

CONCLUSIONS DE L'ETUDE RELATIVE AU « PROTOCOLE STANDARD PRION »

Préambule : Ce protocole repose sur les résultats d'une étude, menée par 4 équipes de recherche et cofinancée par la Direction Générale de la Santé et l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé. Il a été rédigé par :

- Le Professeur J-Y. CESBRON, coordonateur de l'étude, CHU Grenoble, CNRS FRE2685, Université Joseph Fourier - Institut Jean Roget ;

- Le Docteur J-P. DESLYS et le Docteur E. COMOY, CEA, Institut des Maladies Emergentes et des Thérapies Innovantes - Fontenay-aux-Roses ;

- Le Professeur S. LEHMANN, CHU Montpellier, Institut de Génétique Humaine du CNRS, UPR 1142 ;

- Le Docteur A. PERRET-LIAUDET, HCL Biochimie GHE, Hôpital Neurologique – Lyon.

1. INTRODUCTION GENERALE

Le Protocole Standard Prion est un protocole opératoire devant permettre aux fabricants d'évaluer les performances de produits ou procédés revendiquant une élimination ou une inactivation des agents transmissibles non conventionnels (ATNC) présents sur les dispositifs médicaux réutilisables après la dispensation des soins.

L'évaluation des performances du produit, ou procédé, repose sur une méthode *in vivo* permettant d'évaluer l'efficacité du procédé ou du produit en comparaison avec celle d'au moins deux des traitements comparateurs sous la forme d'un facteur de réduction de l'infectiosité. Le modèle du hamster infecté par la souche 263K est requis en tant que modèle de référence utilisé dans de nombreuses études antérieures. Toutefois, considérant la finalité d'utilisation sur des dispositifs médicaux, un modèle complémentaire murin infecté par une souche d'origine humaine ou bovine est nécessaire.

En complément, des études *in vitro* d'analyse de la protéine prion doivent être réalisées pour renseigner les mécanismes d'action du produit ou procédé, en permettant notamment de discriminer l'élimination de l'inactivation des protéines prion en réalisant une étude sur le support parallèlement à une étude dans l'effluent ou en solution.

Pour la méthode *in vivo*, comme pour la méthode *in vitro*, le protocole repose sur la contamination d'un support-modèle par un homogénat de cerveau infecté par une souche de prion. Des essais sont réalisés à l'aide de supports dont les matériaux modélisent ceux des dispositifs médicaux thermorésistants ou thermosensibles. Le modèle de contamination surfacique a été retenu au détriment des modèles en phase liquide (suspension) d'étude d'inactivation, car plus représentatif du type de contamination rencontré sur les instruments médicaux et chirurgicaux. Par ailleurs, ce type de modèle permet de tester des procédés physiques pour lesquels les modèles en suspension sont inappropriés.

Ce support modèle est ensuite traité avec le produit ou procédé.

L'évaluation du produit ou du procédé à tester est réalisée par comparaison de ses performances avec celles obtenues avec au moins deux des traitements inactivants totaux cités dans la circulaire 138 révisée et dénommés dans le protocole « traitements comparateurs » :

- L'immersion dans la soude 1N pendant 1 heure à température ambiante ;
- L'immersion dans l'eau de javel ou hypochlorite de sodium 20 000 ppm, pendant 1 heure à température ambiante.

Bien que mentionnée dans la circulaire 138 révisée comme responsable d'inactivation importante et non pas d'inactivation totale la stérilisation à la vapeur d'eau à 134°C sous 3 bars de pression pendant 18 minutes, est proposée comme traitement comparateur dans ce protocole pour comparer les performances des procédés physiques.

En complément, au moins un des traitements réputés partiellement efficaces est appliqué en parallèle, afin de servir de témoin interne d'efficacité partielle pour valider l'étude réalisée. Ces témoins internes d'efficacité partielle sont basés sur des dilutions ou des temps d'action réduits des traitements comparateurs.

Ce protocole opératoire est susceptible d'être actualisé en fonction de l'évolution de l'état de l'art.

D'ores et déjà, des travaux sont menés en vue d'offrir l'utilisation de culture cellulaire comme méthode alternative à l'expérimentation animale.

2. METHODE *IN VIVO*

La méthode *in vivo* a pour objectif de quantifier la réduction de l'infectiosité et de la comparer à celle obtenue pour des traitements réputés d'efficacité maximale.

Pour se faire, le fabricant adopte la démarche expérimentale suivante, pour un couple d'intérêt (animal, souche ATNC) considéré :

-réalisation d'une gamme contrôle à partir d'homogénat de cerveau de l'espèce animale considérée, infectée par la souche ATNC (cf. 2.1.1.1) afin de contaminer les supports (cf. 2.1.1.2) qui seront inoculés par voie intra-cérébrale à l'animal (cf. 2.1.2). Sur la base des données brutes recueillies (cf. 2.2.1), un taux de transmission et une période moyenne d'incubation sont calculés pour chaque dilution de la gamme de contrôle ; la dose infectieuse 50% (DI₅₀) adsorbée sur la surface des supports est calculée sur la base de ces taux de transmission (cf. 2.2.2).

-en parallèle, des supports contaminés à partir de l'homogénat de la première dilution de la gamme sont traités au moyen des traitements comparateurs réputés comme inactivant (cf. 2.1.1.3), des traitements témoins d'efficacité partielle (cf. 2.1.1.4) et par le produit ou procédé à tester (cf. 2.1.1.5). Les supports ainsi traités sont alors inoculés à l'animal. Sur la base des données brutes recueillies (cf. 2.2.1), les mêmes paramètres que ceux de la gamme contrôle sont calculés (cf. 2.2.2).

L'estimation de la performance du produit ou du procédé testé repose d'une part sur la détermination du facteur de réduction RF (comparaison des résultats obtenus après traitement avec ceux obtenus pour les différentes dilutions de la gamme contrôle) qu'il induit et d'autre part sur la comparaison au RF obtenu avec les traitements comparateurs et les témoins d'efficacité partielle considérés (cf. 2.2.2).

