



**HAL**  
open science

## Sur un procédé hautes pressions de sécurisation du plasma sanguin humain

Nolwennig Rivalain

► **To cite this version:**

Nolwennig Rivalain. Sur un procédé hautes pressions de sécurisation du plasma sanguin humain. Matériaux. Université Sciences et Technologies - Bordeaux I, 2009. Français. NNT : 2009BOR13910 . tel-00607796

**HAL Id: tel-00607796**

**<https://theses.hal.science/tel-00607796>**

Submitted on 11 Jul 2011

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

N° d'ordre : 3910



# THÈSE

PRÉSENTÉE A

**L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 1**

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

Par Nolwennig RIVALAIN

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR

SPÉCIALITÉ : GENIE DES PROCÉDES

## **SUR UN PROCÉDE HAUTES PRESSIONS DE SECURISATION DU PLASMA SANGUIN HUMAIN**

Directeurs de recherche : Docteur Alain LARGETEAU  
Professeur Gérard DEMAZEAU

Soutenue le : 10 décembre 2009

Devant la commission d'examen formée de :

M. BLANCHARD Alain	Professeur, Université Bordeaux 2	Rapporteur
M. LAURENCZY Gabór	Professeur, EPFL Lausanne	Rapporteur
M. BOIRON Jean-Michel	Professeur, EFS-AL	Examineur
M. DELMAS Claude	Directeur de Recherche, ICMCB	Examineur
M. LARGETEAU Alain	Ingénieur de Recherche, ICMCB	Examineur
M. MAUREL Jean-Paul	Docteur, EFS-AL	Examineur
M. MOENNER Michel	Professeur, LMMA	Examineur
M. DEMAZEAU Gérard	Professeur honoraire, ICMCB	Membre invité
M. ROQUAIN Jean	Professeur invité, Université Bordeaux 2	Membre invité
M. DUFOURC Erick	Directeur de Recherche, IECB	Membre invité



## REMERCIEMENTS

*Ce travail a été réalisé au Centre de Ressources Hautes Pressions (site de l'ENSCP) de l'Institut de Chimie de la Matière Condensée CNRS (Université de Bordeaux) avec le soutien du Conseil Régional d'Aquitaine, d'OSEO et d'Aquitaine-Valo.*

*Je tiens à adresser ma sincère reconnaissance à Monsieur le Professeur Gérard DEMAZEAU pour avoir dirigé mes travaux avec compétence et disponibilité et sans qui cette thèse n'aurait pu être réalisée. Je le remercie vivement de son enthousiasme et de ses précieux conseils qui m'ont permis de mener à bien ces travaux.*

*Je souhaite également remercier le Docteur Alain LARGETEAU pour avoir co-dirigé cette thèse et pour toute l'aide qu'il m'a apportée au cours de ces trois dernières années.*

*J'adresse mes remerciements au Docteur Jean ROQUAIN pour nos nombreuses discussions au cours desquelles son « attention » a été largement mise à contribution. Ses remarques judicieuses et son soutien ont largement contribué à l'avancement de ces travaux.*

*Je remercie l'Etablissement Français du Sang Aquitaine Limousin pour cette collaboration, et en particulier Monsieur le Professeur Jean-Michel BOIRON et le Docteur Jean-Paul MAUREL pour leurs conseils et m'avoir fait découvrir le monde de la Transfusion Sanguine durant ces trois années.*

*Que Messieurs les Professeurs Alain BLANCHARD et Gabór LAURENCZY reçoivent ici toute l'expression de ma gratitude pour avoir accepté d'examiner et de juger ce travail.*



*Je tiens à remercier Monsieur le Professeur Michel MOENNER et Monsieur Claude DELMAS, Directeur de l'ICMCB, pour avoir bien voulu participer à mon jury de thèse afin de juger ces travaux.*

*Je souhaite remercier Erick DUFOURC, Directeur de Recherche à l'IECB, pour avoir accepté l'invitation à prendre part à ce jury de thèse.*

*J'adresse une pensée toute particulière à Monsieur Pierre TYNDIUK, dont les compétences auront permis de résoudre de nombreux problèmes techniques. Il restera pour moi l'un des maillons importants de ce parcours de thèse.*

*Je remercie M. Arnaud QUINTON pour son aide technique qui a contribué à l'obtention de nombreux résultats.*

*Ce travail n'aurait pas pu être mené à bien sans les nombreuses collaborations dont il a bénéficié.*

*J'adresse mes remerciements à Madame TICHADOU de l'EFS-AL pour toute l'aide qu'elle a apporté pour les dosages des facteurs de coagulation et au Docteur Zoran IVANOVIC pour ses suggestions dans le domaine des produits sanguins.*

*Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à l'équipe du Professeur Philippe VINCENDEAU, Mesdames Sylvie DAULOUEDE, Pierrette COURTOIS, Patricia NORIEGA et Karima RABO pour toute l'aide qu'ils ont apporté sur l'étude sur les parasites ainsi que pour leur accueil et leur disponibilité.*

*Je souhaite remercier Monsieur Michel VENTURA, Chargé de Recherche, et Madame Marie-Line ANDREOLA, Directrice de Recherche du Laboratoire MCMP pour leur accueil et l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail. Leur aide a été déterminante pour la réalisation du travail sur le VIH.*

*Je remercie Mesdames Joliette COSTE, Daisy BOUGARD et Christiane SEGARRA de l'EFS Pyrénées Méditerranée pour tout le travail réalisé sur le prion.*

*Je tiens à remercier le Docteur Jeannette MAUGEIN du laboratoire de Bactériologie de l'Hôpital Haut-Lévêque et le Docteur Céline OHAYON-COURTES du Laboratoire d'Hydrologie-Environnement pour leur aide et leurs conseils apportés en microbiologie.*

*J'adresse mes remerciements à Monsieur le Professeur Hervé FLEURY pour son apport sur l'évaluation de l'effet des hautes pressions sur le virus de la rougeole.*

*Je voudrais également remercier Melle Sabrina LACOMME pour son implication dans la réalisation des clichés de microscopie électronique.*



# SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION</b> .....	11
<b>CHAPITRE I : LE DEVELOPPEMENT DU PARAMETRE PRESSION DANS LE DOMAINE DES BIOSCIENCES</b> .....	15
I.1. Les hautes pressions hydrostatiques .....	15
I.1.1. Le paramètre thermodynamique Pression.....	15
I.1.2. La Pression sur Terre et dans l'Univers.....	16
I.1.3. Les principales caractéristiques de la pression .....	17
I.1.4. Les premiers développements du paramètre Pression dans divers domaines scientifiques.....	20
I.1.5. Le développement des hautes pressions dans le domaine des Biosciences.....	21
I.2. Effets des hautes pressions hydrostatiques sur les principaux constituants des systèmes biologiques .....	25
I.2.1. Effets des hautes pressions sur les protéines.....	26
I.2.2. Effets des hautes pressions sur les lipides et les membranes.....	29
I.2.3. Effets des hautes pressions sur les glucides.....	30
I.2.4. Effets des hautes pressions sur les acides nucléiques .....	33
I.3. Effets des hautes pressions hydrostatiques sur des systèmes biologiques plus complexes .....	34
I.3.1. Effets des hautes pressions sur les cellules de mammifères .....	34
I.3.2. Effets des hautes pressions sur les agents pathogènes .....	35
I.4. Applications biologiques des hautes pressions hydrostatiques.....	43
I.4.1. L'industrie agro-alimentaire .....	43
I.4.2. L'utilisation des organismes extrémophiles pour le développement de nouveaux outils.....	44
I.4.3. Effets des hautes pressions sur l'allergénicité et la digestibilité des aliments.....	44
I.4.4. Désinfection des biomatériaux.....	45
I.4.5. Modulation de l'activité enzymatique .....	46
I.4.6. Stabilisation d'états protéiques intermédiaires .....	46
I.4.7. Dissociation de complexes protéiques .....	47
I.4.8. Les interactions protéine - ADN .....	49
I.4.9. Le développement de vaccins .....	49
I.4.10. La préparation de vecteurs viraux.....	51
I.4.11. La transformation génétique .....	51
I.4.12. L'extraction cellulaire.....	51
I.4.13. La cryopréservation assistée par la pression.....	52
I.4.14. Les applications en oncologie .....	52
I.5. Conclusions générales.....	53

<b>CHAPITRE II : SANG, PLASMA ET TRANSFUSION SANGUINE</b> .....	55
II.1. Historique de la transfusion sanguine.....	55
II.1.1. La naissance de la transfusion sanguine .....	55
II.1.2. Les banques de sang .....	56
II.1.3. Le fractionnement du plasma .....	57
II.1.4. Le risque transfusionnel et les tests de dépistage .....	58
II.2. Le sang.....	58
II.2.1. Les principaux constituants du sang.....	58
II.2.2. Usage thérapeutique du sang .....	61
II.3. Le plasma sanguin et ses contraintes d'utilisation .....	62
II.3.1. Définition du plasma sanguin .....	62
II.3.2. Le risque transfusionnel.....	67
II.3.3. Méthodes de sécurisation du plasma sanguin.....	68
II.3.4. Les premiers essais de traitement hautes pressions du plasma sanguin .....	74
II.4. Objectifs du travail de thèse .....	76
 <b>CHAPITRE III : MATERIEL ET METHODES</b> .....	 77
III.1. Traitements Hautes Pressions.....	77
III.1.1. Les paramètres caractéristiques du traitement hautes pressions .....	77
III.1.2. Dispositif à compression directe .....	78
III.1.3. Dispositif à compression indirecte .....	81
III.1.4. Dispositif à compression indirecte et vitesse d'application rapide .....	83
III.2. Protéines plasmatiques .....	86
III.2.1. Les marqueurs utilisés.....	86
III.2.2. Préparation des échantillons.....	90
III.2.3. Dosage de l'activité des facteurs de coagulation .....	91
III.3. Microbiologie .....	92
III.3.1 Poste de travail .....	92
III.3.2 Micro-organismes utilisés .....	92
III.3.3. Culture des souches.....	95
III.3.4. Préparation du plasma contaminé .....	95
III.3.5. Dénombrement .....	97
III.3.6. Observations microscopiques.....	99
III.4. Parasitologie .....	100
III.4.1. Parasites utilisés .....	100
III.4.2. Méthodologie .....	103
III.5. Virologie.....	104
III.5.1. Virus utilisés.....	104
III.6. Etude sur le prion .....	108

III.6.1. Modèle du prion de hamster.....	108
III.6.2. Méthodologie .....	109

**CHAPITRE IV : IMPACT DU BAREME DE PRESSION ET DES PARAMETRES ASSOCIES SUR L'ACTIVITE DES FACTEURS DE COAGULATION ET L'INACTIVATION DES MICRO-ORGANISMES AU SEIN DU PLASMA SANGUIN HUMAIN..... 111**

IV.1. Effet de traitements hautes pressions sur l'activité de facteurs de coagulation .....	114
IV.1.1. Rôle du barème de pression sur l'activité de facteurs de coagulation .....	115
IV.1.2. Rôle de chacun des paramètres associés au barème de pression sur l'activité de facteurs de coagulation.....	117
IV.1.3. Influence de la conjugaison de paramètres associés à la pression sur l'activité de facteurs de coagulation.....	123
IV.2. Effet de traitements hautes pressions sur l'inactivation de <i>Staphylococcus aureus</i> .	128
IV.2.1. Rôle du barème de pression sur l'inactivation de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	128
IV.2.2. Rôle de chacun des paramètres associés au barème de pression sur l'inactivation de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	129
IV.2.3. Rôle de la conjugaison de paramètres associés à la pression sur l'inactivation de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	133
IV.2.4. Essai de revivification après traitement hautes pressions de plasma contaminé par <i>Staphylococcus aureus</i> .....	136
IV.2.5. Influence du milieu de suspension sur la sensibilité de <i>Staphylococcus aureus</i> vis-à-vis des hautes pressions.....	138
IV.2.6. Conclusion .....	139
IV.3. Effets de traitements hautes pressions sur l'inactivation des autres micro-organismes de la Pharmacopée Européenne.....	139
IV.3.1. Effets de traitements hautes pressions sur l'inactivation de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	140
IV.3.2. Effets de traitements hautes pressions sur l'inactivation de <i>Candida albicans</i> ..	146
IV.3.3. Effets de traitements hautes pressions sur l'inactivation d' <i>Aspergillus niger</i> ....	151
IV.3.4. Effets de traitements hautes pressions sur l'inactivation de <i>Bacillus subtilis</i> ....	151
IV.3.5. Choix de la température optimale du traitement sous hautes pressions.....	153
IV.4. Conclusion .....	161

**CHAPITRE V : DEFINITION D'UN PROCEDE HAUTES PRESSIONS DE SECURISATION DU PLASMA SANGUIN HUMAIN ET EVALUATION SUR DIVERS AGENTS PATHOGENES..... 163**

V.1. Définition du Procédé de Sécurisation du Plasma Sanguin Humain.....	163
V.1.1. Rappel des résultats antérieurs .....	163
V.1.2. Effet du procédé de sécurisation du plasma sanguin humain sur l'activité des facteurs de coagulation.....	164
V.1.3. Conclusion.....	168

V.2. Visualisation de l'effet du Procédé Hautes Pressions de Sécurisation du Plasma Sanguin Humain sur les micro-organismes de la Pharmacopée Européenne .....	170
V.2.1. Effet du Procédé sur <i>Candida albicans</i> .....	170
V.2.2. Effet du Procédé sur <i>Aspergillus niger</i> .....	172
V.2.3. Effet du Procédé sur <i>Staphylococcus aureus</i> .....	173
V.2.4. Effet du Procédé sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	177
V.3. Evaluation du Procédé Hautes Pressions de Sécurisation du Plasma Sanguin Humain sur divers agents pathogènes .....	179
V.3.1. Effet du Procédé hautes pressions de sécurisation du plasma sanguin humain sur les parasites .....	179
V.3.2. Effet du Procédé hautes pressions de sécurisation du plasma sanguin humain sur les virus .....	183
V.3.3. Effet du procédé hautes pressions de sécurisation du plasma sanguin humain sur un agent pathogène particulier : le prion.....	189
V.4. Conclusion.....	192
<b>CONCLUSIONS</b> .....	193
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	197

## INTRODUCTION

Trois principaux paramètres thermodynamiques gouvernent les équilibres physico-chimiques et biologiques : la température, la pression et la composition (constituants, milieu...).

Si la température – du fait de la facilité de sa mise en œuvre – a été développée depuis plus de 40 siècles, en revanche la maîtrise du paramètre pression est relativement récente puisque les premiers travaux utilisant plus de 1000 bar (ou 100 MPa) datent de la fin du XIX<sup>ième</sup> siècle.

La Physique (avec l'étude des lois de comportement), la Chimie (avec la synthèse de nouvelles phases) et les Géosciences (du fait de la structure de la Terre) ont été les trois principaux domaines scientifiques impliqués dans les applications des Hautes Pressions.

L'existence de fosses marines où la pression peut atteindre des valeurs de l'ordre de 1000 bar (100 MPa) d'une part et la découverte d'organismes vivants dans des conditions extrêmes de pression et de température d'autre part ont conduit vers deux principaux débats :

- Quels mécanismes biologiques ont permis à ces organismes vivants de s'adapter à de telles conditions environnementales ?
- Compte tenu de l'étendue des océans sur Terre, l'origine de la vie était-elle liée à la conjonction d'un milieu hydrothermal et de hautes pressions ?

L'application du paramètre pression en milieu liquide ne développant que de faibles valeurs de l'énergie, l'ensemble de ces questions ont, après une première période (1925-1950) où l'utilisation de hautes pressions a été testée dans l'ensemble des disciplines scientifiques et où se sont illustrés quelques pionniers [Percy W. BRIDGMAN (USA), James BASSET (France)...], conduit depuis une trentaine d'années à une démarche scientifique visant à préciser l'impact de la pression dans le monde du vivant et son action sur ses principaux constituants (acides aminés, protéines, lipides...).

Le secteur de l'Agro-alimentaire a été le premier domaine d'intérêt, dans le but de mettre au point de nouvelles méthodes pour la décontamination des aliments associée à la sauvegarde de leurs propriétés organoleptiques. Depuis quelques années, les hautes pressions ont été introduites dans le domaine de la Biologie et celui de la Santé avec comme objectif : la sécurisation de produits de santé tout en préservant leur activité thérapeutique. Si dans les deux cas, la finalité des hautes pressions est de maintenir un équilibre entre deux actions



pouvant apparaître antagonistes (inactivation des agents pathogènes d'une part et sauvegarde de propriétés spécifiques d'autre part), la principale différence entre ces deux grands domaines de développement réside dans le fait que si les propriétés organoleptiques peuvent sembler subjectives, les propriétés thérapeutiques reposent sur l'action de certains composants bien identifiables (protéines, enzymes ...).

C'est dans ce secteur particulier de l'application des hautes pressions dans le domaine de la Biologie et de la Santé que s'inscrit ce travail.

Etant donné l'importance thérapeutique des produits sanguins et les problèmes liés à leur sécurisation, une collaboration avec l'Etablissement Français du Sang – Aquitaine Limousin (Professeur J. M. BOIRON – Directeur) a été mise en place, avec comme objectif d'évaluer l'applicabilité des hautes pressions pour la décontamination du plasma sanguin. La mise au point d'un procédé physique à cet effet ne ferait appel à aucun additif chimique ni traitement radiatif mais devra être capable de maintenir les propriétés thérapeutiques de ce produit.

Sur la base des conditions imposées à tout procédé de sécurisation d'un produit de santé, à savoir l'inactivation des agents pathogènes et la préservation de l'action thérapeutique du produit concerné, la méthodologie adoptée a conduit à structurer ce mémoire en cinq principaux Chapitres.

Le **premier Chapitre** d'introduction décrira, d'une part, les principales caractéristiques du paramètre Pression ainsi qu'un bref historique de son développement, notamment dans le domaine des Biosciences, d'autre part, l'action des hautes pressions sur les principaux constituants de la matière vivante, quelques systèmes plus complexes et les applications biologiques déjà existantes ou potentielles qui en découlent.

Compte tenu du produit sur lequel se sont focalisés ces travaux de thèse, le **second Chapitre** sera consacré à une présentation des produits sanguins et de leurs usages thérapeutiques. Une attention toute particulière sera portée aux procédés de viro-atténuation du plasma actuellement mis en œuvre et aux travaux antérieurs concernant le comportement des protéines plasmatiques sous hautes pressions.

Le **troisième Chapitre** sera dédié au matériel et aux méthodes utilisés durant ces travaux.

L'utilisation principale des dérivés du sang actuellement préparés, tel que le plasma, étant d'ordre thérapeutique, la préservation de cette propriété est primordiale pour tout Procédé de sécurisation de tels produits. C'est pourquoi il était important d'évaluer tout d'abord l'impact de la pression et de paramètres pouvant lui être associée (vitesse et mode d'application de la pression, température...) sur l'activité de protéines plasmatiques. Sur la base des exigences de la Pharmacopée Européenne, les facteurs de coagulation V, VIIIc et XI ont été sélectionnés comme marqueurs. En parallèle, l'inactivation d'agents pathogènes susceptibles de contaminer le plasma sanguin peut être considérée comme un objectif allant de paire avec le maintien de ses propriétés thérapeutiques. Cinq micro-organismes issus de la Pharmacopée Européenne (*S. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*, *A. niger* et *B. subtilis*) ont alors été choisis comme représentants des micro-organismes pathogènes.

C'est pourquoi le **quatrième Chapitre** traitera de l'optimisation du barème de pression et des paramètres associés de telle manière que l'activité des facteurs de coagulation précités soit peu altérée d'une part et que l'efficacité destructrice vis-à-vis des cinq micro-organismes ciblés soit suffisamment importante d'autre part.

Compte tenu que toute méthode de décontamination du plasma repose sur un équilibre obligatoire entre inactivation des agents pathogènes et préservation des propriétés thérapeutiques, le **cinquième Chapitre** décrira dans une première partie, sur la base des premiers résultats obtenus au Chapitre précédent, la réoptimisation de l'ensemble des conditions expérimentales permettant de définir un *Procédé Hautes Pressions de sécurisation du plasma sanguin humain*. Ce dernier devrait d'une part, maintenir l'activité des facteurs de coagulation dans les normes imposées par les législations française et européenne et d'autre part conduire à l'inactivation des micro-organismes sélectionnés.

Dans une seconde partie, ce Procédé sera évalué vis-à-vis d'autres agents pathogènes tels que des parasites, quelques virus et un agent infectieux particulier : le prion.

**Une Conclusion générale** permettra de mettre en lumière l'originalité des principaux résultats obtenus mais soulignera également ce qu'ils impliquent au niveau des efforts à mener dans le futur afin d'aboutir à la compréhension de l'ensemble des mécanismes biologiques mis en jeu par la pression et ses paramètres associés. En outre cette conclusion présentera quelques perspectives sur les actions restant à conduire afin que ce *Procédé Hautes Pressions de sécurisation du plasma sanguin humain* puisse être développé à une échelle industrielle, en étroite collaboration avec l'Etablissement Français du Sang.



# CHAPITRE I : LE DEVELOPPEMENT DU PARAMETRE PRESSION DANS LE DOMAINE DES BIOSCIENCES

## **I.1. Les hautes pressions hydrostatiques**

### *I.1.1. Le paramètre thermodynamique Pression*

#### I.1.1.1. Définition de la pression

La pression est définie par le quotient d'une force par unité de surface (mathématiquement :  $P = F/A$  où  $P$  est la pression,  $F$  est la force appliquée perpendiculairement et  $A$  est la surface). L'unité officielle de pression (système S.I.) est le Pascal (Pa), ce qui équivaut à une force de 1 Newton exercée sur une surface de  $1 \text{ m}^2$ . Etant donné que le Newton représente une force faible et que le mètre carré est une surface importante, le Pascal correspond à une valeur faible de la pression ( $1 \text{ Pa} = 10^{-5} \text{ bar}$ ). Dans le cas des études mettant en jeu de hautes pressions, le Megapascal (MPa) ( $1 \text{ MPa} = 10^6 \text{ Pa}$ ) et parfois le Gigapascal (GPa) ( $1 \text{ GPa} = 10^9 \text{ Pa}$ ) sont les unités les plus communément utilisées ( $1 \text{ MPa} = 10 \text{ bar}$  et  $1 \text{ GPa} = 10^4 \text{ bar}$ ).

La conversion en Pascal des diverses unités de pression utilisées auparavant est donnée au tableau I.1.

	<b>atmosphère</b>	<b>bar</b>	<b>kg/cm<sup>2</sup></b>	<b>MPa</b>	<b>P.S.I. (pounds/inch<sup>2</sup>)</b>
<b>atmosphère</b>	1	0,987	0,968	9,901	0,068
<b>bar</b>	1,013	1	0,981	10,000	0,069
<b>kg/cm<sup>2</sup></b>	1,033	1,021	1	10,228	0,070
<b>MPa</b>	0,101	0,1	0,098	1	0,00689
<b>P.S.I.</b>	14,696	14,504	14,223	145,038	1

**Tableau I.1** : Conversion des différentes unités de Pression [1]

### I.1.1.2. Les différents types de pression

Deux types de pression peuvent être considérés : les pressions statiques et les pressions dynamiques.

- *Les pressions statiques*

Dans ce cas, la pression peut être maintenue pendant un temps indéterminé. On distingue deux différents cas selon l'homogénéité de répartition du « vecteur » pression dans l'espace.

- La pression isostatique, où la valeur de la pression est la même en tout point du système. C'est le cas au sein de l'eau et on parle alors de « pression hydrostatique ».

La pression est toujours isostatique au sein d'un gaz ou d'un liquide.

- La pression non-isostatique, où un gradient de pression est alors induit dans le système soumis à ce paramètre. Ce phénomène peut résulter soit de la conception de l'équipement générateur de la pression, soit de la non homogénéité de la compressibilité du milieu (c'est notamment ce qui est observé pour les solides présentant une structure anisotrope).

- *Les pressions dynamiques*

Il s'agit de pressions appliquées pendant des temps très courts (de quelques secondes à quelques millisecondes) et toujours associées à la température. Elles sont notamment générées par « ondes de chocs », par « canons à gaz », ou par « chocs laser ». [2, 3] Leurs valeurs sont très élevées par rapport à celles des pressions statiques. Ce type de pressions est principalement utilisé en Physique et parfois en Chimie. [4, 5]

### ***I.1.2. La Pression sur Terre et dans l'Univers***

Les hautes pressions hydrostatiques (HHP) constituent une des caractéristiques essentielles de la Biosphère si l'on considère le volume occupé par la partie émergée et celle aquatique. La zone terrestre où la pression est proche de 1 bar (0,1 MPa) représente environ 1% du volume total de cette Biosphère. Les océans, qui couvrent sensiblement 70% de la surface du globe, ont une profondeur moyenne de l'ordre de 3800 m ce qui équivaut à une pression de 380 bar ou 38 MPa. Les fosses les plus profondes atteignent 11000 m, comme la

fosse des Mariannes, dans l’Océan Pacifique. [6] De plus, la découverte d’organismes vivants à de grandes profondeurs (piézophiles ou barophiles et parfois en plus thermophiles lorsqu’ils sont proches de sources hydrothermales) a initié de nouveaux domaines de recherche sur leur adaptation métabolique et a amené certains scientifiques à considérer que les processus hydrothermaux pourraient être à l’origine de la vie. [7-10] De plus si l’on considère que la valeur évaluée pour la pression au centre de la Terre est proche de 3,7 Megabar (370 GPa), ce paramètre thermodynamique apparaît très important au niveau de notre planète.

En tenant compte que dans l’Univers, la valeur de la pression peut être de 800 à 1200 GPa au sein de certaines planètes telles que Jupiter ou Saturne, et peut atteindre  $10^{32}$  bar ( $10^{28}$  GPa) au cœur des « naines blanches (où la structure atomique s’effondre), il en découle que 90% de la matière sont soumis à une pression supérieure à 100 kbar (10 GPa). [11]

### ***1.1.3. Les principales caractéristiques de la pression***

La pression est caractérisée par trois principales spécificités : l’énergie induite, l’effet de densification et la réactivité chimique.

#### **I.1.3.1. L’énergie**

En comparant l’énergie développée par application de la pression (celle-ci étant corrélée à la compressibilité du milieu concerné) avec celle d’une réaction chimique (Tableau I.2), il est observé que la pression met en jeu une très faible énergie (même dans le milieu le plus compressible tel que les gaz).

<b>Pression</b>	<b>Milieu</b>	<b>Energie (cal.mol<sup>-1</sup>)</b>
100 MPa	Gaz	3000
100 MPa	Solide	1
1 GPa	Solide	5
10 GPa	Fer	20
10 GPa	H <sub>2</sub> O	1000
0,1 MPa	Réaction chimique	20000

**Tableau I.2** : Energie mise en jeu par la compression en fonction de la nature du milieu et comparaison avec la valeur moyenne de celle d’une réaction chimique [12], adapté par Demazeau [13].

(NB : 100 MPa = 1000 bar et 1 GPa = 10 000 bar)

Le tableau I.3 permet de comparer les énergies développées par la pression et la température au sein d'un même milieu : l'eau liquide. Ainsi, il est observé que la compression d'un litre d'eau de 0,1 MPa à 400 MPa met en œuvre la même énergie que celle nécessaire pour chauffer ce litre d'eau de 20°C à 25°C.

