40% (TA) or 10mM TrisHCL/1mM EDTA pH8 (TE) solution and maintained at 4 °C for a week are shown in Figure 2. Indeed, Sup35p, unless in 8M urea solution (even for weeks at 4 °C), tends to form aggregates easily observed by TEM analysis.

FIGURE 2. Transmission Electron Microscopy of Sup35 N-terminal segment in different solutions. Bacterially-produced protein in 8M urea was dialyzed against either 2M urea, Trifluoroacetic acid/acetonitrile 0.1%/40% (TA) or Tris-EDTA (TE), maintained for one week at 4°C and processed for TEM. (Scale: 1 cm = 100 nm)



Moreover, extensive aging of the solutions containing Sup35p should exhibit  $\beta$  sheet-like characteristics, with a single differential absorption minimum near 220 nm when analyzed by circular dichroism. As it can be seen in Figure 3, it is possible to distinguish a spreading of the peak of protein in 2M urea (ordered aggregates) from the random coiling of Sup35p in the 8M urea solution.

FIGURE 3. Circular Dichroism analysis of Sup35 N-terminal protein



*In the 2M urea solution, a decrease in the molar ellipticity at 220nm of the protein indicates an increase in the quantity of  $\beta$  sheet-like properties, thereby indicating an increase in aggregate formation.*

From these results, the bacterially expressed N-portion of the Sup35 protein behaves as expected and exhibits many biochemical features resembling to prions.

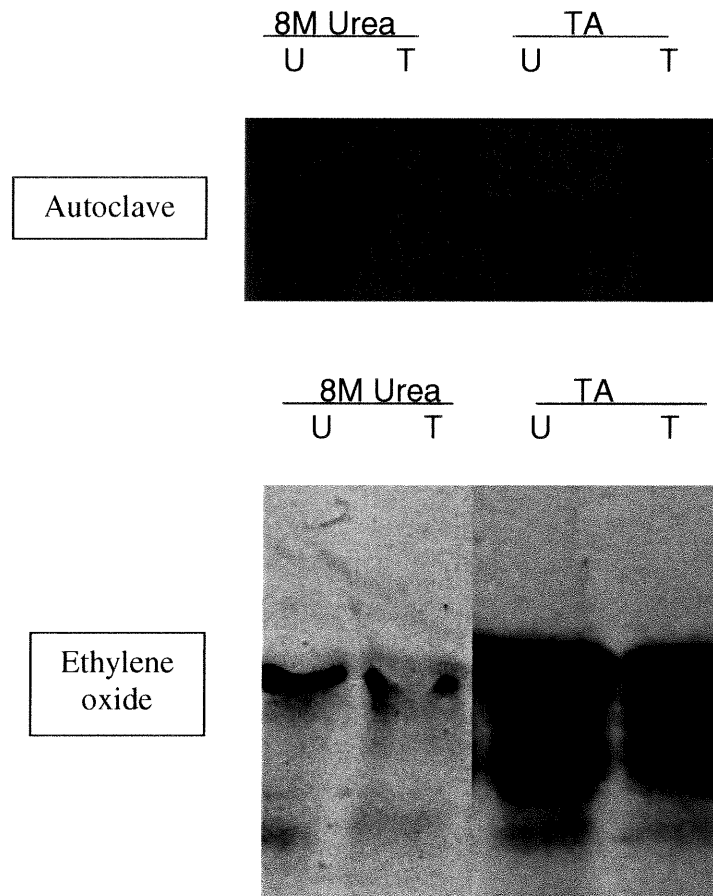
#### *Sup35p Stability to Various Sterilizing Process*

We then proceeded to the evaluation of the efficacy of sterilizing treatments, based on their impact on the integrity of the Sup35p. Samples of the Sup35 protein, kept under different forms (8M urea, 2M urea, TA and TE) were processed and then analyzed by SDS-PAGE and/or Western blotting.

We first confirmed that classical autoclave sterilization cycle was unable to destroy the Sup35 protein as it is the case for prions. No intact protein could be

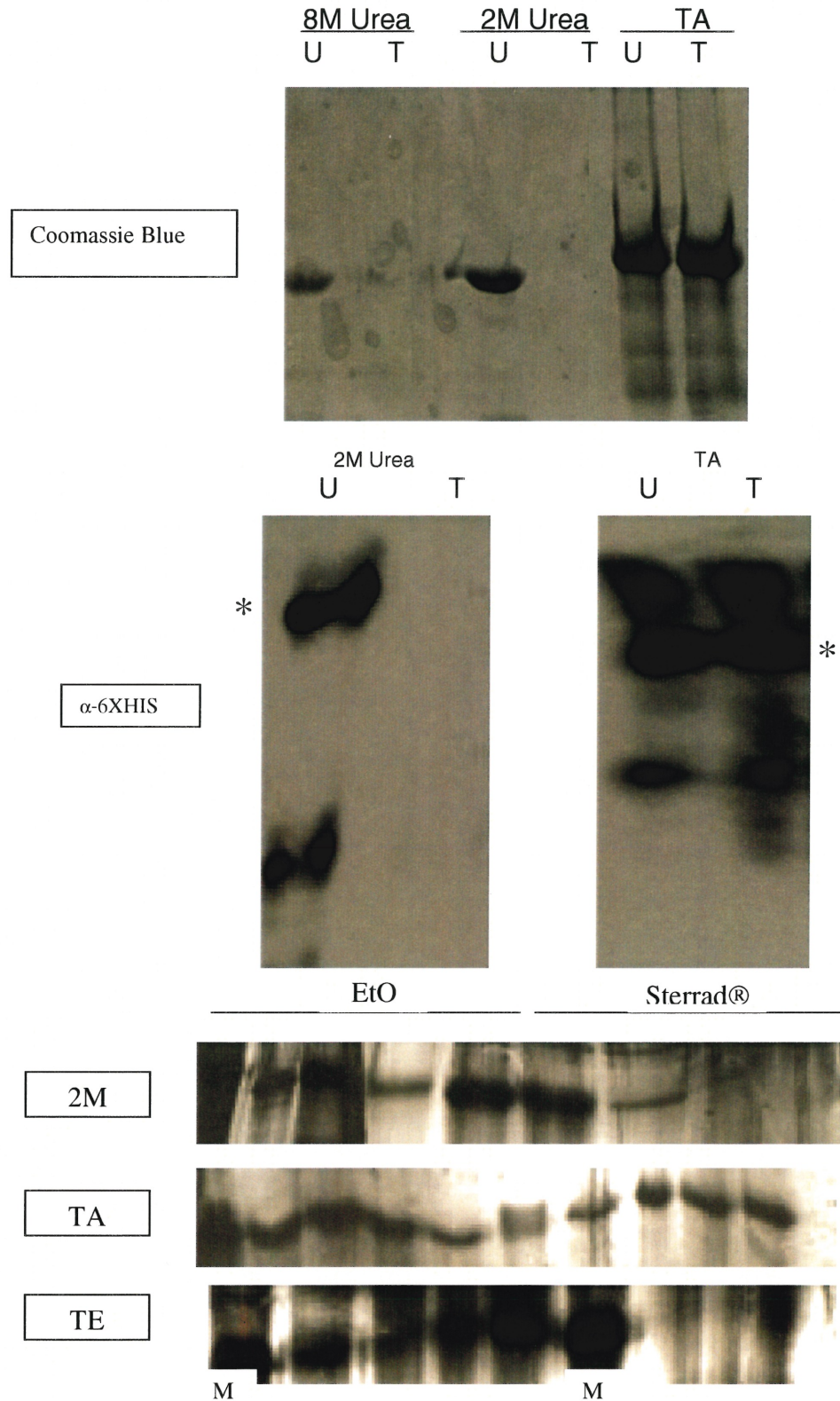
recovered from Sup35p kept in 8M urea (no aggregates) after autoclave while filaments from the Sup35 protein in TFA were resistant to degradation, as seen from Coomassie staining of the SDS-PAGE (Fig. 4, top panel). Similar results were obtained when the same samples were exposed to ethylene oxide (Fig. 4, bottom panel). From these results, it is possible to conclude that autoclave and ethylene oxide treatments are unable to degrade the orderly aggregated Sup35 protein.

FIGURE 4. Effect of autoclave and ethylene oxide treatments on Sup35 N-segment protein integrity. Sup35 protein in 8M urea or in TA was processed for sterilization and then analyzed for integrity by 12% SDS-PAGE and Coomassie Blue staining. (U refers to untreated and T, to treated samples)



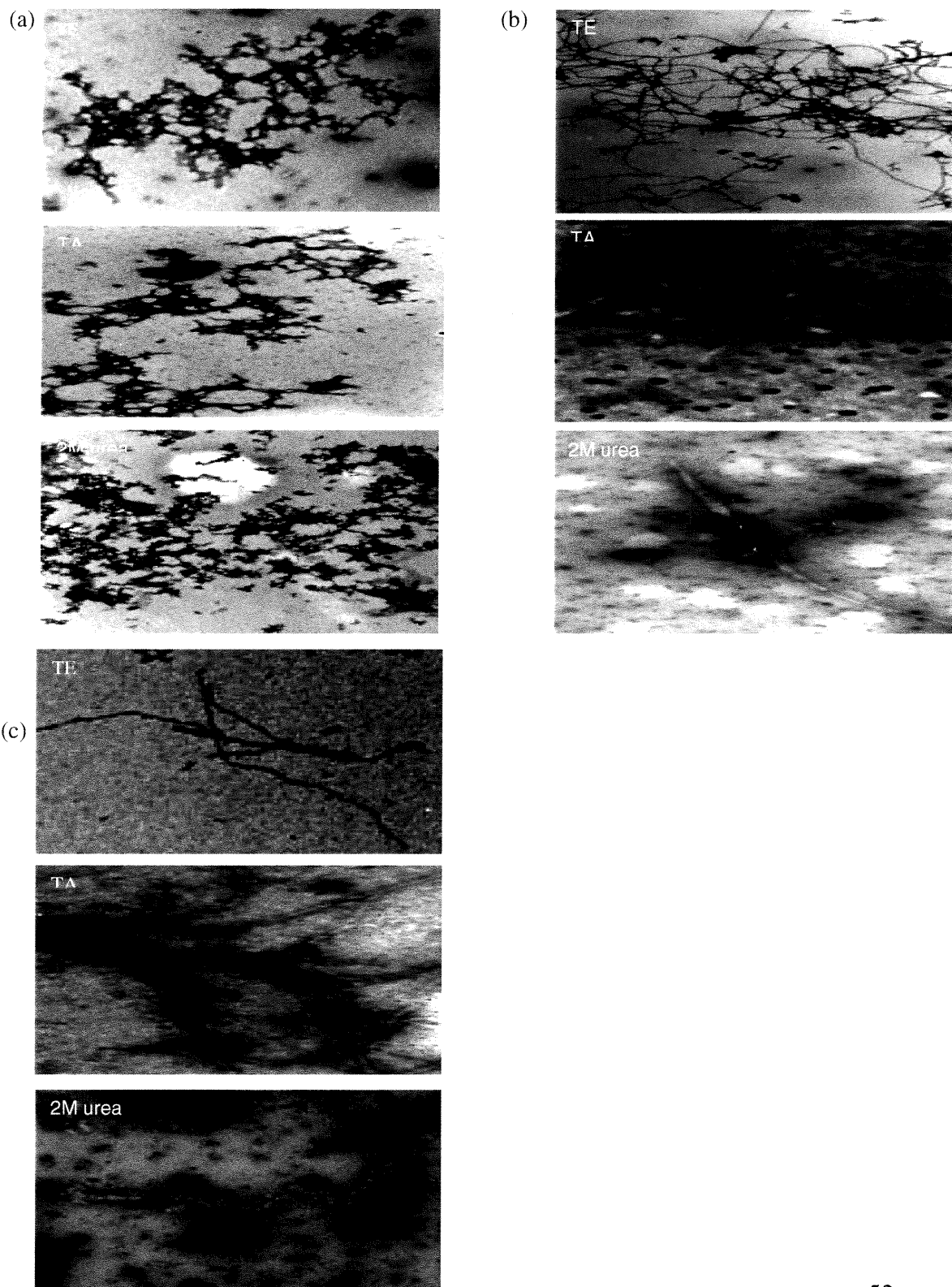
On the other hand, the 8M urea and 2M urea proteins were degraded upon treatment to the Sterrad® 100 treatment (oxidative process, combining hydrogen peroxide and gas plasma). Aggregates of the 2M urea protein could be destroyed by this treatment. Aggregates of the TA protein, however, resisted to the sterilizing process as evaluated by the intact protein seen in the Coomassie Blue stained gel (Fig. 5, top panel). To increase the sensitivity of the detection technique and to ensure that this treatment could indeed degrade the filaments of the 2M urea Sup35 protein, Western blot analysis was performed using an antibody detecting the 6XHIS tag present at the N-terminus of the bacterially-expressed protein (Fig. 5, middle panel). Moreover, to increase detection sensitivity of any residual protein, silver nitrate staining was also performed (Fig. 5, bottom panel). These experiments show that the Sterrad® 100 process can degrade the aggregates of the Sup35 protein kept in 2M urea. The only resistance observed was in the samples of the Sup35 placed in TA. There are two possible explanations for these unexpected results. First, there could have been an interaction between the Trifluoroacetic acid/acetonitrile and the hydrogen peroxide used as the sterilizing agent in Sterrad systems, which could have inhibited the oxidative potential of this process. This increased resistance could also have been caused by the protonation of the protein by TA solution, which would render the protein less susceptible to oxidizing effect of hydrogen peroxide.

FIGURE 5. Effect of Sterrad® 100 treatment on Sup35 N-segment integrity. Sup35p samples in 8M urea, 2M urea or Trifluoroacetic acid/acetonitrile 0.1%/40% (TA) were processed and the remaining intact protein was analyzed by 12% SDS-PAGE revealed by Coomassie Blue staining (top panel), Western blot analysis, with an antibody against 6XHIS tag (middle panel) and silver nitrate staining of the samples exposed to EtO (control) and Sterrad® is displayed in the bottom panel (U refers to untreated, T to treated samples, M to the marker and \* in Western blot panel to intact Sup35p)



Degradation results obtained by SDS-PAGE analysis were confirmed by TEM microphotographs. As it can be seen in Fig. 6, Sup35 filaments kept in 2M urea, TA or TE were all resistant or intact after autoclave treatment (top row). Filaments were also unaltered by ethylene oxide treatment, which is consistent with the literature (Rosenberg et al., 1986). However, and confirming the previous data shown earlier, there was destruction of the Sup35 filaments when exposed to the Sterrad® 100 cycle except for the Sup35 kept in TA (bottom row).

FIGURE 6. Transmission electronic microphotographs of Sup35 N-segment protein, following various treatments. Sup35 filaments from 2M urea, acetonitrile 40% (TA) or Tris-EDTA (TE) was processed for autoclave (a), ethylene oxide (b) or Sterrad® 100 (c) sterilizing cycles and then observed by TEM.





## DISCUSSION

The [PSI+] non-Mendelian genetic element was first described by Brian Cox in 1965<sup>23</sup>. [PSI+] is a genetic element found in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* and is inherited in a dominant cytoplasmic fashion<sup>24</sup>. Indeed, the cytosolic transmission of the altered phenotype of [PSI+] is based on the inheritance of an altered protein structure, Sup35, rather than on an altered nucleic acid.<sup>25</sup> [PSI+] therefore consists solely of protein, which produces a heritable change in phenotype by switching to an altered and self-perpetuating structural form<sup>26,27</sup>. The yeast [PSI+] factor causes an increase in the suppression of nonsense mutations, brought about by an increased tendency of ribosomes to read through stop codons.

The N-terminal domain of Sup35p plays a key role in the [PSI+] phenomenon, since it is required for the [PSI+] maintenance and propagation *in vivo* and is solely responsible for the Sup35p prion conversion and oligomerization into amyloid-like fibrils *in vitro*<sup>28,29,30,31,32,33,34</sup>. Overexpression of Sup35 N-terminal causes the spontaneous appearance of [PSI+] cells<sup>35</sup> and initiates the aggregation of Sup35; deletion of the N-terminal domain causes curing of [PSI+]<sup>36,37,38</sup>. The N-terminal region (a.a. 1-123) also contains certain amino acids that are sensitive to oxidative damage<sup>39</sup>, among which methionine (1), phenylalanine (3) and tyrosine (20).