2.1. MODE OPERATOIRE

2.1.1) PREPARATION DES HOMOGENATS ET DES SUPPORTS

2.1.1.1 Gamme contrôle

1) L'homogénat négatif est constitué d'un homogénat à 10% (poids/volume) de cerveau sain de l'espèce du modèle d'intérêt préparé dans du PBS (1x, sans calcium ni magnésium, pH 7.2 stérile, par exemple réf. 75511 BioMérieux) à calibrer au travers d'une aiguille émoussée (Aiguille 25 G 0.5 mm de diamètre, par exemple réf. 3551120, BIO-RAD)

2) L'homogénat positif est constitué d'un homogénat à 10% de cerveau de l'espèce du modèle d'intérêt infecté au stade terminal de la maladie préparé dans du PBS et constitue le point 10^{-1} de la gamme. Cet homogénat est aliquoté (1ml) dans des tubes en polypropylène stériles et congelé à -80°C .

3) Les points suivants (10^{-2} à 10^{-9}) sont obtenus par des dilutions successives de 10 en 10 de l'homogénat positif dans l'homogénat négatif (à pourcentage total de cerveau constant) et sont préparés extemporanément en triplicats c'est-à-dire pour chaque point de gamme 3 tubes de 0,5 ml sont préparés. A chaque dilution l'échantillon est soigneusement homogénéisé par agitation. La préparation se fait à température ambiante.

	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}
Homogénat positif	1ml	100µl							
Homogénat négatif		900µl							

Pour assurer la reproductibilité et la comparaison des résultats, il est choisi délibérément de privilégier la qualité de l'homogénéisation et une bonne dispersion de l'infectiosité. Ainsi, il est impératif de calibrer les homogénats à travers une aiguille émoussée, et de bien homogénéiser. La dilution dans un homogénat cérébral pour garder une composition des homogénats comparables est impérative.

2.1.1.2 Préparation et contamination des supports

a Choix du support

L'évaluation de produits ou procédés revendiquant l'élimination ou l'inactivation des prions présents sur les dispositifs médicaux nécessite l'utilisation d'un modèle de support représentatif du matériau du dispositif médical considéré. L'intérêt de cette modélisation est de se rapprocher au mieux des conditions réelles d'utilisation des dispositifs médicaux. Les matériaux stérilisables et thermosensibles sont évidemment de compositions différentes : c'est une première caractéristique à prendre en compte dans le choix du support. De plus, les souillures biologiques et

non biologiques ne se comportent pas de la même manière selon la surface sur laquelle elles se trouvent.

Ces considérations amènent à choisir deux natures de support, une pour le modèle thermorésistant et une autre pour le modèle thermosensible.

Modèle thermorésistant : fils d'acier inoxydable

La littérature rapporte dans plusieurs articles l'utilisation de fils d'acier inoxydable implantés par voie intracérébrale (1, 2-4). Ce modèle est choisi comme référentiel.

► Description du support thermorésistant

Acier inoxydable 316, diamètre 0,16 mm à 0,3 mm, longueur 3 mm pour le modèle souris ou 5 mm pour le modèle hamster.

Modèle thermosensible : l'expérimentation avec le modèle définitif est en cours de finalisation et sera intégrée lors d'une mise à jour du protocole.

Le support thermosensible choisi, répond aux critères suivants :

- permet l'adhésion de l'homogénat pour qu'il reste fixé sur le support à la fin de l'étape de contamination de ce dernier à une quantité équivalente ou supérieure à celle fixée sur l'acier inoxydable.
- résiste aux produits ou procédés testés.
- est thermosensible c'est-à-dire est dégradé par une température de 134°C +/- 3°C
- se présente sous forme de fils de 3 à 5 mm de long et de diamètre de 0,15 à 0,3 mm environ
- est suffisamment rigide pour permettre une manipulation aisée et l'implantation chez l'animal.

Le modèle de support thermosensible utilisé pour les résultats indiqués plus bas est représenté par des fils de soie multibrin. Des développements sont actuellement menés pour définir d'autres supports modèles, dont la nature du matériau se rapproche encore plus de ceux constituant les dispositifs médicaux thermosensibles.

► Description du support thermosensible actuel :

Fils de soie multibrin (par exemple Seraflex 2/0, Serag Wiessner), diamètre 2/0 (0,2 mm), longueur 3 mm pour le modèle souris ou 5 mm pour le modèle hamster.

b Préparation du support

Préparation des fils d'acier inoxydable

- Couper des fils d'une longueur de 3 mm (modèle souris) ou 5 mm (modèle hamster) et d'un diamètre de 0,16 à 0,3 mm
- Eliminer les résidus de fabrication : traitement aux ultra-sons à puissance maximale pendant 15 minutes dans un bain d'éthyl acétate pur puis nettoyage au 2-propanol
- Rincer dans de l'eau ultra-pure pour ôter les traces de 2-propanol
- Eliminer les souillures biologiques : sonication à puissance maximale pendant 15 minutes dans une solution de triton X-100 à 2%

- Rincer à l'eau ultra-pure
- Sécher pendant 24 heures à température ambiante sous hotte à flux laminaire.

Préparation des fils de soie multibrin

- Couper des fils d'une longueur de 3 mm (modèle souris) ou 5 mm (modèle hamster) et d'un diamètre de 2/0 (0,20 mm)
- Les fils sont conservés dans de l'éthanol 70 %. Avant utilisation, ils sont séchés pendant 24 heures à température ambiante sous hotte à flux laminaire.

c Contamination des supports

-Supports pour gamme contrôle

Pour réaliser une gamme contrôle indispensable à l'estimation de la réduction de la charge infectieuse induite par les traitements, il convient de contaminer les supports préparés selon le mode opératoire suivant :

- Disposer 200µl d'une dilution de la gamme contrôle préparée comme ci-dessus dans des tubes de type Eppendorf 2ml contenant 5 supports.
- Placer le tube sous agitation lente 1 heure à température ambiante (18°C – 25°C)
- L'homogénat est éliminé par pipetage
- Laisser sécher les supports sous un poste de sécurité microbiologique (PSM) minimum 16 heures, à plat dans une boîte de Pétri stérile. Les supports doivent être bien individualisés les uns des autres.
- Rincer 5 minutes avec 1 ml de PBS sous agitation lente
- Laisser sécher sous un PSM pendant 1 heure, les supports devant bien être individualisés les uns par rapport aux autres.
- Si les supports ne sont pas inoculés à l'animal immédiatement, les congeler à -80°C dans des tubes étanches.
- Après décongélation, laisser sécher les supports 1 heure avant utilisation