	<b>P, T</b>	<b>Energie développée</b>
<b>Température</b>	P = 0,1 MPa T = 20°C → T = 25°C	E ≈ 20,9 kJoules
<b>Pression</b>	T = 20°C P = 0,1 MPa → P = 400 MPa	E = 19,2 kJoules

**Tableau I.3** : Comparaison, pour un litre d'eau, entre l'énergie développée par compression et celle induite par la température, d'après [14].

Par conséquent, la pression est un paramètre peu énergétique et sa mise en œuvre dans une phase liquide ou sur des systèmes riches en phase liquide (tels que les systèmes biologiques) ne pourra altérer que les liaisons chimiques faibles.

*Cependant, la pression, jusqu'à présent étonnamment peu utilisée en biologie, peut se révéler être un instrument précieux dans l'étude des systèmes vivants où les équilibres mettent en jeu le plus souvent peu d'énergie.*

### I.1.3.2. L'effet de densification

D'un point de vue général, une réaction chimique :  $A + B \rightarrow C + D$  peut être caractérisée par la différence de volume  $\Delta V$  entre les produits finaux et les réactifs initiaux :

$$\Delta V = (V_C + V_D) - (V_A + V_B).$$

Etant donné que la pression favorise les systèmes les plus denses, sous l'effet de la pression, cette réaction chimique sera déplacée de gauche à droite uniquement si  $\Delta V < 0$ . Dans le cas où  $\Delta V > 0$ , la formation des produits finaux sera bloquée.

Cet effet de densification, induit par l'application de la pression, peut conduire à divers phénomènes impliquant soit la densification de la matière, soit le déplacement d'équilibres.

- *La densification de la matière*

- En chimie des matériaux, cet effet permet d'élaborer de nouvelles formes structurales denses, comme par exemple la conversion directe du graphite en diamant [15-17],
- En Sciences des Matériaux, le développement du frittage sous pression à chaud (HIP : High Isostatic Pressing) ou à froid (CIP : Cold Isostatic Pressing) a permis de développer la préparation de céramiques denses [18],
- En Biosciences, il est possible de former des biopolymères denses, tels que ceux obtenus par gélification de l'amidon [19, 20].

- *Le déplacement d'équilibres*

Deux principaux exemples peuvent être cités : la dissociation de l'eau  $\text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{H}^+ + \text{OH}^-$  avec  $k_e = [\text{H}^+][\text{OH}^-]$  et la rupture de liaisons chimiques (du fait de la faible taille de  $\text{H}^+$  et de son fort pouvoir ionisant, on considère son association avec une molécule d'eau :  $\text{H}_3\text{O}^+$ ).

Sous pression la valeur de la constante d'équilibre  $k_e$  augmente du fait de la combinaison de deux phénomènes : (i) la valeur négative de  $\Delta V$  caractérisant cet équilibre ( $\Delta V = -22$  mL/mole) [21] et (ii) le phénomène d'électrostriction conduisant à un réarrangement des charges positives ou négatives autour des ions [22]. Par application de pressions élevées ( $P > 6$  GPa), l'eau peut être assimilée à un « sel fondu » (mélange d'ions  $\text{H}_3\text{O}^+$  et  $\text{OH}^-$ ) du fait du déplacement quasi-total de l'équilibre de dissociation.

L'équilibre de dissociation d'une liaison chimique A-B peut s'écrire :



Sa sensibilité à la pression dépend de la valeur de  $\Delta V$  [ $\Delta V = V(\text{A}_{\text{atome}^+} \text{B}_{\text{atome}}) - V(\text{A-B})$ ]. Si  $\Delta V < 0$ , la liaison chimique sera dissociée sous pression. En revanche, si  $\Delta V > 0$ , la pression ne conduira à aucune modification de cette dernière.

*En tenant compte de l'énergie développée par la pression d'une part, et l'effet de densification d'autre part, il en découle que l'application de ce paramètre thermodynamique sur un milieu n'altérera que les liaisons de faible énergie dont la dissociation est caractérisée par une valeur négative de  $\Delta V$ .*



### I.1.3.3. La réactivité chimique

Les paramètres thermodynamiques pression et température peuvent être utilisés pour modifier les équilibres des réactions chimiques. Dans le cas particulier d'un équilibre entre une phase solide et une solution, la pression conduit le plus souvent à un accroissement de la solubilité du solide. Il en découle que la concentration des espèces chimiques solvatées est augmentée. En parallèle la pression induit une diminution de la distance moyenne entre ces espèces chimiques. [23]

Le recouvrement de ces phénomènes mène à une augmentation de la réactivité chimique et un accroissement de la cinétique de réaction. Ces effets cinétiques induits par la pression peuvent être notamment illustrés d'une part par la stabilisation de matériaux métastables au travers de procédés solvothermaux [24], et d'autre part par l'augmentation des vitesses de diffusion, utilisée pour l'imprégnation soit de saccharose (sur-sucrage) ou de NaCl (sur-salage) dans des produits alimentaires [25].

### ***I.1.4. Les premiers développements du paramètre Pression dans divers domaines scientifiques***

Les applications du paramètre Pression dans divers secteurs scientifiques sont intimement liées au développement des technologies utilisées pour générer la pression.

Durant le XIX<sup>ième</sup> siècle, les hautes pressions (quelques dizaines à quelques centaines de MPa) furent principalement mises en œuvre en Physique et en Chimie pour l'étude de la compressibilité des gaz et des liquides. [26-30]

Au début du XX<sup>ième</sup> siècle, dans le domaine de la Chimie, trois principaux secteurs ont concouru au développement des hautes pressions : (i) la reproduction de la synthèse des minéraux [31], (ii) l'hydrométallurgie pour l'extraction des métaux à partir des minerais [32], (iii) l'élaboration de monocristaux à partir de solutions aqueuses (cristallogénèse hydrothermale) [33]. Le principal succès lié au développement des hautes pressions est apparu au milieu du XX<sup>ième</sup> siècle, avec la synthèse du diamant par ASEA en Suède [34] et par General Electric aux USA [35].

La première application industrielle de la pression a été la synthèse de l'ammoniac (NH<sub>3</sub>) du fait de son intérêt dans la préparation des nitrates (développement des engrais et des

explosifs) au travers de l'effet de condensation induit par la réaction suivante :  $N_2 + 3 H_2 \rightarrow 3 NH_3$ . [36]

Les premiers succès des applications mettant en jeu les hautes pressions et les aspects technologiques associés ont mené à ce que ce paramètre thermodynamique soit de plus en plus utilisé dans divers domaines : la Physique [29], la Chimie (inorganique [37] ou organique [38]), les Géosciences [39], les Biosciences [40]...

### ***1.1.5. Le développement des hautes pressions dans le domaine des Biosciences***

Le rôle des hautes pressions sur les systèmes vivants a tout d'abord été abordé par REGNARD dès 1984. [41, 42]

Trois différentes approches ont été développées lors de l'investigation de l'action du paramètre Pression dans le domaine des Biosciences :

- la recherche de nouvelles voies de sécurisation de produits alimentaires et le développement de procédés originaux [43-45],
- l'étude de l'impact de la pression sur les systèmes biologiques et leurs constituants afin de promouvoir diverses applications visant très souvent à sauvegarder leur fonctionnalité tout en inactivant les agents pathogènes contaminants [46-48],
- l'étude des organismes piézophiles (ou barophiles) dans les fosses marines avec comme objectif principal une meilleure connaissance des mécanismes d'adaptation biologique mis en œuvre pour la survie dans de telles conditions et le rôle des processus hydrothermaux sur l'origine de la vie [8-10].

Historiquement et de manière schématique, trois grandes périodes relatives à l'étude de l'apport des hautes pressions dans les Biosciences peuvent être distinguées :

- la première, de 1880 à 1950, avec les travaux des pionniers,
- la seconde, s'étendant de 1950 à 1995, avec les premiers développements dans l'industrie agro-alimentaire,
- la troisième, depuis la fin des années 1990, avec les recherches impliquant diverses applications biologiques ciblées vers le domaine de la Santé.

#### I.1.5.1. Les travaux des pionniers (1880-1950)

Les premiers travaux concernant l'inactivation d'agents pathogènes tels qu'*Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* ont été menés par ROGER dès 1895. [49] HITE et al., aux USA, se sont impliqués dans l'impact du paramètre Pression sur la préservation de produits alimentaires, tels que le lait dès 1899 [50], ou de produits végétaux (1914) [51]. LARSEN et al (1918) ont ensuite confirmé que l'application de hautes pressions inhibait la croissance microbienne et menait à la mort des cellules. [52] Certains travaux de BRIDGMAN ont également porté sur l'évolution sous hautes pressions de constituants biologiques tels que l'albumine [53], sa coagulation dans de telles conditions ayant été élucidée plus tard par GRANT et al. (1941) comme étant due à la dénaturation protéique [54]. Entre 1932 et 1952 James et Jacques BASSET en France se sont fortement impliqués dans l'étude des effets des hautes pressions sur plusieurs types de micro-organismes dans le but de sécuriser les produits alimentaires mais aussi pour développer certaines applications biologiques. Par exemple, ces auteurs s'investirent dans les effets des hautes pressions sur divers agents pathogènes (bactéries [55] ou virus [56-59]), sur certains antigènes et anticorps et l'impact sur l'immunogénicité [60], sur des cellules tumorales [61]. Ces travaux ont permis de mettre en évidence le pouvoir antigénique et les propriétés vaccinales de bactéries inactivées sous hautes pressions. [62]

#### I.1.5.2. Les développements pour le secteur agro-alimentaire (1960-1995)

Durant les années 1960 et 1970, la recherche sur les effets des hautes pressions dans le domaine des Biosciences a été maintenue au travers de l'activité de divers groupes scientifiques impliquant en particulier les aspects « Sciences des aliments ». On peut notamment citer les travaux de TIMSON et SHORT (1965) sur l'inactivation de micro-organismes du lait [63], ceux de GOULD et SALE (1970) concernant la germination des spores [64], ceux de WILSON (1974) relatifs à la stérilisation d'aliments peu acides en combinant pression et température [65], les études de CHARM et al. (1977) sur l'implication de la pression pour la conservation durable de produits réfrigérés [66], les travaux de MARQUIS (1976) et MARQUIS et MATSUMARA (1978) sur les réponses de systèmes biologiques à l'application de pressions hydrostatiques (jusqu'à 110 MPa) [67, 68], les

activités de ELGASIM et KENNIK (1980) concernant l'action sur des protéines de la viande de bœuf [69].

Pendant les années 1980, divers projets de recherche ont été initiés afin d'étudier l'action de la pression dans plusieurs domaines : les enzymes [MORILD (1981) [70]], les protéines et d'autres biomolécules [HEREMANS (1982) [71]], l'inactivation de micro-organismes contaminant les aliments [HOOVER et al.(1989) [72]], l'homogénéisation de produits alimentaires [POPPER et KNOOR (1990) [73]] et l'impact de la technologie « Hautes pressions » dans l'industrie agro-alimentaire [FARR (1990) [74]].

En parallèle, au Japon, dès le début des années 1980, la recherche de nouveaux procédés de conservation des aliments sous hautes pressions était l'objet d'une très grande activité impliquant une large palette de compétences (constructeurs d'équipements, physiciens, chimistes, biologistes, industriels de l'agro-alimentaire...). [75-79] Un tel développement peut s'expliquer par le recouvrement de plusieurs facteurs spécifiques inhérents au Japon : (i) la difficulté - du fait du contexte historique et sociologique - de développer les rayonnements ionisants (qui durant cette période faisaient l'objet d'un grand intérêt dans d'autres pays), (ii) la tradition de la préservation des propriétés organoleptiques des aliments (que l'on retrouve dans la consommation de produits crus), (iii) la structure de la recherche japonaise facilitant les aspects transdisciplinaires d'une part et les applications industrielles d'autre part, (iv) la recherche de nouveaux développements économiques dans le domaine agro-alimentaire (où ce pays avait une position faible) sur la base d'une technologie originale. Cette activité a conduit à deux principaux objectifs. Tout d'abord, la recherche fondamentale dans ce domaine a été renforcée afin de mieux expliquer le rôle de la pression dans le mécanisme d'inactivation des micro-organismes. [40, 43, 44, 80-84] La mise au point à l'échelle industrielle de procédés de traitement hautes pressions de produits alimentaires (les premiers produits ayant été mis sur le marché japonais dès 1993) a été développée. [85]

Depuis ces quinze dernières années, les procédés agro-alimentaires s'appuyant sur la technologie hautes pressions ont connu un large essor dans divers pays et des produits variés issus de ceux-ci sont apparus sur le marché : jus de fruits, confitures, coulis, yaourts chargés en fruits, dérivés de la charcuterie, produits de la mer, biopolymères (par exemple ceux liés à la gélification de l'amidon)... [19, 86]

Le principal objectif de ces procédés était d'accroître la durée limite de conservation de ces produits et leur décontamination vis-à-vis d'agents pathogènes (bactéries, virus, parasites...). [19, 87-89]

En outre des études récentes menées sur certains produits traités sous hautes pressions ont mis en évidence que certaines de leur propriétés pourraient être modifiées, ceci se traduisant notamment par : un accroissement de leur digestibilité [90], une réduction de leur caractère allergène [91-93], leurs aspects nutritionnels [94]. Ces résultats ouvrent de nouvelles perspectives d'applications dans divers domaines des Sciences des aliments et de la Biologie.

Actuellement, plus de 90 installations industrielles sont opérationnelles dans le Monde. Les volumes des équipements varient de 50 L à 400 L pour une gamme de pressions allant de 200 MPa à 600 MPa. [95] De plus, différents paramètres physico-chimiques ont été associés à la pression dans ces procédés tels que les basses ou hautes températures [96-100], l'adjonction d'une atmosphère gazeuse particulière (telle que le CO<sub>2</sub>) [101-104], la combinaison avec des rayonnements ionisants [105], l'utilisation conjointe d'ultrasons [106], l'ajout d'additifs chimiques [107, 108]. Il est cependant nécessaire, afin de ne pas contrecarrer l'atout principal de l'application des hautes pressions, à savoir la faible énergie mise en jeu, de choisir les paramètres physico-chimiques n'apportant pas une énergie importante. Des articles généraux portant sur les procédés hautes pressions : développement d'indicateurs spécifiques les validant [109], sélection de critères de sécurité microbienne [110], recherche de nouveaux créneaux commerciaux [111]... soulignent l'intérêt croissant suscité par ces procédés non-thermiques de traitement des aliments.

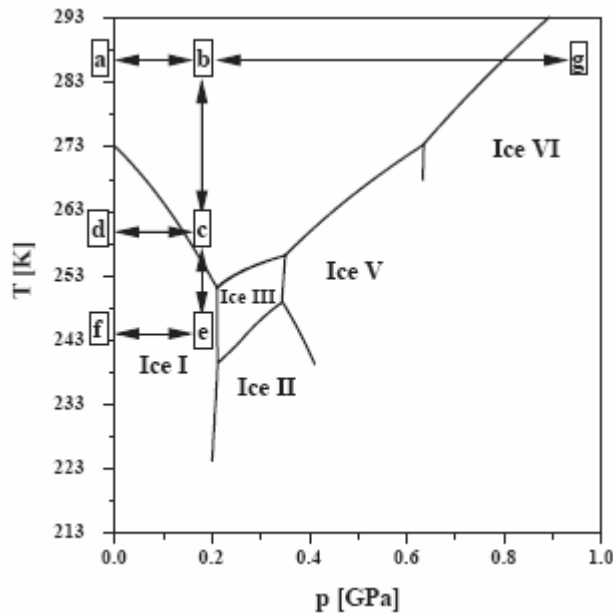
Il faut également souligner le développement en parallèle de recherches fondamentales impliquant les hautes pressions et les Biosciences. L'étude des micro-organismes des grandes profondeurs [112-115], en mettant l'accent sur les mécanismes d'adaptation mis en jeu permettant leur survie dans un tel environnement (associant parfois de hautes températures) [116-120], demeure une question toujours importante. Ces préoccupations scientifiques ont conduit à divers travaux portant sur l'évolution dans de telles conditions (pression ou pression et température élevées) des constituants des organismes vivants tels que les lipides et les membranes biologiques [121, 122] ou les protéines [123-126].

L'ensemble de ces recherches a conduit ces dernières années à prendre en compte les Hautes Pressions Hydrostatiques (HHP) dans le développement d'applications biologiques originales [127-132] pouvant aller jusqu'à des essais cliniques [133]. Ainsi, une nouvelle activité est née à la fin des années 1990 : l'apport des hautes pressions dans le domaine de la Santé.

## **I.2. Effets des hautes pressions hydrostatiques sur les principaux constituants des systèmes biologiques**

Les Hautes pressions Hydrostatiques (HHP) apparaissent, pour plusieurs raisons, un outil particulièrement intéressant pour l'étude de systèmes biologiques [134] :

- Les études des systèmes biologiques en fonction de la température et à pression ambiante induisent des changements simultanés de l'énergie thermique et du volume. En conséquence, afin de discriminer ces deux effets (thermique et volumique), le paramètre pression apparaît être un outil approprié.
- Les interactions non covalentes jouent un rôle primordial pour la stabilisation des systèmes biologiques. Etant donné que la pression n'altère que les liaisons faibles dont la dissociation conduit à une valeur de  $\Delta V$  négative, ce paramètre peut permettre de mieux appréhender les mécanismes gouvernant de tels systèmes.
- La pression modifie également les équilibres chimiques et les vitesses de réaction mais, en raison de la loi de Le Chatelier, le système évoluera toujours vers l'état correspondant au volume le plus faible.
- Le diagramme *Pression – Température* de l'eau met en évidence deux phénomènes importants (Figure I.1) : (i) de nombreuses formes solides de l'eau existent, certaines étant stables à des températures positives, (ii) la forme solide Glace I est moins dense que la phase liquide, ceci étant dû à l'existence de liaisons hydrogène au sein de cette molécule. Ainsi, sous une pression de 200 MPa, l'eau demeure liquide jusqu'à  $-20^{\circ}\text{C}$  environ. [135] Comme l'eau est le solvant principal de tous les systèmes biologiques, des expériences à températures négatives peuvent être conduites en phase liquide.
- De plus le rôle joué par la valeur négative de  $\Delta V$  dans la stabilisation de nouvelles phases peut mener à la mise en évidence, dans les systèmes biologiques, d'états totalement inconnus à pression ordinaire.



**Figure I.1 :** Diagramme de phase de l'eau – *abcd* : congélation par relâchement de la pression, *abef* : congélation assistée par les hautes pressions, *abg* : congélation à température positive. [136]

Sur la base des potentialités apportées par les pressions hydrostatiques dans l'étude des systèmes biologiques, le comportement de divers constituants des systèmes vivants (protéines, lipides et membranes, glucides, acides nucléiques) vis-à-vis de ce paramètre sera présenté.

### ***1.2.1. Effets des hautes pressions sur les protéines***

Plusieurs paramètres peuvent conduire à la dénaturation des protéines : la température, l'ajout de produits chimiques, la pression. La température ou les additifs chimiques mènent, dans la plupart des cas, à une dénaturation irréversible du fait de la rupture de liaisons covalentes et/ou de l'agrégation des molécules.

En revanche, sous pression, seules les liaisons faibles présentant un  $\Delta V < 0$  sont altérées. Ainsi, l'action de ce paramètre sur une protéine ne modifiera jamais sa structure primaire, et modifiera, dans l'ordre, les structures quaternaire (si présente), tertiaire, et éventuellement secondaire. Il en découle que le mécanisme de dénaturation induit par la pression est différent de ceux résultant de l'application de la température ou de l'utilisation d'additifs chimiques.

Pour tous les équilibres chimiques, la constante d'équilibre K est corrélée à l'énergie libre de Gibbs  $\Delta G$  :

$$\boxed{\Delta G = -RT \ln K} \quad \text{avec} \quad R : \text{constante des gaz parfaits (} R = 8,314 \text{ J.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}\text{)}$$

T : température en Kelvin

A température constante, la dépendance de l'énergie libre de Gibbs vis-à-vis de la pression (P exprimée en MPa) est donnée par l'expression :

$$\boxed{\left(\frac{\delta(\Delta G)}{\delta P}\right)_T = \Delta V} \quad \text{avec} \quad \Delta V : \text{changement de volume associé au système}$$

$$\boxed{\Delta V = \sum V_{\text{produits}} - \sum V_{\text{réactifs}}}$$

Ces volumes tiennent compte de plusieurs composantes : les volumes intrinsèques (Van der Waals) et de solvation (réduction de l'enveloppe de solvation et modification du volume des cavités).

Le recouvrement des deux premières équations aboutit à la relation suivante :

$$\boxed{\left(\frac{\delta(\Delta G)}{\delta P}\right)_T = -\frac{\Delta V}{RT}}$$

*Le principal effet de la pression est donc de déplacer l'équilibre vers l'état de plus faible volume.*

Etant donné que, parmi les liaisons faibles impliquées dans le maintien de la conformation des protéines, ce sont les interactions hydrophobes qui sont associées aux valeurs les plus négatives de  $\Delta V$  (Tableau I.4) [128, 137, 138], il apparaît que la pénétration de molécules d'eau dans la matrice protéique joue un rôle important dans le mécanisme de dénaturation sous hautes pressions. Ainsi, la stabilité des protéines sous pression semble dépendre en grande partie de sa flexibilité conformationnelle à compenser les pertes en liaisons faibles, mais également de la taille des cavités dans lesquelles les molécules d'eau peuvent entrer. L'ensemble de ces phénomènes conduit à des transitions conformationnelles pouvant mener à la dénaturation. [139] (Figure I.2)



Type de liaison	$\Delta V$ de dissociation (ml.mol <sup>-1</sup> )	Action de la pression sur la liaison
Covalente	+ 10	Renforcement
Ionique	- 10 par ion engagé	Déstabilisation
Hydrogène	+ 3 à - 1	Renforcement ou effet de déstabilisation réduit
Hydrophobe	< 0, de -10 à -20	Déstabilisation

Tableau I.4 :  $\Delta V$  de dissociation et barosensibilité des liaisons chimiques [138]

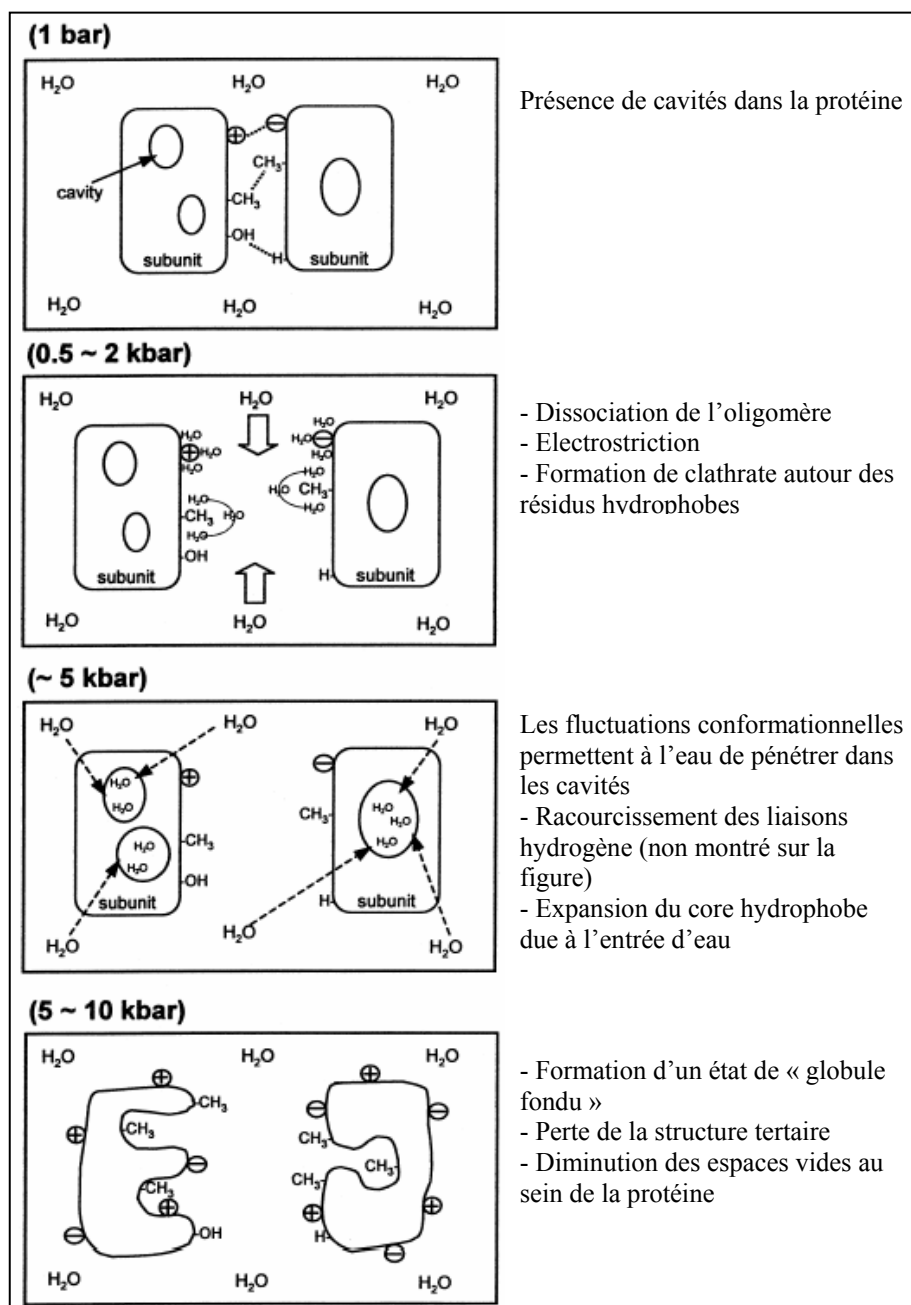
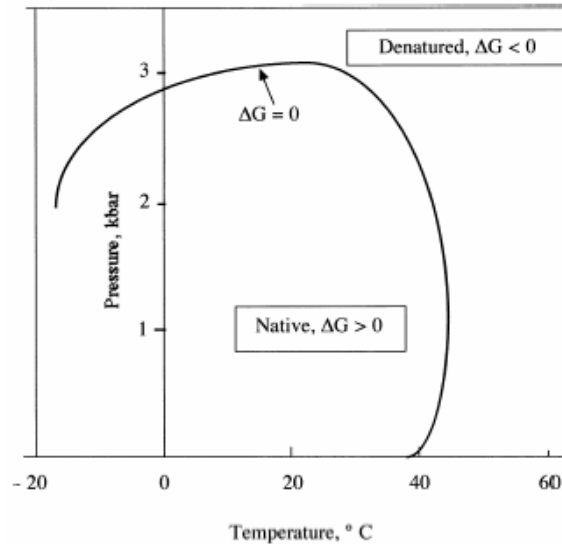


Figure I.2 : Principaux effets des hautes pressions entraînant la dissociation des protéines oligomériques et la dénaturation des sous-unités.