The model of yeast prion based on Sup35p was used to study the effect of various sterilization techniques due to its remarkable similarities to prions. Another major advantage of using the yeast model is that *Saccharomyces cerevisiae* is a unicellular eukaryote, which possesses the cellular complexity of higher organisms, without the complex interactions of multicellular organisms. Moreover, it is as easy to manipulate as bacteria, and *S. cerevisiae* itself has been thoroughly studied and completely sequenced, implying a better understanding of its mechanisms<sup>40</sup>.

In order to purify the protein, the *sup35* gene was first amplified by PCR using the primers previously used by Glover *et al.*<sup>41</sup>, yielding a DNA fragment of 639 nucleotides as observed by gel electrophoresis (not shown). Following this, the fragment was cloned into the pT7Blue-3 vector for subsequent sequencing to ensure that no deletion or mutation had occurred, since these could prevent filament formation or delay the process. It had been previously observed that a single amino

acid substitution in one of the repeats in Sup35p could prevent the establishment and the maintenance of [PSI+]<sup>42</sup>. Also, the deletion of amino acids 22-69 can induce a slower formation of filaments, in both seeded and unseeded reactions and prevents the formation of new [PSI+] elements *in vivo*<sup>43,44</sup>.

The purification of the Sup35 protein was performed with a Ni<sup>2+</sup>-NTA column for affinity chromatography, using a pH gradient for the elution of the protein. In normal yeast strains, Sup35 protein is found in soluble form; however, in [PSI+] strains, most Sup35 is insoluble, and this is inherited from generation to generation<sup>45,46</sup>. Since the N region is mostly insoluble when expressed in *E. coli*, it was purified in the presence of denaturant such as 8M urea<sup>47</sup>, yielding a protein of approximately 30kDa observed by SDS-PAGE gels and Western Blots using an anti-histidine antibody specific to the 6-histidine tail present in the pQE30 vector (Figure 1). It was previously shown that when the concentration of urea is gradually reduced, the protein spontaneously aggregates forming filaments<sup>48</sup>, hence justifying the dialysis in solutions of 2M urea, TA or TE that was performed. No filament aggregation was observable after two days since fibers start forming after a lag phase, whose duration depends, among other things, on the protein concentration. That is why the protein was placed at 4°C for a week to induce the formation of filaments.

This protein undergoes ordered aggregation to form amyloid-like filaments, which is responsible for the propagation of [PSI+]<sup>49,50</sup>. In an article by King<sup>51</sup>, it was observed that two or more filaments could associate laterally to form fibrillar structures with a larger diameter. This aggregation process was observed mainly by transmission electron microscopy (Figure 2), where it can be seen that the dialysis in 2M urea, TA or TE is sufficient to induce the formation of filaments, without precipitation of the protein due to the lowering of the denaturant concentration. In these experiments, no aggregation of Sup35 was observed in the 8M urea, even after several weeks.

Coomassie Blue coloration of SDS-PAGE gels demonstrated that autoclaving at 121°C is sufficient to degrade the denatured protein in 8M urea while the protein in TFA remains resistant to the process (Figure 4), i.e. no degradation of Sup35p is observable. Similar results were obtained when the samples were exposed to ethylene

oxide (Figure 4). Exposition of the Sup35p to Sterrad® 100 sterilizing cycle yielded particularly interesting results. The 8M urea and 2M urea proteins were degraded by the process, which was expected since Sterrad® 100 is an oxidative process. The protein in TA, however, appeared to be resistant to this sterilization cycle. Since the maximum sensitivity of Coomassie Blue staining is of the order of 0.1µg, these assays were revised using Silver Nitrate staining, which has a sensitivity range of 0.1 – 1.0 ng, to ensure that no undetected residual protein remained after the sterilization cycle. Similar results to those obtained with Coomassie Blue staining were observed. As well, to guarantee the specificity of the protein observed, chemiluminescence using an anti-histidine antibody conjugated to horseradish peroxidase was used to observe the degradation of the protein. Again, the process degraded the 2M urea protein, while the TA protein remains resistant.

All the degradation results obtained by SDS-PAGE electrophoresis were confirmed by TEM micrographs (Figure 6), where it was seen that the protein filaments of 2M urea, TA and TE were resistant to autoclaving (Figure 6a), although they were slightly altered by the process. The filaments were unaltered by ethylene oxide (Figure 6b), when placed in either 2M urea, TA or TE, which is consistent with the literature. Alkylating agents alone, rather than degrade proteins, seem to protect it from degradation. However, the protein was degraded when exposed to Sterrad® 100, with the exception of the TA protein, which remained undegraded (Figure 6c).

### **Sterrad® 100 process**

The results reveal the potential of the Sterrad system for the degradation of prions, considering its ability to degrade our prion model based on Sup35p. The only resistance observed is in the samples of the Sup35p placed in TFA/acetonitrile. There are two possible explanations for these unexpected results. First, there could have been an interaction between the TFA/acetonitrile and the hydrogen peroxide used as the sterilizing agent in Sterivac®, which could have inhibited the oxidizing potential of this process. This enhanced resistance to degradation could also have been caused by a protonation of the protein by the TFA/acetonitrile, which would have rendered the protein less susceptible to oxidative damage. Nonetheless, the choice of a suitable

dialysis solution, such as 2M urea or Tris/EDTA, which limited the possible interactions with the sterilizing agents, yielded promising results. However, several assays remain to be performed, such as validation of these results with prions themselves, for instance. Obviously, prions being proteins that are susceptible to oxidative damage, all oxidative processes could definitely have a great potential for the sterilization of medical instruments to avoid iatrogenic contamination.

Therefore, the choice of Sterrad® 100 technique was based on these oxidative damage data, primarily because of the use of oxidative H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and gas plasma in the process itself. It was observed that the hydrogen peroxide phase, and not the gas plasma phase, was very sporicidal.<sup>52</sup> Spores of *B. stearotherophilus* ATCC 7953 (peroxide sterilization), *B. subtilis* var. *niger* ATCC 9372 (dry heat/ethylene oxide) and *B. pumilus* ATCC 27142 (irradiation) were exposed to Sterrad® 100 to evaluate the sporicidal effect of its sterilization cycle. Nonetheless, the gas plasma phase remains critical to remove any peroxide radical and toxic residues, which could soil medical devices following sterilization (detoxifying role)<sup>53</sup>. Therefore, this technique may have three major advantages, when compared to other sterilization techniques. First and foremost, this low temperature process does not damage heat-sensitive medical equipment; there are no toxic residues following a sterilization cycle and these sterilization cycles are relatively rapid since the equipment is available for reuse within an hour, without a desorption period, like in the case of ethylene oxide<sup>54</sup>.

### **Potential use of Sup35 as a biological indicator of oxidative sterilization processes**

Spores were previously considered the organism the most resistant to sterilization, because they can withstand extremes of pH and temperature, including boiling water, for surprisingly long periods of time. The thermal resistance is brought about by the low water content, since spores are small, dehydrated quiescent forms, and by the presence of large amounts of a substance only found in spores, calcium dipicolinate. The resistance to chemicals and radiation is caused by the extremely tough special coats surrounding the spore, which include the spore membrane, the thick cortex composed of a special form of peptidoglycan, a coat consisting of a

cysteine-rich keratin-like insoluble structural protein, and finally, an external lipoprotein and carbohydrate layer called exosporium. Although the resistance of spores is obvious, Sterrad® 100 has been proven to destroy bacteria to a “safety insurance level” of  $10^{-6}$ <sup>55</sup>. Along with ensuring the destruction of bacterial spores, oxidative processes could be a new avenue for the degradation of prions, since it was able to degrade our prion model under specific conditions. Another problematic aspect of sterilization is that the use of spores is no longer appropriate to insure the sterility of medical devices. Indeed, spores might be sensitive to processes to which prions would resist. Therefore, new indicators of sterilization have to be developed. One of these possible concepts would be the use of prions, or prion models, indicating the effective completion of the sterilization cycle, demonstrating the degradation of prions, and thereby, the destruction of any organism.

## CONCLUSION

Due to its striking similarities with prions, the Sup35 protein of *Saccharomyces cerevisiae* was used to assess the efficacy of oxidative sterilization processes on the degradation of the protein. It was observed that, when compared to the reference sterilization techniques proven to be ineffective against prions (autoclaving and ethylene oxide), Sterrad® 100 was actually capable of significantly degrading the protein. However, further testing with the prion protein itself is required in order to ensure that these techniques are indeed efficient in the degradation of prions. Moreover, considering that these processes could potentially have an impact on the materials used in the fabrication of medical devices, in-depth study of the oxidative effects on materials should be performed as well to confirm an upholding of their integrity.

---

<sup>1</sup> Wille, H., Baldwin, M.A., Cohen, F.E., DeArmond, S.J. and Prusiner, S.B. (1996) In *The nature and origin of amyloid fibrils*, Wiley: Chichester, p.181-201.

<sup>2</sup> Lehmann, S. (1996) *Medecine/Sciences* **12**, 949-958.

<sup>3</sup> Turner, M.L. and Ironside, J.W. (1998) *Blood Reviews* **12**, 255-268.

<sup>4</sup> Rohwer, R. G. (1984) *Science* **223**, 600-602.

<sup>5</sup> Steelman, V.M. (1994) *American Journal of Infection Control* **22**, 312-318.

<sup>6</sup> Steelman, V.M. (1994) *American journal of Infection control* **22**, 312-318.

<sup>7</sup> Mudd, J.B., Leavitt, R., Alpaslan, O and McManus, T.T. (1969) *Atmospheric Environment* **3**, 669-682.

<sup>8</sup> Steelman, V.M. (1994) *American Journal of Infectious Control* **22**, 313-317.

<sup>9</sup> King, C.Y., Tittmann, P., Gross, H., Gebert, R., Aebi, M. and Wuthrich, K. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 6618-6622.

<sup>10</sup> Glover, J.R., Kowal, An.S., Schirmer, E.C., Patino, M. M., Liu, J.J. and Lindquist, S. (1997) *Cell* **89**, 811-819.

<sup>11</sup> Sipe, J.D., (1994) *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **31**, 325-354.

<sup>12</sup> Kelly, J.W. (1996) *Curr. Opin. Struct. Biol.* **6**, 11-17.

<sup>13</sup> Glover, J.R., Kowal, An.S., Schirmer, E.C., Patino, M. M., Liu, J.J. and Lindquist, S. (1997) *Cell* **89**, 811-819.

<sup>14</sup> Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. *Molecular cloning : a laboratory manual*, Cold Spring Harbor, NY : Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

<sup>15</sup> Chernoff, Y.O., Derkatch, I.L., and Inge-Vechtomov, S.G. (1993) *Curr. Genet.* **24**, 268-270.

<sup>16</sup> Ter-Avanesyan, M.D., Kushnirov, V.V., Dagkesamanskaya, A.R., Dichenko, S.A., and Chernoff, Y.O. (1993) *Mol. Microbiol.* **7**, 683-692

<sup>17</sup> Derkatch, I.L., Chernoff, Y.O., Kushnirov, V.V., Inge-Vechtomov, S.G. and Liebman, S.W. (1996) *Genetics* **144**, 1375-1386.

<sup>18</sup> Patino, M.M, Liu, J.J., Glover, J.R. and Lindquist, S. (1996) *Science* **273**, 622-626.

<sup>19</sup> Ter-Avanesyan, M.F., Dagkesamanskaya, A.R., Kushnirov, V.V. and Smirnov, V.N. (1994) *Genetics* **137**, 671-676.

<sup>20</sup> Chernoff, Y.O., Derkach, I.L. and Inge-Vechtomov, S.G. (1993). *Current Genetics* **24**, 268-270.

<sup>21</sup> Derkatch, I.L, Chernoff, Y.O., Kushnirov, V.V., Inge-Vechtomov, S.G. and Liebman, S. (1996). *Genetics* **144**, 1375-1386.

- <sup>22</sup> Glover, J.R., Kowal, An.S., Schirmer, E.C., Patino, M. M., Liu, J.J. and Lindquist, S. (1997) *Cell* **89**, 811-819.
- <sup>23</sup> Wickner, R.B., Masison, D.C., and Edskes, H.K. (1995) *Yeast* **11**, 1671-1685.
- <sup>24</sup> Cox, B.S., Tuite, M.F. and McLaughlin, C.S. (1988) *Yeast* **4**, 159-178.
- <sup>25</sup> Glover, J.R., Kowal, A.S., Chirmer, E.C., Patino, M.M., Liu, J.J. and Lindquist, S. (1997) *Cell* **89**, 811-819.
- <sup>26</sup> Wickner, R.B. (1994) *Science* **264**, 566-569.
- <sup>27</sup> Lindquist, S. (1997) *Cell* **89**, 495-498.
- <sup>28</sup> Paushkin, S.V., Kushnirov, V.V., Smirnov, V.N, and Ter-Avanesyan, M.D. (1996) *EMBO J.* **15**, 3127-3134.
- <sup>29</sup> Ter-Avanesyan, M.D., dagkesamanskaya, A.R., Kushnirov, V.V., and Smirnov, V.N. (1994) *Genetics* **137**, 671-676.
- <sup>30</sup> Doel, S.M., McCready, S.J., Nierras, C.R. and Cox, B.S. (1994). *Genetics* **137**, 659-670.
- <sup>31</sup> Paushkin, S.V., Krunirov, V.V., Smirnov, V.N., and Ter-Avanesyan, M.D. (1997) *Mol. Cell. Biol.* **17**, 2798-2805.
- <sup>32</sup> Doel, S.M., McCready, S.J., Nierras, C.R. and Cox, B.S. (1994). *Genetics* **137**, 659-670.
- <sup>33</sup> Ter-Avanesyan, , M.D., dagkesamanskaya, A.R., Kushnirov, V.V., and Smirnov, V.N. (1994) *Genetics* **137**, 671-676.
- <sup>34</sup> Wickner, R.B. (1994) *Science* **264**, 566-569.
- <sup>35</sup> Chernoff, Y.O, Derkach, I.L. and Inge-Vechtomov, S.G. (1993) *Curr. Genet.* **24**, 268-270.
- <sup>36</sup> Doel, S.M., McCready, S.J., Nierras, C.R. and Cox, B.S. (1994). *Genetics* **137**, 659-670.
- <sup>37</sup> Ter-Avanesyan, M.F., Dagkesamanskaya, A.R., Kushnirov, V.V. and Smirnov, V.N. (1994) *Genetics* **137**, 671-676
- <sup>38</sup> Masison, D.C. and Wickner, R.B. (1995) *Science* **270**, 93-95.
- <sup>39</sup> Kushnirov, V.V., Ter-Avanesyan, M.D., Telckov, M.V., Surguchov, A.P., Smirnov, V.N. and Inge-Vechtomov, S.G. (1988) *Gene* **66**, 45-54.
- <sup>40</sup> Dubeau (1982) Ph. D. Dissertation, Université de Montréal.
- <sup>41</sup> Glover, J.R., Kowal, An.S., Schirmer, E.C., Patino, M. M., Liu, J.J. and Lindquist, S. (1997) *Cell* **89**, 811-819.
- <sup>42</sup> Doel, S.M., McCready, S.J., Nierras, C.R. and Cox, B.S. (1994). *Genetics* **137**, 659-670.
- <sup>43</sup> Ter-Avanesyan, , M.D., Kushnirov, V.V., Dagkesamanskaya, A.R., Dichenko, S.A., and Chernoff, Y.O. (1993) *Mol. Microbiol.* **7**, 683-692
- <sup>44</sup> Derkach, I.L., Chernoff, Y.O., Kushnirov, V.V., Inge-Vechtomov, S.G. and Liebman, S.W. (1996) *Genetics* **144**, 1375-1386.
- <sup>45</sup> Patino, M.M, Liu, J.J., Glover, J.R. and Lindquist, S. (1996) *Science* **273**, 622-626.
- <sup>46</sup> Paushkin, S.V., Kushnirov, V.V., Smirnov, V.N. and Ter-Avanesyan, M.D. (1996) *EMBO J.* **15**, 3127-3134
- <sup>47</sup> Glover, J.R., Kowal, An.S., Schirmer, E.C., Patino, M. M., Liu, J.J. and Lindquist, S. (1997) *Cell* **89**, 811-819.
- <sup>48</sup> Glover, J.R., Kowal, An.S., Schirmer, E.C., Patino, M. M., Liu, J.J. and Lindquist, S. (1997) *Cell* **89**, 811-819.
- <sup>49</sup> Paushkin, S.V., Kushnirov, V.V., Smirnov, V.N. and Ter-Avanesyan, M.D. (1996) *EMBO J.* **15**, 3127-3134.
- <sup>50</sup> Patino, M.M., Liu, J.J., Glover, J.R. and Lindquist, S. (1996) *Science* **273**, 622-626.
- <sup>51</sup> King, C.Y., Tittmann, P., Gross, H., Gebert, R., Aebi, M. and Wuthrich, K. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 6618-6622.
- <sup>52</sup> Krebs, M.C., Becasse, P., Verjat, D. and Darbord, J.C. (1998) *International Journal of Pharmaceutics* **160**, 75-81
- <sup>53</sup> Krebs, M.C., Becasse, P., Verjat, D. and Darbord, J.C. (1998) *International Journal of Pharmaceutics* **160**, 75-81
- <sup>54</sup> Krebs, M.C., Becasse, P., Verjat, D. and Darbord, J.C. (1998) *International Journal of Pharmaceutics* **160**, 75-81.
- <sup>55</sup> Krebs, M.C., Becasse, P., Verjat, D. and Darbord, J.C. (1998) *International Journal of Pharmaceutics* **160**, 75-81