-Supports pour traitement comparateur, témoin d'efficacité partielle ou du produit ou procédé à tester

Pour estimer la réduction de la charge infectieuse par les traitements comparateurs, ou les traitements témoins d'efficacité partielle ou les produits ou procédés à tester, il convient d'appliquer les traitements sur des supports contaminés comme ci-dessus avec de l'homogénat positif à la dilution 10^{-1} . Ces supports traités (cf. 2.1.1.3 à 2.1.1.5) seront ensuite inoculés à l'animal selon le mode opératoire décrit en 2.1.2.

- Si les supports traités ne sont pas inoculés à l'animal immédiatement, les congeler à -80°C dans des tubes étanches.
- Après décongélation, laisser sécher les supports 1 heure avant utilisation

2.1.1.3 Traitements comparateurs :

a Choix des traitements comparateurs

Compte tenu des recommandations de l'OMS (5) relatives aux procédés considérés comme inactivant des ATNC, des données issues de la littérature relatives à d'autres procédés que ceux cités par l'OMS et des recommandations françaises en vigueur (6), les traitements comparateurs retenus pour ce protocole sont :

- La stérilisation à la vapeur d'eau à 134°C sous 3 bars de pression pendant 18 minutes ;
- L'immersion dans la soude 1N pendant 1 heure à température ambiante ;
- L'immersion dans l'eau de javel 20 000 ppm, pendant 1 heure à température ambiante.

L'évaluation du produit ou du procédé à tester est réalisée par comparaison de ses performances avec celles obtenues avec au moins deux des traitements comparateurs cités ci-dessus. Les deux traitements comparateurs retenus devront être cohérents avec le produit ou procédé à tester (e.g. un produit alcalin devra au moins se comparer à la soude tandis qu'un procédé à base de vapeurs d'agent actif devra au moins se comparer à la stérilisation par vapeur d'eau.).

b Application des traitements comparateurs sur les supports contaminés

Les traitements comparateurs sont appliqués sur les supports contaminés séchés obtenus après le dernier séchage avant congélation, éventuelle (cf. 2.1.1.2 c); Les traitements comparateurs **liquides** sont réalisés dans de l'eau dure préparée à partir de l'eau ultra pure selon la norme NF-EN14476, ci-après appelée eau dure normée.

Préparation de l'eau dure normée :

1-Solution A :

Dissoudre 19.84 g de chlorure de magnésium (MgCl₂) et 46.24 g de chlorure de calcium (CaCl₂) dans 1000 ml d'eau milliQ.

Stériliser par filtration sur membrane 0.22µm ou à l'autoclave.

Conservation 1 mois à +4°C;

2-Solution B :

Dissoudre 35,02 g de bicarbonate de sodium (NaHCO₃) dans 1000 ml d'eau milliQ.

Stériliser par filtration sur membrane 0.22µm.

Conservation 1 semaine à +4°C;

3- Diluer 6.0 ml de **solution A** + 8.0 ml de **solution B** dans 1000 ml d'eau milliQ stérile. Le pH doit être de 7.0 ± 0.2 à 20°C.

Utiliser dans les 12 h suivant la préparation.

Application du traitement comparateur à la soude 1 N 1 heure (18°C-25°C)

- Préparer la soude 1N extemporanément (2 grammes de pastilles de soude + eau dure normée (qsp 50 ml) à température ambiante).
- Vérifier le pH
- Placer les supports contaminés par 5 dans des tubes de type Eppendorf 2 ml

- Ajouter 1ml de soude 1N fraîchement préparée dans les tubes contenant les tiges contaminées à traiter
- Maintenir le contact pendant 1 heure à température ambiante (18-25°C) sous agitation lente
- Le produit est éliminé par pipetage
- Trois rinçages de 2 minutes sont effectués par adjonction de 1 ml d'eau dure normée, éliminée par pipetage à chaque fois

Application du traitement comparateur à l'eau de javel 20.000 ppm 1 heure (18°C-25°C)

- Préparer l'eau de javel 20 000 ppm ou 2% de chlore actif (c.a.) extemporanément, par dilution d'eau de javel liquide concentrée dans de l'eau dure normée.
- Titrer le chlore actif (7) pour vérifier que le titre obtenu après dilution correspond bien au titre attendu.
- Placer les supports contaminés par 5 dans des tubes de type Eppendorf 2 ml
- Ajouter 1ml d'eau de javel 2 % c.a. fraîchement préparée dans les tubes contenant les supports contaminés à traiter
- Maintenir le contact pendant 1 heure à température ambiante (18-25°C) sous agitation lente
- Le produit est éliminé par pipetage
- Trois rinçages de 2 minutes sont effectués par adjonction de 1 ml d'eau dure normée, éliminée par pipetage à chaque fois

Application du traitement comparateur par autoclavage à 134°C pendant 18 minutes

- Disposer les supports contaminés dans un récipient en verre (thermorésistant mais ne conduisant pas la chaleur), en veillant bien à ce qu'ils ne soient pas en contact les uns avec les autres
- Fermer le récipient au moyen d'un couvercle non étanche laissant passer la vapeur
- Appliquer le traitement par autoclavage à 134°C pendant 18 minutes, selon un cycle « solides »
- Laisser refroidir.

Après application des traitements comparateurs, les étapes suivantes sont réalisées :

- Les tubes sont laissés ouverts pendant au moins deux heures sous un PSM pour obtenir un séchage parfait ;
- Au besoin, congeler les supports à -80°C dans l'attente de l'inoculation ;
- Après décongélation, laisser sécher les supports 1 heure avant l'inoculation.