*subunit* : sous-unité – *cavity* : cavité. D'après [140]

En tenant compte des interactions moléculaires et des effets de pression, un diagramme pression - température a été proposé pour la dénaturation des protéines. [141] (Figure I.3)



**Figure I.3** : Diagramme (P, T) de dénaturation des protéines [141]

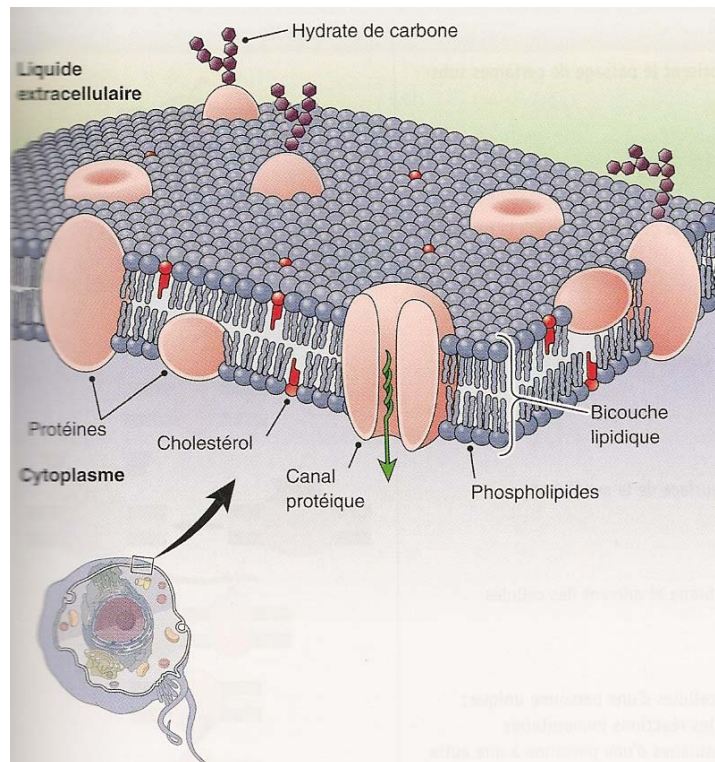
*En conclusion, du fait des rôles différents de la pression et de la température sur le phénomène de dénaturation des protéines, la courbe (P, T) séparant l'état natif de l'état dénaturé présente une allure particulière (elliptique). Chaque protéine est alors caractérisée par un diagramme qui lui est propre.*

### ***1.2.2. Effets des hautes pressions sur les lipides et les membranes***

Les lipides sont les constituants biologiques les plus sensibles à la pression. Les mésophases lyotropiques lipidiques sont organisées en systèmes biomoléculaires constitués de molécules amphiphiles (principalement des phospholipides) en présence d'eau. [134] Celles-ci présentent un large polymorphisme structural dépendant de divers paramètres : leur structure moléculaire, leur teneur en eau, la valeur du pH, la force ionique, la température et la pression. [142-145]

Dans les structures biologiques, les lipides sont principalement présents dans les membranes. Ces dernières sont organisées en bicouches de phospholipides dans lesquelles sont insérées notamment des protéines. [134] (Figure I.4) Les phospholipides saturés présentent souvent deux types de transition de phases : une pré-transition gel → gel ( $L_{\beta}' \rightarrow$

$P_{\beta}$ ) et une transition gel  $\rightarrow$  liquide  $\rightarrow$  cristal ( $P_{\beta} \rightarrow L_{\alpha}$ ). Toutes les transitions induites par la pression sont caractérisées par un  $\Delta V$  négatif au travers de changements de conformations et d'empilements des phases lipidiques. De plus l'application de hautes pressions peut conduire à la formation de nouvelles phases de type gel. [145] Les organismes barophiles présentent généralement des membranes plus fluides, grâce notamment à l'augmentation du rapport lipides insaturés / lipides saturés.



**Figure I.4** : Structure générale des membranes biologiques [146]

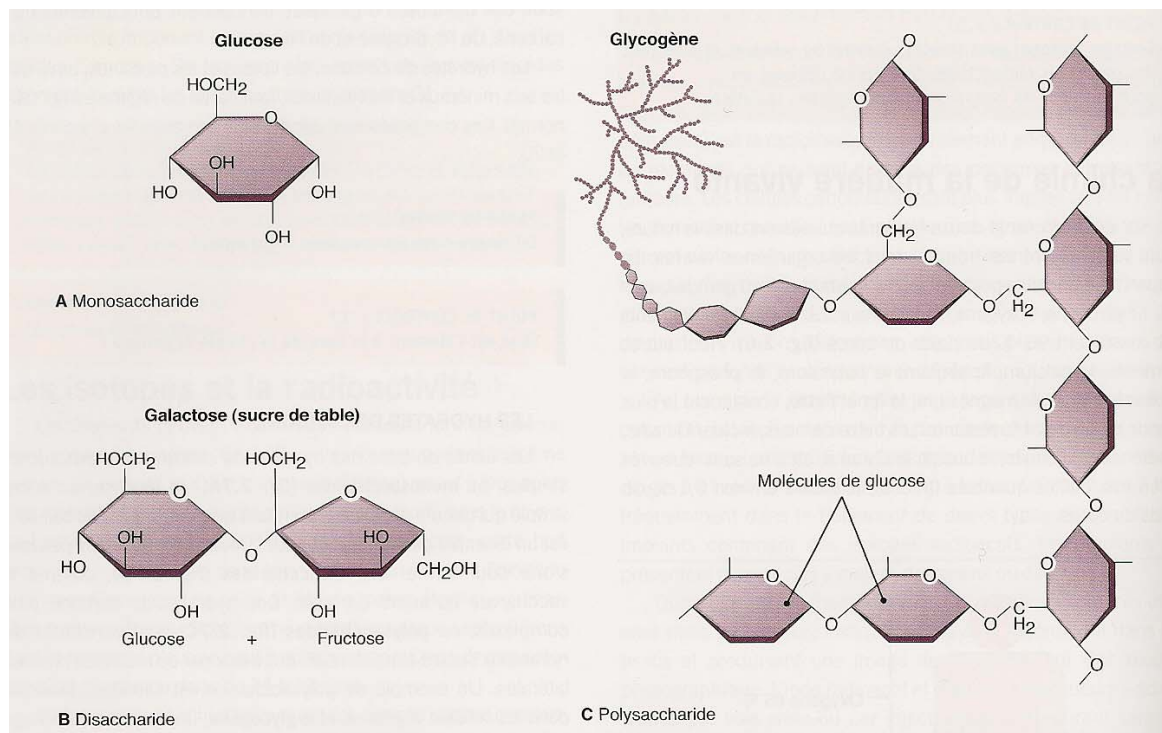
*En conclusion, du fait d'une part - au travers de ces transitions de phases - de la sensibilité importante des lipides à la pression et d'autre part de leur présence dans les membranes biologiques, ces constituants peuvent jouer un grand rôle dans le comportement des systèmes vivants soumis aux hautes pressions (Cf. § I.3).*

### ***1.2.3. Effets des hautes pressions sur les glucides***

La sensibilité des glucides à la pression dépend en grande partie de leur taille. En effet, si les oses et les oligosides sont relativement résistants, les polysides, en revanche, ont tendance à se gélifier sous l'action de la pression.

### I.2.3.1. Les oses et les oligosides

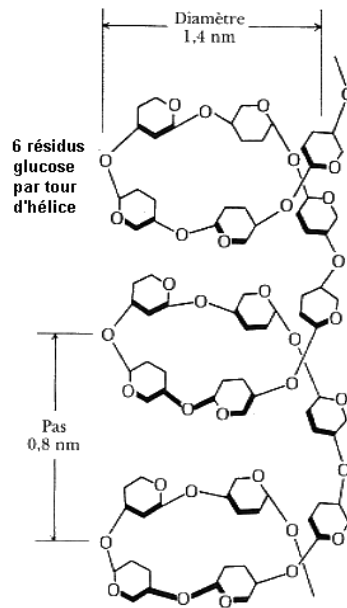
Les oses et les oligosides ou hydrates de carbone ne contiennent que des liaisons covalentes. (Figure I.5) Par conséquent, la pression n'a aucun effet sur de telles structures. Par exemple un jus de citron frais traité à 600 MPa voit sa teneur en glucose, fructose et saccharose totalement conservée. [147]



**Figure I.5** : Exemples d'hydrates de carbone [146]

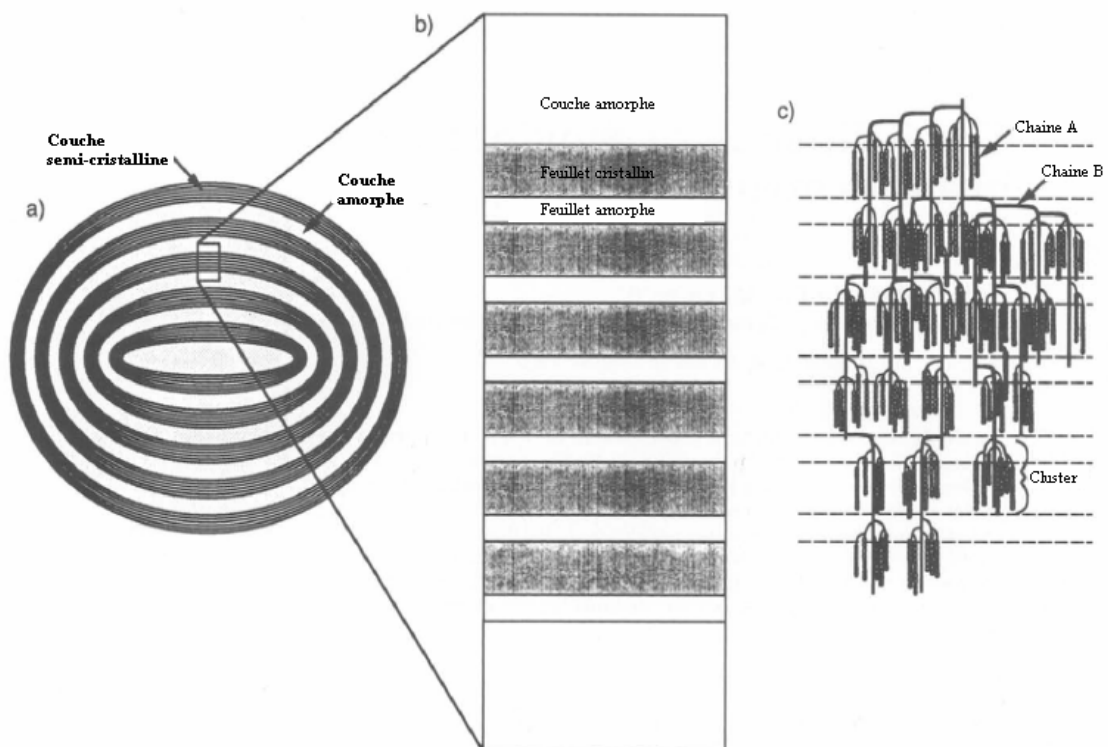
### I.2.3.2. Les polysides et les structures plus complexes

Les polysides sont constitués de nombreux oses unis par liaisons osidiques. Ils peuvent être linéaires (ex. : cellulose) ou ramifiés (ex. : glycogène). De plus, ils peuvent posséder une structure hélicoïdale stabilisée par des liaisons hydrogène. [148] C'est le cas par exemple de l'amylose, un des polysides constitutif de l'amidon. (Figure I.6)



**Figure I.6** : Structure de l'amylose [149]

L'amidon se présente sous forme de granules, alternance de couches semi-cristallines et amorphes. Il est composé de chaînes d'amylose (zone amorphe) et d'amylopectine organisée en feuillets (partie cristalline), dont la proportion varie selon son origine (riz, maïs...) [150, 151] (Figure I.7).



**Figure I.7** : Représentation schématique de la structure d'un granule d'amidon.

- a) Granule, b) Alternance des couches semi-cristalline et amorphe,  
c) Arrangement des chaînes d'amylopectine dans la couche semi-cristalline. D'après [150]

Du fait de l'action de la pression sur les liaisons faibles, ce paramètre va pouvoir déstabiliser les chaînes d'oses qui seront susceptibles ensuite de former d'autres structures plus denses que celle du polyoside d'origine. Ainsi les macromolécules glucidiques telles que les pectines, l'amidon ou les alginates sont susceptibles d'être modifiées par la pression.

Le comportement de l'amidon vis-à-vis de la pression dépend du type d'amidon concerné, celui de type B étant plus barorésistant que ceux de types A et C. [152] La barorésistance du type B pourrait être attribuée à sa plus faible compressibilité [153] apportée par une plus grande teneur en amylopectine. Des travaux plus récents ont montré une transition partielle de type A en type B sous l'effet de la pression due au réarrangement des hélices. [154]

Les phénomènes induits par la pression, et en particulier la gélification, sur un mélange amidon / eau dépendent de divers facteurs : son origine (maïs, pomme de terre...), la teneur en amidon, la température, la pression et la durée de traitement. Cependant les propriétés du gel d'amidon préparé sous hautes pressions sont différentes de celles obtenues après chauffage, ce qui suggère que les mécanismes d'action sont différents. Un mécanisme en deux étapes a été proposé par RUBENS et al. [155, 156] dans lequel la partie amorphe des granules d'amidon est tout d'abord hydratée, ce qui conduit à leur gonflement, avant que l'eau ne vienne attaquer la partie cristalline.

*En conclusion, la pression a principalement une action sur les polyosides, en particulier l'amidon, au travers d'interactions avec l'eau.*

#### ***1.2.4. Effets des hautes pressions sur les acides nucléiques***

L'action de la pression conduit dans la plupart des cas à la stabilisation des liaisons hydrogène et en particulier celles stabilisant la structure de l'ADN. Ainsi, la température de transition du double brin au simple brin (température de fusion  $T_M$ ) est augmentée sous l'effet de la pression. [157]

Dans les mécanismes d'action de la pression sur les systèmes vivants, l'ADN et l'ARN ne seront pas altérés par l'application de ce paramètre, au moins dans une gamme inférieure à 1,5 GPa (15000 bar, limite des expériences menées).

### **I.3. Effets des hautes pressions hydrostatiques sur des systèmes biologiques plus complexes**

#### ***I.3.1. Effets des hautes pressions sur les cellules de mammifères***

Le traitement sous hautes pressions de cellules de mammifères conduit généralement à leur mort. Le mécanisme régissant ce processus dépend du niveau de pression :

- pour des pressions inférieures à 200 MPa, la mort cellulaire est induite par *apoptose*,
- pour des pressions supérieures à 300 MPa, c'est le phénomène de *nécrose* qui conduirait à la mort cellulaire. [132, 158, 159]

L'*apoptose* apparaît généralement après un traitement sous hautes pressions à une valeur proche de 100 MPa. Ce phénomène a été observé sur de nombreux types cellulaires, tels que les cellules MEL, B35, PC12, les lymphoblastes humains, ou les cellules ganglionnaires de la rétine. [158, 160, 161] Le mécanisme d'*apoptose* induite par la pression implique l'activation de la caspase-3, via les deux voies intrinsèque et extrinsèque. La voie extrinsèque est caractérisée par la liaison du ligand Fas aux récepteurs de la mort cellulaire Fas situés à la surface de la cellule. La voie intrinsèque, quant à elle, met en jeu la libération par les mitochondries de cytochrome c dans le cytosol. Le stimulus de l'*apoptose* reste néanmoins encore indéfini. [158] Les conséquences : la contraction de la cellule, la condensation de la chromatine, la perte des microvillosités...conduisent à la mort cellulaire. [158, 160]

Le phénomène de *nécrose* est induit pour les cellules soumises à des pressions supérieures à 300 MPa. [159, 160] Ceci a été observé sur des lymphoblastes humains immédiatement après décompression. [160] La *nécrose* ne dépend pas de l'activation de la caspase et conduit au gonflement cellulaire, à la dégradation des organelles, et en particulier à des dommages irréversibles au niveau des mitochondries, ainsi que des modifications de la concentration ionique intracellulaire. Ces altérations mènent à la rupture de la membrane et au relargage du contenu cellulaire, ce qui provoque une inflammation. [158, 160]

### ***1.3.2. Effets des hautes pressions sur les agents pathogènes***

#### **1.3.2.1. Effets des hautes pressions sur les bactéries**

L'inactivation des bactéries a constitué le principal objectif des premiers travaux menés sous hautes pressions. [50] Depuis ces expériences conduites notamment par HITE, de nombreuses avancées ont été observées dans ce domaine, notamment en ce qui concerne les mécanismes impliqués.

Des approches récentes impliquant des conditions de valeurs moyennes de la pression ( $P < 100$  MPa) (conditions sub-létales) mettent en évidence deux types de réponses cellulaires : (i) les modifications des propriétés physico-chimiques de la membrane, (ii) les variations de l'activité métabolique (division cellulaire, biosynthèse des protéines, modification des protéines de transport, pH intracellulaire...) [162, 163]

En règle générale, quel que soit le domaine de pression considéré (conditions sub-létales ou létales), la membrane cellulaire est considérée comme la première cible lors de l'inactivation de bactéries sous pression. Des observations par microscopie électronique montrent notamment des cicatrices de bourgeons à la surface des cellules soumises à la pression, suggérant ainsi que la membrane cellulaire pourrait être un site privilégié de l'action des hautes pressions. [164] Cependant, la perméabilité de la membrane de certaines souches bactériennes (évaluée par une coloration à l'iodure de propidium) apparaît plus tard que la mort cellulaire [164, 165] et la rupture de cette membrane n'a pas été observée même aux pressions les plus élevées. [166] Ainsi l'action de la pression sur la membrane cellulaire impliquerait d'autres mécanismes.

Il est connu que la fluidité de la membrane diminue quand la valeur de la pression appliquée augmente, ce qui implique que les micro-organismes possédant les membranes les plus rigides soient les plus barosensibles. [167] Ce phénomène conduit notamment à des altérations de la fonctionnalité des enzymes liées à la membrane. [168] Par exemple, la mort cellulaire de *Lactobacillus rhamnosus* peut être corrélée à l'inactivation du système d'exclusion des colorants ATP-dépendant, localisé sur la membrane cellulaire. La dégradation de ce système détériore la capacité de ces cellules à se reproduire et à former des colonies sur milieu non sélectif. [165] De plus, une analyse des images obtenues par microscopie électronique à balayage de *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* montre que, suite à leur

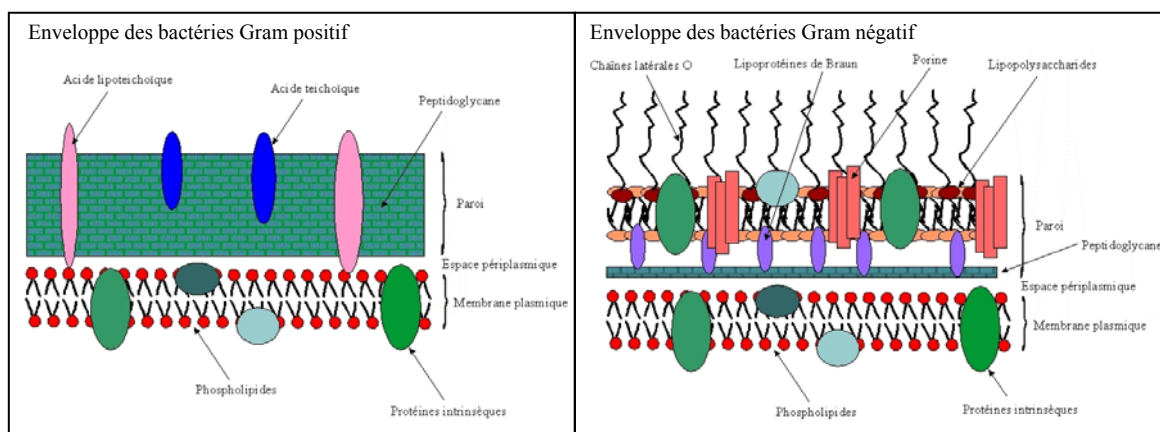


inactivation par la pression, la surface et le volume moyen augmente. Il est proposé que de telles observations pourraient être liées à des modifications des propriétés de la membrane, telles que la dénaturation des protéines membranaires ou des transitions de phases des bicouches de lipides. [169] Cette transition liquide → gel est confirmée par la diminution de l'épaisseur de la bicouche phospholipidique. [170] La mise en évidence d'une diminution de la concentration en ATP intracellulaire et du potentiel de membrane constitue une autre preuve de l'altération des protéines membranaires. En effet, ces deux processus peuvent respectivement être corrélés à un dysfonctionnement de l'ATPase et à l'incapacité de la cellule à maintenir son hémostasie, phénomène qui met en jeu plusieurs protéines transmembranaires. [164, 166]

Comme expliqué précédemment, la perméabilisation de la membrane cellulaire n'est pas suffisante pour expliquer le processus d'inactivation des bactéries sous hautes pressions. Après un traitement sous hautes pressions d'*Escherichia coli*, la structure interne de la cellule est également modifiée comme l'atteste la condensation des nucléoïdes et l'agrégation des protéines cellulaires. Cependant, aucune corrélation absolue n'a pu être définie entre ces phénomènes et la mort de la cellule. La condensation des nucléoïdes pourrait être due à l'effet du compactage de l'ADN dans les cellules (qui n'est pas associé à un dysfonctionnement de l'ADN) ou par l'action de la pression sur les complexes protéine-ADN. L'agrégation des protéines cellulaires pourrait être induit par leur dénaturation sous pression. Il est intéressant de souligner que ces deux effets pourraient également être partiellement expliqués par l'altération de la membrane cellulaire. En effet, la stabilisation des complexes protéine-ADN ainsi que des protéines intracellulaires telles que les ribosomes fait intervenir des cations divalents. Du fait de la perméabilisation de la membrane la perte de ces ions est fortement probable et conduirait alors à la déstabilisation de ces entités. [171]

L'efficacité de l'inactivation des bactéries sous hautes pressions dépend de nombreux facteurs, tels que : la cellule elle-même, l'activité de l'eau au sein du système ainsi que la température utilisée pour ce traitement.

Les bactéries Gram positif apparaissent être plus barorésistantes que les Gram négatif. Il est admis que cette différence de sensibilité vis-à-vis de la pression pourrait être associée aux différences de structure de l'enveloppe. En effet l'enveloppe de la cellule de bactéries Gram négatif comprend une couche supplémentaire : la membrane externe, qui est plus sensible à la pression que la membrane cytoplasmique. [169] (Figure I.8)



**Figure I.8** : Comparaison de la structure des enveloppes des bactéries Gram positif et Gram négatif [172]

L'activité de l'eau ( $a_w$ ) du système est également un facteur important pour l'inactivation de bactéries sous pression. Il apparaît que lorsque la valeur de  $a_w$  diminue, les bactéries deviennent plus barorésistantes. Il est généralement proposé qu'une diminution de l'activité de l'eau du cytoplasme rend ce dernier moins compressible et modifie alors le rapport surface / volume de la cellule. Or, il semblerait que ce rapport joue un rôle dans la sensibilité des bactéries sous pression. [173]

De manière générale, l'utilisation de températures négatives permet d'augmenter l'efficacité destructrice des bactéries sous hautes pressions, comme *Escherichia coli* par exemple. [173] Dans de telles conditions, l'action des hautes pressions semble plus efficace lorsque les conditions de traitement conduisent à une transition Glace I  $\rightarrow$  Glace III. Cet effet serait dû au stress associé à cette transition de phases. [99] En outre, la perméabilisation de la membrane semble être réversible. *Ainsi, il est suggéré que lorsque le traitement sous hautes pressions est appliqué à températures négatives, le processus d'inactivation a lieu durant l'état transitoire d'accroissement de la perméabilité membranaire.* [171]

### I.3.2.2. Effets des hautes pressions sur les levures et moisissures

En général, les levures et moisissures sont plus sensibles à la pression que les bactéries à l'état végétatif.

Le mécanisme d'inactivation par la pression des levures est proche de celui mis en jeu pour les bactéries. En effet, la pression affecte la perméabilité de la membrane, les structures

cellulaires, et conduit à la dénaturation des protéines. [174, 175] Ainsi un traitement « hautes pressions » modéré (300 MPa, 15 min, 25°C) entraîne des modifications au niveau des parois cellulaires et de la membrane plasmique de *Saccharomyces cerevisiae*, mais il semble que la membrane intracellulaire soit la première cible du processus d'inactivation. [176] L'hypothèse que la perméabilité de la membrane soit le principal site touché est renforcée par la diminution du volume de la cellule observée après traitement. Ceci implique la création d'un flux d'eau, qui est rendu possible si la membrane devient perméable et laisse sortir les molécules internes. [174]

Contrairement aux bactéries, les levures sont des cellules eucaryotes et possèdent donc des mitochondries. Il apparaît que ces organelles pourraient être l'un des éléments sensibles à l'action de la pression, ce type de traitement pouvant conduire à la libération du cytochrome c (considéré comme une étape clé du processus d'apoptose menant à la mort cellulaire). [176]

Les ascospores de moisissures thermorésistantes apparaissent plus barorésistantes, et la plupart d'entre elles ne sont pas inactivées dans un domaine de pression compris entre 300 MPa et 800 MPa. Leurs formes végétatives (conidies) sont plus fragiles sous pression, avec une sensibilité comparable à celle des levures. Il est supposé que les hautes pressions agissent sur la perméabilité et la rigidité des parois des ascospores, accroissant ainsi leur perméabilité à l'eau. Cette réhydratation est généralement considérée comme la première étape de leur germination. [175]

### I.3.2.3. Effets des hautes pressions sur les spores bactériennes

Les spores bactériennes constituent la forme de résistance de certaines bactéries Gram positif. Le processus de sporulation est généralement initié quand les conditions environnementales deviennent défavorables, notamment quand le milieu s'appauvrit en éléments nutritifs. La forte résistance des spores vis-à-vis de nombreux stress (chaleur, radiation, dessiccation, agents chimiques...) est principalement due à leur structure particulière constituée d'un certain nombre de couches. (Figure I.9) Le cortex, qui est la partie responsable de la mise en place et du maintien de la faible concentration en eau au cœur de la spore, est probablement responsable de sa barorésistance. [175, 177] L'inactivation directe des spores sous hautes pressions nécessite donc d'utiliser des conditions drastiques, comme par exemple un traitement à 827 MPa et 75°C pendant 30 min. [178, 179]

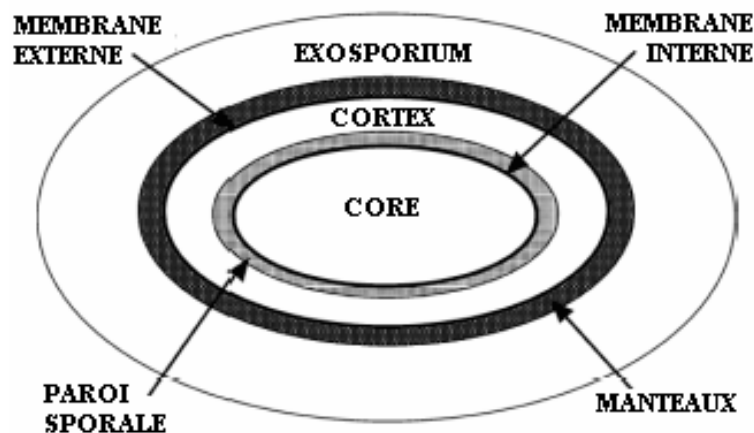


Figure I.9 : Structure générale d'une spore bactérienne. D'après [175]

Afin d'inactiver les spores sous pression, le traitement est souvent divisé en deux étapes : la première à basse ou moyenne pression (50 MPa à 300 MPa) ayant pour objectif d'initier la germination [180] et la seconde à plus hautes pressions (> 400 MPa) afin d'inactiver la forme végétative issue de la première étape. [177] En effet, une pression modérée initie le processus de germination au travers de l'activation des récepteurs des nutriments présents à la surface de la membrane interne de la spore. [177, 181] Cependant le mécanisme d'activation mis en jeu est encore mal connu. Il est probable que la pression agisse directement sur les récepteurs eux-mêmes, en entraînant des modifications structurales, ou sur la membrane interne dans laquelle résident ces récepteurs. Suite à cette phase d'activation, le processus de germination suit la même voie que celle induite en présence de nutriments. [175, 177, 182]

#### I.3.2.4. Effets des hautes pressions sur les virus

La résistance des virus vis-à-vis de la pression dépend en grande partie de leur structure. [183] Les virus sont généralement classés en deux groupes : (i) les virus enveloppés et les non enveloppés, en fonction de la présence ou non d'une membrane entourant une coque protéique (capside) et l'acide nucléique. [184]

La plupart des études menées sous hautes pressions ont porté sur les virus enveloppés. Dans ce cas, la pression peut, en principe, altérer trois types d'interactions : (i)

protéine-lipide, (ii) protéine-protéine, (iii) protéine-acide nucléique, cette dernière demeurant cependant insensible à la pression. [185]

Après un traitement sous hautes pressions, la structure globale du virus n'est pas modifiée et seules quelques différences peuvent être décelées par microscopie électronique, telles que la présence de renflements à la surface. Ce phénomène peut s'expliquer par un déplacement des sous-unités protéiques de la capsid, présente sous la membrane constituée de lipides et de protéines. [186, 187] Ces changements de conformation subtils au niveau des protéines de la coque virale et/ou des glycoprotéines de l'enveloppe sont comparables à ceux observés au cours de l'état fusogène du virus ("fusion-active state"), lorsque les particules virales fusionnent avec les récepteurs de la membrane de l'hôte. [132, 185] La transition vers cet état fusogène entrave la liaison du virus traité sous hautes pressions avec ses récepteurs cellulaires et ainsi empêche l'endocytose et l'infection virale. [184]

Les virus non enveloppés sont généralement plus barorésistants que les virus enveloppés. L'état fusogène décrit précédemment peut également être observé pour les virus non enveloppés inactivés sous hautes pressions. L'hypothèse la plus répandue fait état d'un désassemblage de la capsid sous pression, suivi d'une réassociation lorsque la pression est relâchée. Les particules ainsi obtenues ne sont pas infectieuses et s'apparentent à l'état fusogène proposé pour les virus enveloppés. [184]

L'inactivation des virus sous pression est souvent accrue lorsque la température de traitement est négative. Dans ces conditions, les liaisons hydrogène locales et l'hydratation des groupes hydrophobes au sein des protéines seraient altérées, ce qui conduirait à la déstabilisation des protéines virales. [188, 189]

#### I.3.2.5. Effets des hautes pressions sur les parasites

Peu d'études ont été conduites sur l'effet des hautes pressions sur les parasites. Ces recherches se sont principalement intéressées à deux types de parasites : les protozoaires et les nématodes, avec un objectif principal de sécurité alimentaire.