### **Chapitre 3. Résultats additionnels non publiés sur l’ozone**

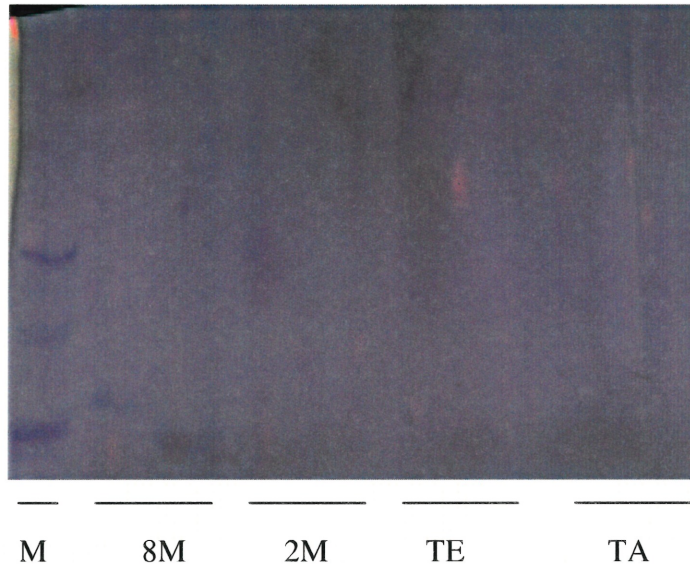
L’ozone, qui a un pouvoir oxydant puissant tel que décrit au Chapitre 1, est un agent de stérilisation potentiel des prions. Pour évaluer ce potentiel, des échantillons ont été préparés selon la méthodologie décrite dans l’article 1 du Chapitre 2. Ils ont été exposés à un quart du cycle de stérilisation à l’ozone. Il est impossible de développer davantage sur ce cycle, considérant qu’il est en instance de commercialisation. Cependant, le fabricant de cet appareil, la compagnie TSO<sub>3</sub> à Québec, nous a indiqué qu’ils ont utilisé les protocoles IN-09-06 (instruction d’utilisation du stérilisateur TSO<sub>3</sub>-125L) et MCB-09-12, faisant référence à la quantité minimale requise pour assurer la stérilisation des spores bactérienne (“D-Value”) pour valider le cycle et l’appareil de stérilisation.

Suite à un quart de cycle d’exposition à l’ozone, il apparaît que le cycle de stérilisation auquel les échantillons de Sup35p ont été soumis n’est pas suffisant pour dégrader complètement la protéine, mais pourrait malgré tout être très prometteur. En effet, sur les gels de SDS-PAGE colorés au Bleu de Coomassie, aucun résidu protéique n’a été détecté, même dans les échantillons provenant de la solution de Trifluoroacide acétique et d’acétonitrile, signe que la protéine serait dégradée en dessous d’une quantité de 0.1µg (Figure 10). Cependant, des résidus de protéines non dégradés ont été détectés dans les échantillons de Tris/EDTA et Trifluoroacide acétique/acétonitrile sur les gels colorés au nitrate d’argent (Figure 11). Ces gels possèdent une sensibilité maximale de 0,1 – 1,0 ng. Pourtant, les micrographies de MET indiquent clairement une fragmentation de la protéine (Figure 12), quoique incomplète, ce qui est indicatif de la dégradation des filaments. Ces derniers corroborent donc le potentiel oxydatif de l’ozone en tant que stérilisant pour les prions.



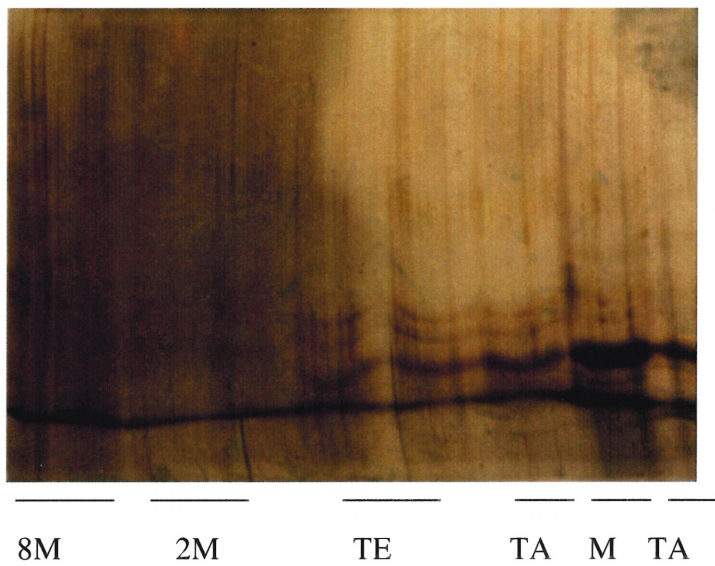
**FIGURE 10. COLORATION AU BLEU DE COOMASSIE D'UN GEL 12% DE SDS-PAGE.**

*Tous les échantillons présents (urée 8M, urée 2M, TE et TA) ont été dégradés*



**FIGURE 11. COLORATION AU NITRATE D'ARGENT D'UN GEL 12% DE SDS-PAGE**

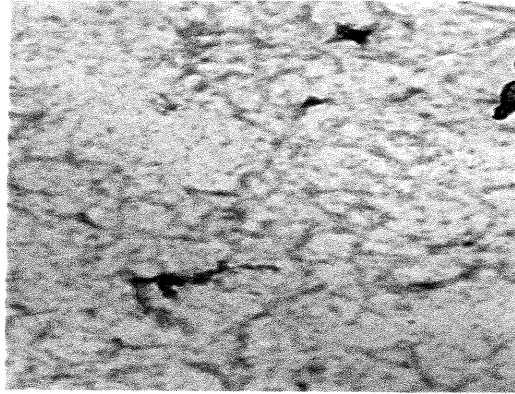
*De nouveau, en augmentant la sensibilité de détection de la coloration, tous les échantillons présents (urée 8M, urée 2M, TE et TA) ont été dégradés*



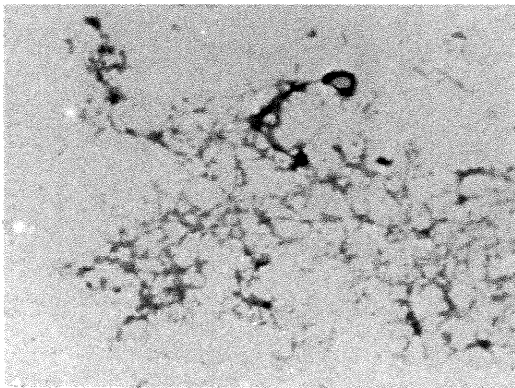
**FIGURE 12. MICROGRAPHIES ELECTRONIQUES SUITE À LA STÉRILISATION À L'OZONE.**

*(a) Fragmentation de la protéine dans l'urée 2M. Le même phénomène est observé en (b), Fragmentation de la protéine dans le TE. (c) Résistance à la stérilisation de la protéine lorsqu'elle est placée dans une solution de TA.*

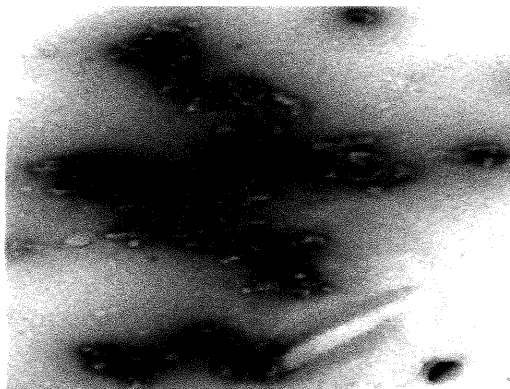
2 M urée



TE



TA



## Chapitre 4. Discussion Générale

### 4.1 Choix du modèle de prion Sup35

Les objectifs principaux de ce mémoire étaient donc de purifier la protéine Sup35, de la levure *Saccharomyces cerevisiae*, afin de l'utiliser ultérieurement pour étudier sa dégradation lorsqu'elle est soumise à divers procédés de stérilisation. Les résultats obtenus pourraient donc servir à établir des protocoles de stérilisation des instruments médicaux contaminés par les prions. Il existe un risque réel pour les médecins ou techniciens manipulant les prions, puisque quelques cas de contamination en milieu de travail ont été rapportés. Un neurochirurgien, trois techniciens en pathologie et un pathologiste, ayant effectué près de 14 000 autopsies, ont contracté la MCJ (Steelman, 1994). Pourtant, il existe un modèle de prion qui peut donc assurer plus de sécurité aux manipulateurs tout en simulant les propriétés intrinsèques des prions. Le choix du prion de levure Sup35p pour étudier la stérilisation des prions mammifères permet d'évaluer efficacement les effets de certaines techniques de stérilisation, principalement à cause de ses propriétés remarquablement similaires à celles des prions. Un autre avantage majeur d'utiliser ce modèle est que *Saccharomyces cerevisiae* est un eucaryote unicellulaire, possédant la complexité cellulaire des organismes supérieurs, sans en avoir, toutefois, la complexité génétique (Dubeau, 1982). De plus, cette levure est aussi facilement manipulable que les bactéries, et son génome, ayant été complètement séquencé, permet une meilleure compréhension de ses mécanismes.

### 4.2 Purification de la protéine Sup35 et préparation des échantillons pour les essais de dégradation

La souche de *Saccharomyces cerevisiae* finalement utilisée a été obtenue du Dr Ter-Avanesyan (Institute of Experimental Cardiology, Cardiology Research Center, 3rd Cherepkovskaya Street 15A, Moscow 121552, Russie) après que plusieurs essais pour la purification de la protéine eurent échoué lorsque l'ADN génomique disponible dans notre laboratoire a été utilisé. Afin de purifier la protéine, seule la portion N-terminal du gène *SUP35* a été amplifiée par PCR. En effet, il a été

démontré que le domaine N-terminal de Sup35p, et plus particulièrement ses 114 premiers acides aminés, jouent un rôle primordial dans le phénomène de [PSI+], puisqu'il est requis pour le maintien et la propagation *in vivo* de [PSI+], et qu'il est le seul responsable de la conversion en prion et de l'oligomérisation de Sup35p en filaments de type amyloïde *in vitro* (Paushkin *et al.*, 1996; Ter-Avanesyan *et al.*, 1994; Doel *et al.*, 1994; Paushkin *et al.*, 1997; Wickner, 1994). Cependant, pour plus de commodité, la séquence complète du fragment N-terminal a été amplifiée, c'est-à-dire les paires de bases 1 à 759.

Afin d'assurer la fidélité de l'amplification du gène, le fragment a été cloné dans un vecteur, pT7Blue3 de Novagen, pour effectuer un séquençage de cet ADN. L'importance de séquencer Sup35 avant l'induction de la formation des filaments a été amplement soulignée dans des études précédentes, puisque toute délétion ou mutation peut altérer la formation des filaments. Une fois la séquence du fragment vérifiée, il a été inséré dans le vecteur pQE30 (Qiagen), couramment utilisé pour la purification de protéines par chromatographie d'affinité en colonne de Ni<sup>2+</sup>-NTA, auquel peut se lier une queue de 6 histidines présente dans le vecteur lui-même. La quantité requise de IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranside), le temps d'induction et la température d'induction appropriée ont également causé problème. Une concentration trop élevée de IPTG inhibait la surexpression dans BL 21 [ pREP4] et une quantité trop faible ne produisait pas de protéine en quantité suffisante. Contrairement à Glover *et al.*, il a été constaté dans nos expériences, qu'une meilleure induction se faisait à 25°C, pour une heure et avec une concentration de 0.5-1 mM d'IPTG.

Le choix du gradient de pH dans un tampon de 8M d'urée, plutôt que l'imidazole pour l'élution de la protéine a été purement aléatoire, mais s'est révélé très efficace. Lorsque tous les paramètres de croissance de culture et d'élution ont été mis au point, il était possible d'obtenir jusqu'à près de 1 mg de protéine par litre de culture. Ces conditions dénaturantes ont été choisies afin d'éviter la précipitation de la protéine lors de sa purification et de sa conservation. En effet, toute protéine, incluant Sup35p, s'avère être soluble dans de telles conditions, permettant ainsi une manipulation plus facile.

De plus, il a été observé qu'une simple dialyse, telle qu'effectuée dans cette étude, est suffisante pour induire la formation de filaments (Glover *et al.*, 1997). Donc, une dialyse lente (minimum 6 heures, effectuée 2 fois) dans des tampons successifs contenant une concentration décroissante d'urée (6M, 4M, et 2M) a été effectuée. Ceci a permis la conservation de la protéine dans un tampon de 2 M urée, sans qu'aucune précipitation ne soit observable. Par la suite, il a été facile de dialyser la protéine dans d'autres tampons appropriés permettant une analyse plus complète, selon l'appareil de caractérisation utilisé puisque certains tampons peuvent interagir avec les composantes de certains appareils. Par exemple, un tampon de TFA (acide trifluoroacétique) et d'acétonitrile est préférable à une solution de 2M urée pour la caractérisation de la protéine par dichroïsme circulaire, puisque l'urée interférant avec l'absorption de la lumière polarisée dans la région des UV lointains, ne permet pas une utilisation appropriée de l'appareil. De plus, l'urée formant des cristaux observables en microscopie électronique à transmission, cause ainsi des artefacts. Cependant, le TFA/acétonitrile réagit très mal en présence de SDS, en causant la précipitation de la protéine dans les gels d'électrophorèse SDS-PAGE suite à l'exposition aux procédés de stérilisation, particulièrement à celui de Sterrad®. Voilà pourquoi l'évaluation de la dégradation de la protéine est très difficile. C'est pour cette raison qu'une solution contenant seulement du Tris/EDTA a été utilisée pour les essais de caractérisation et de stérilisation.

Des problèmes peuvent survenir lors de la caractérisation de la protéine par dichroïsme circulaire si une concentration trop élevée de protéine est utilisée. Pour contourner ce problème, une concentration relativement faible (20µM), permettant de déterminer plus aisément les structures secondaires présentes dans la protéine a été utilisée. Cependant, la protéine contrôlée utilisée pour la quantification d'hélices  $\alpha$  étant dans une solution de 8M urée, en état soluble, il est raisonnable d'émettre l'hypothèse que cette courbe n'est pas nécessairement optimale. Comme mentionné précédemment, l'urée peut interférer avec la lumière dans la région d'UV évaluée. Néanmoins, il était impossible d'utiliser une autre solution, considérant qu'elle induirait immédiatement la formation de filaments, malgré le temps de latence, ce qui de nouveau biaiserait les résultats.

Le choix du support approprié pour l'exposition de la protéine aux différents procédés de stérilisation est également complexe. Certains biomatériaux peuvent réagir avec les agents stérilisants, et c'est pour cette raison qu'un support fait d'un matériau relativement neutre a été sélectionné. Le choix s'est donc porté vers des tubes de verre de faible diamètre, résistants à la chaleur comme à l'oxydation, dans lesquels nous avons placé la protéine en solution que nous avons laissé sécher, tout en effectuant une rotation constante du tube. C'est ce procédé qui a permis de préserver l'échantillon à l'intérieur du tube suite à la stérilisation, tout en minimisant les chances d'avoir des multicouches de protéine et d'observer une interaction entre le matériau et les agents stérilisants, qui auraient pu inhiber la dégradation de la protéine.