2.1.1.4 Témoins d'efficacité partielle

Des traitements réputés partiellement efficaces seront appliqués en parallèle, afin de servir de témoin interne d'efficacité partielle pour valider l'étude réalisée. Ces traitements sont :

- L'immersion dans la soude 0,1N pendant 15 minutes ou 1 heure à température ambiante (8) ;
- L'immersion dans l'eau de javel 2 000 ppm ou 5 000 ppm pendant 15 minutes.

Tout comme pour les traitements comparateurs, ces traitements témoins d'efficacité partielle seront :

- appliqués sur les supports contaminés séchés obtenus après le dernier séchage avant congélation, éventuelle (cf. 2.1.1.2 c);
- réalisés dans de l'eau dure normée préparée à partir de l'eau ultra pure selon la norme NF-EN14476.

Application du témoin d'efficacité partielle à la soude 0,1 N 15 minutes ou 1 heure (18°C-25°C)

- Diluer la soude 1N au 1 :10 dans de l'eau dure normée.
- Vérifier le pH
- Placer les supports contaminés par 5 dans des tubes de type Eppendorf 2 ml
- Ajouter 1ml de soude 0,1N fraîchement préparée dans les tubes contenant les supports contaminés à traiter
- Maintenir le contact pendant 15 minutes ou 1 heure à température ambiante (18-25°C) sous agitation lente
- Le produit est éliminé par pipetage
- Trois rinçages de 2 minutes sont effectués par adjonction de 1 ml d'eau dure normée, éliminée par pipetage à chaque fois

Application du témoin d'efficacité partielle à l'eau de javel 5.000 ppm 15 minutes (18°C-25°C)

- Diluer l'eau de javel à 2% c.a. au ¼ dans de l'eau dure normée.
- Titrer le chlore actif par une méthode d'analyse chimique (7) pour vérifier que le titre obtenu après dilution correspond bien au titre attendu.
- Placer les supports contaminés par 5 dans des tubes de type Eppendorf 2 ml
- Ajouter 1ml d'eau de javel 0,5 % c.a. fraîchement préparée dans les tubes contenant les supports contaminés à traiter
- Maintenir le contact pendant 15 minutes à température ambiante (18-25°C) sous agitation lente
- Le produit est éliminé par pipetage
- Trois rinçages de 2 minutes sont effectués par adjonction de 1 ml d'eau dure normée, éliminée par pipetage à chaque fois

Application du témoin d'efficacité partielle à l'eau de javel 2.000 ppm 15 minutes (18°C-25°C)

- Diluer l'eau de javel à 2% c.a. au 1/10 dans de l'eau dure normée.
- Titrer le chlore actif par une méthode d'analyse chimique (7) pour vérifier que le titre obtenu après dilution correspond bien au titre attendu.
- Placer les supports contaminés par 5 dans des tubes de type Eppendorf 2 ml

- Ajouter 1ml d'eau de javel 0,2 % c.a. fraîchement préparée dans les tubes contenant les supports contaminés à traiter
- Maintenir le contact pendant 15 minutes à température ambiante (18-25°C) sous agitation lente
- Le produit est éliminé par pipetage
- Trois rinçages de 2 minutes sont effectués par adjonction de 1 ml d'eau dure normée, éliminée par pipetage à chaque fois

Après application des témoins d'efficacité partielle, les étapes suivantes sont réalisées :

- Les tubes sont laissés ouverts pendant au moins deux heures sous un PSM pour obtenir un séchage parfait ;
- Au besoin, congeler les supports à -80°C dans l'at tente de l'inoculation. ;
- Après décongélation, laisser sécher les supports 1 heure avant l'inoculation.

2.1.1.5 Produit ou procédé à tester

Le produit ou le procédé à tester est appliqué, selon les recommandations du fabricant, sur les supports contaminés séchés obtenus après le dernier séchage avant congélation, éventuelle.

- Le produit est éliminé par pipetage
- Trois rinçages de 2 minutes sont effectués par adjonction de 1 ml d'eau dure normée, éliminée par pipetage à chaque fois
- Les tubes sont laissés ouverts pendant 2 heures sous un PSM pour obtenir un séchage parfait
- Au besoin, congeler les supports à -80°C dans l'at tente de l'inoculation.
- Après décongélation, laisser sécher les supports 1 heure avant l'inoculation

Dans le cas de l'évaluation **d'un procédé physique**, seules les trois dernières étapes (séchage / congélation / décongélation) sont appliquées.

2.1.2) INOCULATION DES ANIMAUX

Les études sont réalisées dans des locaux agréés pour l'expérimentation animale, présentant des niveaux de sécurité microbiologique compatibles avec l'utilisation de souches de prion. Les travaux d'expérimentation animale et d'entretien des animaux sont réalisés par du personnel qualifié dans le respect des règles éthiques et après accord des comités ad hoc.

Pour le modèle de hamster infecté par la souche 263K, des hamsters syriens femelles de 6 à 8 semaines sont préférés. Egalement des animaux femelles de 6 à 8 semaines sont préférés pour les modèles souris. Les animaux sont identifiés de manière individuelle (puce électronique, tatouage, ou bague) et hébergés selon les normes en vigueur.

Sous anesthésie générale, les animaux sont inoculés par voie intra-cérébrale à raison d'un support par animal, laissée à demeure pendant toute la durée de l'étude (cf. 2.2.1).

- Pour les supports contaminés avec les différentes dilutions (gamme contrôle) : un minimum de 4 animaux pour les trois premiers points de dilution, un minimum de 8 animaux (préférentiellement 12 pour renforcer la puissance statistique de l'étude) pour les autres dilutions.
- Pour les supports contaminés (homogénat positif à 10^{-1}) et traités : un minimum de 12 animaux sera inoculé par traitement, à raison de 4 animaux pour chacun des triplicats de traitement

2.2. RESULTATS POUR LES MODELES ANIMAUX ET SOUCHES PRIONS

2.2.1) DONNEES BRUTES

Les données brutes suivantes sont recueillies et fournies par le fabricant pour chaque animal qui doit être identifié individuellement :

- numéro de l'expérience,
- lignée de souris ou de hamster utilisée,
- son fournisseur et son statut sanitaire,
- sexe,
- date de naissance
- souche de prions inoculée,
- date d'inoculation,
- date du début des signes cliniques par une surveillance 2 fois par semaine avec une description des signes cliniques¹,
- date du sacrifice de l'animal.
- Le cerveau de chaque animal est prélevé pour une recherche de la forme pathologique de la PrP par une méthode biochimique sensible et reconnue, la méthode du Western Blot (WB). Tous les animaux survivants au terme de l'expérimentation sont sacrifiés et analysés.