Les oocystes constituent la forme de résistance des protozoaires. Ceux de *Cryptosporidium parvum* ou de *Toxoplasma gondii* peuvent être facilement inactivés par un traitement court ( $\leq 3$  min) à une pression comprise entre 340 MPa et 550 MPa. [190-192] La

viabilité des oocystes est généralement testée par excystation, dont le principe repose sur la capacité des oocystes à libérer des sporozoïtes lorsqu'ils sont mis en présence d'une solution contenant des sels biliaires et de la trypsine. [191] Après traitement sous hautes pressions, les observations par microscopies optique et électronique ne montrent aucune modification morphologique. [193, 194] La perméabilité et la fragilité de leur paroi restent inchangées. Il semble cependant que les hautes pressions affectent l'intégrité des sporozoïtes puisque leur extraction des oocystes et leur morphologie sont modifiées. [193]

Les études relatives aux nématodes tels que *Ascaris suum* ou *Anisakis simplex* ont montré que ces parasites étaient inactivés à des pressions relativement basses ( $\approx 200$  MPa) pour des temps de traitement courts ( $\leq 10$  min). [195-198] Après l'application de hautes pressions, l'observation des larves au microscope optique ne permet pas de détecter d'altérations morphologiques des nématodes. [195, 198] Une étude en microscopie électronique à balayage des larves tuées par la pression ne montre pas de dommages externes au niveau des cuticules. Des observations histochimiques utilisant la coloration à l'Azan mettent en évidence un changement de coloration pour la larve morte. Les auteurs ont émis l'hypothèse que la pression pourrait induire une basification des tissus. Les résultats obtenus par coloration à l'acide périodique-Schiff suggèrent également que la pression conduirait à la décomposition du glycogène et/ou des glycoprotéines. [199]

#### I.3.2.6. Effets des hautes pressions sur un agent pathogène particulier : le prion

Le terme de protéine prion pour « PRoteinaceous Infecious particle ONly » (PrP) a été employé pour la première fois par Stanley B. Prusiner en 1982 (Prix Nobel en 1997), lorsqu'il émit l'hypothèse que l'agent infectieux responsable des maladies à prion était de nature uniquement protéique. Cet agent, responsable d'Encéphalopathies Spongiformes Subaiguës Transmissibles (ESST) est défini comme un « agent transmissible non conventionnel » (ATNC). [200]

Les maladies à prion (humaines ou animales) sont caractérisées par une période d'incubation très longue conduisant à la dégénérescence du système nerveux central dont l'évolution est toujours fatale. Chez l'Homme, la maladie la plus fréquente (80 % des ESST) est la forme sporadique de la maladie de Creutzfeldt Jakob (sMCJ) décrite en 1920-1921 et dont l'incidence est d'environ 100 cas par an en France. (Cf. deux reviews récentes : [201, 202])

Une nouvelle forme de MCJ dont l'origine serait alimentaire émerge en 1996 : le variant de la maladie de Creutzfeldt Jakob ou vMCJ. Elle résulterait de la consommation de viande provenant de bovins atteints d'Encéphalopathie Spongiforme Bovine (ESB) plus connue sous le nom de « maladie de la vache folle ». [201, 202, 203]

La protéine prion normale ( $\text{PrP}^{\text{C}}$ ) est présente dans la plupart des cellules adultes et en particulier dans les neurones. Sa fonction est encore peu connue (elle pourrait être impliquée dans le stress oxydatif). L'événement principal de la maladie résiderait en la conversion de la forme cellulaire normale  $\text{PrP}^{\text{C}}$  en une forme anormale pathologique  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  (Sc : scrapie). Le mécanisme de transconformation reste mal identifié et très controversé.

La  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  et la  $\text{PrP}^{\text{C}}$  possèdent la même séquence d'acides aminés et seule leur conformation diffère. En effet, la  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  contient plus de feuillets  $\beta$  que la  $\text{PrP}^{\text{C}}$  et est capable de s'agréger, ce qui lui confère une résistance particulière à l'activité des protéases et aux méthodes classiques de décontamination (traitement UV, autoclavage...). L'accumulation dans le cytoplasme de tels agrégats pourrait être associée à la mort des cellules neuronales. [201, 202, 203, 204]

L'inactivation sous hautes pressions de la protéine infectieuse du prion (telle que la souche 263K) requiert des conditions de traitement très drastique, allant jusqu'à 1200 MPa pendant 10 min et à une température pouvant atteindre 135°C. [205] Les molécules  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  inactivées sous hautes pressions perdent leur résistance à la PK, du fait probablement de modifications conformationnelles. [206] Ainsi des conditions combinant très hautes pressions et températures élevées pourraient être suffisantes pour dissocier de manière irréversible les agrégats de  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ . Ces derniers présentent des cavités dues aux défauts de compaction et seraient stabilisés majoritairement par des interactions hydrophobes et électrostatiques. Etant donné que les hautes pressions favorisent l'état de plus faible volume, elles entraîneraient la rupture de ces interactions et la disparition des cavités internes, ce qui conduirait à la dissociation des agrégats. [207]

La conformation de la protéine  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  apparaît être un paramètre clé dans sa barosensibilité. Ainsi selon l'origine de celle-ci – protéine native du prion issue d'un broyat de cerveau de hamster ou protéine de prion recombinante – les molécules  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  sont plus ou moins barorésistantes. Ce comportement suggère que la  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  existerait sous deux formes : l'une constituée de structures  $\beta$  sensibles à la pression et l'autre de structures  $\beta$  plus résistantes.

Cette observation souligne l'importance du choix de l'origine de la protéine dans toute étude d'inactivation. [206]

#### **I.4. Applications biologiques des hautes pressions hydrostatiques**

##### ***I.4.1. L'industrie agro-alimentaire***

La capacité des hautes pressions à inactiver un certain nombre de pathogènes tout en conservant la majorité des propriétés organoleptiques des produits alimentaires représente un intérêt majeur pour l'industrie agro-alimentaire. Ainsi l'utilisation de la pression présente de nombreux avantages tant en ce qui concerne le produit lui-même (préservation de la teneur en vitamines, sauvegarde des arômes et des qualités nutritives...), qu'au niveau de la mise en œuvre du procédé (peu d'énergie consommée, application instantanée et uniforme de la pression...). [167]

Cette technologie a tout d'abord été développée pour la décontamination de produits contenant des arômes thermosensibles. C'est pourquoi les premières applications concernaient les produits dérivés des fruits (jus, coulis, confitures...). [167, 208] Depuis ces dernières années, la gamme de produits "pascalisés" s'est considérablement élargie (produits dérivés de la charcuterie, du poisson...). Par exemple, les fruits de mer crus présentent des risques importants de contamination par des parasites tels que *Cryptosporidium parvum* ou *Anisakis simplex*. Il a été montré que l'application de hautes pressions permettait d'inactiver de tels pathogènes tout en ayant peu d'effets secondaires sur les qualités sensorielles du produit, à l'exception d'un léger blanchissement. [192, 196, 197]

Depuis les premiers développements des procédés hautes pressions en agro-alimentaire, [209] la recherche d'indicateurs (physiques ou biologiques) destinés à comparer l'impact de tels traitements (pascalisation) par rapport aux procédés thermiques conventionnels (pasteurisation, stérilisation...) constitue un point important pour les aspects industriels. [210]



#### ***1.4.2. L'utilisation des organismes extrêmophiles pour le développement de nouveaux outils***

Les protéines et les enzymes extraites des organismes extrêmophiles (barophiles et/ou thermophiles) ouvrent la voie à de nouvelles applications dans divers domaines impliquant tant la recherche fondamentale que l'industrie. En effet, elles pourraient servir à la mise au point de nouvelles méthodes d'analyse, de nanosenseurs, de nouveaux médicaments... Par exemple, il est envisageable, par transformation génétique, d'apporter les gènes de résistance à la pression à des levures, qui pourront par la suite être utilisées en industrie avec pour objectif une augmentation des rendements. [211-213]

#### ***1.4.3. Effets des hautes pressions sur l'allergénicité et la digestibilité des aliments***

Il est souvent proposé que la protéolyse partielle des produits alimentaires sous hautes pressions (en particulier dans le cas des protéines du lait) conduit à un accroissement de leur digestibilité et une réduction de leur caractère allergène. [90, 214, 215]

Les protéines du lactosérum sont très souvent utilisées dans l'industrie alimentaire. Dans le cas de produits hypoallergéniques, elles sont généralement remplacées par des hydrolysats de ces mêmes protéines, obtenus par digestion enzymatique, du fait de leur faible capacité de liaison aux immunoglobulines (Ig). Cette protéolyse réduit cependant leurs propriétés fonctionnelles, et en particulier leurs propriétés émulsifiantes. Lorsque cette protéolyse enzymatique est réalisée sous hautes pressions, les protéines telles que la  $\beta$ -lactoglobuline deviennent plus sensibles à diverses enzymes (pepsine, trypsine, chymotrypsine, pronase, thermolysine). Les hydrolysats ainsi obtenus présentent alors une plus faible allergénicité, caractérisée notamment par la réduction de leur capacité de liaison aux IgG et aux IgE. Ils conservent néanmoins une large partie de leur propriétés fonctionnelles (stabilité thermique accrue, et index d'activité émulsifiante comparable à celui du lactosérum). [90, 216]

L'utilisation de la pression peut également diminuer l'allergénicité d'autres aliments, comme par exemple le riz. [214] Dans ce cas, les cellules de l'endosperme contenues dans les grains de riz sont en partie détruites dans de telles conditions et deviennent alors perméables, ce qui conduit à la libération des principaux allergènes. [132]

#### ***1.4.4. Désinfection des biomatériaux***

Depuis que les hautes pressions ont démontré leur efficacité dans l'industrie agro-alimentaire, l'utilisation de tels traitements dans le but de décontaminer des biomatériaux, qu'ils soient d'origine naturelle ou synthétique, a été proposée.

Les biomatériaux de synthèse sont maintenant relativement nombreux, et sont notamment issus de la métallurgie et des céramiques (prothèses osseuses, plaque vissée,...) ou de la plasturgie (substituts de tendons, cornées artificielles...) Il a été démontré, par exemple, que l'application d'un traitement hautes pressions à 300 MPa et +4°C pendant 10 min, permettait de stériliser des vis contaminées par *Staphylococcus aureus*. [217]

Les biomatériaux naturels tels que ceux destinés à des autogreffes ou à des allogreffes pourraient également bénéficier de ce type de traitement. La décontamination d'un greffon dans le cadre d'une autogreffe est généralement envisagée suite au développement d'une infection ou de cellules tumorales. Dans le cas des greffons osseux ou de tendons, ces derniers sont tout d'abord prélevés, puis désinfectés avant d'être réimplantés. Actuellement, l'étape de désinfection est réalisée soit par irradiation extracorporelle, autoclavage, chauffage, ou ajouts de détergents mais ces procédés conduisent à la perte des propriétés biologiques et biomécaniques du greffon. [133, 218, 219] Les hautes pressions pourraient constituer une alternative à ces méthodes puisqu'il a été montré que les principales protéines présentes dans les tissus osseux (fibronectine, vitronectine, collagène de type I) n'étaient pas altérées après un traitement jusqu'à 600 MPa. [218] De plus, il a également été observé que dans ces conditions (600 MPa), des échantillons de tendons d'Achille et d'os trabéculaire conservaient leurs propriétés biomécaniques (évaluées par les valeurs de la limite élastique et du module d'Young). [219, 220] A cette pression, les cellules tumorales sont inactivées, ce qui ouvre une nouvelle approche pour la décontamination des autogreffes. [220]

En ce qui concerne les allogreffes, le transplant (os, tendon, ligament, cartilage...) est issu d'un donneur de la même espèce que le receveur. Dans ce cas, le risque de contamination (bactérienne notamment) du greffon est à envisager, et oblige à prévoir une étape de désinfection avant la transplantation. Il a été récemment montré que des ménisques bovins pouvaient être soumis à une pression de 600 MPa sans altération des collagènes de types I, II, III, de la versicane, de l'agrécan... [221]

*Les procédés hautes pressions, conduisant à la fois à l'inactivation d'une grande gamme d'agents pathogènes et à la sauvegarde des propriétés mécaniques et biologiques des*

*biomatériaux, apparaissent donc comme prometteurs pour la désinfection de nombreux types de greffons.*

#### ***1.4.5. Modulation de l'activité enzymatique***

L'activité enzymatique, telle que celle des protéases, peut être modulée par la pression. Ceci est possible car la stabilité et la fonctionnalité de la plupart des enzymes ne sont pas altérées à une valeur inférieure à 200 MPa. [214]

Si une réaction enzymatique conduit à une valeur de  $\Delta V$  négative, l'application de hautes pressions peut alors augmenter l'activité enzymatique associée. Par exemple, l'activité de l' $\alpha$ -chymotrypsine à 450 MPa est 6,5 fois plus élevée qu'à pression atmosphérique. [132, 137, 222, 223]

Il a aussi été établi que la résistance thermique d'une protéine peut être accrue sous des conditions de pression modérée. La vitesse de nombreuses réactions enzymatiques est améliorée quand la température est augmentée. La mise en œuvre de procédés combinant ces deux paramètres avec des valeurs modérées pourrait donc conduire à la définition de nouvelles conditions optimales de réaction. Dans ces conditions, la vitesse de réaction d'une enzyme, dont la stabilité thermique est accrue grâce à la pression, pourrait être accrue, ce qui aboutirait à des rendements de production plus importants. Par exemple, l'activité enzymatique de l' $\alpha$ -chymotrypsine à 50°C est multipliée par 30 quand la réaction est réalisée sous une pression de 360 MPa. [132, 222, 223]

#### ***1.4.6. Stabilisation d'états protéiques intermédiaires***

Le mécanisme de repliement des protéines est encore peu connu du fait des difficultés à isoler d'une part et à décrire d'autre part les états intermédiaires. Sous pression, il est possible d'atteindre ces intermédiaires et leurs structures peuvent alors être étudiées grâce à diverses techniques physiques (fluorescence, RMN, diffusion de la lumière...). Les réactions conduisant au repliement ou à l'association des protéines sont comparables, en ce sens qu'elles s'accompagnent toutes deux d'une augmentation de l'entropie et du volume du système. Contrairement à l'utilisation des agents de déstabilisation utilisés communément tels que la température ou divers produits chimiques (urée, guanidine...) qui conduit à des modifications

drastiques des structures protéiques, les hautes pressions altèrent uniquement les interactions non polaires (si elles conduisent à un  $\Delta V$  négatif) et qui sont essentielles dans le repliement des protéines. Par conséquent, la dénaturation des protéines sous pression dépend principalement de leurs structures tertiaires et quaternaires. [131, 132, 222, 224]

Pour de nombreux systèmes protéiques, la mise en œuvre de hautes pressions s'est avérée très utile pour isoler leur état de « globule fondu » (« molten-globule state ») qui correspond à un état partiellement replié. En effet, dans de telles conditions, l'équilibre est déplacé vers cet état du « globule fondu », ce qui a permis de mettre en évidence plusieurs conformations partiellement repliées, intermédiaires entre les états natif et dénaturé, avec en particulier l'agrégation et la formation d'amyloïdes. L'isolement de ces intermédiaires est crucial pour la compréhension du phénomène de "mauvais repliement" (« misfolding ») et de l'agrégation des protéines tant dans le domaine des biotechnologies (par exemple l'expression de corps d'inclusion dans des bactéries) que dans celui de la Santé pour aider à l'identification des mécanismes sous-jacents aux maladies amyloïdes et ainsi permettre de développer diverses thérapies. [48, 131, 224-227] De plus, certains cancers sont également suspectés d'être induits par le mauvais repliement de protéines. [228-232]

*Pour l'ensemble de ces raisons, les hautes pressions apparaissent comme un outil prometteur dans le développement d'activités de recherche portant sur ces états de repliement protéique imparfait, menant à des applications dans le domaine des Biotechnologies et de la Pharmacie. [131]*

#### ***1.4.7. Dissociation de complexes protéiques***

Etant donné que des pressions inférieures à 200 MPa permettent de dissocier des protéines oligomériques, elles peuvent également être mises en œuvre pour séparer des agrégats protéiques ou des corps d'inclusion. Quand les protéines sont exprimées dans des bactéries, elles ont tendance à s'agréger dans des corps d'inclusion, ce qui rend difficile la préparation de composés bioactifs complètement fonctionnels. L'application de hautes pressions permet de rétablir le repliement correct des protéines impliquées et ainsi conduit simultanément à leur solubilisation et leur retour à l'état natif. [48, 131, 132, 222]

Au cours du processus de préparation de molécules bioactives, la purification du produit d'intérêt constitue l'un des principaux défis. Pour cela, la chromatographie d'affinité, dont le principe est basé sur la reconnaissance stérique entre la molécule recherchée

(considérée comme l'antigène) et l'anticorps correspondant associé à une matrice, est couramment utilisée. L'étape critique de cette méthode réside dans la dissociation du complexe antigène / anticorps, qui nécessite souvent des conditions drastiques d'élution, afin de recueillir l'antigène élué sous sa forme active sans perte importante des propriétés de l'immuno-adsorbant (matrice). [233, 234]

Etant donné que la formation du complexe antigène / anticorps est souvent accompagnée d'une augmentation du volume moléculaire, il a été proposé que les hautes pressions – qui conduisent toujours à un  $\Delta V$  négatif - pourraient être utilisées comme une méthode alternative d'immuno-désorption. Cette approche a été testée sur plusieurs complexes antigène / anticorps tels que les systèmes  $\beta$ -galactosidase — anti- $\beta$ -galactosidase ou PSA — anti-PSA (Prostate Specific Antigen). Il a alors été montré qu'un traitement sous hautes pressions permettait de récupérer la molécule bioactive et de conserver la matrice d'affinité sous une forme plus stable qu'après une élution à pH faible. [132, 222, 233-235]

La biopurification dans de telles conditions peut également être envisagée pour d'autres techniques de séparation mettant en œuvre des interactions faibles entre un composé bioactif d'une part et un ligand lié à une matrice d'autre part. [233] Par exemple, la pression peut être utilisée pour dissocier des biomolécules amphiphiles qui sont purifiées grâce à une adsorption sur lit fixe. [236]

L'adhésion cellulaire est une étape clé au cours de nombreux mécanismes biologiques, tels que la différenciation ou la prolifération cellulaire. Elle dépend principalement des interactions entre protéines, que ce soit entre celles de surface (dans le cas d'adhésion entre deux cellules) ou entre des protéines de surface et d'autres de la matrice extracellulaire. Les hautes pressions pouvant perturber les interactions entre protéines, elles pourraient constituer un outil intéressant pour l'étude de l'adhésion cellulaire. [237]

#### ***1.4.8. Les interactions protéine - ADN***

La régulation de nombreuses fonctions cellulaires telles que la transcription, la réplication, la traduction, la régulation de gènes... est dépendante d'interactions protéine-ADN. Ces dernières sont basées sur des liaisons de faible énergie, de types Van der Waals, hydrogène ou électrostatiques. Etant donné que seules les liaisons hydrogène sont stabilisées par la pression, ceci peut permettre de discriminer la contribution de chaque type d'interactions impliqué dans le mécanisme de reconnaissance. [224, 238]

Des études sous pression ont révélé que diverses conformations partiellement repliées (« molten globule ») pouvaient exister entre l'état natif et celui totalement dénaturé pour des structures présentes chez des bactéries, plantes et virus de mammifères. Par un exemple un état intermédiaire d'une ribonucléoprotéine a été mis en évidence sous pression, dans lequel les protéines de la capsidie sont partiellement dénaturées mais restent liées à l'ARN.

*Ces intermédiaires pourraient constituer des cibles potentielles pour le développement d'antiviraux et diverses applications biotechnologiques.* [239]

#### ***1.4.9. Le développement de vaccins***

Il est souvent proposé que les agents pathogènes inactivés par traitement sous hautes pressions seraient capables de stimuler le système immunitaire et pourraient alors être utilisés comme vaccin. En effet, les hautes pressions seraient capables de révéler des sites antigéniques préalablement enfouis, et de ce fait d'accroître les propriétés immunogènes de protéines, de virus ou bactéries inactivés par un tel procédé. [214]

Les premiers essais sur la capacité de parasites soumis à la pression à induire une réponse immunitaire ont été menés sur un protozoaire : *Eimeria acervulina*. Il a été montré qu'une immunité partielle pouvait se développer. En effet, un challenge test avec des parasites infectieux réalisé sur des poulets a révélé que les animaux ayant reçu une primo-injection avec des oocystes soumis à la pression développaient des lésions moins sévères. [193]

Les effets des hautes pressions sur le développement d'une immunogénicité chez des bactéries ont tout d'abord été décrits par C.C.M. SILVA [240]. En effet, il a été montré que des lapins auxquels avaient été injectés une souche de *Leptospira interrogans* serovar *hardjo*

inactivée sous hautes pressions développaient une réponse immunitaire, telle que suivie par titration des anticorps. Cette réponse, probablement induite par l'apparition de nouveaux épitopes, pourrait s'expliquer par l'extrusion partielle de protéines membranaires ou la dissociation de protéines membranaires oligomériques. Ces résultats semblent prometteurs pour la mise au point de vaccins à base de bactéries inactivées sous pression. [240]

Une autre stratégie d'élaboration de vaccins concerne l'utilisation de « fantômes » bactériens au lieu de micro-organismes tués ou atténués. Ces « fantômes » bactériens sont généralement obtenus au travers de l'expression d'un gène lytique qui aboutit à la formation d'un canal transmembranaire conduisant à la fuite des constituants cellulaires. Ces entités conservent leurs propriétés immunogènes dans la mesure où la surface de la cellule demeure intacte. Les traitements sous hautes pressions – de part leurs spécificités liées à la faible énergie développée et aux mécanismes induits – pourraient constituer une alternative intéressante pour la production de « fantômes » bactériens. Ainsi il a été observé que la surexpression de la protéine Mrr chez *Escherichia coli* K12 augmentait la barosensibilité des cellules, ces dernières étant alors inactivées après un traitement à 100 MPa et 20°C pendant 15 min. De plus, ces bactéries inactivées sous pression grâce à l'expression de la protéine Mrr gardent leur structure cellulaire globale et ne sont pas lysées ou rendues perméables, contrairement aux « fantômes » bactériens préparés via l'expression d'un gène lytique.

*Les fantômes bactériens ainsi préparés pourraient être utilisés comme vecteurs pour délivrer des vaccins à base d'ADN ou de sous-unités protéiques.* [241]

L'intérêt du développement de vaccin grâce à la technologie hautes pressions a suscité le plus grand intérêt en virologie. Il a été montré que les virus soumis à de tels traitements perdaient leur infectiosité mais gardaient leur aptitude à provoquer la synthèse d'anticorps neutralisants. En effet, il est généralement supposé que les protéines de la capsid se dissocient *in situ* puis se réassocient de manière aléatoire quand la pression est relâchée. Les particules ainsi obtenues perdraient alors leur caractère infectieux mais conserveraient leurs propriétés immunogènes. [132, 184-187, 242] De plus des épitopes cachés pourraient être révélés, accroissant ainsi l'immunogénicité des virus ainsi inactivés. [184]

*Par comparaison avec les vaccins obtenus de façon traditionnelle, la préparation de vaccins sous pression présente de nombreux avantages, notamment une diminution du risque de développer l'infection associée par rapport aux vaccins atténués, ainsi qu'une immunogénicité plus grande que les vaccins utilisant des sous-unités isolées.* [187]

#### ***1.4.10. La préparation de vecteurs viraux***

Les virus adéno-associés (AAV) présentent un grand potentiel pour le développement de vecteurs de distribution de gènes thérapeutiques. La production de ces vecteurs (AAV) nécessite un virus helper, tel qu'un adénovirus, qui doit par la suite être inactivé et éliminé de la préparation afin d'obtenir uniquement les AAV.

Leonard et al. [243] ont montré que les AAV de sérotypes 2 et 5 sont plus barorésistants que l'adénovirus humain de sérotype 5. Cette différence de sensibilité à la pression pourrait conduire à une nouvelle méthode de préparation de systèmes de distribution de gènes.