#### **4.3 Discussion des résultats obtenus suite aux essais de dégradation de Sup35p**

Pour ce qu'il s'agit du choix des procédés oxydants en tant qu'agents stérilisants des prions, il a déjà été établi précédemment que les prions, constitués de protéines, sont particulièrement sensibles à ce type de dommage. Lorsque le potentiel de dégradation de la protéine Sup35 est évalué, il est possible d'observer que sa région N-terminale (a.a. 1-123) possède quelques acides aminés sensibles au dommage causé par l'oxydation (Kushnirov *et al.*, 1988), comme la méthionine (1), le phénylalanine (3) et la tyrosine (20). Cependant, malgré cette sensibilité, il est impossible d'établir une corrélation directe entre ces acides aminés et les prions, puisque leurs séquences diffèrent énormément et leur pourcentage d'identité se situant autour de 34%. Par contre, étant donné que la protéine de prion possède une quantité plus grande d'acides aminés sensibles au produit oxydant (3 cystéine, 12 méthionine, 11 tyrosine, 9 histidine, 6 phénylalanine, et 29 acides aminés possiblement sensibles), contrairement à 24 acides aminés sensibles dans Sup35, il est possible de présumer que l'effet des agents stérilisants sera équivalent, sinon supérieur, dans la protéine de prion elle-même.

Dans les résultats précédemment mentionnés dans l'article 1, il est possible d'observer que les études effectuées sur la stérilisation du modèle de prion Sup35p sont très concluantes. En effet, ils démontrent que la protéine Sup35, lorsqu'elle est

exposée à l'autoclave à 121°C ou à l'oxyde d'éthylène selon le procédé de Sterivac<sup>®</sup>, résiste à la dégradation, quel que soit le tampon utilisé. Ceci a été démontré par l'emploi de gels de SDS-PAGE colorés au bleu de Coomassie et par l'utilisation de la microscopie électronique à transmission (Figures 4, 5 et 6). La protéine n'est pratiquement pas dégradée comparativement au contrôle selon le gel par électrophorèse. Les micrographies (Figure 6) ont néanmoins montré une certaine modification de la protéine suite à l'exposition à l'autoclave. Malgré l'inefficacité de cette technique pour la dégradation de la protéine, elle demeure quand même un procédé physique relativement efficace, causant ainsi une légère modification de surface de la protéine, sans toutefois être capable de détruire les filaments eux-mêmes. Les gels d'électrophorèse avec une coloration au nitrate d'argent n'ont pas été effectués, puisqu'une résistance de Sup35p a été clairement révélée. Des résultats similaires ont été obtenus en utilisant l'oxyde d'éthylène, sans toutefois observer une quelconque modification de la protéine par MET. L'oxyde d'éthylène est un procédé alkylant qui semble protéger la protéine de la dégradation. Sans nul doute, c'est pour cette raison que les filaments sont demeurés intacts, et que les gels de SDS-PAGE ne démontrent aucune dégradation.

Cependant, lorsque la protéine Sup35 est exposé au procédé de Sterrad<sup>®</sup>, les résultats obtenus sont particulièrement intéressants. Premièrement, la protéine Sup35, lorsqu'elle est placée dans une solution de 2M urée ou Tris/EDTA, est complètement dégradée. Ceci concorde bien avec les hypothèses précédemment établies, c'est-à-dire qu'elle a une sensibilité des acides aminés à l'oxydation. Puisque la coloration au bleu de Coomassie n'est pas assez sensible pour détecter des quantités résiduelles de protéine, une coloration au nitrate d'argent des gels de SDS-PAGE a été effectuée, afin d'assurer une dégradation complète. En effet, le bleu de Coomassie possède une sensibilité maximale de 0,1 µg, en comparaison avec le nitrate d'argent, qui peut détecter des quantités de l'ordre de 0,1-1,0 ng. Or, la dose infectieuse de prions étant de 0,5-5,0 fg, la méthode au nitrate d'argent est nécessaire pour s'assurer de la quantité exacte non dégradée de la protéine Sup35. Le but de ce travail est d'éviter une contamination iatrogène par des instruments médicaux contaminés. Ces gels colorés au nitrate d'argent ont de nouveau prouvé la dégradation de la protéine ou, du

moins, une dégradation à une quantité inférieure à 0,1 ng. Etant donné que des résultats similaires ont été obtenus par MET, il apparaît évident que la protéine est dégradée lorsque placée dans une solution de 2M urée ou de Tris/EDTA. De plus, la chimiluminescence, qui a une sensibilité semblable à celle du nitrate d'argent, a permis de confirmer la spécificité de la protéine. Le premier anticorps utilisé était un anticorps anti-histidine, qui a permis de détecter la queue d'histidine présente dans le vecteur pQE30 utilisé pour la purification de la protéine.

Par contre, lorsque la protéine Sup35 se retrouve dans un tampon d'acide trifluoacétique (TFA) et d'acétonitrile, des résultats inattendus sont observés. La présence de protéine résiduelle, voire intacte, est détectée par gels de SDS-PAGE colorés au bleu de Coomassie et par nitrate d'argent. De même, les filaments observés par MET ne semblaient nullement affectés par ce procédé de stérilisation. Selon nos hypothèses, cette résistance accrue peut provenir de deux sources distinctes. Premièrement, le TFA/acétonitrile du tampon a pu réagir avec le peroxyde d'hydrogène, inhibant ainsi son pouvoir oxydant. De plus, il est recommandé d'éviter les agents oxydants très forts en présence de TFA ou d'acétonitrile, puisqu'ils peuvent réagir avec ces derniers. Deuxièmement, ces composantes chimiques peuvent avoir protoné directement la protéine, inhibant ainsi l'oxydation des acides aminés.

Ceci indique clairement que le tampon utilisé peut grandement influencer la résistance de la protéine Sup35 à la stérilisation. Comme il n'est pas toujours possible de contrôler les paramètres dans lesquels se retrouve la protéine, une résistance parfois inévitable peut survenir. Il est possible de présumer que, dans des conditions similaires, la protéine de prion elle-même démontrera également une certaine résistance.

Contrairement à ce qui a été décrit pour les échantillons exposés à Sterrad®, lors de l'exposition à l'ozone le tampon n'a nullement influencé la finalité de la protéine Sup35. En effet, suite à une coloration au Bleu de Coomassie des gels de SDS-PAGE, aucune protéine non dégradée n'a été détectée. Par contre, lorsque la coloration au nitrate d'argent est utilisée, de la protéine résiduelle est clairement observée dans les échantillons de TE et de TA (article 1), suite à un quart de cycle de stérilisation. Ceci remet l'accent sur l'utilisation de méthodes de détection assez



sensible pour évaluer la possibilité de contamination iatrogène. Cependant, la microscopie électronique de ces échantillons indique sans nul doute possible la dégradation de la majeure partie des filaments. Ceci laisse clairement sous-entendre qu'un cycle complet permettrait probablement la dégradation complète de la protéine, et donc, que cette technique possède malgré tout un potentiel énorme pour la dégradation des prions.

#### **4.4 Autres modèles existants de prions de levure**

Le choix d'un modèle de prion ne peut se faire à la légère. Certaines caractéristiques de base doivent être satisfaites avant de conclure qu'une protéine est similaire aux prions. Par exemple, en levure, celle-ci doit être un élément génétique non-mendélien, transmis par transfert cytoplasmique. Si elle est «guérie», elle peut réapparaître spontanément, même si ce processus se déroule à basse fréquence. Le gène chromosomal codant pour la forme normale de la protéine est requis pour la propagation de la forme prionique. La surproduction de la forme normale devrait augmenter l'apparition de la forme prionique, entre autres (Wickner and Masison, 1996). Selon ces principes, plusieurs modèles de prions de levure sont présents dans la nature. Par exemple, en 1971, Lacroute a isolé certains mutants qui pouvaient utiliser l'uréidosuccinate présent dans le milieu afin de remplacer l'uréidosuccinate généralement produit dans la biosynthèse de l'uracile par la transcarbamylyase aspartate (*Ure2p*) (Lacroute, 1971). Les souches normales peuvent utiliser l'uréidosuccinate seulement lorsqu'elles poussent sur une source très faible en azote, mais cette utilisation est bloquée lorsqu'elles poussent sur une bonne source d'azote, comme l'ammoniaque ou la glutamine. Les mutants découverts par Lacroute peuvent utiliser l'uréidosuccinate malgré la présence d'ammoniaque dans le milieu, causant une dérégulation des enzymes cataboliques de l'azote. Ils ont donc été nommés *ure* pour uréidosuccinate. Parmi ces mutants, on retrouve les mutants *ure2* qui se comportent comme des mutants chromosomaux normaux, et les mutants *URE3* qui ont un caractère dominant et qui démontrent une ségrégation non-mendélienne (Aigle et Lacroute, 1975).

Le caractère non chromosomique de URE3 a été confirmé par cytoduction (une transmission par mélange cytoplasmique sans fusion nucléaire) (Aigle et Lacroute, 1975). Ure3p dépend du gène chromosomique *URE2* pour sa propagation et peut être « guéri » par une croissance sur un milieu riche contenant 5mM de HCl guanidine (Wickner, 1994). De même, [PSI+] peut être éliminé en présence de faibles concentrations d'hydrochloride de guanidine (GuHCl) (Tuite and Cox, 1980), 2.5M de KCl, ou 1.75M d'éthylèneglycol (Singh, 1979). Il peut cependant réapparaître suite à l'expression de Sup35p (Chernoff *et al.*, 1993; Wickner, 1994). Finalement, la surproduction de Ure2p augmente la fréquence d'apparition de *URE3*. Tous ces faits démontrent que plusieurs autres types de prions peuvent exister dans la nature.

#### **4.5 Nécessité de développer de nouveaux indicateurs de stérilisation pour les prions**

Les spores étaient auparavant considérées comme étant les organismes les plus difficiles à stériliser dû à leur résistance particulière. En effet, elles sont des formes déshydratées et métaboliquement passives produites par certaines bactéries en réponses à des stress nutritionnels, par exemple. Les spores de certaines espèces peuvent survivre à des températures ou des pH extrêmes, comme l'eau bouillante. Cette résistance thermique est due au faible contenu en eau et à la présence de grandes quantités d'une substance que l'on peut retrouver uniquement dans les spores, le dipicolinate de calcium. La résistance chimique ou aux radiations est, quant à elle, principalement causée par les couches spéciales entourant les spores. Celles-ci incluent la membrane de la spore, un cortex relativement épais composé d'une forme particulière de peptidoglycane, d'une couche constituée de protéines insolubles riches en cystéine et ressemblantes à la kératine, et finalement, d'une couche externe de lipoprotéines et carbohydrates communément appelée exosporium.

Cependant, depuis l'avènement des prions, il s'avère que les spores ne sont plus appropriées comme indicateur ultime biologique de stérilisation, puisque les prions peuvent résister à des traitements beaucoup plus draconiens que les spores. Ceci remet en question l'utilité de ces spores, car elles ne peuvent plus dorénavant assurer la stérilité des instruments médicaux. Une des perspectives découlant de

l'étude sur la validation de stérilisation de la protéine Sup35 effectuée ici est de montrer que possiblement, ce modèle de prion, pourrait devenir un nouveau contrôle de validation de stérilisation. Etant donné que les prions représentent un danger potentiel, Sup35 pourrait leur être substituée.

En somme, les procédés oxydants tels que Sterrad® et l'ozone sont très prometteurs pour la dégradation des prions, puisqu'ils sont capables de dégrader notre modèle de prion basé sur la protéine Sup35. Suite à ces essais de dégradation, un brevet provisoire, ayant comme fondement l'utilisation de la protéine Sup35 comme indicateur biologique pour la stérilisation des prions, a été déposé. Cependant, il a été démontré que certains paramètres de stérilisation doivent être étudiés attentivement afin de ne pas en renforcer la résistance déjà existante.

## Chapitre 5. Conclusion

Les objectifs de ce mémoire de maîtrise étaient de purifier la protéine Sup35 de la levure *Saccharomyces cerevisiae* afin d'effectuer des essais de stérilisation en utilisant des procédés oxydants. L'importance de ce travail réside principalement dans l'utilité clinique du développement de nouveaux protocoles de stérilisation pour les instruments médicaux contaminés par les prions. En effet, jusqu'à ce jour, aucune technique ne permet d'assurer la dégradation complète de la protéine de prion, ce qui pourrait mener à une contamination iatrogène.

Au cours des expériences effectuées pour ce travail de recherche, nous avons constaté que la protéine Sup35 démontre d'énormes similarités avec les prions. Les études de caractérisation effectuées suite à la purification de la protéine, en utilisant la microscopie électronique à transmission et le dichroïsme circulaire prouvent, sans l'ombre d'un doute, que l'habileté particulière de Sup35 de changer spontanément de conformation pour former des filaments est une caractéristique commune avec les prions. D'autres similarités, telles que la résistance à la protéinase K et la capacité de se lier au Rouge Congo, mais surtout leurs similarités structurales et conformationnelles, en plus de leur méthode de « réplication », ont été clairement énoncées dans les articles scientifiques, renforçant la justesse du choix de ce modèle de prion.

Suite à nos essais de stérilisation par l'ozone et le plasma, nous avons pu observer que la protéine Sup35 est efficacement dégradée, à quelques exceptions près. Malgré cette particularité, il n'en demeure pas moins que ces techniques s'avèrent prometteuses pour la dégradation des prions de mammifères. Cependant, un point crucial reste en suspens: valider ces procédés et le modèle de prion en effectuant des essais sur les prions eux-mêmes. En effet, même si les résultats obtenus sont révélateurs dans le cas de la protéine de levure, ces résultats ne garantissent pas un comportement similaire des prions, d'où l'importance de soumettre les prions à ces mêmes procédés et d'évaluer leur dégradation. Une autre conséquence importante de ce travail est la possibilité de développement d'un indicateur de stérilisation basé sur la protéine Sup35, ce qui permettrait d'attester la

stérilité des instruments médicaux stérilisés en milieu hospitalier, afin d'éviter une contamination iatrogène.

## Remerciements

Il y a beaucoup de gens qui m'ont motivé et inspiré pour l'accomplissement de ce travail. Premièrement, le Dr Maryam Tabrizian, qui a toujours su être disponible et à l'écoute de mes besoins. Elle a été plus qu'une simple associée pour moi et m'a motivé à donner le meilleur de moi-même. Le Dr Pierre Belhumeur, qui m'a aidé lors de mes expériences, et qui m'a fourni un support technique et intellectuel extraordinaire pour compléter adéquatement ces travaux. Les Dr Richard Marchand et L'Hocine Yahia, qui sont à la base même de l'idée de ces expériences, et qui ont énormément cru en moi et m'ont permis de d'exposer ces résultats au monde scientifique.

J'aimerais également souligner la grande participation de tous mes directeurs, co-directeurs et associés dans la soumission du brevet provisoire que nous avons récemment déposé, pour la création d'un indicateur biologique basé sur la protéine Sup35.

Je m'en voudrais d'oublier tous les gens qui se sont impliqués de près ou de loin dans ces travaux. M.Robert Alain, de l'Institut Armand-Frappier qui m'a aidé pour le microscope électronique à transmission, le Dr Gordon Willick qui m'a aidé à analyser les résultats de dichroïsme circulaire, et Martin Clément et Francis Deshaies, du laboratoire du Dr. Belhumeur, qui m'ont aidé à mener à bien mes expériences grâce à leurs connaissances techniques. De plus, plusieurs institutions ont collaboré lors des essais de stérilisation, notamment le centre hospitalier St-Eustache, l'Hôpital Charles Lemoyne et la compagnie TSO<sub>3</sub>, principalement M. Jocelyn Vézina, M. Simon Robitaille et Mme Sylvie Dufresne. Merci également à l'Association des Médecins Microbiologistes Infectiologues du Québec, qui a reconnu mes efforts et mon travail en m'octroyant le prix de la meilleure présentation en 1999.

À tous ceux qui m'ont enduré durant les périodes difficiles et qui ont toujours su me motiver, m'inciter à persévérer grâce à leur enthousiasme et leur inébranlable confiance en moi, principalement mes parents, Sophie, Germain, Mathieu, Hugues, Mélizande, LP, Benjamin, Stéphane, Marc, Sandrine, et tous les autres, un merci du plus profond du coeur.