La durée de l'étude doit être comprise entre 3 et 6 fois la période d'incubation minimale observée dans le modèle expérimental considéré.

Ainsi pour le modèle de hamsters infectés par la souche 263K la période d'incubation minimale est de 90 jours, la durée de l'étude est de 12 à 18 mois.

¹ Les signes cliniques sont de cinq ordres :

- Troubles du comportement (excitabilité, troubles de la nidation et du toilettage),
- Perte du réflexe de positionnement visuel,
- Ataxie cérébelleuse, démarche anormale, prostration,
- Obésité puis amaigrissement,
- Paraplégie puis tétraplégie.

2.2.2) EXPRESSION DES RESULTATS ET METHODOLOGIE STATISTIQUE

L'analyse statistique de ces données est fondée sur l'approche « end-point titration ». Seul le statut final de l'animal (infecté / non infecté) à la fin de l'expérimentation sera considéré.

Ce statut est déterminé comme suit : la durée de l'expérience est fixée a priori comme la durée de suivi des animaux. Le choix de cette durée doit être justifié, dans un souci de limiter au maximum les cas de Western Blots négatifs en raison d'une durée d'observation trop courte. Ainsi, pour les hamsters la période d'incubation minimale est de 90 jours, la durée de l'étude est de 12 à 18 mois. Pour les souris, la période minimale est de 6 mois, la durée d'étude est de 18 mois à 2 ans (proche de l'espérance de vie de ces animaux).

Le **statut final** est alors déterminé comme suit :

- 1) Les animaux dont le cerveau présente les caractéristiques biochimiques de la pathologie (WB+) sont considérés comme « infectés »
- 2) Les animaux décédés au cours de l'étude mais dont le cerveau ne présentait aucune caractéristique de la pathologie (WB-) sont considérés comme non infectés au moment de leur décès (lié à une cause intercurrente) mais sont éliminés de l'étude. En effet, il n'est pas possible de conclure quant à leur statut vis-à-vis de l'infection, ces animaux ayant potentiellement pu présenter les signes de l'infection postérieurement à cette date.
- 3) Les autres animaux, qui étaient donc à la fois vivants à la fin de l'expérience, et dont le cerveau ne présentait aucune caractéristique de la pathologie (WB-) sont considérés comme non infectés.

Un taux de transmission est ainsi établi d'une part pour chaque dilution de la gamme contrôle, et d'autre part pour chaque traitement testé dans l'expérience. Egalement, une période moyenne d'incubation est calculée pour chacun de ces groupes.

Pour la gamme contrôle, le mode de calcul de la dose infectieuse 50% (DI₅₀ i.e. 50% des animaux infectés au sein d'une population ou groupe d'animaux) reposera sur l'analyse du statut final des animaux. La détermination de la DI₅₀ reposera sur la réponse étudiée en tout-ou-rien (infecté/non infecté) comme par exemple, les méthodes de Spearman & Kärber, des Probits ou des Logits. L'estimation de la DI₅₀ est assortie de son intervalle de confiance à 95%.

L'efficacité du procédé ou produit testé est estimée en évaluant le facteur de réduction (RF) qu'il induit, sur la base de la comparaison des taux de transmission et des périodes d'incubation dans le groupe traité d'une part, avec les résultats obtenus pour les points de la gamme contrôle d'autre part. Selon la même méthode, les facteurs de réduction (RF) induits sont estimés pour chacun des traitements comparateurs et du ou des témoins d'efficacité partielle appliqués.

Par ailleurs, un calcul précis de ce facteur de réduction ne pourra être réalisé qu'en effectuant le rapport des DI₅₀ en présence et en absence du produit ou du procédé à tester. En cas d'un taux de transmission de 100 % après traitement sur des supports

contaminés avec l'homogénat positif 10^{-1} , la comparaison de ces DI_{50} implique alors l'application du traitement à tester sur les différents points de gamme.

L'estimation des facteurs de réduction devra être assortie de son intervalle de confiance (IC) à 95%. Le produit ou le procédé testé devra être mis en regard de performances obtenues avec les traitements comparateurs retenus.

2.2.3) RESULTATS

Les résultats suivants devront être fournis :

- Evaluation de la charge infectieuse apparente adsorbée sur le support, sous la forme d'une DI 50 % (avec son intervalle de confiance à 95 %). Cette charge infectieuse doit être suffisante pour permettre d'observer une mortalité à la dilution 10^{-6} . Notamment, l'augmentation du nombre d'animaux inoculés avec les fortes dilutions augmente d'autant la probabilité de détecter des animaux positifs pour ces groupes, et par conséquent la sensibilité du modèle.
- Traitements comparateurs : dans les groupes d'animaux inoculés avec les supports traités avec les traitements comparateurs, aucune infection ne devra être observée (validation de la pertinence du modèle et de la bonne réalisation des procédés)
- Traitements témoins d'efficacité partielle : dans les groupes d'animaux inoculés avec les supports traités avec les traitements témoins d'efficacité partielle, un taux de transmission compris entre 1 et 99 % devra être observé (validation de la robustesse de la contamination)
- Traitements étudiés : pour chaque produit ou procédé étudié, le taux de transmission devra être fourni, ainsi que les périodes d'incubation individuelles (une courbe de Kaplan-Meier pourra être proposée avec son intervalle de confiance à 95%, et mis en regard des courbes observées pour chaque point de dilution de la gamme). Ces comparaisons permettront d'estimer un facteur de réduction induit par le produit ou le procédé à tester utilisé.