#### ***1.4.11. La transformation génétique***

La transformation génétique de cellules est une procédure couramment utilisée en génie-biologique. Elle est cependant souvent limitée par l'efficacité de transformation car seule une faible proportion des cellules acquière le plasmide d'intérêt. Il a été montré que des plasmides traités sous hautes pressions (pUC18 à 200 MPa et pBR322 à 400 MPa) possédaient une capacité plus importante à transformer des cellules compétentes. Ce phénomène pourrait être induit par la stabilisation sous hautes pressions des liaisons hydrogène, comme le laisse supposer la modification de nombreuses propriétés des plasmides, telles que leur mobilité et leur capacité à lier le bromure d'éthidium. [244]

#### ***1.4.12. L'extraction cellulaire***

Une nouvelle méthode d'extraction cellulaire a été développée par *Pressure Biosciences Inc.* (USA). Son principe est basé sur l'utilisation d'une application cyclique de la pression (PCT) en présence de solvants d'extraction, conduisant à la dissolution et à la séparation de chaque type de molécules en fractions distinctes. L'utilisation de ce procédé suivie d'une centrifugation conduit à une bonne récupération des protéines et des lipides, à des rendements élevés en ADN et ARN non altérés, sans étapes supplémentaires de purification. [245, 246] Il est également possible d'ajuster les conditions de traitement afin d'extraire des organelles telles que les mitochondries. [247]



#### ***1.4.13. La cryopréservation assistée par la pression***

Après un traitement sous hautes pressions de cellules de mammifères, il apparaît qu'elles présentent une plus grande résistance à la cryopréservation. [132] Par exemple, du sperme de taureau soumis à la pression (40 MPa - 90 à 120 min) puis congelé montre une viabilité et une mobilité plus grandes ainsi qu'une fertilité accrue par rapport à celui uniquement congelé. [248] Le nombre de blastocystes de souris et de bovins ainsi que celui d'oocystes de porcs après décongélation est plus élevé lorsque cette dernière est précédée d'un traitement sous hautes pressions.

*L'accroissement de résistance à la congélation pourrait être apportée par la production de protéines de stress suite au traitement hautes pressions, celles-ci jouant le rôle de cryoprotecteurs.* [249-251]

#### ***1.4.14. Les applications en oncologie***

*Les procédés hautes pressions font apparaître des perspectives prometteuses dans le domaine de la cancérologie, avec deux principaux objectifs :*

- le premier visant à *produire des vaccins tumoraux à base de cellules entières,*
- le second, limité à l'orthopédie, concernant la *désinfection de segments osseux présentant une tumeur avant leur réimplantation* (Cf. § I.4.4). [132]

En ce qui concerne le premier objectif, des études ont déjà montré que certaines cellules cancéreuses, telles que les cellules EL-4 retrouvées chez des patients atteints de leucémie, devenaient plus immunogènes après avoir été soumises à un traitement à des pressions modérées (120 à 150 MPa pendant 15 min). Des souris auxquelles ces cellules ont été réinjectées ont développé plus tardivement une tumeur et ont présenté des taux de survie beaucoup plus élevés. [252]

Depuis cette découverte, la mise au point de procédures de production de vaccin à partir de tumeurs soumises à la pression s'est développée. Des cellules tumorales exposées à une pression de 120 MPa en présence d'un agent de réticulation biocompatible (CL), (dialdéhyde 2'-3'-adénosine) a conduit à l'obtention de cellules très immunogènes. En effet, le traitement

utilisé a amélioré leur présentation antigénique, suite au réarrangement des protéines exprimées à la surface des cellules en clusters immunogènes. [253]

Afin d'accroître les propriétés vaccinales des cellules obtenues précédemment, le traitement sous hautes pressions des cellules cancéreuses en présence d'agent de réticulation a été suivi d'une réduction des ponts disulfure présents dans les protéines de surface grâce à la N-acétyl-L-cystéine (NAC). L'association d'une injection de telles cellules au niveau de la tumeur d'une part et l'injection intraveineuse de NAC d'autre part a conduit au développement d'une réponse anti-tumorale, capable d'éradiquer des métastases existantes. [254, 255]

## **I.5. Conclusions générales**

*Les hautes pressions apparaissent donc comme un outil très utile en Biologie, tant au niveau de la recherche fondamentale qu'à celui des applications en Biotechnologies. En effet, en ce qui concerne le premier volet, il a été montré que ce paramètre thermodynamique pouvait améliorer la compréhension de divers mécanismes biologiques, notamment de par sa capacité à séparer les effets thermiques et volumiques et à accéder à de nouveaux états intermédiaires des protéines. De plus, au niveau des applications biotechnologiques, les procédés « hautes pressions » possèdent un fort potentiel de développement dans divers secteurs, en particulier dans les domaines de l'agro-alimentaire et de la Santé (depuis la décontamination de nombreux produits ou biomatériaux jusqu'à la production de nouveaux types de vaccins).*

*Pour de nombreuses applications, les procédés hautes pressions mis en œuvre sont basés sur un équilibre subtil entre les effets visés (par exemple l'inactivation de pathogènes) et la sauvegarde des propriétés spécifiques du produit traité (notamment les propriétés thérapeutiques).*

*Les résultats obtenus ces dernières années dans divers pays laissent présager que le domaine de la Santé sera probablement, en ce début du XXIème siècle, largement bénéficiaire du développement des hautes pressions dans de nombreuses applications.*



## CHAPITRE II : SANG, PLASMA ET TRANSFUSION SANGUINE

### II.1. Historique de la transfusion sanguine

La transfusion sanguine, basée sur le principe simple d'injecter à un receveur du sang prélevé sur un donneur, s'est surtout développée au cours des cent dernières années. En effet, la maîtrise de cet acte a tout d'abord nécessité de comprendre les mécanismes de la circulation sanguine et de la compatibilité entre donneur et receveur. [256]

#### *II.1.1. La naissance de la transfusion sanguine*

La première transfusion connue date de 1492, lorsque le Pape Innocent VIII a été transfusé suite à une crise d'apoplexie qui l'avait plongé dans le coma. Il décédera néanmoins dans les mois qui suivirent. En 1615, Andreas Libavius met au point une technique de transfusion sanguine mais ses travaux sont restés dans l'oubli. [257] En 1628, William Harvey décrit le principe de la circulation du sang et des fonctions du cœur, fondement indispensable au développement de la transfusion. [256-258]

Les premiers essais reportés ont tout d'abord concerné les animaux, avec notamment les travaux de Richard Lower, vers 1666, sur la transfusion entre chiens. Des essais de l'animal à l'Homme ont ensuite été conduits, notamment par Jean-Baptiste Denis (1667) mais cette technique a été interdite par la Société Parisienne des Médecins dès 1678 suite à de nombreux décès. [256, 257] La première transfusion sanguine humaine est attribuée à James Bludell en 1818, qui a utilisé cette technique pour soigner des femmes victimes d'hémorragie post-partum. Ceci marque le début de « l'ère moderne » de la médecine transfusionnelle. [256, 257, 259]

La notion de groupe sanguin n'a été mise en évidence qu'en 1901 par Karl Landsteiner, qui décrit alors trois groupes sanguins qu'il nomme A, B et C (qui deviendront A, B et O à l'avenir). Il reçoit en 1930 le Prix Nobel de Médecine pour ses travaux. En 1902, un quatrième groupe sanguin, le groupe AB, est découvert par A. Decastrello et A. Sturli. [256-258, 260]

Il faut ensuite attendre 1939 et les travaux de Philip Levine pour mettre en évidence une incompatibilité entre donneur et receveur de même groupe sanguin. Il s'agit en fait du système Rhesus qui sera nommé ainsi après la démonstration que l'ajout d'anticorps obtenus après immunisation de lapins ou de cobayes par du sang de singes Rhésus (travaux de Karl Landsteiner et Alex Wiener) à du sang humain conduit à l'agglutination des érythrocytes dans 85 % des cas. [256]

Dans les années qui suivirent, de nombreux antigènes présents à la surface des érythrocytes ont été mis en évidence, donnant naissance à de nouveaux systèmes, tels que le système Kell identifié par Robin Coombs (1946), le système Duffy et le système Kidd. [256]

### ***II.1.2. Les banques de sang***

Le concept de banque du sang n'a pu naître qu'avec le développement d'anticoagulants. En effet, en l'absence de ces derniers, la transfusion sanguine ne pouvait être réalisée que si donneur et receveur se trouvaient à proximité, afin que celle-ci soit réalisée immédiatement après le prélèvement. [256]

En l'absence d'anticoagulant, le sang devenait très rapidement impossible à transfuser. Afin de contrer ce problème, Alexis Carrel a mis au point une technique de transfusion qui consiste à suturer l'artère du donneur à la veine du receveur. Cette méthode, difficile à mettre en œuvre dans le cadre des transfusions, du fait de la nécessité d'avoir un donneur sur place et de la difficulté à évaluer la quantité de sang transfusé, a ouvert la voie aux transplantations d'organes, ce qui lui a valu l'attribution du Prix Nobel en 1912. [256]

En 1915, Robert Lewinshon démontre qu'une concentration non toxique de citrate de sodium (0,2 %) a un pouvoir anticoagulant, mais cette méthode n'est utilisée pour conserver le sang uniquement que quelques heures. [256, 260, 261] Dans les années qui suivirent, des travaux complémentaires ont conduit à la mise au point de nouvelles solutions anticoagulantes, jusqu'à l'adoption du mélange citrate-phosphate-dextrose permettant alors de conserver le sang pendant 28 jours. [256]

Dès 1916, grâce aux anticoagulants, les premiers dons du sang ont pu avoir lieu, notamment à l'initiative d'Oswald Robertson. [257, 262] Puis, en 1926, la Croix Rouge Britannique a mis en place le premier service de transfusion sanguine dans le monde, grâce au travail de Percy L. Oliver. Celui-ci a instauré un système de panel de donneurs qui étaient appelés dès qu'un patient avait besoin d'une telle intervention. [256, 257, 261] Enfin, en

1937, Bernard Fantus met en place la première banque du sang au Cook County Hospital à Chicago (USA), grâce à laquelle le sang prélevé dans des bouteilles en verre pouvait être conservé jusqu'à 10 jours au réfrigérateur. [256]

La seconde guerre mondiale a ensuite été un élément moteur dans le développement des services de transfusion sanguine. A l'automne 1938, à la vue d'une menace de guerre, le Ministère de la Guerre crée l'ABSD (Army Blood Supply Depot) à Bristol (GB) sous le contrôle de Lionel Whitby. Grâce à ce service, l'armée a pu fournir les fronts de bataille avec du sang collecté au niveau d'une Centrale. A la fin de la guerre, un service national de transfusion sanguine (National Blood Transfusion Service) a été mis en place (1946), sous le contrôle du Ministère de la Santé. [256]

En France, l'organisation de la transfusion sanguine a d'abord été définie par la loi de 1952. Suite à l'affaire du sang contaminé dans les années 1980, une nouvelle loi a été votée en 1993 afin de réorganiser tout le système. Après cinq années d'application de cette loi, une révision a conduit à la loi du 1<sup>er</sup> juillet 1998 qui décrit l'organisation de la transfusion sanguine française telle qu'elle est connue aujourd'hui. Celle-ci prévoit que seuls les Etablissements Français du Sang sont autorisés à réaliser la collecte du sang, la qualification biologique des dons, la préparation et la distribution des produits sanguins labiles. En revanche, la préparation des médicaments dérivés du plasma (facteurs de coagulation, immunoglobulines...) est gérée uniquement par le Laboratoire Français du Fractionnement et des Biotechnologies (LFB). [263]

### ***II.1.3. Le fractionnement du plasma***

Avec la guerre, la difficulté de transporter de grandes quantités de sang depuis les centres de collecte vers les zones de bataille a été mise en évidence. C'est ce qui a motivé les recherches pour développer le fractionnement des produits sanguins. En 1940, Edwin Cohn met au point le fractionnement du plasma par addition successive d'éthanol, en modifiant à chaque étape certaines conditions (concentration en sels, température, pH). Il prépare ainsi plusieurs fractions de plasma : la *fraction I* contenant principalement le fibrinogène, les *fractions II et III* renfermant les immunoglobulines, et la *fraction V* constituée d'albumine. Les propriétés osmotiques de l'albumine ont ensuite permis à Isodor Ravdin de soigner de nombreuses victimes de Pearl Harbor en décembre 1941. [256]

Le développement des produits sanguins stables a aussi mené à l'amélioration des conditions de vie des hémophiles, notamment dès 1961, quand les premiers concentrés de facteurs antihémophiliques dérivés du plasma (facteurs de coagulation VIII et IX) ont été préparés. En 1964, le problème de disponibilité de tels produits a été en partie résolu grâce à Judith Pool qui a démontré que la fraction restant insoluble après décongélation à 4°C de plasma congelé contenait du facteur VIII en grande quantité. [256]

#### ***II.1.4. Le risque transfusionnel et les tests de dépistage***

Le risque de contamination du receveur suite à une transfusion sanguine a rapidement été mis en évidence. Ainsi, dès 1867, Joseph Lister a introduit l'utilisation d'antiseptiques pour contrôler l'infection. [257] Par la suite, la protection des transfusés est surtout passée par l'introduction de tests de dépistage qui permettent d'éliminer les dons de sang contaminé par le pathogène testé.

Dès la création du service de transfusion sanguine de la Croix Rouge Britannique, les donneurs étaient soumis à un examen médical et des tests sérologiques étaient réalisés pour déterminer le groupe sanguin et dépister la syphilis. [256] Les Centres de transfusion américains ont introduit différents tests de détection : un de l'antigène de l'hépatite B en 1971, puis un premier pour la présence du virus de l'immunodéficience humaine en 1985. Deux autres, indirects, pour détecter le virus de l'hépatite C ont ensuite été validés en 1987, avant d'être remplacés par un test spécifique en 1990. [257]

## **II.2. Le sang**

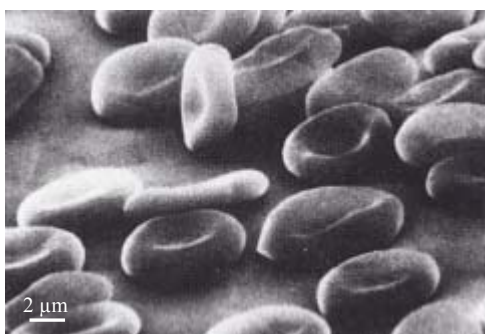
### ***II.2.1. Les principaux constituants du sang***

Chez l'Homme, environ 8 % du poids total du corps est dû au volume sanguin. Ceci correspond à un volume de 5 litres pour un adulte mâle de 70 kg. Le sang est constitué de deux principaux composants, à savoir les éléments figurés (45 %) et le plasma (55 %). Le plasma représente la fraction liquide du sang et sera présenté ultérieurement. [146, 264]

Les éléments figurés du sang comprennent les cellules et des fragments cellulaires. Ils sont répartis en trois groupes : les érythrocytes, les leucocytes et les plaquettes. [146, 265]

### II.2.1.1. Les érythrocytes

Les érythrocytes, autrement appelés globules rouges ou hématies, sont présents dans le sang à une concentration d'environ 5 millions de cellules par millimètre cube. Ce sont de petites cellules anucléées, mesurant 7  $\mu\text{m}$  de diamètre et 2  $\mu\text{m}$  d'épaisseur, et se présentant sous la forme de disques biconcaves (Figure II.1). Etant donné que celles-ci sont dépourvues de noyau, elles sont incapables de se diviser et doivent être renouvelées en permanence, puisque leur durée de vie n'excède pas 120 jours. [146, 265]



**Figure II.1** : Hématies vues au microscope électronique à balayage [146]

Ces cellules sont responsables du transport de l'oxygène par l'intermédiaire d'une liaison au fer présent dans l'hème de l'hémoglobine, principale protéine présente dans le cytoplasme. Sa combinaison avec l'oxygène donne au sang sa couleur rouge. Outre sa fonction de transport de l'oxygène, l'hémoglobine est aussi capable de transporter le dioxyde de carbone depuis les tissus vers les poumons pour que celui-ci soit évacué. [146, 265]

### II.2.1.2. Les leucocytes

Les leucocytes, également appelés globules blancs, sont présents dans le sang à une concentration de 5000 à 10000 cellules par  $\mu\text{L}$ . Ils sont principalement impliqués dans les réponses immunitaires. [146, 265]

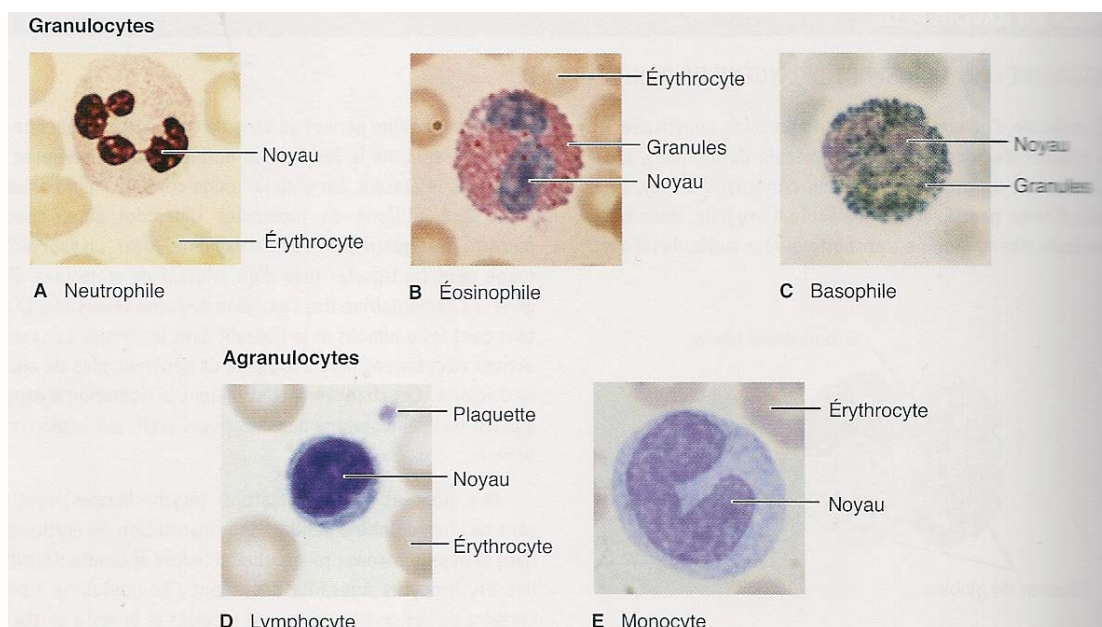
Les globules blancs sont classés en fonction de la taille et de la forme de leur noyau et de l'aspect des granules présents dans le cytoplasme, observés après coloration. (Figure II.2)

- Les lymphocytes, dont le diamètre varie entre 8 et 17  $\mu\text{m}$ , possèdent un noyau arrondi et un cytoplasme pauvre en organites. Ils représentent environ 22 % des globules blancs.



- Les monocytes sont les leucocytes les plus volumineux avec un diamètre de 15 à 25  $\mu\text{m}$ . Ils présentent un noyau courbé et un cytoplasme riche en organites. Ils constituent 10 % des leucocytes.

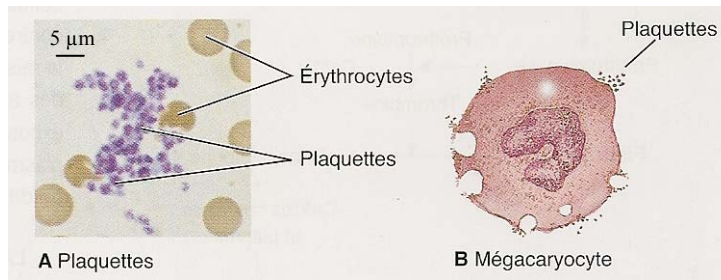
- Les granulocytes ou polynucléaires (15 à 18  $\mu\text{m}$ ) comprennent un noyau très segmenté et un cytoplasme riche en lysosomes. Ils sont sous-classés en fonction du type de colorant qu'ils fixent préférentiellement, à savoir les neutrophiles, les éosinophiles et les basophiles. Les premiers constituent environ 60 % des globules blancs alors que les deux autres sont plus rarement représentés (2 % et 1 % respectivement). [146, 265]



**Figure II.2** : Les différents types de leucocytes [146]

### II.2.1.3. Les plaquettes

Les plaquettes ne sont pas à proprement parlé des cellules mais des fragments de cellules beaucoup plus grosses, les mégacaryocytes, présents dans la moelle osseuse. (Figure II.3) Le sang renferme entre 150000 et 450000 plaquettes par millimètre cube. [146, 265]



**Figure II.3** : Plaquettes (A) Plaquettes dans un frottis sanguin.  
(B) Mégacaryocyte libérant des plaquettes. [146]

Les plaquettes ont une durée de vie de 10 jours maximum. Elles ne contiennent ni noyau ni ADN, mais des enzymes actives et des mitochondries. Elles jouent un rôle important dans la coagulation sanguine. [146, 265]

### ***II.2.2. Usage thérapeutique du sang***

Le sang possède de nombreuses propriétés thérapeutiques et peut être utilisé sous plusieurs formes : d'une part les *produits sanguins labiles*, qui comprennent le concentré de globules rouges déleucocyté, le concentré de plaquettes déleucocyté et le plasma, et d'autre part les *produits sanguins stables*, préparés par fractionnement du plasma. [266]

Les transfusions de globules rouges déleucocytés sont les transfusions les plus fréquentes. Elles sont pratiquées pour corriger un déficit en hématies responsable d'une hypoxie ou d'une anoxie tissulaire. Elles permettent de traiter les anémies, quelle que soit leur origine, médicale, chirurgicale ou obstétricale. [266]

Le concentré de plaquettes déleucocyté est principalement utilisé pour traiter les cas de thrombopénie inférieure à 20000 plaquettes/mm<sup>3</sup>. Celles-ci peuvent survenir, par exemple, après des traitements par chimiothérapie. [266]

## **II.3. Le plasma sanguin et ses contraintes d'utilisation**

### ***II.3.1. Définition du plasma sanguin***

Le plasma sanguin correspond à la partie liquide du sang et constitue environ 55% du volume total de sang. Il est constitué en grande partie d'eau (90%) et de protéines ( $\approx 7\%$ ). Il contient également des sels minéraux (bicarbonate...) et des ions (calcium, cuivre,...), des carbohydrates (glucose, fructose,...), des nucléotides, des vitamines, des hormones, des lipides et triglycérides... [267]

Le plasma sanguin humain peut être obtenu de deux façons différentes :

- soit par *centrifugation d'un don de sang total*,
- soit lors d'un *prélèvement par plasmaphérèse*.

La plasmaphérèse consiste à prélever le sang total d'un donneur par l'intermédiaire d'un équipement qui, par centrifugation, sépare le plasma des autres constituants du sang. Le plasma obtenu est recueilli dans une poche et les cellules sont restituées au donneur. [263]

Après prélèvement, le plasma doit être congelé dans les 8 h afin que les activités des facteurs de coagulation, VIIIc et V notamment, ne se dégradent pas. Après congélation, le plasma frais congelé (PFC) peut être conservé jusqu'à 5 ans si il est stocké à une température d'au moins  $-18^{\circ}\text{C}$ . [268]

#### **II.3.1.1. Les protéines plasmatiques**

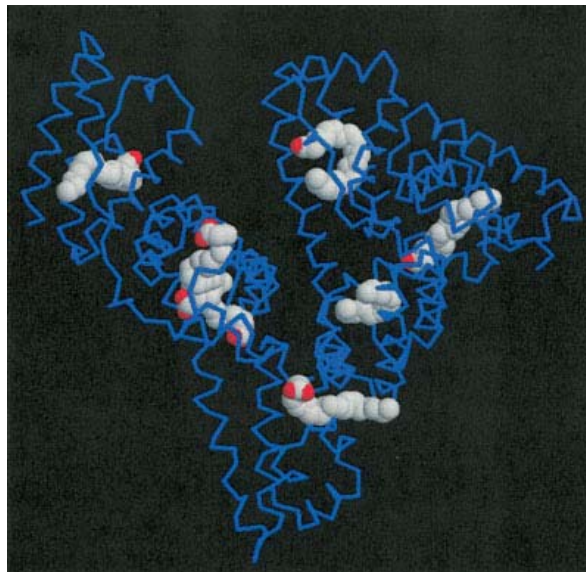
A l'exception de l'eau, les protéines constituent la majeure partie du plasma sanguin. En effet, ce dernier contient plus d'une centaine de protéines qui peuvent être classées en trois principales catégories : l'albumine, les globulines et les fibrinogènes. [269]

- **L'albumine**

L'albumine représente le constituant protéique majeur du plasma sanguin, avec une concentration de 30 à 50  $\text{g.L}^{-1}$ , ce qui correspond à environ 60% des protéines plasmatiques. Elle est synthétisée par le foie sous forme d'une chaîne polypeptidique de 585 acides aminés

et possède un poids moléculaire de 66 kDa. C'est une protéine non glycosylée et chargée négativement. [270, 271] (Figure II.4)

Grâce à sa fonction thiol libre, l'albumine est capable de se lier à de nombreux ligands, tels que des acides gras, des ions métalliques... Cette protéine est responsable de 80% du pouvoir oncotique du plasma. En effet, il est estimé que chaque gramme d'albumine permet de retenir 18 mL d'eau. Elle possède également une fonction antioxydante et des propriétés de transport. [263, 270, 271]

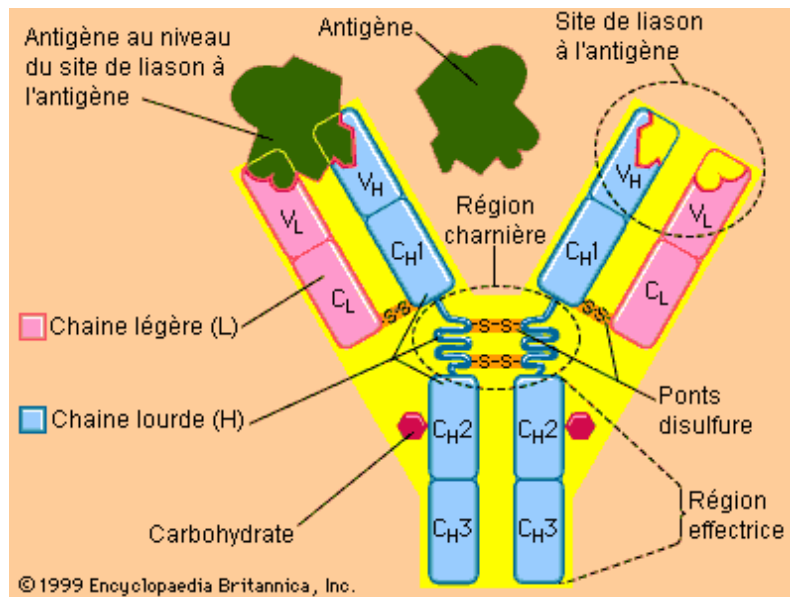


**Figure II.4 :** Structure de l'albumine, montrant la liaison avec 7 molécules d'acide arachidonique.

*Illustration extraite de la base de données RCSB – PDB ID gnj par D. S. Goodsell. [271]*