## Bibliographie

1. Abkevich, V.E., Gutin, A.M. and Shakhnovich, E.I. (1998) Theory of Kinetic Partitioning in Protein Folding with Possible Applications to Prions, *Proteins: Structure, Function and Genetics* **31**: 335-344.
2. Adjou, K.T., Deslys, J-P., Lasmezas, C.I., Demaimay, R., Dormont, D., et Seman, M. (1997) Hypothèses sur les mécanismes d'action de l'amphotéricine B et de ses dérivés dans les encéphalopathies subaiguës spongiformes transmissibles, *Médecine/Sciences* **13**: 892-7.
3. Aigle, M. and Lacroute, F. (1975) Genetical aspects of URE3 a nonmitochondrial cytoplasmically inherited mutatin in yeast, *Molecular and General Genetics* **136(4)**: 327-335.
4. Alves-Rodrigues, A., Gregori, L. and Figueiredo-Pereira, M.E. (1998) Ubiquitin, cellular inclusions and their role in neurodegeneration, *Trends in neurosciences* **21** : 516-520.
5. Bellinger-Kawahara, C.B., Diener, T.O., McKinley, M.P., Groth, D.F., Smith, D.R. and Prusiner, S.B. (1987) Purified scrapie prions resist inactivation by procedures that hydrolyze, modify, or shear nucleic acids, *Virology* **160(1)**: 271-274
6. Bessen, R.A (1996) Neurodegenerative Prion Diseases, *Science and Medecine* **Sept./Oct.** : 12-21.
7. Bodaghi, B. et Hauw, J.J. (1998) Les agents transmissibles non conventionnels, ou « prions », *Journal Français d'Ophtalmologie.*, **21(1)** : 51-69.
8. Brown, D.R. and Mohn, C.M. (1999) Astrocytic Glutamate Uptake and Prion Protein Expression, *GLIA* **25**: 282-292.

9. Brown, D.R., Qin, K., Herms, J.W., Madlung, A., Manson, J., Strome, R., Fraser, P.E., Kruck, T., von Bohrens, A., Schulz-Schaeffer, W., Giese, A., Westaway, D and Kretzschmar, H. (1997) The cellular prion protein binds copper in vivo, *Nature* **390**: 684-687.
10. Brown, D.R., Schulz-Schaeffer, W.J., Schmidt, B., Kretzschmar, H.A. (1997) Prion protein-deficient cells show altered response to oxidative stress due to decreased SOD-1 activity, *Experimental Neurology* **146(1)**: 104-112.
11. Brown, P., Goldfarb, L.G. and Gajdusek, D.C. (1991) The new biology of spongiform encephalopathy: infectious amyloidoses with a genetic twist, *Lancet* **337** : 1019-1022.
12. Brown, P., Rohwer, R.G., Green, E.M. and Gajdusek, D.C. (1982) Effect of Chemicals, Heat and Histopathologic Processing on High-Infectivity Hamster-Adapted Scrapie Virus, *The Journal of Infectious Diseases* **145(5)**: 683-687.
13. Buell , G.C., Tokiwa, Y. and Mueller, P.K. (1965) Potential cross-linking agents in lung tissue, *Archives of Environmental Health* **10** : 213-219.
14. Carrell, R.W. and Gooptu, B. (1998) Conformational changes and disease – serpins, prions and Alzheimer's, *Current opinion in structural biology* **8**: 799-809.
15. Cashman NR, Loertscher R, Nalbantoglu J, Shaw I, Kascsak RJ, Bolton DC, Bendheim PE. (1990) Cellular isoform of the scrapie agent protein participates in lymphocyte activation, *Cell* **61**: 185-192.
16. Caspi, S., Halimi, M., Yanai, A., Ben Sason, S., Taraboulos, A. and Gabison, R. (1998) The Anti-prion Activity of Congo Red, putative mechanism, *The Journal of biological chemistry* **273(6)**: 3484-3489.
17. Caughey, B. (1993) Scrapie associated PrP accumulation and its prevention: insights from cell culture, *British medical bulletin* **49**: 860-872.



18. Caughey, B., Kocisko, D.A. Raymond, G.J. and Lansbury, P.T., Jr. (1995) Aggregates of scrapie-associated prion protein induce the cell-free conversion of protease-sensitive prion protein to the protease-resistant state, *Chemical Biology* **2(12)**: 807-817.
19. Chernoff, Y.O., Derkach, I.L. and Inge-Vechtomov, S.G. (1993). Multicopy SUP35 gene induces de-novo appearance of psi-like factors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Current Genetics* **24(3)**, 268-270.
20. Chernoff, Y.O., Lindquist, S.L., Ono, B.-I., Inge-Vechtomov, S.G., and Liebman, S.W. (1995) Role of the Chaperone Protein Hsp104 in Propagation of the Yeast Prion-Like Factor [psi<sup>+</sup>], *Science* **268** : 880-884.
21. Chesebro, B. (1990) Spongiform Encephalopathies the transmissible agents, in: B.N. Fields and D.M. Knipe (Eds.) *Virology*, vol. 2, Raven Press, New York, pp. 2325-2336.
22. Chiesa, R., Piccardo, P., Ghetti, B. and Harris, D.A. (1998) Neurological Illness in Transgenic Mice Expressing a Prion Protein with an Insertional Mutation, *Neuron* **21**: 1339-1351.
23. Chow, C.K., and Tappel, A.L. (1972) An enzymatic protective mechanism against lipid peroxidation damage to lungs of ozone-exposed rats, *Lipids* **7(8)**: 518-524
24. Colon, W. and Kelly, J.W. (1992) Partial denaturation of transthyretin is sufficient for amyloid fibril formation in vitro, *Biochemistry* **31(36)** : 8654-8660.
25. Combs, C.K., Johnson, D.E., Cannady, S.B., Lehman, T.M. and Landreth, G.E. (1999) Identification of Microglial Signal Transduction Pathways Mediating a Neurotoxic Response to Amyloidogenic Fragments of  $\beta$ -Amyloid and Prion Proteins, *The Journal of Neuroscience* **19**: 928-939.

26. Come, J.E., Fraser, P.E. and Lansbury, P.T. Jr. (1993) A kinetic model for amyloid formation in the prion diseases: importance of seeding, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **90(13)**, 5959-5963.
27. Conseil d'Évaluation des technologies de la Santé du Québec. La réutilisation des cathéters à usage unique et les risques de transmission de la maladie de Creutzfeldt-Jakob. Rapport, Mai 1997 (CÉTS97-4RF).
28. Cox, B.S., Tuite, M.F., McLaughlin, C.S. (1988) The psi factor of yeast: a problem in inheritance *Yeast* **4(3)**: 159-178.
29. Cross, C.E., Reznick, A.Z., Packer, L, Davis, P.A., Suzuki, Y.J. and Halliwell, B. (1992) Oxidative Damage to Human Plasma Proteins by Ozone, *Free Radical Research Communications*. **15(6)** : 347-352.
30. Dagkesamanskaya, A.R. and Ter-Avanesyan, M.D. (1991) Interaction of the yeast omnipotent suppressors SUP1(SUP45) and SUP2(SUP35) with non-mendelian factors, *Genetics* **128(3)**: 513-520.
31. Darbord, J.C. (1999) Inactivation of prions in daily medical practice, *Biomedical pharmacotherapy* **53**: 34-38.
32. DebBurman, S.K., Raymond, G.J., Caughey, B. and Lindquist, S. (1997) Chaperone-supervised conversion of prion protein to its protease-resistant form, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **94(25)**: 13938-13943.
33. Decq, P. (1998) Application des Recommandations concernant la Décontamination et la Stérilisation des Instruments utilisés au Bloc Opératoire de Neurochirurgie et le Risque de Contamination de la Maladie de Creutzfeldt-Jakob, *Neurochirurgie* **44(4)**: 292-293.
34. DePace, A.H., Santoso, A., Hillner, P. and Weissman, J.S. (1998) A Critical Role for Amino-Terminal Glutamine/Asparagine Repeats in the Formation and Propagation of a Yeast Prion, *Cell* **93** : 1241-1252.

35. Derkatch, I.L, Chernoff, Y.O., Kushnirov, V.V., Inge-Vechtomov, S.G. and Liebman, S. (1996) Genesis and variability of [PSI] prion factors in *Saccharomyces cerevisiae*, *Genetics* **144(4)**: 1375-1386.
36. Dodelet, V.C. and Cashman, N.R. (1998) Prion protein expression in human leukocyte differentiation, *Blood* **91(5)**: 1556-1561.
37. Doel , S.M., McCready, S.J., Nierras, C.R. and Cox, B.S. (1994). The dominant PNM2- mutation which eliminates the psi factor of *Saccharomyces cerevisiae* is the result of a missense mutation in the SUP35 gene, *Genetics* **137(3)**: 659-670.
38. Doillon, C.J., Drouin, R., Coté, M.F., Dallaire, N., Pageau, J.F. and Laroche, G. (1997) Chemical Inactivators as Sterilisation agents for Bovine Collagen Materials, *Journal of biomedical materials research* **37**: 212-221.
39. Dubeau, H. (1982) Etude du Mode D'action et des Dommages induits par l'ozone chez *Saccharomyces cerevisiae*, Thèse PhD., Université de Montréal.
40. Dyas, A.C. and Burdon, D.W. (1990) Studies of a novel agent possessing resistance to moist heat and disinfectants : parallels with Creutzfeldt-Jakob agent, *Journal of Hospital Infection* **15**: 265-272.
41. Ernst, D.R. and Race, R.E. (1993) Comparative analysis of scrapie agent inactivation methods, *Journal of Virological Methods* **41**: 193-202.
42. Estebe, J.P. (1997) Anesthésie et agents transmissibles non conventionnels (ou maladies à prions), *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation* **16**: 955-63.
43. Farooq, S. and Akhlaque, S. (1983) Comparative response of mixed cultures of bacteria and virus to ozonation, *Water Research* **17(7)**: 809-812.
44. Galtier, F. (1994) Prions et stérilisation à l'hôpital, *Journal de Pharmacie clinique* **13(4)**:317-19.

45. Giese, A.C. and Christensen, E. (1954) Effects of ozone on organisms, *Physiological Zoology* **27** : 101-115.
46. Giese, A.C., Leighton, H.L. and Bailey, R.E. (1952) Changes in the absorption spectra of proteins and representative amino acids induced by ultraviolet radiations and ozone, *Archives of Biochemistry and Biophysics* **40** : 71-84.
47. Glaser, Z.R. (1977) *Special occupational hazard review with control recommendations for the use of Ethylene Oxide as a Sterilant in medical facilities*, US Department of Health, Education and Welfare, Public Health Service, Center for Disease Control, Rockville, Maryland.
48. Glover, J.R., Kowal, A.S., Chirmer, E.C., Patino, M.M., Liu, J.J. and Lindquist, S. (1997) Self-Seeded Fibers formed by Sup35, the Protein Determinant of [PSI<sup>+</sup>], a Heritable Prion-like Factor of *Saccharomyces cerevisiae*, *Cell* **89** : 811-819.
49. Gohel, C., Grigoriev, V., Escaig-Haye, F., Lasmezas, C.I., Deslys, J.P., Langeveld, J., Akaaboune, M. Hantai, D. and Fournier, J.G. (1999) Ultrastructural Localization of Cellular Prion Protein (PrP<sub>c</sub>) at the Neuromuscular Junction, *Journal of neuroscience research* **55**: 261-267.
50. Goldmann, W., Chong, A., Foster, J., Hope, J. and Hunter, N. (1998) The shortest known prion protein gene allele occurs in goats, has only three octapeptide repeats and is non-pathogenic, *Journal of general virology* **79**: 3173-3176.
51. Hamelin, C., and Chung, Y.S. (1975a) The effect of low concentrations of ozone on *Escherichia coli* chromosome, *Mutation Research* **28(1)** : 131-132.
52. Hamelin, C., and Chung, Y.S. (1975b) Characterization of mucoid mutants of *Escherichia coli* K-12 isolated after exposure to ozone, *Journal of Bacteriology* **122(1)** : 19-24.

53. Harakeh, M., and Butler, M. (1984) Inactivation of human rotavirus, SA11 and other enteric viruses in effluent by disinfectants, *The Journal of Hygiene* **93(1)**:157-63.
54. Harper, J.D. and Lansbury, P.T. (1997) Models of Amyloid Seeding in Alzheimer's Disease and Scrapie: Mechanistic truths and physiological consequences of the time-dependent solubility of Amyloid proteins, *Annual Review of Biochemistry* **66**: 385-407.
55. Hill A.F., Antoniou M., and Collinge J. (1999) Protease-resistant prion protein produces *in vitro* lacks detectable infectivity, *Journal of General Virology* **80** : 11-14.
56. Hill, A.F., Butterworth, J., Joiner, S., Jackson, G., Rossor, M.N., Thomas, D.J., Frosh, A., Tolley, N., Bell, J.E., Spencer, M., King, A., Al-Sarraj, A., Ironside, J.W., Lantos, P.L. and Collinge, J. (1999). Investigation of variant Creutzfeld-Jakob disease and other human prion diseases with tonsil biopsy samples, *The Lancet* **353**: 183-189
57. Hilton, D.A., Fathers, E., Edwards, P., Ironside, J.W. and Zajicek, J. (1998) Prion immunoreactivity in appendix before clinical onset of variant Creutzfeldt-Jakob disease, *The Lancet* **352(9129)**: 703-704.
58. Hornemann, S. and Glockshuber, R. (1996) Autonomous and Reversible folding of a Soluble Amino-terminally truncated segment of the Mouse Prion Protein, *Journal of Molecular Biology* **262**: 614-619.
59. Horwich, A.L. and Weissman, J.S. (1997) Deadly Conformations – Protein Misfolding in Prion Disease, *Cell* **89**: 499-510.
60. Hwang, B.J., Woo, K.M., Goldberg, A.L. and Chung, C.H. (1988). Protease Ti, a new ATP-dependent protease in *Escherichia coli*, contains protein-activated ATPase and proteolytic functions in distinct subunits, *Journal of Biological Chemistry* **263(18)** :8727-8734.

61. Ikeda, K., Kawada, N., Wang, Y.Q., Kadoya, H., Nakatani, K., Sato, M. and Kaneda, K. (1998) Expression of Cellular Prion Protein in Activated Hepatic Stellate Cells, *American journal of pathology* **153(6)**: 1695-1700.
62. Jacobs, P.T. (1995) Système de Stérilisation Sterrad, une nouvelle technologie pour la stérilisation des instruments. Advanced Sterilization Products, Johnson and Johnson.
63. Jarrett, J.T. and Lansbury, P.T. Jr. (1992) Amyloid fibril formation requires a chemically discriminating nucleation event: studies of an amyloidogenic sequence from the bacterial protein OsmB, *Biochemistry* **31(49)**: 12345-12352.
64. Jarrett, J.T. and Lansbury, P.T. Jr. (1993) Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie?, *Cell* **73(6)**: 1055-1058.
65. Jarvis, W.R. (1985) Precautions prevent spread of Creutzfeld-Jakob disease, *Hospital Infection Control* **12(12)**: 145-147
66. Johnson, R.T. and Gibbs, C.J. (1998) Creutzfeld-Jakob Disease and Related Transmissible Spongiform Encephalopathies, *The New England Journal of Medicine* **339**: 1994-2004.
67. Kaneko, K., Zulianello, L., Scott, M., Cooper, C.M. Wallace, A.C., James, T.L., Cohen, F.E. and Prusiner, S.B. (1997) Evidence for protein X binding to a discontinuous epitope on the cellular prion protein during scrapie prion propagation, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **94**: 10069-74.
68. Katamine, S., Nishida, N., Sugimoto, T., Noda, T, Sakaguchi, S, Shigematsu, K, Kataoka, Y., Nakatani, A., Hasegawa, S., Moriuchi, R. and Miyamoto, T. (1998) Impaired Motor Coordination in Mice Lacking Prion Protein, *Cellular and molecular neurobiology* **18(6)**: 731-742.

69. Kawamura, K., Kaneko, M., Hirata, T. and Taguchi, K. (1986) Microbial indicators for the efficiency of disinfection processes, *Water Science and Technology* **18(10)**: 175-184.
70. Kelly, J.W. (1996) Alternative conformations of amyloidogenic proteins govern their behavior, *Current Opinion in Structural Biology* **6** : 11-17.
71. Kim, C.K., Gentile, D.M. and Sproul, O.J. (1980) Mechanism of ozone in inactivation of bacteriophage F-2, *Applied Environmental Microbiology*. **39(1)** : 210-218.
72. King, C.Y., Tittmann, P., Gross, H., Gebert, R., Aebi, M. and Wuthrich, K. (1997) Prion-inducing domain 2-114 of yeast Sup35 protein transforms *in vitro* into amyloid-like filaments, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **94** : 6618-6622.
73. King, M.E. (1969) Ph.D. Dissertation. Illinois Inst. Tech.
74. Klein, M.A., Frigg, R., Raeber, A.J., Glechsig, E., Hegyi, I, Zinkernagel, R.M., Weissmann, C. and Aguzzi, A. (1998) PrP expression in B lymphocytes is not required for prion neuroinvasion, *Nature medicine* **4(12)**: 1429-1433.
75. Klunk, W.E., Pettegrew, J.W., and Abraham, D.J. (1989) Two simple methods for quantifying low-affinity dye-substrate binding, *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. **37(8)**: 1293-1297.
76. Kochneva-Pervukhova, N.V., Paushkin, S.V., Kushnirov, V.V., Cox, B.S., Tuite, M.F. and Ter-Avanesyan, M.D. (1998) Mechanism of inhibition of [PSI<sup>+</sup>] prion determinant propagation by a mutation of the N-terminus of the yeast Sup35 protein, *EMBO Journal* **17(19)** : 5805-5810.
77. Krebs, M.C., Becasse, P., Verjat, D. and Darbord, J.C. (1998) Gas-plasma sterilisation : relative efficacy of the hydrogen peroxide phase compared with that of the plasma phase, *International Journal of Pharmaceutics* **160** : 75-81.