A titre d'exemple, les résultats suivants ont été obtenus (données CEA en cours de publication mises à la disposition de l' Afssaps) :

Modèle	Hamster 263K		
Type	Thermorésistant		
Support	Acier		
Gamme-contrôle	Transmission		
10-1	100%	24/24	
10-2	100%	28/28	
10-3	100%	28/28	
10-4	90%	18/20	
10-5	82%	23/28	
10-6	18%	5/28	
10-7	7%	2/28	
10-8	5%	1/28	
		DI50	IC 95 %
		4,57	4,27 - 4,92
	Transmission	RF	IC 95 %
Traitement comparateur			
Soude 1M 1 heure	0%	0/20	> 6,1
Hypochlorite de sodium 20.000 ppm 1 heure	0%	0/31	> 6,4
Autoclavage 134°C 18 minutes	0%	0/22	> 6,1
Traitement témoin d'efficacité partielle			
Soude 0,1M 15 minutes			
Soude 0,1M 1 heure	36%	4/11	4,7
Hypochlorite de sodium 2.000 ppm 15 minutes	40%	6/15	5
Hypochlorite de sodium 5.000 ppm 15 minutes			

Modèle Hamster 263K
Type Thermosensible
Support Fil de soie

Gamme-contrôle	Transmission	
10-1	100%	8/8
10-2	100%	8/8
10-3	100%	8/8
10-4	100%	8/8
10-5	100%	8/8
10-6	50%	4/8
10-7	0%	0/8
10-8	0%	0/8

		IC 95 %
DI50	5,00	4,99-5,01

Traitement comparateur	Transmission		RF	IC 95 %
Soude 1M 1 heure	0 %	0/8	> 5,7	
Hypochlorite de sodium 20.000 ppm 1 heure				
Autoclavage 134°C 18 minutes				
Traitement témoin d'efficacité partielle				
Soude 0,1M 15 minutes	100 %	8/8	2,5	1,8 - 3
Soude 0,1M 1 heure	0 %	0/8		> 5,7
Hypochlorite de sodium 2.000 ppm 15 minutes	87 %	5/8	4,9	3,8 - 5,6
Hypochlorite de sodium 5.000 ppm 15 minutes	25 %	2/8	5,4	4,6 - > 6

Modèle Souris 6PB1
Type Thermorésistant
Support Acier

Gamme-contrôle	Transmission	
10-1	100%	10/10
10-2	86%	6/7
10-3	87%	7/8
10-4	44%	4/9
10-5	78%	7/9
10-6	33%	3/9
10-7	0%	0/8
10-8	0%	0/8

DI50	4,61	IC 95 %	3,10 - 4,82
-------------	------	----------------	-------------

Traitement comparateur	Transmission		RF	IC 95 %
Soude 1M 1 heure	0%	0/9	> 5,2	
Hypochlorite de sodium 20.000 ppm 1 heure	0%	0/9	> 5,2	
Autoclavage 134°C 18 minutes	0%	0/5	> 4,6	

Traitement témoin d'efficacité partielle

Soude 0,1M 15 minutes
 Soude 0,1M 1 heure
 Hypochlorite de sodium 2.000 ppm 15 minutes
 Hypochlorite de sodium 5.000 ppm 15 minutes

Modèle Souris 6PB1
Type Thermosensible
Support Teflon / polyuréthane
En cours

3. METHODE IN VITRO

Cette méthode *in vitro* vient en complément de la méthode *in vivo* (9).

Elle a pour objectif de renseigner sur les mécanismes d'action du produit ou procédé vis-à-vis des prions, et tout particulièrement discriminer l'inactivation des ATNC du simple décrochage du dispositif médical (ci-après dénommé élimination) conduisant à la diminution d'infectiosité apparente.

Elle présente aussi l'intérêt de vérifier la corrélation entre infectiosité et protéine prion pathologique.

3.1 METHODOLOGIE : PRINCIPES GENERAUX

Pour l'approche *in vitro*, le protocole n'a pas vocation à figer une méthodologie particulière. Il présente les grandes lignes méthodologiques à respecter et laisse à l'appréciation de l'industriel de présenter une technique avec les critères de qualité permettant une interprétation correcte des résultats.

Dans la mesure du possible, la méthodologie sera proche de celle utilisée pour la méthode *in vivo* décrite précédemment afin d'assurer une bonne corrélation entre les deux méthodes.

Le principe retenu est a minima celui d'une analyse biochimique visant à détecter la PrP, seul marqueur spécifique des maladies à prions, résiduelle sur les supports en comparaison d'une analyse en solution soit directement après contact du matériel infectieux avec le procédé ou produit, soit dans les effluents générés par le traitement des supports.

Cette analyse permet de qualifier la performance du produit ou du procédé en inactivant, éliminant (détergent) ou inactivant/éliminant.

Tout autre résultat portant sur une approche pouvant apporter des informations supplémentaires quant aux mécanismes d'action du produit ou du procédé pourra être fourni en complément.

Dans le cadre de cette approche *in vitro*, tous les détails nécessaires relatifs à la méthodologie utilisée devront être fournis afin de permettre de juger de la pertinence de l'approche choisie et de la cohérence des résultats. Notamment, les contrôles de spécificité et de sensibilité devront être renseignés.

Le dossier fourni par le fabricant comprend, notamment :

- Une description et une justification du modèle expérimental (souche de prion) choisi ;
- Une description et une justification du support choisi ;
Idéalement, le support utilisé pour l'étude *in vitro* est identique à celui utilisé pour l'étude *in vivo*.
- Une description détaillée du mode de contamination des supports ;
- Une description détaillée de la réalisation de la gamme contrôle ;

Pour la méthode *in vitro* cette gamme contrôle permet d'attester de la robustesse et de la sensibilité de la technique utilisée.

- La justification du choix des traitements comparateurs et du ou des traitements témoins d'efficacité partielle ;

Comme pour l'*in vivo*, l'évaluation du produit ou du procédé à tester est réalisée par comparaison de ses performances avec celles obtenues avec au moins deux des traitements pris comme comparateur. Les deux traitements comparateurs retenus devront être cohérents avec le produit ou procédé à tester. En complément, des traitements réputés partiellement efficaces sont appliqués en parallèle, afin de servir de témoin interne d'efficacité partielle pour valider l'étude réalisée. Ces traitements d'efficacité partielle seront basés sur des dilutions ou des temps d'action réduits des traitements comparateurs, et ils devront être adaptés au modèle afin d'avoir une efficacité partielle par rapport à la gamme contrôle de l'essai.