- **Les globulines**

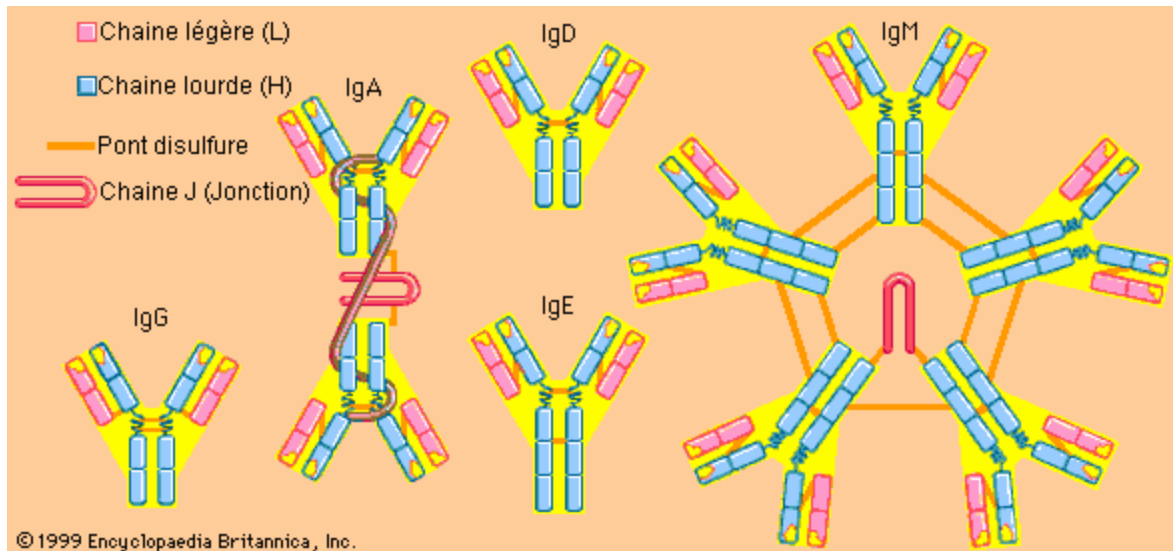
Il s'agit principalement des immunoglobulines (Ig) ou anticorps (Ac). Ces protéines représentent 20% des protéines plasmatiques, avec une concentration comprise entre 12 et 15 g.L<sup>-1</sup>. Leur structure de base est composée de quatre chaînes polypeptidiques, deux lourdes (≈ 53-75 kDa) et deux légères (≈ 23 kDa), maintenues entre elles par des ponts disulfure. Chaque chaîne légère est composée d'une région variable et d'une région constante tandis que chaque chaîne lourde contient une région variable et trois régions constantes. L'association des régions variables d'une chaîne lourde et d'une chaîne légère constitue le site de liaison à l'antigène ou paratope. [267, 272] (Figure II.5)



**Figure II.5** : Structure générale d'une immunoglobuline. D'après [272]

Les immunoglobulines sont divisées en cinq classes : les IgG, les IgA, les IgM, les IgE et les IgD. (Figure II.6)

- Les IgG sont les anticorps les plus répandus et se présentent sous la forme classique d'une immunoglobuline, à savoir deux chaînes lourdes et deux chaînes légères.
  - Les IgM sont les premiers anticorps synthétisés par les lymphocytes B matures et constituent la forme majeure d'immunoglobulines présentes à la surface de ces cellules. Quand elles sont excrétées, les IgM s'associent en pentamère.
  - Les IgA sont la forme d'anticorps majoritairement présents dans les sécrétions tels que les larmes, la salive... Elles sont souvent associées deux par deux. Leur concentration est très faible dans le plasma.
  - Les IgD sont présentes à la surface de la plupart des lymphocytes B, mais sont rarement libérées dans la circulation.
  - Les IgE sont présentes dans le sang à très faible concentration. Elles ont une structure proche des IgG, à l'exception d'un domaine constant supplémentaire sur chaque chaîne lourde. Elles sont impliquées dans les réactions allergiques.
- [267, 272]



**Figure II.6 :** Structure générale des cinq classes d'immunoglobulines. D'après [272]

- **Les protéines de la cascade de coagulation**

La concentration de chacune de ces protéines varie entre  $1 \mu\text{g}$  à  $1 \text{ng.mL}^{-1}$ . Elles sont généralement synthétisées sous forme de zymogènes et nécessitent une étape d'activation pour être fonctionnelles. [267]

La coagulation sanguine fait principalement intervenir les protéines suivantes : le fibrinogène (facteur I), la prothrombine (facteur II), le facteur V, le facteur VII, le facteur VIII (facteur anti-hémophilique A), le facteur IX (facteur anti-hémophilique B), le facteur X, le facteur XI, le facteur XII, le facteur XIII (facteur stabilisant la fibrine), la prékallikréine, le kininogène de haut poids moléculaire. [267]

Le système de la coagulation sanguine agit en collaboration avec les plaquettes dès qu'un vaisseau sanguin est endommagé. Cela se traduit par la formation d'un caillot composé d'un réseau de plaquettes agrégées et de fibrine. La cascade de coagulation est initiée par la formation d'un complexe entre le facteur VII et un facteur tissulaire (TF) qui est une protéine membranaire spécifique des cellules de la paroi des vaisseaux sanguins. A l'issue de la cascade de coagulation, le fibrinogène, en présence de thrombine, de facteur XIII activé et d'ions calcium, est transformée en fibrine qui s'organise en réseau stable, formant ainsi un caillot. [263, 267, 273] (Figure II.7)

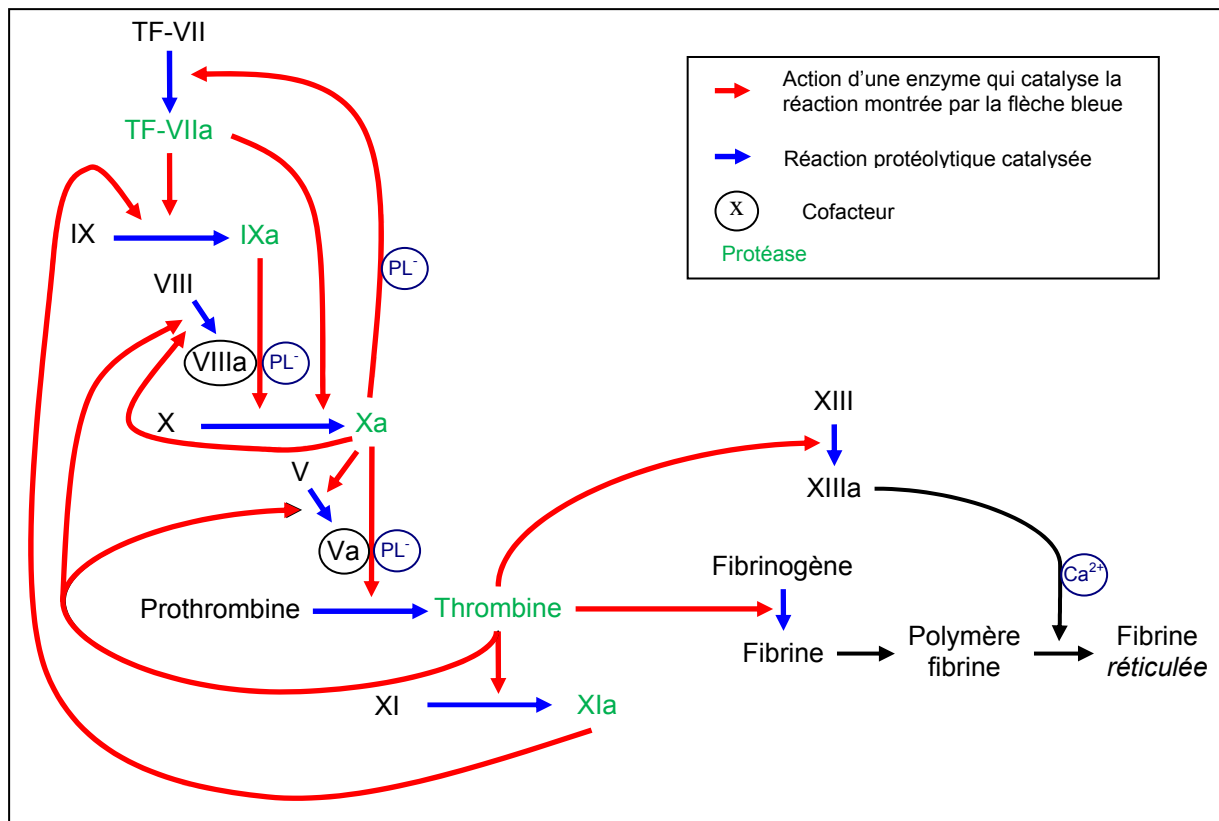


Figure II.7 : Cascade de coagulation. D'après [273]

### II.3.1.2. Indications thérapeutiques du plasma sanguin

Le plasma sanguin humain peut être utilisé sous deux formes : sous sa forme liquide initiale : le plasma frais congelé (PFC), ou sous forme de concentrés de protéines thérapeutiques. En France, les médicaments dérivés du sang sont préparés uniquement par le Laboratoire français du Fractionnement et des Biotechnologies (LFB). Il s'agit principalement d'albumine, de facteurs de coagulation ou d'immunoglobulines purifiés. [263, 268]

Le PFC est utilisé dans trois principaux cas :

- les *coagulopathies graves*, au cours desquels tous les facteurs de coagulation s'effondrent,
- les *hémorragies aiguës* présentant un déficit global des facteurs de coagulation,
- les *déficits rares en facteurs de coagulation*, pour lesquels les concentrés de facteur purifié n'existent pas, tels que les facteurs de coagulation II, V, X... [263, 268, 270]

### II.3.1.3. La réglementation concernant le Plasma Frais Congelé

En France, le plasma frais congelé doit répondre aux normes de qualité suivantes :

- un pH compris entre 6,5 et 7,6,
  - une osmolalité d'au moins  $240 \text{ mosmol.kg}^{-1}$ ,
  - une concentration en protéines supérieure ou égale à  $45 \text{ g.L}^{-1}$ ,
  - un temps de coagulation minimum de 150 s,
  - une concentration en anticorps contre le virus de l'hépatite A d'au moins  $2 \text{ UI.mL}^{-1}$ ,
  - une recherche d'anticorps anti-érythrocytaires irréguliers négative,
  - une concentration en citrate inférieure à  $25 \text{ mmol.L}^{-1}$ ,
  - une concentration en calcium au maximum de  $5,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ ,
  - une concentration maximale en potassium de  $5,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ ,
  - une concentration en potassium n'excédant pas  $5,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ ,
  - une concentration en sodium de  $2,00 \times 10^2 \text{ mmol.L}^{-1}$ ,
  - être stérile,
  - une recherche de pyrogènes négatives,
  - une activité en facteur de coagulation VIIIc (FVIIIc) au moins égale à  $0,7 \text{ UI.mL}^{-1}$ ,
  - une activité des facteurs de coagulation V et XI (FV et FXI) d'au moins  $0,5 \text{ UI.mL}^{-1}$ .
- [270, 274]

Les PFC sont conditionnés en poche de 200 mL et peuvent être conservés pendant une année à  $-30^{\circ}\text{C}$ . [270]

### ***II.3.2. Le risque transfusionnel***

Comme pour toute transfusion, de par l'origine humaine du produit, celle de plasma sanguin présente un risque de transmission d'agents bactériens, parasitaires, viraux, du donneur vers le receveur. [263]

Le principal risque transfusionnel provient d'agents viraux. Il s'agit en particulier :

- du *virus de l'hépatite A* (VHA), pour lequel la transmission par transfusion reste exceptionnelle,
- du *parvovirus B19*, dont la prévalence est de l'ordre de 1 don sur 5000,



- du *virus de l'hépatite B* (VHB), qui présente un risque transfusionnel de 1 don sur 1.000.000,
- du *virus de l'hépatite C* (VHC), avec un risque de 1 sur 12.500.000 dons,
- du *virus de l'immunodéficience humaine* (VIH), présentant un risque transfusionnel de 1 don sur 2.950.000. [263, 275]

En ce qui concerne le risque bactérien, il provient principalement des bactéries commensales normales de la peau, des bactéries de l'environnement aérien ou de surface et de celles présentes dans le flux circulatoire du donneur. En France, en 2007, neuf incidents transfusionnels par contamination bactérienne sont été reportés (tous produits sanguins confondus). [275]

Le risque parasitaire peut provenir d'agents tels que *Plasmodium falciparum* (paludisme)... En Amérique du Sud, le risque de transmission de la maladie de Chagas (*Trypanosoma cruzi*) est également présent et demeure un problème important. [270]

Depuis la publication au Royaume Uni de trois cas de patients décédés de la vMCJ suite à la transfusion de concentrés de globules rouges non déleucocytés provenant de donneurs ayant développé la maladie plusieurs années après leur don, le risque de transmission interhumaine du prion par les produits sanguins labiles ne peut plus être écarté. En effet, la protéine prion pathologique présente en majorité dans le système nerveux central peut également être retrouvée en plus faible quantité dans les tissus lymphoïdes. Ces derniers étant en contact immédiat avec le sang, le risque d'une contamination sanguine est devenu une priorité pour les autorités sanitaires. [201, 202]

### ***II.3.3. Méthodes de sécurisation du plasma sanguin***

Les méthodes de sécurisation du plasma sanguin peuvent être de deux types : soit elles font appel à des *contrôles*, soit elles mettent en place des *procédés d'inactivation des agents pathogènes* susceptibles de contaminer le produit. Le plus souvent, la sécurité transfusionnelle est assurée par le cumul de plusieurs de ces méthodes.

### II.3.3.1. Méthodes de contrôle du plasma sanguin

Des contrôles du plasma sanguin sont effectués en amont et en aval du don. En effet, avant chaque don, une sélection médicale des donneurs est réalisée, par l'intermédiaire d'un entretien, avec un examen général et une mesure de la pression artérielle. A l'issue du don, chaque poche de plasma subit des contrôles biologiques obligatoires. Ceux-ci consistent en de nombreux dosages et dépistages, conduisant à l'élimination de toute poche présentant des résultats non conformes... [263, 275]

Les poches de plasma peuvent être sécurisées par quarantaine. Dans ce cas, les tests de dépistage sont confirmés à l'issue d'une période suffisamment longue pour couvrir la fenêtre sérologique silencieuse précédant la séroconversion. [263]

### II.3.3.2. Procédés d'inactivation des agents pathogènes

Il existe désormais plusieurs procédés d'inactivation du plasma sanguin, ayant pour objectif de diminuer en grande partie le risque de transmission d'agents pathogènes. En effet, il n'est pas envisageable de développer un système de détection de tous les pathogènes émergents. De plus, il est nécessaire de prévenir au maximum le risque posé par d'éventuels pathogènes qui n'ont pas encore été mis en évidence et qui pourraient être identifiés dans les années à venir. [275]

Tous ces procédés font appel à l'ajout d'un ou plusieurs produits chimiques dans le plasma. Il s'agit notamment de la pasteurisation, de la méthode solvant-détergent et des procédés photochimiques. [263] Dans tous les cas, il est nécessaire de limiter les effets secondaires que pourraient entraîner l'injection de l'agent inactivant chez le receveur. Pour cela, des étapes d'élimination ou de transformation en produit(s) secondaire(s) inoffensif(s) de cet agent inactivant doivent être ajoutées afin de limiter les risques de toxicité. [275]

- **La Pasteurisation**

La pasteurisation est une technique d'inactivation virale nécessitant au préalable un poolage de plasma issu de 100 dons. Afin de réunir la quantité de poches nécessaires, le plasma est donc congelé dans l'attente du traitement et doit être décongelé au début du traitement. La pasteurisation consiste à chauffer le plasma pendant 10 heures à 60°C après

ajout de stabilisateurs de protéines. Ces stabilisateurs sont majoritairement des sucres ou des acides aminés tels que :

- le sorbitol, qui limite la formation d'agrégats protéiques et stabilise de nombreux facteurs de coagulation (FVIII, FV, FXI...),
- le saccharose, dont l'action complète celle du sorbitol,
- le gluconate de calcium, qui possède un effet stabilisateur vis-à-vis de facteurs de coagulation,
- la lysine, qui limite les pertes d'activités du FVIII et du fibrinogène,
- l'arginine, qui stabilise les facteurs de coagulation et certains anticoagulants (protéine C).

A l'issue de la pasteurisation, les différents stabilisateurs ajoutés doivent être éliminés par dialyse. Pour finir, le plasma est réparti en poches de 200 mL, puis congelé et stocké à -30°C. Le risque bactérien est quant à lui éliminé par une étape ultérieure de filtration à 0,22 µm. Il a été démontré que l'ensemble de ce procédé est peu dénaturant vis-à-vis des protéines plasmatiques. [275]

- **Le procédé Solvant-Détergent**

Ce procédé, le plus couramment utilisé à ce jour, fait appel à l'ajout d'un solvant organique, le tri-*n*-butyl-phosphate (TNBP) et d'un détergent, le Tween 80 ou le Triton X100. L'ajout des produits chimiques se fait après le pooling de poches de plasma de même groupe sanguin issues de 100 donneurs différents. Ces poches de plasma étaient préalablement congelées et doivent donc être décongelées avant le début du traitement. Après ajout du solvant et du détergent, les produits sont laissés en contact avec le plasma pendant 4 heures. Les molécules chimiques ajoutées sont ensuite éliminées par addition d'huile de ricin suivie d'une chromatographie, et elles sont alors à l'état de traces voire non décelables. Enfin, trois filtrations, dont une stérilisante (0,22 µm) sont intercalées au cours du processus. A la fin du traitement, le plasma est échantillonné en poches de 200 mL qui sont congelées puis stockées à -30°C. L'ensemble de ce processus comprend donc de nombreuses étapes et nécessite une dizaine d'heures. [268, 275, 276]

Pour le plasma de groupe sanguin O, il faut rajouter une étape préalable d'ultrafiltration afin de le concentrer et aboutir, à la fin du procédé, à une concentration finale en FVIII d'au moins 0,7 UI.mL<sup>-1</sup>. [275]

Le procédé solvant-détergent agit principalement sur les membranes lipidiques. Par conséquent, il est efficace sur les virus enveloppés tels que le VIH, le VHB ou le VHC

(réduction supérieure à 6 log) mais n'inactive pas les virus nus (VHA, B19). En revanche, il a été démontré que l'ensemble des étapes du processus (poolage, chromatographie, filtration...) permet de diminuer le risque transfusionnel de tels virus. De plus, l'étape de filtration à 0,22 µm assure l'élimination des bactéries. Enfin, grâce aux étapes de filtration et d'élimination du solvant et du détergent, il a été montré que la protéine prion PrP<sup>res</sup> est réduite de 2,5 log. [263, 268, 275, 276] L'activité des facteurs de coagulation est diminuée de 10 à 20 %, celle de l'α2-antiplasmine de 70 % et celle de la protéine S de 14 à 37 %. [276]

Le procédé solvant-détergent décrit ci-dessus est utilisé depuis plus de 15 années, avec plus de 5 millions d'unités transfusées en Europe. Depuis 1992, l'Etablissement Français du Sang Aquitaine-Limousin est équipée d'une unité de production de plasma viro-atténué par solvant-détergent et fournit en France ce produit. [275, 276]

- **Les méthodes photochimiques**

Ces méthodes nécessitent l'addition d'une molécule photosensible à la poche de plasma suivie d'une illumination à une longueur d'onde choisie en fonction du type de molécule ajoutée. Dans tous les cas, l'application du rayonnement entraîne la transformation de la molécule photosensible en un photo-produit agissant sur les acides nucléiques des pathogènes. [268, 275]

Il existe plusieurs combinaisons possibles de molécules photosensibles et de rayonnements lumineux, telles que :

- *la conjugaison d'un psoralène et d'une lumière ultraviolet (UV), telle que l'amotosalen et les UVA (méthode Intercept<sup>TM</sup>). L'amotosalen s'intercale dans les acides nucléiques simple ou double brin(s). Il se fixe également sur les lipides et les protéines, à raison de 15% de la quantité initiale d'amotosalen. Après illumination par les UVA, les molécules photo-activées se lient de façon covalente aux bases pyrimidiques, ce qui provoque de nombreuses liaisons covalentes entre les brins d'acides nucléiques. Les photo-produits et l'amotosalen résiduel doivent ensuite être éliminés par une phase d'adsorption longue (4 à 6 heures), à l'issue de laquelle ils sont retrouvés en faible quantité. Les effets mutagènes de ces résidus sont peu probables mais ne peuvent être exclus. L'ensemble du procédé est efficace sur les virus enveloppés (4-6 log de réduction) et certains non enveloppés, les parasites, les bactéries (3 log).*

L'activité des facteurs de coagulation I, V, VII, VIII et X est diminuée de 17 à 30 %. La phase clinique III de ce procédé a été validée, et a montré une possibilité d'augmentation de la fréquence d'urticaires. En Europe, les plasmas préparés par cette méthode bénéficient d'une norme CE. Aux Etats-Unis, en revanche, ils ne sont acceptés qu'en essais cliniques. En France, cette méthode est actuellement utilisée par l'EFS Alsace. [275, 276]

- *la conjugaison d'une phénothiazine, telle que le bleu de méthylène, et d'une lumière lumineuse (méthode MBLT).* Cette méthode inhibe la réplication et la transcription de l'ADN et/ou l'ARN viral en entraînant la dénaturation irréversible des acides nucléiques et de certaines protéines. Le bleu de méthylène doit ensuite être éliminé par filtration, permettant d'obtenir des concentrations très faibles en bleu de méthylène et photo-produits. Les effets mutagènes de ces résidus sont improbables mais ne peuvent être exclus. Cette méthode n'est pas efficace sur les bactéries, mais a démontré son action sur les virus enveloppés (4-6 log) et quelques virus nus. L'activité du facteur I est diminuée de 23-39 %, et celle des facteurs V, VIII, IX et XI de 4 à 32 %. Le procédé MBLT est utilisé depuis plus de 10 ans et présente de bons rapports cliniques. Cette technique est actuellement mise en place dans 8 EFS. [275, 276]

- *la conjugaison d'une vitamine, telle que la riboflavine, et d'une lumière UV.* Il s'agit notamment du procédé Mirasol™. La riboflavine est également un agent intercalant des acides nucléiques. Etant donné la grande quantité de photo-produits induits par le rayonnement UV, des études sont nécessaires pour évaluer leur niveau de toxicité, même si de tels produits sont fréquemment retrouvés dans les aliments et dans le sang. Par conséquent, dans le schéma actuel, aucune étape d'élimination des produits activés n'est ajoutée. Cette méthode a démontré son efficacité sur les bactéries (2-3 log de réduction), les virus enveloppés (4-6 log) et certains virus non enveloppés (efficacité variable) et les parasites. L'effet sur les facteurs de coagulation est comparable à celui du procédé Intercept™. A l'heure actuelle, ce procédé a passé avec succès la phase II des essais cliniques, mais n'est pas encore accepté sur le marché. [275, 276]

Ces méthodes se déroulent en général selon le même schéma global :

- dans une première étape, du plasma est prélevé par aphérèse,
- la molécule photosensible est ensuite ajoutée dans chaque poche de plasma (traitement unitaire),
- les poches sont illuminées afin que la molécule photosensible agisse,
- l'agent inactivant ajouté (si potentiellement toxique) est ensuite éliminé, soit par filtration (bleu de méthylène), soit par adsorption (amotosalen),
- pour finir, le plasma est congelé puis stocké à -30°C.

### II.3.3.3. Analyse critique des divers procédés de viro-atténuation

Les procédés d'inactivation actuellement mis en œuvre pour la sécurisation du plasma sanguin humain décrits précédemment présentent de nombreux inconvénients.

Tout d'abord, tous font appel à l'ajout de produits chimiques dans le plasma sanguin. Même si l'étape d'inactivation est suivie d'une étape d'élimination de l'agent inactivant, cette dernière étape ne garantit jamais une élimination complète de ce produit. Le problème d'une toxicité à long terme, par effets cumulatifs, notamment pour les patients dont les besoins en plasma sont réguliers, reste donc toujours posée. De plus, le fait d'ajouter des étapes supplémentaires alourdit et allonge le processus.

Les procédés actuels d'inactivation sont inefficaces sur les agents non conventionnels tels que le prion. [275] Seule une chromatographie d'affinité a été mise au point par la société Octapharma, et permettrait d'éliminer environ 5,8 log de doses infectieuses / ml de gel. De plus, du fait de l'émergence continue de nouveaux pathogènes, il est préférable d'avoir à disposition plusieurs procédés d'inactivation dont certains pourront démontrer par la suite leur efficacité sur ces agents infectieux.

Pour finir, il n'existe actuellement aucun procédé d'inactivation permettant un traitement unitaire de poches de plasma congelées. En effet, les procédés unitaires (procédés photochimiques) doivent être mis en place rapidement après le prélèvement de plasma. Quant à ceux permettant de stocker le plasma à -30°C avant de le traiter, ils nécessitent par la suite une décongélation et un poolage des dons. Ce dernier peut constituer une source d'augmentation du risque de transmission d'agents pathogènes si une poche contaminée est présente parmi les poches mélangées.

Par conséquent, la mise au point d'un nouveau procédé, faisant appel à un paramètre physique, pourrait répondre aux problèmes évoqués ci-dessus.

Parmi les divers procédés basés sur un traitement « physique » du plasma, celui faisant appel à la pression pouvait apparaître prometteur du fait, d'une part, de la faible énergie véhiculée par l'application de ce paramètre thermodynamique (susceptible de limiter l'altération de l'activité des protéines plasmatiques), et d'autre part, des effets inactivants sur un grand nombre de pathogènes.

En effet, les traitements d'inactivation par hautes pressions sont des procédés physiques, ne nécessitant pas l'ajout d'autres produits chimiques. De plus, ils sont généralement de courte durée (ne dépassant couramment pas une trentaine de minutes). Enfin, dans le cas particulier du plasma, il est envisageable de traiter les poches de façon unitaire et congelées. Le plasma étant majoritairement composé d'eau, il est possible de traiter sous pression les poches en phase liquide à température négative (l'eau restant liquide jusqu'à -20°C à 200 MPa).

#### ***II.3.4. Les premiers essais de traitement hautes pressions du plasma sanguin***

Le procédé optimal de sécurisation du plasma serait celui qui pourrait être réalisé en une seule étape, sans ajouts de produits extérieurs (donc par une méthode physique) avec des temps de manipulation courts et un bon rendement (en termes de sécurisation : l'inactivation de l'ensemble des agents pathogènes connus et émergents et en termes thérapeutiques : le maintien de l'activité des protéines plasmatiques). Il aurait un coût faible, et permettrait d'aboutir un à bon rapport sécurité/efficacité. De plus, il devrait avoir peu d'impact négatif sur l'environnement, notamment en termes de production de déchets. [276]

Dans cet objectif, quelques groupes de recherche se sont intéressés à la sécurisation du plasma sanguin par un procédé hautes pressions. En effet, la mise en œuvre de celui-ci permettrait de répondre à la plupart des critères précédemment cités.

Ainsi, Shigesha et al. [277] ont démontré que le VIH était inactivé après un traitement à 350 MPa pendant 10 min à température ambiante (> 5 log). En revanche ces essais ont été réalisés dans une solution contenant du sérum de veau fœtal (10%) et non dans du plasma sanguin. En parallèle, ils ont évalué l'effet des hautes pressions sur plusieurs protéines

plasmatiques, telles que les immunoglobulines, la thrombine, l'antithrombine, le facteur IX et le facteur VIII. Toutes ces protéines conservaient leur activité, à l'exception du FVIII.

Bradley et al. [278], quant à eux, ont étudié l'effet des hautes pressions sur une suspension de phage  $\lambda$  dans du plasma sanguin. Après 20 cycles de 2 min à  $-5^{\circ}\text{C}$ , le titre en phage lambda est diminué de 4,2 log à 275 MPa et 6,9 log à 345 MPa. En parallèle, après 10 cycles de 1 min à des pressions allant jusqu'à 345 MPa et 1 min à pression ambiante, les mesures d'activité Immunoglobuline G anti-CMV, Immunoglobuline M anti-CMV et facteur X montrent que ces protéines sont peu affectées par le traitement HP.