78. Kushnirov , V.V. and Ter-Avanesyan, M.D. (1998) Structure and Replication of Yeast Prions, *Cell* **94** : 13-16.
79. Kushnirov VV, Ter-Avanesyan MD, Didichenko SA, Smirnov VN, Chernoff YO, Derkach IL, Novikova ON, Inge-Vechtomov SG, Neistat MA, Tolstorukov II. (1990) Divergence and conservation of SUP2 (SUP35) gene of yeast *Pichia pinus* and *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast* **6(6)**: 461-472.
80. Kushnirov, V.V., Ter-Avanesyan, M.D., Telckov, M.V., Surguchov, A.P., Smirnov, V.N. and Inge-Vechtomov, S.G. (1988) Nucleotide Sequence of the SUP2 (SUP35) gene of *Saccharomyces cerevisiae*, *Gene* **66** : 45-54.
81. Kuznetsov, I.B., Morozo, P.S. and Matushkin, Y.G. (1997) Prion proteins : evolution and preservation of secondary structure, *FEBS letters* **412** : 429-432
82. Kyi, M.S., Holton, J. and Ridgway, G.L. (1995) Assessment of the efficacy of a low temperature hydrogen peroxide gas plasma sterilization system, *Journal of Hospital Infection* **31(4)** : 275-284
83. Lacroute, F. (1971). Non-Mendelian mutation allowing ureidosuccinic acid uptake in yeast, *Journal of Bacteriology* **106(2)**: 519-522.
84. Lasmezas, C.I., Deslys, J.P. Dormont, D. and Weiss, S. (1998) Une première étape dans l'identification de récepteurs cellulaires de la protéine du prion, *Médecine Sciences* **14** : 595-599.
85. Laurent, M. (1996) Les maladies à prions : l'hypothèse de la « protéine seule » et ses conséquences dynamiques, *Médecine/Sciences* **12** : 774-785.
86. Lehmann, S. (1996) Le rôle de la protéine du prion dans les encéphalopathies spongiformes transmissibles humaines, *Médecine/Sciences* **12(8-9)** : 949-958.
87. L'Hérault, P. and Chung, Y.S. (1984) Host cell reactivation capacity of different strains of E. coli B resistant or sensitive to ozone, *Experientia* **40(7)** : 469-471



88. Lindquist, S. (1997) Mad cows meet psi-chotic yeast: the expansion of the prion hypothesis, *Cell* **89** : 495-498.
89. Lindquist S; Patino MM; Chernoff YO; Kowal AS; Singer MA; Liebman SW; Lee KH; Blake T. (1995) The role of Hsp104 in stress tolerance and [PSI<sup>+</sup>] propagation in *Saccharomyces cerevisiae*, *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*. **60** : 451-460.
90. Lomakin, A., Chung, D.S. Benedek, G.B., Kirschner, D.A. and Teplow, D.B. (1996) On the nucleation and growth of amyloid beta-protein fibrils: detection of nuclei and quantitation of rate constants, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **93(3)**: 125-1129.
91. Manuelidis, L, Fritch, W. and Xi, Y.G. (1997) Evolution of a Strain of CJD that Induces BSE-like Plaques, *Science* **277**: 94-98.
92. Manuelidis, E.E., Kim, J.H., Mericangas, J.R. and Manuelidis, L.(1985) Transmission to animals of Creutzfeldt-Jakob disease from human blood, *The Lancet* **2(8460)** :896-7.
93. Marchand, R. Communication personnelle – Les prions, travail préparé par Maryse Cayouette, Université de Montréal, Septembre 1996
94. Marsh, R.F., Bessen, R.A. (1991) Epidemiological and experimental studies on a new incident of transmissible mink encephalopathy, *Journal of General Virology* **72(Pt 3)**: 589-94.
95. Martins, V.R., Graner, E., Garcia-Abreu, J., de Souza, S., Mercadante, A., Veiga, S., Zanata, S., Moura Neto, V, and Bretani, R. (1997) Complementary hydrophathy identifies a cellular prion protein receptor, *Nature Medicine* **3(12)**: 1376-1382.
96. Marx, J.L.(1975) Opiate receptors, implications and applications, *Science* **189** : 708-710.

97. Masison, D.C. and Wickner, R.B. (1995) Prion-inducing domain of yeast Ure2p and protease resistance of Ure2p in prion-containing cells, *Science* **270(5233)**: 93-95.
98. Maurizi, M.R., Thompson, M.W., Singh, S.K. and Kim, S.H. (1994) Endopeptidase Clp: ATP-dependent Clp protease from Escherichia coli, *Methods in Enzymology* **244** : 314-331.
99. McCready, S.J., Cox, B.S. and McLaughlin, C.S. (1977) The extrachromosomal control of nonsense suppression in yeast: an analysis of the elimination of [psi+] in the presence of a nuclear gene PNM, *Molecular and General Genetics*. **150(3)**: 265-270.
100. McKinley, M.P., Meyer, R.K., Kenaga, L, Rahbar, F., Cotter, R., Serban, A. and Prusiner, S.B.(1991) Scrapie Prion rod formation in vitro requires both detergent extraction and limited proteolysis, *Journal of Virology* **65(3)**: 1340-1351.
101. Menzel, D.B. (1971) Oxidation of biologically active reducing substances by ozone, *Archives of Environmental Health* **23(2)**: 149-153.
102. Mudd, J.B., Leavitt, R., Alpaslan, O and McManus, T.T. (1969) Reaction of Ozone with amino acids and proteins, *Atmospheric Environment* **3** : 669-682.
103. Murphy, M.E. and Kehrer, J.P. (1989) Oxidation state of tissue thiol groups and content of protein carbonyl groups in chickens with inherited muscular dystrophy *Biochemical Journal* **260(3)**: 359-364.
104. Nemoto, T., Horiuchi, M., Ishiguro, N. and Shinagawa, M. (1999) Detection methods of possible prion contaminants in collagen and gelatin, *Archives of Virology* **144**; 177-184.
105. Oesch, B., Groth, D.F., Prusiner, S.B., and Weissmann, C. (1988) Search for a scrapie-specific nucleic acid : a progress report, in *Novel infectious agents and the central nervous system*. Wiley, Chichester, p.209-223.

106. O'Leary, R.K. and Guess, W.L. (1968) The toxicogenic potential of medical plastics sterilized with ethylene oxide vapors, *Journal of Biomedical Materials research* **2(3)** : 297-311.
107. Oliver, C.N., Starke-Reed, P.E., Stadtman, E.R., Liu, G.J., Carney, J.M. and Floyd, R.A. (1990) ) Oxidative damage to brain proteins, loss of glutamine synthetase activity, and production of free radicals during ischemia/reperfusion-induced injury to gerbil brain, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **87(13)**: 5144-5147.
108. Pan KM, Baldwin M, Nguyen J, Gasset M, Serban A, Groth D, Mehlhorn I, Huang Z, Fletterick RJ, Cohen FE, et al (1993) Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **90(23)**: 10962-10966.
109. Parsell DA, Kowal AS, Singer MA, Lindquist S. (1994) Protein disaggregation mediated by heat-shock protein Hsp104, *Nature (London)* **372(6505)**: 475-478.
110. Patino, M.M., Liu, J.J., Glover, J.R. and Lindquist, S. (1996) Support for the prion hypothesis for inheritance of a phenotypic trait in yeast, *Science* **273(5275)** : 622-626.
111. Paul, J. (1995) Le prion, des vaches folles au Creutzfeld-Jakob iatrogène, quel risque en laboratoire ou à l'hôpital?, *Pathologie Biologie* **43(2)**: 114-120.
112. Paul, J. (1995) La manipulation du prion au laboratoire, précautions et méthodes possibles de décontamination, *Pathologie Biologie* **43(2)**: 121-123.
113. Paushkin, S.V., Krusnirov, V.V., Smirnov, V.N., and Ter-Avanesyan, M.D. (1997) Interaction between Yeast Sup45p (eRF1) and Sup35p (eRF3) polypeptide chain release factors: Implication for prion-dependent regulation, *Molecular and Cellular Biology* **17** : 2798-2805.

114. Paushkin, S.V., Kushnirov, V.V., Smirnov, V.N. and Ter-Avanesyan, M.D. (1996) Propagation of the yeast prion-like [*psi*<sup>+</sup>] determinant is mediated by oligomerization of the *SUP35*-encoded polypeptide chain release factor, *EMBO Journal* **15(12)** : 3127-3134.
115. Payne, R.J.H. and Krakauer, D.C. (1998) The spatial dynamics of prion disease, *Proceedings of the Royal Society of London B* **265** : 2341-2346.
116. Pergami, P., Jaffe, H. and Safar, J. (1996) Semipreparative Chromatographic method to purify the normal cellular isoform of the prion protein in nondenatured form, *Analytical Biochemistry* **236**: 63-73.
117. Perini, F., Frangione, B., Prelli, F. (1996) Prion protein released by platelets, *The Lancet* **347(9015)**: 1635-1636.
118. Perini F, Vidal R, Ghetti B, Tagliavini F, Frangione B, Prelli F. (1996) PrP27-30 is a normal soluble prion protein fragment released by human platelets, *Biochemical and biophysical research communications* **223(3)** : 572-577.
119. Post, K, Pitschke, M, Schafer, O., Wille, H., Appel, T.R., Kirsch, D., Mehlhorn, I., Servan, H., Prusiner, S.B. and Riesner, D. (1998) Rapid acquisition of beta-sheet structure in the prion protein prior to multimer formation, *Biological Chemistry* **379(11)**: 1307-17.
120. Previero, A. and Bordignon, E. (1964) Modifica controllata di triptofano, metionina, cistina e tirosina in peptidi naturali e proteine, *Gazzetta Chimica Italiana* **94** : 630-638.
121. Previero, A., Coletti-Previero, MA. and Jolles, P. (1967) Localization of non-essential tryptophan residues for the biological activity of lysozyme, *Journal of Molecular Biology* **24(2)**: 261-268.
122. Previero, A. and Scoffone, E. (1963) Ossidazione dei legami disolfuro con ozono in peptidi della cistina, *Gazzetta Chimica Italiana* **93** : 859-866.

123. Previero, A. , Scoffone, E., Pajetta, P. and Benassi, C.A. (1963) Modificazioni del residuo del triptofano in catena peptidica, *Gazzetta Chimica Italiana* **93** : 841-848.
124. Priola, S.A. and Caughey, B. (1994) Inhibition of scrapie-associated PrP accumulation. Probing the role of glycosaminoglycans in amyloidogenesis, *Molecular neurobiology* **8(2-3)**: 113-120.
125. Priola, S.A., Caughey, B., Race, R.E. and Chesebro, B. (1994) Heterologous PrP molecules interfere with accumulation of protease-resistant PrP in scrapie-infected murine neuroblastoma cells, *Journal of Virology* **68(8)**: 4873-4878.
126. Priola, S. A. and Chesebro, B. (1995) A single hamster PrP amino acid blocks conversion to protease-resistant PrP in scrapie-infected mouse neuroblastoma cells, *Journal of Virology* **69(12)**: 7754-7758
127. Prusiner S.B. (1994) Biology and genetics of prion diseases, *Annual Review of Microbiology* **48** : 655-686.
128. Prusiner, S. (1996) Molecular biology and pathogenesis of prion diseases, *TIBS* **21** : 482-487
129. Prusiner, S.B. (1991) Molecular biology of prion diseases, *Science* **252**: 1515-1522.
130. Prusiner, S.B. (1982) Novel Proteinaceous infectious particles cause scrapie, *Science* **216**: 136-143.
131. Prusiner, S.B., Bolton, D.C., Groth, D.F., Bowman, K.A., Cochran, S.P. and Mckinley, M.P. (1982) Further purification and characterization of scrapie prions, *Biochemistry* **21**: 6942-50.
132. Pryor, W.A. and Uppu, R.M. (1993) A kinetic Model for the competitive reactions of ozone with amino acid residues in proteins in reverse micelles, *Journal of Biological Chemistry* **268** : 3120-3126.

133. Rice, R.G., Robson, C.M., Miller, G.W. and Hill, A.G. (1981) Use of ozone in drinking water treatment, *American Water Works Association Journal* **73(1)** : 44-57.
134. Rohwer, R.G. (1984) Virus-like sensitivity of the scrapie agent to heat inactivation, *Science* **223** : 600-602.
135. Rosenberg, R.N., White, C.I., Brown, P., Gajdusek, D.C. Volpe, J.J., Posner, J. and Dyck, P.J. (1986) Precautions in handling tissues, fluids, and other contaminated materials from patients with documented or suspected Creutzfeldt-Jakob disease, *Annals of Neurology* **19(1)**: 75-77.
136. Roy, D., Wong, P.K.Y., Engelbrecht, R.S. and Chian, E.S.K. (1981) Mechanism of enteroviral inactivation by ozone, *Applied and Environmental Microbiology* **41(3)**: 718 -723.
137. Safar, J., Ceroni, M., Piccardo, P., Gajdusek, D.C. and Gibbs, C.J. (1990) Scrapie-associated precursor proteins : antigenic relationship between species and immunocytochemical localization in normal, scrapie and Creutzfeldt-Jakob disease brains, *Neurology* **40**: 513-517.
138. Sakaguchi, S., Katamine, S., Yamanouchi, K., Kishikawa, M., Moriuchi, R., Yasukawa, N., Doi, T. and Miyamoto, T. (1993) Kinetics of infectivity are dissociated from PrP accumulation in salivary glands of Creutzfeldt-Jakob disease agent-inoculated mice, *Journal of General virology* **74(Pt 10)**: 2117-2123.
139. Sanchez Y. and Lindquist, S.L. (1993) HSP104 required for induced thermotolerance, *Science* **248(4959)**: 1112-1115.
140. Schirmer, E.C. and Lindquist, S. (1997) Interactions of the chaperone Hsp104 with yeast Sup35 and mammalian PrP, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **94** : 13932-13937.
141. Scott, M.R., Groth, D., Tatzelt, J., Torchia, M., Tremblay, P., DeArmond, S.J. and Prusiner, S.B. (1997) Propagation of prion strains through specific conformers of the prion protein, *Journal of Virology* **71(12)**: 9032-9044 .

142. Silei, V., Fabrizi, C., Venturini, G., Salmona, M., Bugiani, O., Tagliavini, F., and Lauro, G.M. (1999) Activation of microglial cells by PrP and  $\beta$ -amyloid fragments raises intracellular calcium through L-type voltage sensitive calcium channels, *Brain Research* **818**: 168-170.
143. Singh, A.C., Helms, C. and Sherman, F. (1979) Mutation of the non-mendelian suppressor PSI plus in yeast by hypertonic media, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **76(4)** : 1952-1956.
144. Sipe, J.D. (1994) Amyloidosis, *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*. **31(4)**: 325-354.
145. Stadtman, E.R. (1990) Metal ion-catalyzed oxidation of proteins : biochemical mechanism and biological consequences, *Free Radical Biology and Medicine* **9(4)**: 315-325.
146. Stadtman, E.R. and Oliver, C.N. (1991) Metal-catalyzed oxidation of proteins, *Journal of Biological Chemistry* **266** : 2005-2008.
147. Stahl, N., Baldwin, M.A., Teplow, D.B., Hood, L., Gibson, B.W., Burlingame, A.L. and Prusiner, S.B. (1993) Structural Studies of the scrapie prion protein using mass spectrometry and amino acid sequencing, *Biochemistry* **32**: 1991-2002.
148. Stansfield I. Jones, K.M., Kushnirov, V.V., Dagkesamanskaya, A.R., Poznyakovski, A.I., Paushkin, S.V., Nierras, C.R., Cox, B.S., Ter-Avanesyan, M.D., and Tuite, M.F. (1995) The products of the *SUP45* (eRF1) and *SUP35* genes interact to mediate translation termination in *Saccharomyces cerevisiae*, *EMBO Journal* **14** : 4365-4373.
149. Stansfield, I. and Tuite, M.F. (1994) Polypeptide chain termination in *Saccharomyces cerevisiae*, *Current Genetics* **25(5)**: 385-395.
150. Steelman, V.M. (1994) Crutzfeld-Jakob disease : Recommendations for infection control, *American journal of infection control* **22** : 312-318.