- La description du mode d'application de ces traitements et du produit ou procédé à tester sur les supports contaminés ;

A minima, le produit ou le procédé à tester doit être utilisé tel que recommandé par le fabricant.

- Si le produit ou procédé à tester génère des effluents qui seront analysés, la description détaillée du recueil des effluents ;

Par effluents on entend

- les liquides récupérés après l'application d'un traitement liquide sur le support contaminé,

- éventuellement, les liquides de rinçage du support contaminé après traitements.

L'étude des effluents comparativement aux supports est nécessaire pour interpréter les résultats et apprécier les phénomènes de décrochage pur différents de l'inactivation.

Le fabricant peut au choix, décider d'une étude de l'efficacité du procédé sur un homogénat cérébral en solution, notamment en cas de difficulté technique à gérer l'inactivation des effluents et/ou le volume de récupération de l'effluent à tester.

- La description détaillée de l'analyse biochimique des supports, des effluents ou des solutions.

Généralement, les techniques utilisent une désorption de la PrP du support, quel que soit le type, pour une analyse ultérieure immunologique. Cependant, l'utilisation d'une technique de détection directe de la PrP sur le support est envisageable, accompagnée du protocole de validation de la technique.

Chaque manipulation est réalisée avec et sans traitement à la protéinase K (PK). Pour être exploitables, les résultats doivent obligatoirement faire état d'une manipulation sans traitement par la PK.

Ces éléments sont issus notamment de données de la littérature (3, 9, 10, 11, 12, 13, 14)

3.2 RESULTATS *IN VITRO*

3.2.1) DONNEES BRUTES

Les données brutes consistent en l'observation comparative du signal de PrP des différents points de gamme avec celui de PrP résiduelle issus des supports et des effluents traités avec le produit ou procédé à tester, les traitements comparateurs et le ou les témoins d'efficacité interne.

- Signaux en chimiluminescence non linéaires sur la totalité de la gamme
- Pour chaque puits, l'observation est tout d'abord qualitative : présence ou absence de signal
- Par ailleurs, une comparaison quantitative de l'intensité des signaux permet d'estimer la quantité de PrP résiduelle au regard des signaux des différents points de gamme. S'il y a un doute sur un puits, une quantification du signal par caméra est possible. L'interprétation nécessite l'établissement d'une limite de détection.

3.2.2) EXPRESSION DES RESULTATS

En l'absence d'analyse quantitative, les résultats sont exprimés de la manière suivante :

- Signal négatif dans le puits considéré : absence de PrP détectable, en tenant compte de la limite de dilution du témoin positif détectable.
- Signal positif dans le puits considéré : si celui-ci est faible et inférieur au dernier point de gamme, on peut annoncer une diminution significative. Si celui-ci est d'intensité supérieure, on ne peut pas conclure à une diminution significative du signal.

Lors d'estimation quantitative du signal, il est possible d'estimer un facteur de réduction.

3.2.3) RESULTATS

A minima, l'approche *in vitro* permet de préciser si l'efficacité du produit ou procédé repose sur des phénomènes d'élimination ou d'inactivation.

Deux scénarios sont notamment envisageables :

- Aucun signal (support / effluent ou solution)
L'efficacité partielle est probablement liée à une inactivation de la protéine prion, qu'y soit associé un effet détergent ou non.
- Signal dans l'effluent (ou solution) avec / sans signal pour le support
L'efficacité partielle est tout ou partie liée à une élimination de la protéine prion par effet détergent majeur.

Les résultats obtenus en présence de protéinase K doivent être interprétés avec réserve, notamment du fait de la sensibilisation possible de la PrP^{sc} à un traitement préalable de type alcalin introduisant donc un biais d'interprétation.

Quoiqu'il en soit, du fait de la faible sensibilité de la méthode *in vitro* par rapport à l'étude *in vivo*, un procédé efficace totalement ne pourrait revendiquer une inactivation totale qu'en présence d'une étude *in vivo* sur effluent ou solution.

4. PERSPECTIVE : CULTURE CELLULAIRE

Cette procédure décrit l'utilisation des cultures cellulaires comme méthode alternative à l'expérimentation animale pour la mesure du niveau d'infectiosité associé à des surfaces, avant et après traitements avec un produit ou un procédé revendiquant l'élimination ou l'inactivation des prions.

L'expérimentation animale pour déterminer l'infectiosité telle que présentée dans les parties précédentes de ce protocole présente en effet des nombreuses contraintes dont notamment :

- l'utilisation d'animaux qui est sujet à des cautions éthiques
- le coût important de ces approches
- le délai très long d'obtention des résultats
- les limites des modèles transgéniques utilisés éventuellement, en termes de reproductibilité et de reproduction des phénomènes physiopathologiques

L'utilisation de cultures cellulaires infectables par les prions est ainsi attractive dans la mesure où ces modèles sont capables, avec une sensibilité et une reproductibilité suffisantes, de détecter l'infectiosité prion. Des publications ont montré que cela était le cas dans certains modèles précis (N2a avec une souche classique issue de petit ruminant) (15). La sensibilité de la méthode est comparable à celle des modèles animaux et des travaux ultérieurs ont également montré qu'il était possible de les utiliser pour tester une contamination de surface avec le modèle de support proposé dans ce protocole (4, 16).

En terme de souche de prion, il faut cependant noter que ce protocole prion se focalise sur la souche 263K de hamster utilisée en parallèle avec une souche d'origine humaine ou bovine. Pour l'instant, il n'y a pas de modèle cellulaire publié sensible à la souche 263K. Pour les souches d'origines humaine ou bovine, plusieurs publications décrivent des systèmes cellulaires sensibles (17). A ce jour cependant ces souches n'ont pas été utilisées dans un système quantifié avec des fils pour tester une décontamination prion comme publié récemment avec les cellules N2a et une souche issue du mouton (16).