Enfin, Matser et al [279] ont traité du plasma sanguin humain à une pression comprise entre 300 et 450 MPa, avec une température initiale de  $-10^{\circ}\text{C}$ , une vitesse de compression de  $8,33 \text{ MPa}\cdot\text{s}^{-1}$  et une décompression en 10s. La température de traitement était alors comprise entre  $6^{\circ}\text{C}$  (300 MPa) et  $9-19^{\circ}\text{C}$  (450MPa). A 300 MPa, quelle que soit la durée de traitement (90s, 120s,  $3\times 20\text{s}$ ), il a été montré que le facteur VIII perd entre 30 et 35% de son activité. *Les auteurs concluent alors que de par la perte importante des propriétés fonctionnelles, notamment de l'activité du facteur de coagulation VIII, un procédé hautes pressions de sécurisation du plasma sanguin serait peu approprié.*

En parallèle, plusieurs brevets américains ont été déposés. Ceux-ci présentent la potentialité des traitements hautes pressions pour la décontamination de nombreux produits biologiques, y compris le plasma sanguin humain. Dans les exemples exposés dans ces brevets, les traitements hautes pressions peuvent être associés à une température négative et à un mode d'application cyclique. Les inventeurs démontrent alors que dans certaines conditions, il est possible d'inactiver certains pathogènes tels que des bactéries (*S. aureus*, *P. aeruginosa*...), des virus (phage  $\lambda$ , virus MS2...). Ils décrivent également qu'il est possible de conserver la plupart des propriétés thérapeutiques du plasma. *Néanmoins, aucun des exemples ne permet de définir un procédé global, où l'application d'un traitement hautes pressions et de ses paramètres associés conduit à la fois à l'inactivation des agents pathogènes et à la préservation des propriétés thérapeutiques du plasma sanguin humain.* [280-282]



#### **II.4. Objectifs du travail de thèse**

*Sur la base de ces premières analyses (tant sur les méthodes de viro-atténuation du plasma actuellement existantes que les premières tentatives menées avec le paramètre pression), et compte tenu de l'expérience du Centre de Ressources Hautes Pressions (ICMCB – Bordeaux) dans le domaine des hautes pressions, l'objectif était d'évaluer l'impact d'autres paramètres (vitesse d'application, mode d'application, température, durée) pouvant être associés au barème de pression.*

*Le plasma sanguin humain, de par sa complexité (en termes de protéines) et l'absence de corps cellulaires (très sensibles à la pression), représentait un bon modèle d'étude. La recherche d'un procédé « hautes pressions » de sécurisation d'un tel produit, alliant d'une part l'inactivation de l'ensemble des agents pathogènes susceptibles de le contaminer et d'autre part la sauvegarde de ses propriétés thérapeutiques, constituait alors un défi difficile.*

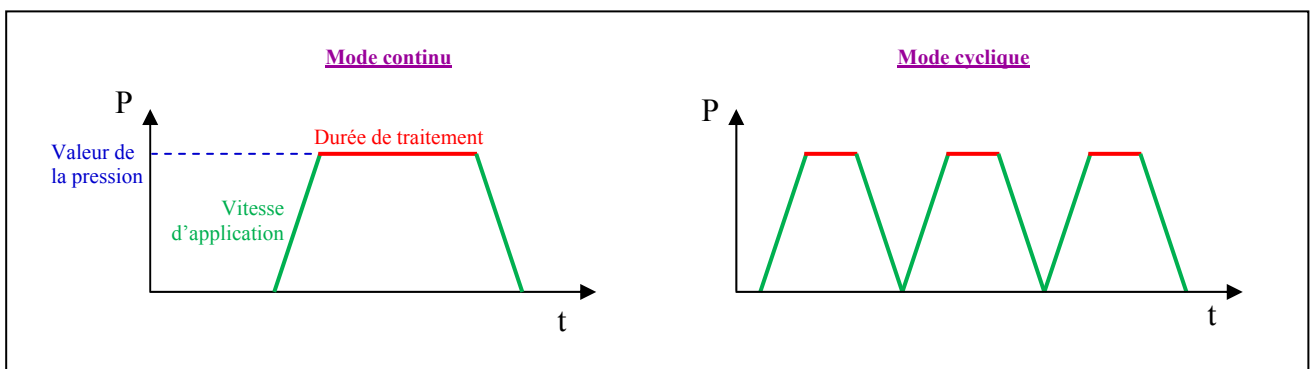
## CHAPITRE III : MATERIEL ET METHODES

### III.1. Traitements Hautes Pressions

L'ensemble des expériences hautes pressions a été réalisé sur trois types de dispositifs différents, mis en place au Centre de Ressources Hautes Pressions. Le choix de l'équipement utilisé se fait en fonction des paramètres associés au traitement et du volume de l'échantillon à traiter.

#### III.1.1. *Les paramètres caractéristiques du traitement hautes pressions*

Chaque traitement Hautes Pressions est défini selon cinq paramètres, à savoir la *valeur de la pression*, la *vitesse d'application de la pression*, le *mode d'application de la pression*, la *durée de traitement*, et la *température*. (Figure III.1)



**Figure III.1:** Schéma des différents paramètres associés au traitement Hautes Pressions

- La *valeur de la pression* (P) est équivalente au niveau de pression auquel le traitement hautes pressions est réalisé. Celle-ci est exprimée en MégaPascal (MPa) ou en bar.
- La *vitesse d'application de la pression* (VA) correspond au temps nécessaire pour atteindre le palier auquel se fait le traitement hautes pressions et est exprimée en  $\text{MPa}\cdot\text{s}^{-1}$ .
- Le *mode d'application de la pression* (MA) représente la façon dont cette dernière est appliquée, c'est-à-dire soit en continu, soit de manière cyclique. En mode continu, l'échantillon est comprimé jusqu'à la pression souhaitée, maintenu à cette pression

pendant une durée de traitement  $t$ , et enfin ramené à pression ambiante. Dans le cas d'une application cyclique, chaque enchaînement (correspondant à un cycle) compression / maintien de la pression / décompression peut être répété plusieurs fois. Par exemple, pour un traitement de 10 minutes, celui-ci peut être réalisé en mode continu, et dans ce cas la pression est maintenue pendant 10 min avant retour à pression ambiante ; ou en mode cyclique, et dans ce cas le traitement peut être divisé en  $n$  cycles, la pression étant maintenue pendant  $10/n$  min pour chaque cycle (par exemple 5 cycles de 2 min).

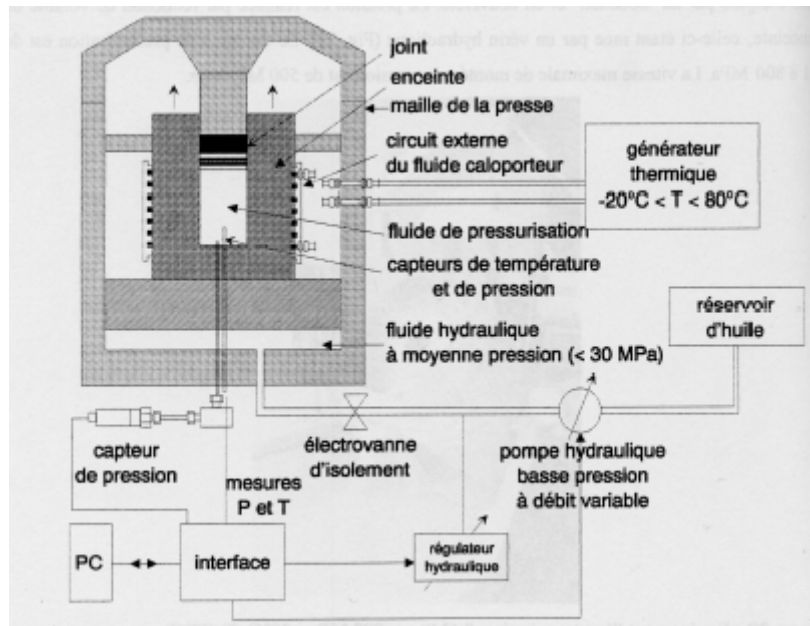
- La *durée de traitement* ( $t$ ) est définie comme le temps de maintien de la pression une fois la pression souhaitée atteinte.

- La *température* ( $T$ ) à laquelle le traitement hautes pressions est appliqué peut être fixée, et choisie en fonction de l'équipement utilisé et des objectifs visés.

### ***III.1.2. Dispositif à compression directe***

#### **III.1.2.1. Principe**

L'équipement utilisant un système de compression directe a été mis au point en collaboration avec les sociétés NFM-Technologies, FRAMATOME et la société CLEXTRAL. Son principe repose sur la poussée d'un vérin hydraulique (de surface  $S_1$ ), promu par une pompe hydraulique, qui entraîne alors la montée de l'enceinte « hautes pressions » de surface interne  $S_2$  le long d'un piston fixe. Ainsi, le volume de l'enceinte d'expérience se réduit, ce qui conduit à une augmentation de la pression interne. De manière approximative (en ne tenant pas compte des frottements), sa valeur est égale à la pression délivrée par la pompe hydraulique multipliée par le rapport entre les surfaces  $S_1$  et  $S_2$ , à savoir  $\frac{S_1}{S_2} \approx 23$ . (Figure III.2)



**Figure III.2** : Schéma du principe de l'équipement Framatome

Cet équipement est constitué de quatre parties principales (Figure III.3) :

- une plateforme sur laquelle repose l'enceinte réactionnelle de 3 litres de volume utile,
- un générateur basses pressions (pompe hydraulique), produisant des pressions jusqu'à environ 300 MPa,
- un système de contrôle-commande et d'acquisition du signal, géré par une interface informatique,
- un générateur thermique, permettant de refroidir ou chauffer l'enceinte réactionnelle entre  $-20^{\circ}\text{C}$  et  $+80^{\circ}\text{C}$ .



**Figure III.3:** Vue générale de l'équipement Framatome

L'équipement Framatome illustré sur la figure III.3 permet d'atteindre une pression de 800 MPa et de réaliser des traitements en mode continu ou en mode cyclique. Il est capable de monter en pression à une vitesse maximale de  $8,33 \text{ MPa}\cdot\text{s}^{-1}$ . Enfin, grâce au générateur thermique, l'enceinte réactionnelle peut être refroidie ou chauffée entre  $-20^\circ\text{C}$  et  $+80^\circ\text{C}$ . Afin de pouvoir appliquer les hautes pressions à température négative, le fluide transmetteur de pression est un mélange éthylène glycol / eau ( $T_{\text{fusion}} \approx -30^\circ\text{C}$ ) afin d'éviter toute transition vers une phase solide à la décompression.

#### III.1.2.2. Fonctionnement

Avant tout traitement Hautes Pressions, il est nécessaire, afin d'éviter toute contamination ultérieure, de mettre le produit à traiter dans un emballage étanche et résistant à la pression, dans les conditions de température de travail.

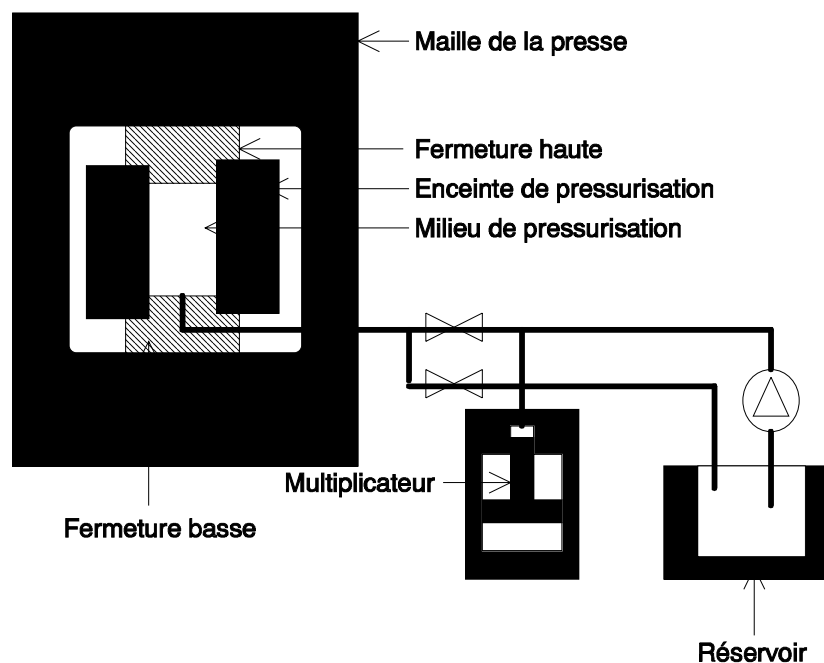
Une fois l'échantillon préparé, celui-ci est placé au sein de l'enceinte d'expérience de l'équipement FRAMATOME. Le niveau du fluide transmetteur de pression est vérifié à l'aide d'une jauge puis le piston est placé en haut de l'enceinte réactionnelle. L'évent est ensuite vissé dans le piston, puis le couvercle descendu afin d'éliminer l'air résiduel et le trop plein de fluide de compression. Après remontée du couvercle, l'évent est retiré puis l'enceinte à nouveau fermée. Les différents paramètres du traitement hautes pressions (vitesse

d'application, valeur de la pression, durée du traitement...) sont saisis sur l'ordinateur avant la mise en route. Une fois le traitement fini, le dispositif est ouvert, et le piston est extrait à l'aide d'un dispositif utilisant le principe du « tire-bouchon ». Pour finir, les échantillons préemballés sont récupérés afin d'être analysés.

### ***III.1.3. Dispositif à compression indirecte***

#### **III.1.3.1. Principe**

L'équipement à compression indirecte utilisé au Centre de Ressources Hautes Pressions a été conçue et assemblée dès 1992 par le Groupe de recherche « Matériaux et Hautes Pressions ». Pour un tel dispositif, le fluide transmetteur de pression est directement injecté par une pompe hydraulique dans une enceinte d'expérience fermée et étanche. Le volume de l'enceinte ne change pas mais le fait d'introduire du liquide supplémentaire provoque une augmentation de la pression au sein de cette même enceinte. (Figure III.4)

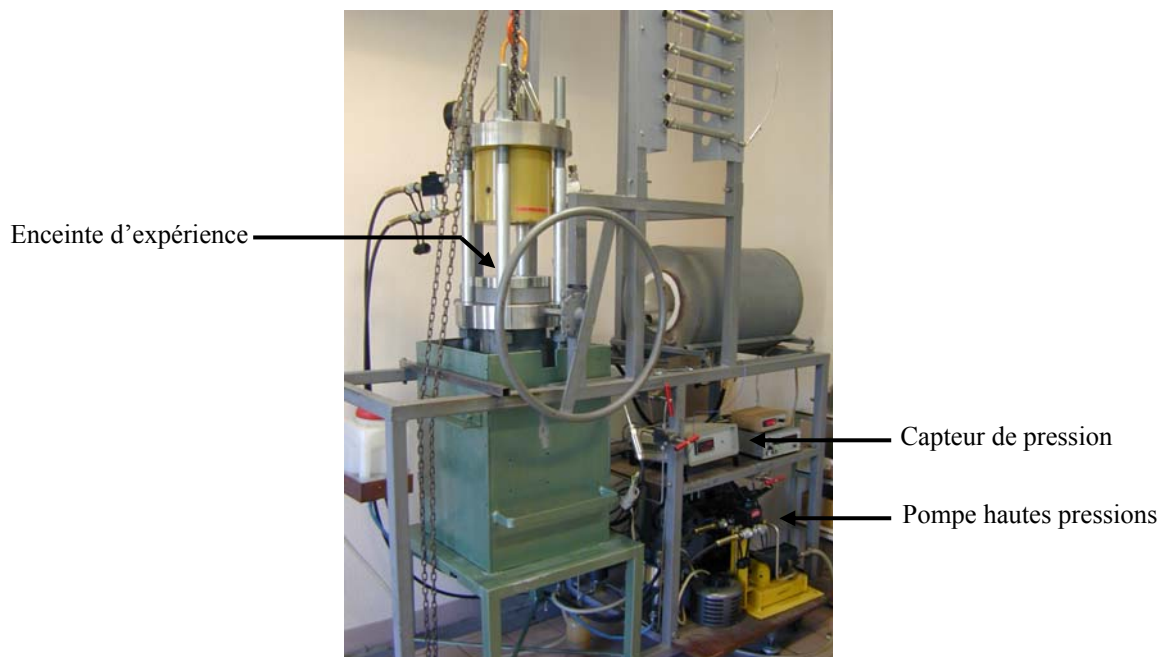


**Figure III.4** : Schéma du principe d'un dispositif à compression indirecte [283]

Cet équipement se divise en deux parties :

- un système générateur de hautes pressions constitué de plusieurs pompes en série, qui permet d'injecter le fluide transmetteur de pression (eau) dans l'enceinte d'expérience,
- une enceinte d'expérience, de volume fixe et égal à 0,85 L. (Figure III.5)

La température à l'intérieur du dispositif est suivie à l'aide d'un thermocouple glissé dans une gaine métallique traversant l'obturateur et relié à un afficheur électronique. La pression est quant à elle mesurée par un capteur électronique de pression directement positionné sur une tuyauterie connectée à l'enceinte.



**Figure III.5** : Vue générale du dispositif à compression indirecte

La fermeture de l'enceinte d'expérience se fait par l'intermédiaire d'un obturateur tubulaire sur lequel s'applique la pression d'un vérin hydraulique. L'étanchéité est assurée par une légère différence de conicité et des propriétés mécaniques des alliages constituant l'obturateur et le col d'entrée de l'enceinte qui sont alors en contact direct, métal sur métal.

### III.1.3.2. Fonctionnement

L'échantillon à traiter, pré-emballé, est placé dans l'enceinte d'expérience. Après avoir vérifié que cette dernière est remplie de fluide transmetteur de pression, elle est fermée à

l'aide de l'obturateur. En abaissant le vérin hydraulique, l'étanchéité est assurée par la déformation plastique du cône de l'obturateur sur celui d'entrée de l'enceinte.

La deuxième étape consiste à injecter le fluide transmetteur de pression à travers des tubulures rigides vers l'enceinte à l'aide du système générateur de hautes pressions. La vitesse maximale d'application de la pression dépend de la nature du système générateur de pression utilisé et peut être contrôlée manuellement. Une fois la pression souhaitée atteinte, la pompe est fermée et la pression est maintenue par fermeture de la vanne d'isolement entre la pompe et l'enceinte.

A la fin du traitement, la dépressurisation est assurée par l'ouverture d'une vanne de purge positionnée sur le circuit, qui entraîne l'élimination de l'excédent de fluide transmetteur de pression vers un flacon de dégorgement.

Grâce à un système de résistances chauffantes, il est possible de réaliser des traitements sous hautes pressions à des températures allant jusqu'à +120°C. Pour travailler à plus basses températures, il faut refroidir l'enceinte en la plongeant dans un bain d'eau glacée ou un dispositif réfrigérant.

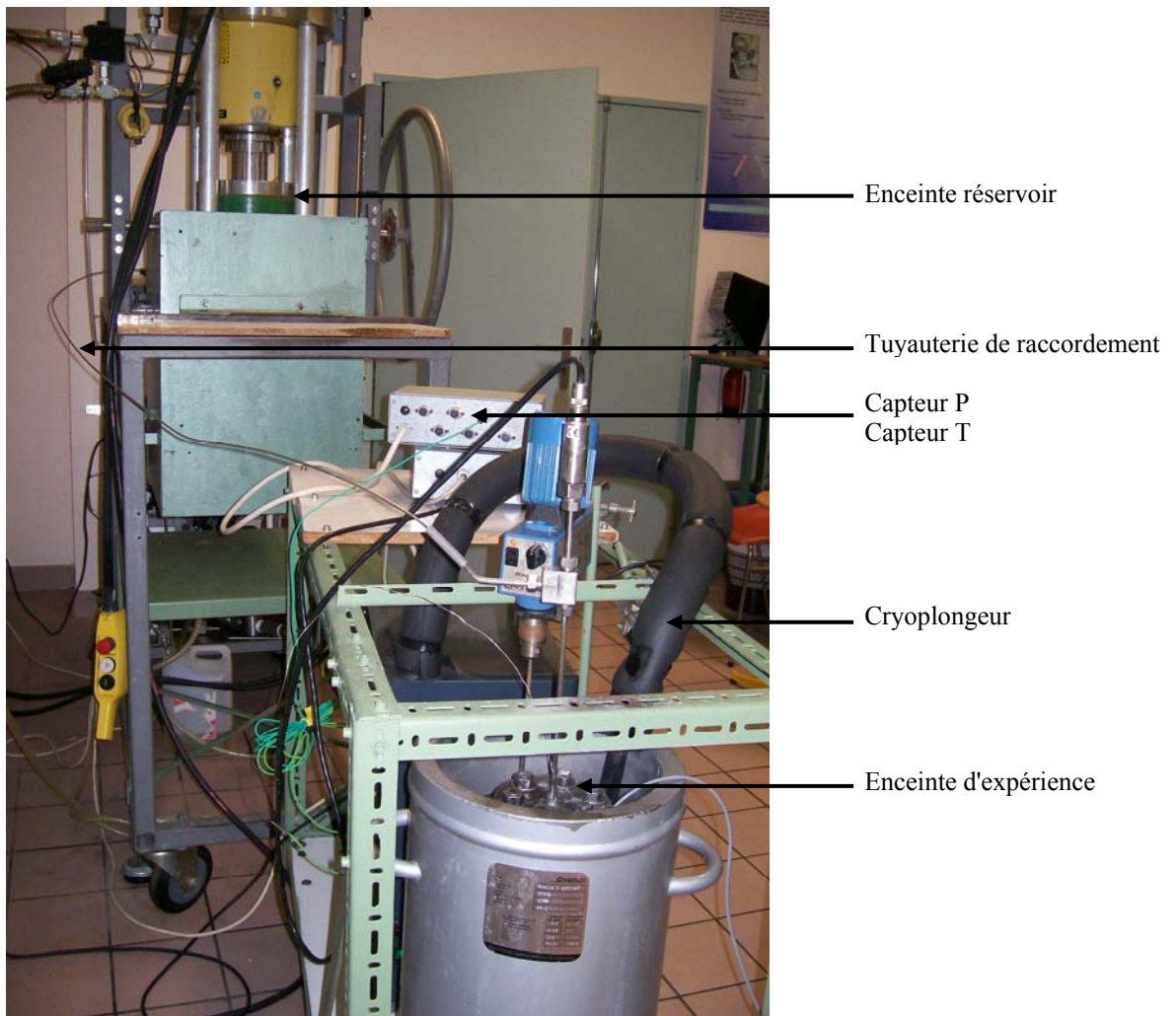
### ***III.1.4. Dispositif à compression indirecte et vitesse d'application rapide***

#### **III.1.4.1. Principe**

Afin de réaliser des traitements hautes pressions avec des vitesses d'application d'au moins  $50 \text{ MPa}\cdot\text{s}^{-1}$ , le dispositif à compression indirecte décrit ci-dessus a été réadapté de façon à ce que l'enceinte d'expérience serve de réservoir. Cette enceinte réservoir est ensuite raccordée à une deuxième enceinte d'expérience, également étanche et de volume fixe inférieur à celui de l'enceinte réservoir. Une vanne d'isolement a été insérée entre l'enceinte réservoir et l'enceinte réactionnelle et est positionnée en position fermée dans un premier temps. Quand la pression souhaitée est atteinte dans l'enceinte réservoir, la vanne d'isolement est ouverte, et le fluide transmetteur de pression est introduit dans l'enceinte de manière quasi instantanée, de façon à ce que la pression s'équilibre entre les deux enceintes. La vitesse d'application de la pression dans l'enceinte d'expérience dépend alors de plusieurs facteurs, notamment : le  $\Delta P$ , le diamètre de la tuyauterie de raccordement... (Figure III.6)



L'enceinte d'expérience est mise dans un dewar contenant un fluide cryogénique et peut être refroidie à la température souhaitée grâce à un cryoplongeur placé dans celui-ci. Il est alors possible de descendre à une température allant jusqu'à  $-50^{\circ}\text{C}$ . Pour des températures allant jusqu'à  $-20^{\circ}\text{C}$ , le fluide transmetteur de pression peut être un mélange éthylène glycol / eau. Pour des températures plus basses, il peut s'agir d'une huile siliconée ou d'éthanol.



**Figure III.6** : Vue générale du dispositif à compression indirecte et vitesse d'application rapide

Ce dispositif à compression indirecte caractérisé par une vitesse d'application rapide a également été adapté et miniaturisé de façon à ce qu'il puisse être installé dans un laboratoire de virologie de niveau de sécurité P3. Dans ce cas, le principe de fonctionnement est le même sauf que le système générateur de hautes pressions est assuré, principalement pour des raisons de plus faible encombrement, par une pompe manuelle. (Figure III.7)



**Figure III.7 :** Vue générale du dispositif miniaturisé à compression indirecte et vitesse d'application rapide

#### III.1.4.2. Fonctionnement

Selon la température désirée, le cryoplongeur est réglé et le bain laissé à refroidir jusqu'à ce que la température s'équilibre. L'enceinte d'expérience, remplie de fluide transmetteur de pression, est alors immergée dans le bain réfrigérant. Une fois l'ensemble refroidi, celle-ci est sortie du bain et les échantillons à traiter, pré-emballés, sont placés à l'intérieur. Après avoir vérifié le niveau de fluide transmetteur de pression, l'obturateur est positionné sur le col d'entrée, et l'étanchéité est assurée grâce à un serrage avec une clé dynamométrique de deux brides entourant ces deux éléments. L'enceinte est ensuite remise dans le bain réfrigéré jusqu'à ce que la température s'équilibre. La température interne est suivie grâce à un thermocouple inséré dans l'obturateur et relié à un afficheur électronique. Une fois l'enceinte d'expérience et l'enceinte réservoir connectées, la vanne d'isolement entre les deux est fermée, ainsi que la vanne de purge. La pression est ensuite augmentée dans le réservoir grâce au système générateur de hautes pressions. La pompe est arrêtée quand la pression souhaitée est atteinte et la vanne d'isolement ouverte, permettant d'atteindre la pression désirée dans l'enceinte réactionnelle avec une vitesse d'application supérieure ou égale à  $50 \text{ MPa.s}^{-1}$ . Les pressions à l'intérieur des deux enceintes sont mesurées à l'aide de capteurs de pression numériques, ayant une précision de  $\pm 5 \text{ MPa}$ .

Quand la pression a été maintenue pour la durée de traitement choisie, la dépressurisation est assurée par l'ouverture de la vanne de purge, permettant au fluide transmetteur de pression

excédent de se déverser dans le flacon d'expansion. La vitesse de dépressurisation est également rapide et supérieure à  $50 \text{ MPa.s}^{-1}$ .

Avec ce système, il est également possible de réaliser des traitements hautes pressions en mode cyclique. Dans ce cas, quand le premier cycle est terminé, avant d'ouvrir la vanne de purge, celle d'isolement entre les deux enceintes est fermée, et seul l'excédent de fluide transmetteur dans l'enceinte d'expérience est éliminé par l'ouverture de la vanne de purge. Afin de poursuivre le traitement par d'autres cycles, il suffit de répéter le protocole décrit au paragraphe précédent autant de fois que nécessaire.

Une fois le traitement hautes pressions terminé, l'enceinte d'expérience contenant les échantillons est déconnectée de celle servant de réservoir puis sortie du bain réfrigéré. Elle est ensuite ouverte et les échantillons peuvent être récupérés pour diverses caractérisations et analyses ultérieures.