151. Taguchi, F., Tamai, Y., Uchida, K. Kitajima, R., Kojima, H., Kawaguchi, T., Ohtani, Y. and Miura, S. (1991) Proposal for a procedure for complete inactivation of the Creutzfeldt-Jakob disease agent, *Archives of Virology* **119(3-4)**: 297-301.
152. Tateishi, J. (1985) Transmission of Creutzfeldt-Jakob disease from human blood and urine into mice, *The Lancet* **2(8463)**: 1074.
153. Tatzelt, J., Voellmy, R. and Welch, W.J. (1998) Abnormalities in stress proteins in prion diseases, *Cellular and molecular neurobiology* **18(6)**: 721-729.
154. Taylor, D.M. (1987) Autoclaving standards for Creutzfeld-Jakob disease agent, *Annals of Neurology* **22(4)**: 557-558.
155. Telling, G.C., Scott, M., Mastrianni, J., Gabizon, R., Torchia, M., Cohen, F.E., DeArmond, S.J., and Prusiner, S.B. (1995) Prion propagation in mice expressing human and chimeric PrP transgenes implicates the interaction of cellular PrP with another protein *Cell* **83(1)** : 79-90.
156. Ter-Avanesyan, M.F., Dagkesamanskaya, A.R., Kushnirov, V.V. and Smirnov, V.N. (1994) The *SUP35* omnipotent suppressor gene is involved in the maintenance of the non-Mendelian determinant [*psi*<sup>+</sup>] in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Genetics* **137** : 671-676.
157. Ter-Avanesyan, M.D., Kushnirov, V.V., Dagkesamanskaya, A.R., Dichenko, S.A., and Chernoff, Y.O. (1993) Deletion analysis of the *SUP35* gene of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* reveals two non-overlapping functional regions in the encoded protein, *Molecular Microbiology* **7(5)** : 683-692.
158. Trabacchi, G. (1997) De la désinfection à l'alimentation le prion est sur tous les fronts!, *Revue de l'infirmière* **32** : 11-12.
159. Tuite, M.F. and Cox, B.S. (1980) Ultraviolet mutagenesis studies of [*psi*], a cytoplasmic determinant of *Saccharomyces cerevisiae*, *Genetics* **95(3)** : 611-630.



160. Tuite, M.F. and Lindquist, S.L. (1996) Maintenance and inheritance of yeast prions, *Trends in Genetics : TIG* **12(11)** : 467-471.
161. Tuite, M.F., Mundy, C.R. and Cox, B.S. (1981) Agents that cause a high frequency of genetic change from [psi+] to [psi-] in *Saccharomyces cerevisiae*, *Genetics* **98(4)** : 691-711.
162. Turner, M.L., and Ironside, J.W. (1998) New variant Creutzfeldt-Jakob disease : the risk of transmission by blood transfusion, *Blood Reviews* **12** : 255-268.
163. Van Asten, J.A., Geertsma, R.E., and Dorpema, J.W. (1996) Prions and hospital infections, *The Lancet* **347** : 966-967.
164. Wallace, M. (1993) Creutzfeldt-Jakob disease, assessment and management, *Journal of Gerontological Nursing* **19**: 15-22.
165. Wawrzynow, A., Wojtkowiak, D., Marzalek, J., Banecki, B., Jonsen, M., Graves, B., Georgopoulos, C. and Zylicz, M. (1995) The ClpX heat-shock protein of *Escherichia coli*, the ATP-dependent substrate specificity component of the ClpP-ClpX protease, is a novel molecular chaperone, *EMBO Journal*. **14(9)**: 1867-1877.
166. Weissmann, C. (1994) The prion connection: now in yeast? *Science* **264(5158)** : 528-30.
167. Wickner, R. B. (1994) [URE3] as an altered URE2 protein: evidence for a prion analog in *Saccharomyces cerevisiae*, *Science* **264(5158)**: 566-569.
168. Wickner, R.B. and Masison, D.C. (1996) Evidence for two prions in yeast: [URE3] and [PSI], in *Current topics in Microbiology and Immunology*, pp. 147-160.
169. Wickner, R.B., Masison, D.C., and Edskes, H.K. (1995) [PSI] and [URE3] as yeast prions, *Yeast* **11** : 1676-1685.

170. Wille, H. and Prusiner, S.B. (1999) Structural studies on Scrapie Prion Protein Crystals obtained from reverse micellar solutions, *Biophysical Journal* **76**: 1048-1062.
171. Wille, H., Baldwin, M.A., Cohen, F.E., DeArmond, S.J. and Prusiner, S.B. (1996) Prion protein amyloid: separation of scrapie infectivity from PrP polymers, in *The nature and origin of amyloid fibrils*. **Wiley**, Chichester, p. 181-201.
172. Wilson, P.G. and Culbertson, M.R. (1988) SUF12 suppressor protein of yeast. A fusion protein related to the EF-1 family of elongation factors, *Journal of Molecular Biology* **199(4)**: 559-573.
173. Windl, O., Lorenz, H., Behrens, C., Romer, A. and Kretzschmar, H.A. (1999) Construction and characterization of murine neuroblastoma cell clones allowing inducible and high expression of the prion protein, *Journal of General virology* **80** : 15-21.
174. Wood, S.J. Maleeff, B., Hart, T. and Wetzel, R. (1996) Physical, morphological and functional differences between pH 5.8 and 7.4 aggregates of the Alzheimer's amyloid peptide A $\beta$ , *Journal of Molecular Biology* **256(5)**: 870-877.
175. Xi, Y.G., Ingrosso, L., Ladogana, A., Masullo, C., and Pocchiari, M. (1992) Amphotericin B treatment dissociates in vivo replication of the scrapie agent from PrP accumulation, *Nature* **356(6370)**: 598-601.
176. Yap, P.L, Leaver, H.A. and Gillon, J. (1998) Prions : properties, occurrence, modes of transmission and relevance for blood transfusion and blood derivatives, *Vox Sanguinis* **74** : 131-134.
177. Zhourvleva, G., Frolova, L., Le Goff, X., Le Guellec, R., Inge-Vechtomov, S.G., Kisselev, L, and Phillippe, M. (1995) Termination of translation in

eukaryotes is governed by two interacting polypeptide chain release factors, eRF1 and eRF3, *EMBO Journal*. **14(16)**: 4065-4072.

## **APPENDICE A**

Article 2. The problematic of prions and the sterilization of medical devices

## **Article 2. The problematic of prions and the sterilization of medical devices**

Julien, K., Tabrizian, M., Marchand, R., Belhumeur, P. and Yahia, L'H.

### **Prions and the transmission of neurodegenerative diseases**

Prions are the primary cause of transmissible spongiform encephalopathies (TSE) in both humans and animals, all of which are neurodegenerative diseases. Among the most commonly known, we can name the Creutzfeldt-Jakob disease (human) and the Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE), responsible for the “mad cow” epidemic in Europe in the late 1980s. This epidemic was provoked by the feeding of cattle with tainted sheep-derived dietary supplements, probably infected with scrapies. Even other animal species food derivatives might be involved in the transmission of spongiform encephalopathies<sup>1</sup>. Great concerns emerged regarding the beef industries in many countries, particularly in Great Britain, and even in the pharmaceutical industries, where cattle are often involved in the fabrication of various products. Another issue arose in 1996 after 12 cases of atypical or new variant Creutzfeldt-Jakob disease were reported. Their onset was probably triggered by the consumption of contaminated beef products<sup>2</sup>. NvCJD, linked to a dietary exposure to BSE, represented a challenge since the duration of clinical disease was longer (7,5-22,5 months), and had a far younger age of onset<sup>3</sup>; however, methionine homozygosity at codon 129 was present in all cases<sup>4</sup>. No change in EEG could be observed, and the dose of BSE required to contaminate orally humans is still undetermined

The first animal prion disease ever observed was the Scrapies of sheep and goat, 200 years ago, while the first case of transmissible prion disease recorded in humans by Gajdusek and Zigas in 1957 was Kuru. It is a disease associated to cannibalistic rituals of the Fore people, in New Guinea, where there was consumption of contaminated cadaveric brain parts<sup>5,6</sup>. This was the first human spongiform encephalopathy proven to be transmissible orally, just like BSE, since the cessation of the ritualistic rituals lead to the termination of the disease transmission<sup>7,8</sup>. Typically, the world-wide incidence of human prion disease is of 1 per million population and appears to affect men and women equally<sup>9</sup>.

## **Transmission**

There are three major routes of infection. TSEs can be transmitted genetically, sporadically, or iatrogenically. For instance, sporadic CJD (not associated with mutations in the PRNP gene) represents 87% of the recorded cases, while 8% of the cases are genetic and 5% result from iatrogenic contamination<sup>10</sup>. Considering that elimination of iatrogenic contamination is currently the main preoccupation, we will focus exclusively on this route of infection.

Iatrogenic transmission can occur following corneal transplants, intracerebral electrode implants, the administration of human pituitary gland growth hormones, and through the consumption of infected bovine or sheep products<sup>11</sup>. As little as 1g of BSE-infected brain materials can transmit the disease to other cattle<sup>12</sup>. Even the use of tonometers to evaluate the intraocular pressure, the suturing of trauma and suturing to the head and neck, or any type of ocular, cranial, cardiovascular, and neurological surgery can pose a potential problem of iatrogenic contamination. Until 1997, 142 cases of iatrogenic contamination had been recorded, including: 4 cases following neurosurgery, 2 by stereotactic electrodes, 2 by corneal transplantation, 1 by tympanic membrane (ear drum) transplantation, 53 by dura-mater transplantation and 80 by injection of contaminated growth hormones<sup>13</sup>. More cases (5) of contamination following the administration of human pituitary gonadotropin were reported in 1998<sup>14</sup>. It has now been established that oral contamination following consumption of tainted beef products has infected 23 people in Great Britain and 1 in France<sup>15</sup>. As of today, there are no recorded cases of transplacental transmission, and no particular prevalence has been observed in hemophiliacs, the group most at risk of blood contamination, suggesting that blood transmission of CJD is rare<sup>16</sup>. However, mice inoculated intracerebrally with blood from CJD or nvCJD patients have contracted the disease, which indicates that this route of inoculation has to be taken into consideration<sup>17, 18</sup>.

Other routes of iatrogenic transmission of CJD were established in 1986. Contamination of laboratory animals was observed following intracerebral, intraperitoneal, intravenous, as well as subcutaneous and intravenous inoculation of

prions, the last two, however, constituting a less efficient method of transmission of the disease. Therefore, along with neurosurgical and ocular instruments, caution has to be taken with other instruments as well, including those coming in contact with the liver, lungs, lymph nodes, kidney and leukocytes, since they contain detectable infectious titers of the pathogen. Blood and urine could also be infectious to humans, while saliva, stool and external secretions have been eliminated as routes of transmission of the disease (Table 1)<sup>19</sup>.

Previously, it had been demonstrated that blood transfusions and blood products were not a risk factor for the development of classical CJD. However, in the light of new results, such as significant concentrations of PrP<sup>SC</sup> in the lymphoreticular tissues of nvCJD, along with an observed role of mature B lymphocytes in prion pathogenesis, one cannot exclude the possibility of iatrogenic contamination by blood or its derivative coming from patients incubating nvCJD<sup>20</sup>. Although the infectivity in blood components is of several magnitude lesser than in neural tissues for example, blood components (lymphocytes, monocytes and platelets<sup>21, 22, 23</sup>) can probably still transmit nvCJD. It appears that defects in T cells do not impair susceptibility to prions, but most likely, the cells whose maturation depend on B cells, such as follicular dendritic cells, would be responsible for the accumulation of prions, thereby be responsible for neuroinvasion. Other hypothetical roles of B lymphocytes in prion pathogenesis could include a direct transport of prions to the nervous system, or the secretion of factors that could bind to prions and facilitate their access to the nervous system<sup>24</sup>. Therefore, one possible method of preventing blood contamination could be the processing of blood to reduce the possibility of infection, such as leukodepletion<sup>25</sup>, or the use of alternatives to blood derived products<sup>26</sup>. Infectivity could also be reduced by spiking blood components or by pretreating patients with sulphated glycosaminoglycans, phenothiazines and amphotericin, for example, which may interfere with the replication of PrP<sup>SC</sup><sup>27</sup>.

All the information gathered here shows that everyone and anyone is at risk of iatrogenic contamination if the appropriate steps are not taken now to prevent this propagation. Again, new sterilization technologies have to be developed and

validated to insure the degradation of the protein, with the sole purpose of protecting the patient exposed to possibly contaminated medical devices.

### **Degradation and sterilization of the prion protein**

There is no hazard per se for the physicians but rather from the physicians to the patient through transplantation and the use of drugs derived from affected human tissues and contaminated medical devices<sup>28</sup>, although some cases of hospital personnel contamination have been reported<sup>29</sup>. Prions are resistant to inactivation techniques such as incubation with 5mM Mg<sup>2+</sup>, 2mM Zn<sup>2+</sup>, digestion with DNase 1, RNase A and T, micrococcal nuclease, psoralens and hydroxylamine, along with ultraviolet and ionizing radiation, which are were just as ineffective<sup>30, 31</sup>. These results agree with the prion « protein-alone » hypothesis, since most exposed viruses (bacteriophage M14, TMV, potato virus X and potato spindle tuber viroid) are inactivated by these processes. Therefore, one of the major problems associated with prions is their degradation, to insure the sterility of the medical devices used in hospital, and even of pharmaceutical products commonly used in research. For instance, Doillon *et al.* in 1997 attempted the sterilization of bovine collagen for subsequent use in biomedical implants. One of the advantages of using such a product is the large purified quantity of protein that can be yielded. However, they emphasized the fact that no practical test is yet capable of detecting prions in the material<sup>32</sup>.

Some sterilization studies performed by Brown *et al.* in 1982<sup>33</sup> showed that 5,25% sodium hypochlorite could reduce the infectivity of infected brain tissue (titers varying between 10<sup>10.11</sup>-10<sup>10.14</sup> LD<sub>50</sub>/g brain tissues) by 4 log LD<sub>50</sub> (99,99%), which was by far superior to other chemical treatments tested, such as sodium metaperiodate, chlorine dioxide, Lysol, iodine, potassium permanganate, formaldehyde and hydrogen peroxide, which could barely achieve a 2 log LD<sub>50</sub> inactivation. As for the standard autoclaving procedures (one hour at 121°C, 1atm), it was able to reduce the infectivity from 10<sup>10-11</sup> to 10<sup>2-6</sup> LD<sub>50</sub>/g of brain tissues. Although they appear efficient in the degradation of prions, these autoclaving techniques are damaging to most thermosensitive instruments. In all cases, the



inactivation observed occurred rapidly, that is, within the first hour of exposure, but eventually reaching a plateau. However, even after these rather harsh treatments, there were some residual proteins remaining, thereby indicating a lack of sterilization, and thus a possibility of iatrogenic contamination.

Two years later, Rohwer performed another series of experiments, this time by varying the temperature parameter in standard autoclaving<sup>34</sup>. Again, at 100°C, 97% of the infectivity was destroyed, while at 121°, 99,9999% of the protein was degraded and this, within 2 minutes. Both these studies indicate a indubitable sensitivity of PrP<sup>Sc</sup> to these methods; however, some infectious subpopulations still remained, proving *de novo* the inadequacy of these techniques for complete sterilization of medical devices. Moreover, this increased resistance to heat lead to the invalidity of the conventional virus model, thereby inferring the « protein-alone » hypothesis.

Jarvis emphasized the difficulty associated to the decontamination of contaminated medical devices and recommended some protocols for those medical devices particularly at risk (i.e. those exposed to brain matter, cerebrospinal fluid (CSF) and blood), since several cases of iatrogenic contamination had been observed following brain and eye surgeries, and the administration of growth hormones taken from CJD contaminated cadavers<sup>35</sup>. These techniques included autoclaving for an hour at 121°C, immersion in 1N sodium hydroxide or 0.5% sodium hypochlorite for an hour at room temperature or even combining both autoclaving and trisodium phosphate in the case of grossly contaminated instruments, to insure proper disinfection of the devices. He also suggested disassembling the equipment according to manufacturer's guideline to ensure proper disinfection. Again, these techniques might be effective, but can greatly damage the medical devices by either deforming thermosensitive biomaterials or due to their strong corrosive effects on metals, which, in both cases, modifies the intrinsic properties of the instruments.