Compte tenu des éléments cités précédemment et des études réalisées dans le cadre de la définition de ce protocole, les points importants pour la validation des cultures de cellules comme méthode alternative au deuxième modèle (en plus du modèle animal hamster/ souche 263K) sont les suivants :

- utilisation d'un modèle cellulaire publié ayant déjà montré sa susceptibilité aux prions
- utilisation d'une souche d'origine humaine ou bovine
- utilisation de supports préparés selon les procédures identiques à celles décrites précédemment
- comparaison des résultats des produits ou procédés à tester aux traitements comparateurs et aux témoins internes d'efficacité partielle tel que décrit précédemment dans le protocole.
- capacité de la culture à couvrir au moins 4 log d'infectiosité.

La procédure détaillée de l'utilisation des cultures cellulaires est encore en cours de finalisation et sera intégrée lors d'une mise à jour du protocole. Cependant les étapes et éléments importants de cette procédure sont listés ci-dessous :

- culture des cellules standardisée en termes de passage et de stabilité du phénotype de sensibilité aux prions
- cultures réalisées dans des conditions similaires pour toutes les expériences faisant partie d'une même expérimentation (même lot de produits de culture, de consommables...)
- traçabilité de tous les produits utilisés
- utilisation de supports de même nature que dans les approches *in vivo* mais utilisation possible de support de longueur supérieure et de plusieurs supports par puits de culture.
- donnée suffisante sur la reproductibilité de l'infection cellulaire. Une répétition des résultats sur trois expériences indépendantes sera un point important pour la validité du modèle et des résultats.
- mise en contact entre les supports et les cultures.
- repiquage des cellules (totales ou celles en contact avec les supports uniquement) un nombre de fois suffisant pour observer une disparition d'un signal éventuellement dû à l'inoculum (support).
- détection de la positivité de transmission à un puits cellulaire par une méthode validée de détection de la PrPsc.
- traitement statistique des données se calquant sur l'analyse décrite pour les modèles animaux en considérant que chaque puits cellulaire (indépendamment de la méthode de détection) comme « une souris ». Ceci implique de définir auparavant un critère de positivité de transmission pour un puits.

BIBLIOGRAPHIE

1. Zobeley, E., E. Flechsig, A. Cozzio, M. Enari, and C. Weissmann. 1999. Infectivity of scrapie prions bound to a stainless steel surface. *Mol Med* 5:240.
2. Yan, Z. X., L. Stitz, P. Heeg, E. Pfaff, and K. Roth. 2004. Infectivity of prion protein bound to stainless steel wires: a model for testing decontamination procedures for transmissible spongiform encephalopathies. *Infect Control Hosp Epidemiol* 25:280.
3. Fichet, G., E. Comoy, C. Duval, K. Antloga, C. Dehen, A. Charbonnier, G. McDonnell, P. Brown, C. I. Lasmezas, and J. P. Deslys. 2004. Novel methods for disinfection of prion-contaminated medical devices. *Lancet* 364:521.
4. Flechsig E, Hegyi I, Enari M, Schwarz P, Collinge J, Weissmann C. 2001. Transmission of scrapie by steel-surface-bound prions. *Mol Med*;7(10):679-84.
5. WHO manual for surveillance of human transmissible spongiform encephalopathies including variant Creutzfeldt-Jakob disease, 2003.
<http://whqlibdoc.who.int/publications/2003/9241545887.pdf>
6. CIRCULAIRE N°XX DGS/RI3/DHOS/E2/2009/XX relative à l'actualisation des précautions à observer lors des soins en vue de réduire les risques de transmission d'agents transmissibles non conventionnels et abrogeant la circulaire 138
7. Teneur en chlore actif des Eaux et Concentrés de Javel-Chambre Syndicale Nationale de l'Eau de Javel- 05/06. www.eaudejavel.fr
8. Brown, P., Rohwer, R.G. and Gajdusek, D.C. 1986 Newer data on the inactivation of scrapie virus or Creutzfeldt-Jakob disease virus in brain tissue. *J. Infect. Dis.* 153 : 1145-1148.
9. Käsermann, F., Kempf, C. 2003. Sodium hydroxide renders the prion protein PrP^{Sc} sensitive to proteinase K. *J Gen Virol.*;84:3173-76.
10. Lawson VA, Stewart JD, Masters CL. 2007. Enzymatic detergent treatment protocol that reduces protease-resistant prion protein load and infectivity from surgical-steel monofilaments contaminated with a human-derived prion strain. *J Gen Virol. Oct;88(Pt 10):2905-14.*
11. Lemmer K, Mielke M, Pauli G, Beekes M. 2004. Decontamination of surgical instruments from prion proteins: *in vitro* studies on the detachment, destabilization and degradation of PrP^{Sc} bound to steel surfaces. *J Gen Virol. Dec;85(Pt 12):3805-16*
12. Vadrot C, Darbord JC. 2006. Quantitative evaluation of prion inactivation comparing steam sterilization and chemical sterilants: proposed method for test standardization. *J Hosp Infect. Oct;64(2):143-8.*
13. Rogez-Kreuz C, Yousfi R, Soufflet C, Quadrio I, Yan ZX, Huyot V, Aubenque C, Destrez P, Roth K, Roberts C, Favero M, Clayette P. 2009. Inactivation of animal and human prions by hydrogen peroxide gas plasma sterilization. *Infect Control Hosp Epidemiol. Aug;30(8):769-77.*
14. Lehmann S, Pastore M, Rogez-Kreuz C, Richard M, Belondrade M, Rauwel G, Durand F, Yousfi R, Criquelion J, Clayette P, Perret-Liaudet A. 2009. New hospital disinfection processes for both conventional and prion infectious agents compatible with thermosensitive medical equipment. *J Hosp Infect. Aug;72(4):342-50.*
15. Klohn, P. C., Stoltze, L., Flechsig, E., Enari, M., Weissmann, C., A quantitative, highly sensitive cell-based infectivity assay for mouse scrapie prions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, 100, 11666-11671.
16. Edgeworth JA, Jackson GS, Clarke AR, Weissmann C, Collinge J. Highly sensitive, quantitative cell-based assay for prions adsorbed to solid surfaces. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106(9):3479-83.
17. Vilette *Vet Res.* 2008 Jul-Aug;39(4):10.