According to Rosenberg, decreasing the exposure time or the concentration of the chemical agents would proportionally decrease the efficacy, while boiling, UV irradiation, ethylene oxide, ethanol, formalin, acetone, beta-propiolactone detergents and quaternary ammonium compounds would be completely

inefficient in the inactivation of the pathogen<sup>36</sup>. Moreover, the temperature of sterilization is crucial, since it has been observed that autoclaving at 126°C, even for two hours, could not completely eradicate scrapie infectivity.

However, not every committee agrees on the recommended techniques of sterilization. It was observed by Taylor that there were differences between the standards established by various countries<sup>37</sup>. Indeed, the UK based their standards on a « porous-load » type of autoclave, while the United States used a « gravity-displacement » autoclave, which appears to be less efficient. Therefore, their recommendation of autoclaving at 134°C for 18 minutes could probably be as stringent as the US protocol indicating a complete inactivation of CJD at 132°C for 1 hour. These discrepancies, and probably many others yet to be determined, should be taken into account when determining the basic requirements for sterilization.

One model for prion sterilization was established by Dyas and Burdon, based upon the resistance to sterilization of another protein, the ileal fluid-dependant organism (IFDO)<sup>38</sup>. Moist autoclaving, at 134°C for 120 minutes or even at 140°C for 105 minutes, was inefficient to sterilize the IFDO protein. Only dry heat (160°C, 1 hour), hypochlorite immersion or the combination of both Stericol 10% and autoclaving at 134°C for an hour was capable of achieving sterilization. Based on these conclusions, they assumed that the commonly sterilization techniques alone for prions were also inadequate due to the correlation of the two proteins, thereby recommending a combination of both a strong disinfection pretreatment, followed by autoclaving. This work was also in accordance with Tagushi *et al* who also confirmed that combining 1N NaOH soaking at room temperature and autoclaving did completely inactivate up to  $10^{5.8}$  ID<sub>50</sub> of CJD agent in mouse brain tissues.<sup>39</sup> However, since much higher titers of infectious CJD agent are usually present *in vivo*, these techniques might still be inefficient. Nonetheless, Ernst and Race demonstrated that autoclaving alone at 132°C for 90min, and not for only 60 minutes, completely eliminate the infectivity of a  $10^{7.4}$  ID<sub>50</sub>/50µl of brain homogenate, although combining both autoclaving at 121°C and NaOH or LpH, a phenolic derivative, like previously mentioned by Chesebro, also proved to be efficient.<sup>40,41</sup> However, toxicity can be associated to LpH, and cannot be used on stationary objects. The effect of

LpH can be due to glycolic acid, which is a very effective agent for protein degradation.

When considering various decontamination techniques, one must take into consideration that some protocols may be more appropriate for particular medical instruments. For instance, 1N NaOH is not corrosive to iron or martensitic steels, and therefore might be used for metallic instruments, while 2.5% NaOCl is better used on non-metallic, thermosensitive instruments, as well as those made of aluminum<sup>42</sup>. Proper rinsing prior to autoclaving, however, should be ensured<sup>43</sup>. In addition, it has been proven that prions are resistant to all other detergents and disinfectants used in hospitals, as well as to  $\gamma$  irradiation (even at 20 000 000 rads), alkylating methods such as 88% ethylene oxide, 10% formaldehyde, and 5% glutaraldehyde, which presently limits the sterilization options. Again the choice of autoclave is crucial, since a 134°C/18min treatment is efficient when using a prevacuum sterilizer, while a 132°C/60min treatment is required when using a standard gravity sterilizer, unless a 132°C/30min cycle is preceded by a decontamination treatment, such as 1N NaOH at room temperature<sup>44</sup>. Nonetheless, the efficacy of these techniques is always dependent on the particular strain and the initial infectious titers<sup>45</sup>.

Particular care has been taken when manipulating medical devices that have been placed in contact with identified or suspected CJD patients. In 1995, Paul recommended that thermosensitive materials or corrodable in either NaOH or NaOCl should be immediately incinerated<sup>46</sup>. Potential infectivity of instruments can be decreased by immersing them in pure SDS heated between 60°C and 100°C due to the subsequent susceptibility of prions to proteolytic digestion, but these devices should never, under any condition, be considered as sterile. When possible, single-use instruments should be preferred, and special care should be given to the protection of the personnel exposed to any electrodes, ophthalmic, dental, and neurosurgical instruments used. The manipulation of experimental strains of CJD for research is particularly dangerous, since these strains possess elevated infectious titers. Hence, higher concentrations of sodium hydroxide or hypochlorite, or an increased cycle of autoclave (up to 136°C for 90 minutes) should be used to ensure the sterilization of

the equipment. In 1996, van Asten *et al* validated the use of a 3-5 minute cycle of moist autoclaving at 134°C, provided that the use of any types of aldehydes is avoided, since they protect prions against any other type of sterilization techniques and that the air removal system of the sterilizer functioned correctly. Only an alkaline decontamination pre-treatment should be advocated.<sup>47</sup>

All these drastic measures are pertinent in the case of interventions involving organs at risk and when suspicion of CJD is present. However, depending on the relevance, less extensive measures can be taken. For instance, incineration of the material, or cleansing of the instrument followed by immersion in NaOH is essential when a case of CJD has been diagnosed, or when one of the patient with CDJ history in his family is being submitted to any neurological intervention (Type I). When a high-risk patient is submitted to a potential-risk surgery or again, when a patient with potential risk is undergoing a high-risk surgery (Type II), then cleaning the instrument, followed by sterilization with either NaOH or autoclaving might be sufficient.<sup>48</sup> In all cases, the type of intervention (i.e. the type of tissues with which the medical device is going to come in contact with) and the medical history should be taken into consideration. Moreover, the type of instrument itself being used, along with the type of contact with the tissues are relevant in the proper choosing of a sterilization protocol<sup>49</sup>.

More recently, new technologies have been tested for their ability to degrade the prion protein. Steris 20, for one, is a novel sterilizer using peracetic acid as its main sterilizing agent. Interesting results were obtained using this technique; however, residual proteins remained following the sterilization cycle, implying again the possibility, even remote, of iatrogenic contamination. Moreover, their validation technique using proteinase K digestion might not be relevant, since infectivity can be dissociated from the proteinase K resistance of the protein, considering that the protease resistance acquisition by PrP<sup>C</sup> is not sufficient for the production of infectivity<sup>50</sup>.

Even with all the technological advancements in sterilization, the concluding effective sterilization techniques have not evolved: soaking in 1N sodium hydroxide or 12,5% bleach for an hour at room temperature, or steam sterilization in an

autoclave at 134°-138°C for 18 minutes are still the recommended procedures for sterilization of medical devices used in high-risk surgeries<sup>51</sup>, while dry heat, even at elevated temperatures (360°C) for one hour remains ineffective (Table 2)<sup>52</sup>. New sterilization processes and protocols, along with sterilization indicators specifically designed to evaluate the degradation of prions, will have to be developed in order to insure sterility of all devices presently used in hospitals.

## **List of Tables**

**Table 1.** CJD infectivity level associated with various human tissues.

**Table 2.** Effective and ineffective techniques for medical devices sterilization contaminated with prions.

**Table 1.** CJD infectivity level associated with various human tissues.

<b>CATEGORY</b>	<b>INFECTIVITY</b>	<b>TISSUES</b>
<b>Type I</b>	<b>High</b>	Brain, spinal cord, eyes
<b>Type II</b>	<b>Medium</b>	Spleen, lymphatic glands, tonsils, proximal and ileac colon, placenta, dura mater
<b>Type III</b>	<b>Low</b>	Sciatic nerve, distal colon, suprarenal and pituitary glands, nasal mucosa, hypophysis (dissected)
	<b>Minimal</b>	Thymus, bone marrow, liver, lungs, pancreas, CSF
<b>Type IV</b>	<b>Not detectable</b>	Blood clot, serum, milk, colostrum, mammal glands, skeletal muscle, heart, kidney, thyroid, salivary glands, saliva, ovaries, uterus, testicles, seminal vesicle, faeces, fetal tissues, bile, urine, bony, cartilaginous and fibrous tissus, skin

**Table 2.** Effective and ineffective techniques for medical devices sterilization contaminated with prions.

Techniques	Inefficient	Efficient	Problems/requirements of efficient techniques
<b>CHEMICAL</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ethanol</li> <li>• iodophore</li> <li>• hydrogen peroxide</li> <li>• ethylene oxide</li> <li>• potassium permanganate</li> <li>• urea</li> <li>• peracetic acid</li> <li>• glutaraldehyde</li> <li>• formaldehyde</li> <li>• boiling</li> <li>• acetone</li> <li>• Lysol</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1N NaOCl</li> <li>• 1N NaOH, room temperature</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• very corrosive</li> <li>• dangerous for skin and tissues</li> </ul>
<b>PHYSICAL</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• UV irradiation</li> <li>• <math>\gamma</math> irradiation</li> <li>• dry heat</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• autoclaving (gravity displacement) 132°C, 1 hour</li> <li>• autoclaving (porous load) 134-138°C, 18 min.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• eliminate all presence of tissues</li> <li>• do not fix tissues with formol</li> </ul>

### References

- <sup>1</sup> Marsh, R.F., Bessen, R.A., Lehmann, S and Hartsough, G.R. (1991) *Journal of General Virology* **72**, 589-94.
- <sup>2</sup> Prusiner, S.B. (1996) *TIBS* **21**, 482-487.
- <sup>3</sup> Horwich, A.L. and Weissman, J.S. (1997) *Cell* **89**, 499-510.
- <sup>4</sup> Turner, M.L., and Ironside, J.W (1998) *Blood Reviews* **12**, 255-268.
- <sup>5</sup> Laurent, M. (1996) *Médecine/Sciences* **12**, 774-785.
- <sup>6</sup> Bessen, R.A. (1996) *Science and medicine* **Sept./Oct.**, p. 12-21.
- <sup>7</sup> Johnson, R.T. and Gibbs, C.J. (1995) *The New England Journal of Medicine* **339**, 1994-2004.
- <sup>8</sup> Prusiner, S.B. (1991) *Science* **252**: 1515-1522.
- <sup>9</sup> Wallace, M. (1993) *Journal of Gerontological Nursing* **19**: 15-22.
- <sup>10</sup> Turner, M.L., and Ironside, J.W (1998) *Blood Reviews* **12**, 255-268.
- <sup>11</sup> Wallace, M. (1993) *Journal of Gerontological Nursing* **19**: 15-22.
- <sup>12</sup> Turner, M.L., and Ironside, J.W (1998) *Blood Reviews* **12**, 255-268.



- <sup>13</sup> Trabacchi, G. (1997) *Revue de l'infirmière* **32**: 11-12.
- <sup>14</sup> Yap, P.L, Leaver, H.A. and Gillon, J. (1998) *Vox Sanguinis* **74**: 131-134.
- <sup>15</sup> Trabacchi, G. (1997) *Revue de l'infirmière* **32**, 11-12
- <sup>16</sup> Johnson, R.T. and Gibbs, C.J. (1998) *The New England Journal of Medicine* **339**, 1994-2004
- <sup>17</sup> Manuelidis, E.E., Kim, J.H., Mericangas, J.R., Manuelidis, L. (1995) *The Lancet* **2**, 898-7.
- <sup>18</sup> Tateishi, J. (1985) *The Lancet* **2**, 1074.
- <sup>19</sup> Paul, J. (1995) *Pathologie Biologie* **43**, 121-123.
- <sup>20</sup> N. R. Cashman, R. Loertscher, J. Nalbantoglu, I. Shaw, R. J. Kascsak, D. C. Bolton, and P. E. (1990) *Cell* **61**, 185-192.
- <sup>21</sup> Dodelet, V.C. and Cashman, N.R. (1998) *Blood* **91**, 1556-1561.
- <sup>22</sup> Perini, F., Vidal, R., Ghetti, B., Tagliavini, F., Grangione, B., Prelli, F. (1996) *Biochemical and Biophysical Research Communications* **223**, 572-577.
- <sup>23</sup> Perini, F., Frangione, B., Prelli, F. (1996) *The Lancet* **347**, 1635-1636.
- <sup>24</sup> Klein, M.A., Frigg, R., Raeber, A.J., Glechsig, E., Hegyi, I, Zinkernagel, R.M., Weissmann, C. and Aguzzi, A. (1998) *Nature medicine* **4**, 1429-1433.
- <sup>25</sup> Turner, M.L., and Ironside, J.W (1998) *Blood Reviews* **12**, 255-268.
- Yap, P.L, Leaver, H.A. and Gillon, J. (1998) *Vox Sanguinis* **74**: 131-134.
- <sup>27</sup> Turner, M.L., and Ironside, J.W (1998) *Blood Reviews* **12**, 255-268.
- <sup>28</sup> Johnson, R.T. and Gibbs, C.J. (1998) *The New England Journal of Medicine* **33**, 1994-2004.
- <sup>29</sup> Steelman, V.M. (1994) *American Journal of Infection Control* **22**, 312-318.
- <sup>30</sup> Prusiner, S.B. (1991) *Science* **252**, 1515-1522.
- <sup>31</sup> Kawahara, C.B., Diener, T.O., McKinley, M.P., Groth, D.F., Smith, D.R. and Prusiner, S.B. (1987) *Virology* **160**, 271-274.
- <sup>32</sup> Doillon, C.J., Drouin, R., Coté, M.F., Dallaire, N., Pageau, J.F. and Laroche, G. (1997) *Journal of Biomedical Materials Research* **37**, 212-221.
- <sup>33</sup> Brown, P., Rohwer, R.G., Green, E.M. and Gajdusek, D.C. (1982) *The Journal of Infectious Diseases* **145**, 683-687.
- <sup>34</sup> Rohwer, R.G. (1984) *Science* **223**, 600-602.
- <sup>35</sup> Jarvis, W.R. (1985) *Hospital Infection Control* **12**, 145-147.
- <sup>36</sup> Rosenberg, R.N., White, C.I., Brown, P., Gajdusek, D.C. Volpe, J.J., Posner, J. and Dyck, P.J. (1986) *Annals of Neurology* **19**, 75-77.
- <sup>37</sup> Taylor, D.M. (1987) *Annals of Neurology* **22**: 557-558.
- <sup>38</sup> Dyas, A.C. and Burdon, D.W. (1990). *Journal of Hospital Infection* **15**: 273-278.
- <sup>39</sup> Taguchi, F., Tamai, Y., Uchida, k. Kitajima, R., Kojima, H., Kawaguchi, T., Ohtani, Y. and Miura, S. (1991) *Archives of Virology* **119**: 297-301.
- <sup>40</sup> Ernst, D.R. and Race, R.E. (1993) *Journal of Virological Methods* **41**: 193-202.
- <sup>41</sup> Chesebro, B. (1990) In: B.N. Fields and D.M. Knipe (Eds.) *Virology*, vol. 2, Raven Press, New York, pp. 2325-2336.
- <sup>42</sup> Estebe, J.P. (1997) *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation* **16**: 955-63.
- <sup>43</sup> Galtier, F. (1994) *Journal de Pharmacie clinique* **13**:17-19.
- <sup>44</sup> Steelman, V.M. (1994) *American journal of infection control* **22**: 312-318.
- <sup>45</sup> Paul, J. (1995) *Pathologie Biologie* **43**: 114-120.
- <sup>46</sup> Paul, J. (1995) *Pathologie Biologie* **43**: 114-120.
- <sup>47</sup> Van Asten, J.A., Geertsma, R.E., and Dorpema, J.W. (1996) *The Lancet* **347**: 966-967.
- <sup>48</sup> Decq, P. (1998) *Neurochirurgie* **44**: 292-293.
- <sup>49</sup> Conseil d'Évaluation des technologies de la Santé du Québec. La réutilisation des cathéters à usage unique et les risques de transmission de la maladie de Creutzfeldt-Jakob. Rapport, Mai 1997 (CÉTS97-4RF).
- <sup>50</sup> Hill A.F., Antoniou M., and Collinge J. (1999) *Journal of General Virology* **80**: 11-14.
- <sup>51</sup> Darbord, J.C. (1999) *Biomedical pharmacotherapy* **53**: 34-8.
- <sup>52</sup> Turner, M.L., and Ironside, J.W. (1998) *Blood Reviews* **12**: 255-268.