## **III.2. Protéines plasmatiques**

### ***III.2.1. Les marqueurs utilisés***

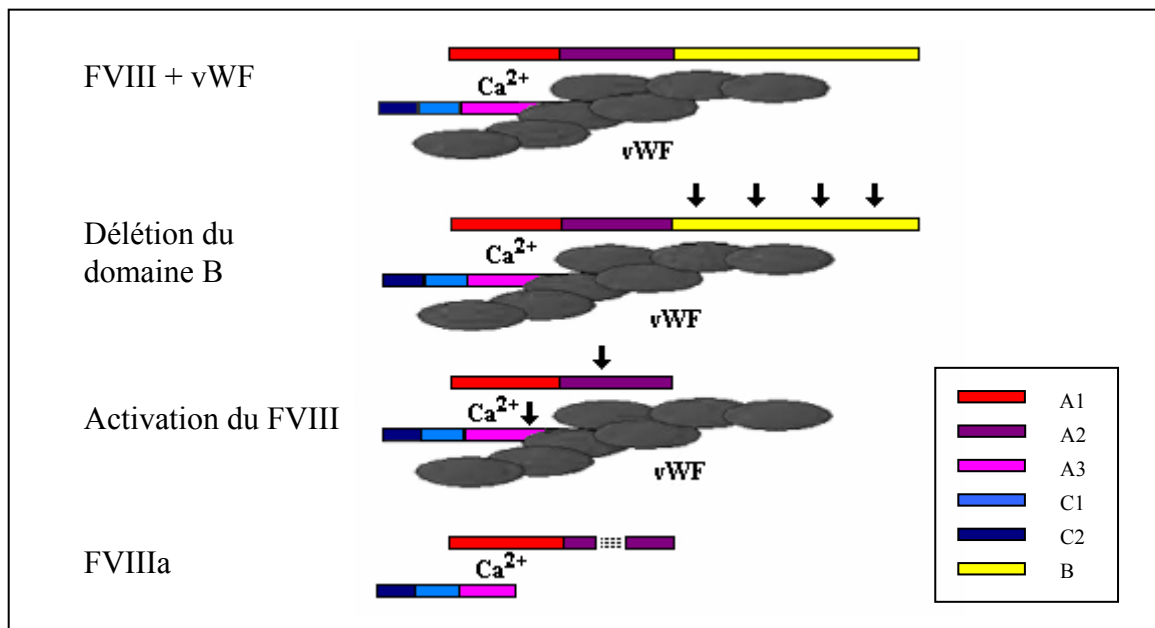
Les trois marqueurs utilisés pour représenter les propriétés thérapeutiques du plasma sont les facteurs de coagulation VIIIc, V et XI. Ils ont été choisis car ce sont les trois facteurs de coagulation qui doivent être dosés sur chaque lot de plasma, selon les législations française et européenne.

#### **III.2.1.1. Le facteur de coagulation VIIIc**

Le facteur de coagulation VIIIc est l'un des plus connus car son absence est la principale cause de l'hémophilie de type A, forme la plus fréquente de cette maladie. Il est synthétisé dans le foie sous la forme d'une pré-protéine de 265 à 330 kDa, composée de 3 domaines distincts selon l'arrangement suivant : A1-A2-B-A3-C1-C2. Il est sécrété dans la circulation sanguine sous une conformation hétérodimérique, constituée d'une chaîne lourde de 210 kDa (A1-A2-B) et d'une chaîne légère de 80 kDa (A3-C1-C2). Les deux chaînes sont associées par l'intermédiaire d'un ion métallique divalent, dont le site d'interaction serait situé entre les domaines A1 et A3. Dans le plasma, cet hétérodimère, stabilisé par l'association avec

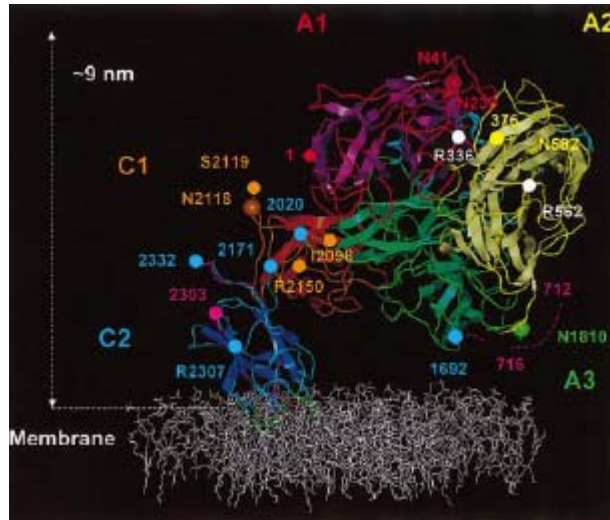
le facteur VonWillebrand (vWF), est présent à une concentration d'environ  $0,1\mu\text{g.mL}^{-1}$ . [284-287]

Au cours de la cascade de coagulation, le facteur VIII est activé par la thrombine ou le facteur Xa, ces derniers agissant notamment au niveau des résidus suivants : Arg 372 entre les domaines A1 et A2, Arg 740 entre les domaines A2 et B, et Arg 1689 présent dans le domaine A3. Ainsi, le peptide A2 est libéré de la chaîne légère. [284-287] (Figure III.8)



**Figure III.8** : Représentation schématique de la structure du FVIII et son activation par la thrombine [285]

Après avoir été activé, le facteur VIII se dissocie du facteur vWF pour se lier à une surface phospholipidique. Il est alors sous forme de trimère, composé des sous-unités A1 (50 kDa), A2 (45 kDa) et A3-C1-C2 (70 kDa). Les sous-unités A1 et A3-C1-C2 sont maintenues entre elles grâce à l'intervention d'un cation divalent. Quant à la sous-unité A2, elle est associée au dimère par des liaisons électrostatiques. (Figure III.9) Après activation, le facteur VIII sert de cofacteur et permet d'augmenter l'efficacité catalytique du facteur IXa dans l'activation du facteur X. [285-288]



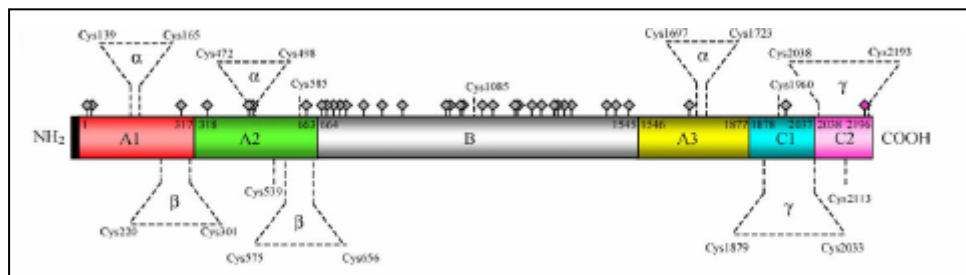
**Figure III.9** : Représentation du facteur VIIIa associé à une membrane phospholipidique (blanc).

*Rouge : domaine A1 (résidus 1-336) – Jaune : domaine A2 (résidus 376-716) –*

*Vert : domaine A3 (résidus 1692-2020) – Orange : domaine C1 – Bleu : domaine C2 [288]*

### III.2.1.2. Le facteur de coagulation V

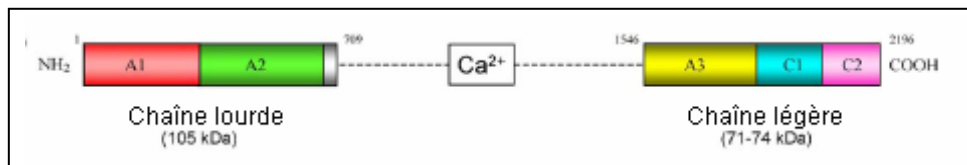
Une déficience en facteur V peut être à l'origine d'une parahémophilie ou d'une thrombose. 80 % du facteur V sanguin circule dans le plasma, à une concentration d'environ  $7 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Il est synthétisé dans le foie sous la forme d'un précurseur de 330 kDa composé de trois domaines distincts organisés de la façon suivante : A1-A2-B-A3-C1-C2. (Figure III.10) Sa structure est très similaire de celle du facteur VIII, ces deux facteurs partageant 40 % d'identité de séquence au niveau de leurs domaines A et C.[289-291]



**Figure III.10** : Représentation en domaines de la simple chaîne du facteur V (330 kDa) [289]

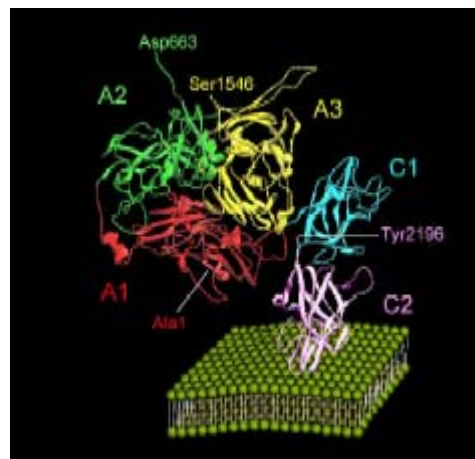
Le domaine B contient les sites de coupure nécessaires à son activation par la thrombine ou le facteur X. Un dimère est alors formé, constitué des sous-unités A1-A2 (chaîne lourde de 105 kDa) d'une part, et A3-C1-C2 (chaîne légère de 74 kDa) d'autre part.

L'association entre les deux sous-unités est maintenue de manière non covalente grâce à l'intervention d'un ion  $\text{Ca}^{2+}$  et d'interactions hydrophobes. [289, 290] (Figure III.11)



**Figure III.11** : Représentation en domaines du facteur Va [289]

Après activation, le facteur Va s'assemble avec le facteur Xa sur les membranes phospholipidiques pour former le complexe prothrombinase. [289-291] (Figure III.12)



**Figure III.12** : Modèle 3D du FVa lié à une membrane phospholipidique obtenu en utilisant le programme SwissPDB 3.7 et les coordonnées PDB 1F4V.

Rouge : domaine A1 - Vert : domaine A2 - Jaune : domaine A3 - Bleu : domaine C1 - Violet : domaine C2 [289]

Le facteur V joue un double rôle :

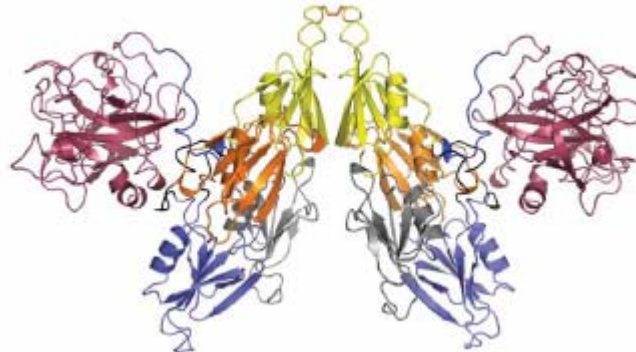
- sous sa forme active, il est un cofacteur essentiel du facteur Xa dans la cascade de coagulation,
- sous sa forme inactive, il est alors un cofacteur anticoagulant. [289-291]

### III.2.1.3. Le facteur de coagulation XI

L'hémophilie de type C est causée par une déficience en facteur XI. Ce facteur est synthétisé par les hépatocytes sous forme d'un homodimère de 160 kDa. Chaque chaîne présente quatre domaines "apple" homologues (A1, A2, A3 et A4) à l'extrémité N-terminale.



Ces deux chaînes sont associées par l'intermédiaire d'un pont disulfure. [292-294] (Figure III.13)



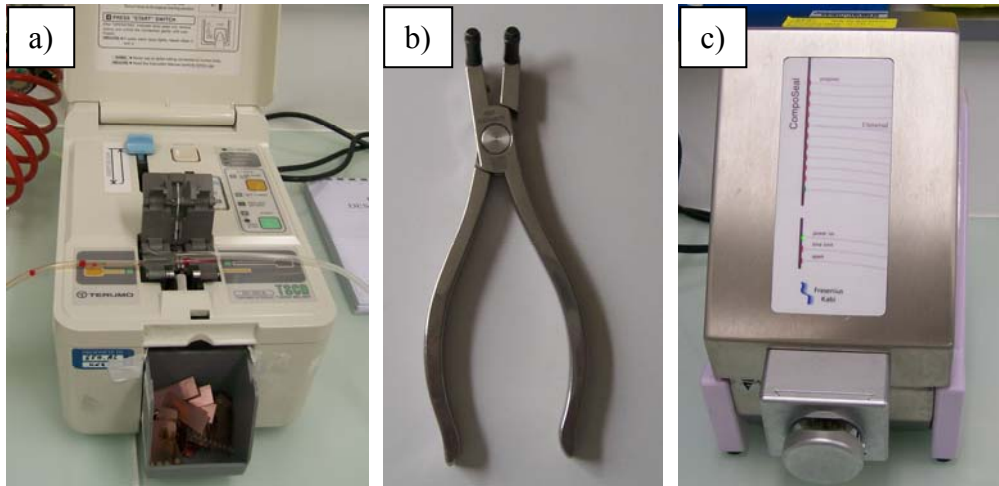
**Figure III.13** : Structure 3D du facteur XI

(Rouge : domaine protéase, Gris : A1, Bleu : A2, Orange : A3, Jaune : A4) [292]

Le facteur XI est activé par la thrombine et le facteur XIIIa, ceux-ci coupant au niveau d'un seul site, entre les résidus Arg 369 et Ile 370 sur chaque chaîne. Cette protéolyse conduit à l'obtention de deux chaînes lourdes (369 résidus) et de deux chaînes légères (238 résidus). Les quatre chaînes sont maintenues ensemble via des ponts disulfure. Le facteur XIa permet d'activer le facteur IX en présence de calcium. [292-294]

### ***III.2.2. Préparation des échantillons***

Le plasma sanguin humain, obtenu grâce à un don par plasmaphérèse, est fourni par l'Etablissement Français du Sang Aquitaine-Limousin. Chaque don permet de prélever environ 600 mL de plasma qui est ensuite échantillonné dans des emballages stériles et souples, ce qui permet de transmettre la pression. Les tubulures raccordées aux poches de sang ont donc été choisies à cet effet. Afin de répartir le plasma dans celles-ci, une connexion stérile est réalisée entre les deux contenants. L'air présent dans cette tubulure est ensuite éliminé à l'aide d'une strippeuse puis les échantillons sont soudés, de manière à obtenir des "bâtonnets" contenant chacun près de 2 mL de plasma. (Figure III.14) Suite à cette préparation, les échantillons sont conservés à une température au moins égale à  $-30^{\circ}\text{C}$ , dans l'attente des traitements hautes pressions.

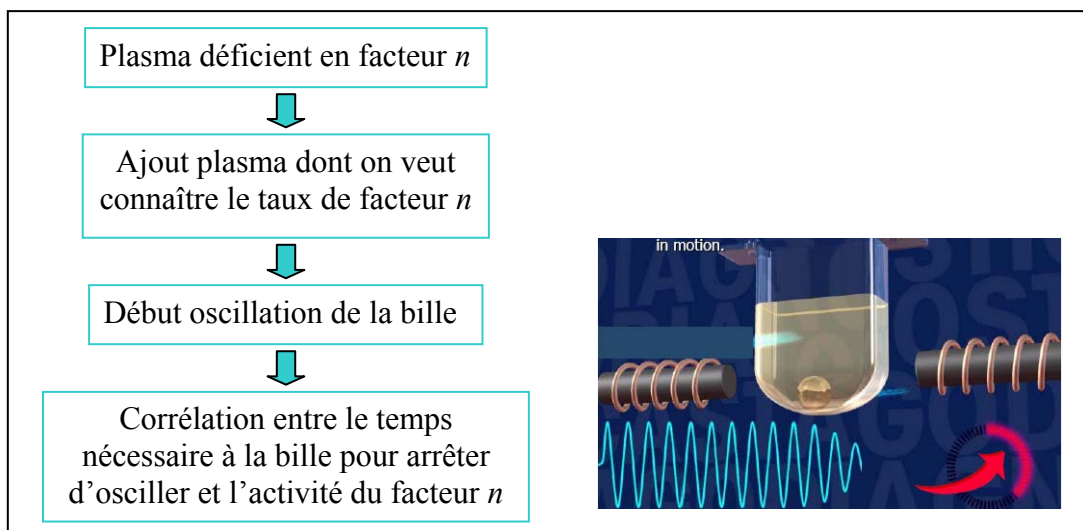


**Figure III.14** : Matériel servant à la préparation des échantillons  
 a) Connexion stérile, b) Strippeuse, c) Soudeuse

### ***III.2.3. Dosage de l'activité des facteurs de coagulation***

L'activité des trois facteurs de coagulation (VIIIc, V et XI) a été mesurée avant et après chaque traitement hautes pressions par la méthode du temps de céphaline avec activateur. Ce dosage consiste à mesurer, en présence de céphaline et d'activateur, le temps de coagulation d'un plasma immuno-déplété en facteur à doser, le facteur manquant étant apporté par l'échantillon à tester. [295] La mesure est basée sur la détection de la viscosité du plasma contenant le facteur à doser. Elle est réalisée à l'aide d'un automate, qui ajoute l'ensemble des produits dans une cuve contenant une bille, qui entre en oscillation grâce à deux bobines magnétiques. Dès que la bille commence à osciller, un chronomètre est déclenché et mesure le temps nécessaire pour que la bille s'arrête, c'est-à-dire quand un caillot de coagulation s'est formé. (Figure III.15) **Etant donné les grandes différences d'un donneur à l'autre, les résultats ont été exprimés en activité résiduelle relative**, et ont donc été déterminés par le rapport entre la valeur d'activité après traitement hautes pressions et la valeur d'activité avant traitement hautes pressions. Chaque expérience a été répétée à trois reprises de façon indépendante. La moyenne et l'écart-type ont alors été calculés en utilisant le logiciel « Excel ».





**Figure III.15** : Principe du dosage des facteurs de coagulation basé sur la détection de la viscosité. [295]

### **III.3. Microbiologie**

#### **III.3.1 Poste de travail**

Afin de réaliser toutes les analyses microbiologiques, un environnement de travail a été installé au Centre de Ressources Hautes Pressions. Celui-ci comprend tout le matériel nécessaire aux manipulations en conditions stériles (bec bunsen, autoclave...), à la culture et au stockage des souches de micro-organismes (étuves, réfrigérateur...).

#### **III.3.2 Micro-organismes utilisés**

##### **III.3.2.1. *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538)**

*Staphylococcus aureus* est une bactérie Gram positive, non mobile, apparaissant à l'observation microscopique sous la forme de coques de 0,5 à 1  $\mu\text{m}$  de diamètre, regroupées en paires, chaînes ou grappes de raisin. Cette bactérie est très ubiquitaire et peut être présente dans l'air, l'eau, les produits alimentaires, mais également être transportée par l'Homme ou les animaux. *S. aureus* est à l'origine de nombreuses infections purulentes, et peut causer des lésions cutanées superficielles (furoncles, acné...) ou des infections plus graves (pneumonie, méningite...). C'est également une des causes majeures des infections nosocomiales.

La pathogénicité de *S. aureus* provient de l'expression de multiples facteurs de virulence, tels que : des protéines de surface permettant de coloniser les tissus de l'hôte, des invasives qui lui servent à se répandre dans les tissus, des facteurs de surface inhibant la phagocytose, la production de toxines entraînant la lyse des membranes des cellules eucaryotes...[296, 297] Pour l'ensemble des expériences, la souche utilisée provient de l' « American Type Culture Collection » (ATCC), et a été fournie par l'intermédiaire de la société AES Chemunex.

### III.3.2.2. *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027)

*Pseudomonas aeruginosa* ou bacille pyocyanique est une bactérie Gram négative, mesurant de 0,5 à 0,8 µm par 1,5 à 3 µm, mobile grâce à une ciliature polaire. Il est capable de synthétiser des pigments, tels que la pyocyanine ou la pyoverdine, ce qui explique la couleur bleu-verte des colonies lorsqu'il se développe sur certaines géloses.

C'est une bactérie retrouvée fréquemment dans les sols et l'eau, mais également parfois à la surface des plantes ou des animaux. Elle est considérée comme un pathogène opportuniste émergent, responsable de maladies nosocomiales. Elle peut causer des infections urinaires, gastro-intestinales, du système respiratoire, des dermatites, des infections, en particulier chez des personnes immunodéprimées, telles que des patients atteints de cancer ou du SIDA. *P. aeruginosa* étant un pathogène opportuniste, toute infection débute par une altération des défenses de l'hôte. Sa pathogénicité est due à la fois à des facteurs invasifs et de virulence. [298]

La souche ATCC 9027 utilisée au cours des expériences a été obtenue par l'intermédiaire de la société AES Chemunex.

### III.3.2.3. *Bacillus subtilis* (ATCC 9372)

Le genre *Bacillus* regroupe des bacilles Gram positifs, généralement mobiles et capables de sporuler. *B. anthracis* et *B. cereus* sont les espèces les plus fréquemment étudiées car ils sont respectivement responsables d'infections et d'intoxications alimentaires. *B. subtilis*, en revanche, est une bactérie opportuniste, entraînant des infections le plus souvent chez des malades immuno-déprimés, tels que des personnes souffrant de cancer généralisé.

*B. subtilis* est sporogène, c'est-à-dire qu'il possède une forme de résistance, la spore, qui se met en place dès que les conditions environnementales lui deviennent défavorables. Ces spores comptent parmi les plus résistantes aux agents physico-chimiques. [175]

Au cours des expériences, les deux formes de *B. subtilis*, végétative et sporulée, ont été étudiées, et ont été fournies par la société AES Chemunex.

#### III.3.2.4. *Candida albicans* (ATCC 10231)

*Candida albicans* est une levure non pigmentée, non capsulée, à bourgeonnement multilatéral. C'est un commensal des muqueuses digestives et génitales, et est rarement présent sur la peau humaine. C'est un pathogène opportuniste, responsable de candidoses superficielles (au niveau de la peau et des muqueuses), mais également profondes principalement en présence de patients immunodéprimés. *C. albicans* est la principale levure impliquée en pathologie humaine. [299]

La souche de *Candida* ATCC 10231 utilisée au cours des expériences a été obtenue auprès de la société AES Chemunex.

#### III.3.2.5. *Aspergillus niger* (ATCC 16404)

*Aspergillus niger* est une moisissure omniprésente dans l'environnement (air, sol, surfaces, alimentation...) et peut être véhiculée par les systèmes de ventilation. La contamination se fait essentiellement par inhalation de spores, ce qui explique que les poumons et les voies aériennes supérieures (bronches, sinus) soient les premiers sites d'infection. *A. niger* peut également être responsable d'infections locales par dépôt de spores directement sur des plaies ou des brûlures. Les contaminations digestives sont plus rares. [299]

Les expériences ont été menées sur les spores d'*A. niger*, préparées à partir de la souche végétative lyophilisée fournie par AES Chemunex.

### **III.3.3. Culture des souches**

L'ensemble des milieux de culture (gélose Trypticase Soja, gélose Sabouraud et bouillon Tryptone Sel) ont été achetées sous forme déshydratée auprès de la société AES Chemunex. Après préparation, ces milieux sont stérilisés par autoclavage à 121 °C pendant 15 min.

Les spores de *Bacillus subtilis* sont fournies sous forme d'une suspension qui peut être conservée pendant 1 an à +4°C.

Les souches de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* et *Aspergillus niger* ont été achetées sous forme de disques lyophilisés. Après réhydratation, la suspension obtenue sert àensemencer des boîtes de pétri contenant un milieu de culture approprié, à savoir de la gélose Trypticase Soja (TCS) pour *S. aureus* et *P. aeruginosa*, et de la gélose Sabouraud pour *C. albicans* et *A. niger*. Les boîtes de pétri sont ensuite mises à incuber à l'étuve, à une température de 35°C pendant 48 h pour *S. aureus* et *P. aeruginosa*, et 22°C pendant 72 h pour *C. albicans* et *A. niger*. Les colonies obtenues peuvent être utilisées soit pour préparer une suspension de micro-organismes servant à contaminer le plasma sanguin humain, soit pour être repiquées sur une gélose en pente qui, après incubation, pourra être stockée à +4°C pendant 1 mois. Les géloses en penteensemencées ainsi obtenues servent de réserve de souche et sont repiquées tous les mois vers de nouveaux tubes.

### **III.3.4. Préparation du plasma contaminé**

Avant de contaminer le plasma sanguin humain, il est nécessaire de préparer des suspensions denses de micro-organismes. Toutes les suspensions ont été réalisées dans du bouillon Tryptone Sel (TS) qui est un diluant isotonique.

Pour les spores de *B. subtilis*, la suspension est obtenue par simple dilution dans du bouillon TS de la suspension commerciale, de façon à obtenir une concentration  $\geq 10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup> (UFC : Unité Formant Colonie). Pour les expériences sur la forme végétative, ce micro-organisme a tout d'abord été repiqué dans du bouillon cœur-cervelle, qui est un milieu très nutritif permettant de faire germer les spores.

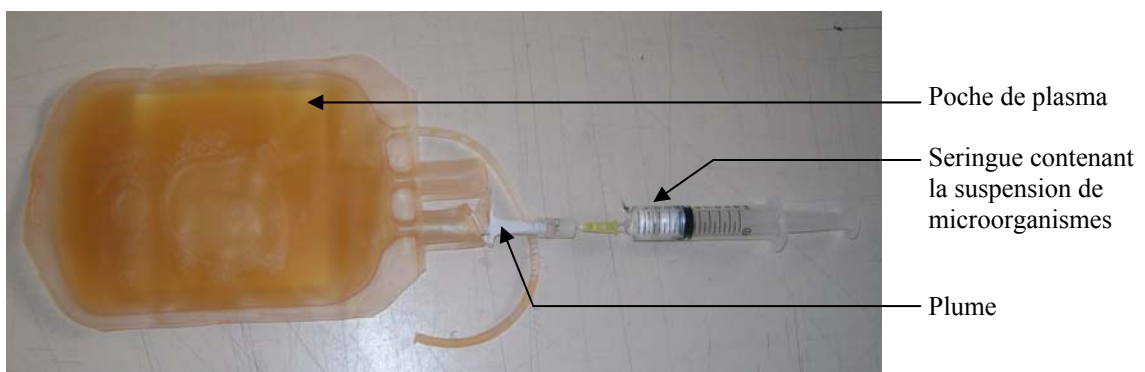
Pour *Aspergillus niger*, il faut au préalable cultiver cette moisissure pendant 14 jours à 25°C dans de fioles de Roux contenant de la gélose Sabouraud. Passée cette période d'incubation, les ascospores sont récupérées par lavages successifs avec du bouillon TS en

présence de billes de verre. La suspension ainsi obtenue peut être conservée pendant 14 jours à +4°C avant de servir à contaminer le plasma sanguin.

En ce qui concerne les trois autres micro-organismes (*S. aureus*, *P. aeruginosa* et *C. albicans*), les colonies issues d'une culture sur boîtes de pétri sont prélevées à l'aide d'une anse et mises en suspension dans du bouillon TS. Il est ainsi possible de préparer des suspensions denses ( $N \geq 10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup>) dont la concentration pourra être contrôlée par un dénombrement.

La suspension de micro-organismes préparée selon le protocole ci-dessus sert à contaminer le plasma sanguin humain à raison de 10 ml de suspension pour 300 ml de plasma environ. Pour cela, la poche de plasma est perforée au niveau d'une connectique à l'aide d'une « plume ». Cette plume sert à injecter la suspension de micro-organismes par l'intermédiaire d'une seringue. (Figure III.16) Le plasma présent dans la tubulure de la poche est évacué vers la poche de plasma à l'aide d'une strippeuse, puis la poche est agitée afin d'être homogénéiser. Cette opération est répétée plusieurs fois. Les échantillons de plasma contaminé sont ensuite placés dans des tubulures stériles et étanches. Pour cela, une connexion stérile est réalisée entre la poche de plasma et la tubulure vide. Afin d'éliminer l'ensemble de l'air présent dans la tubulure, celle-ci est « strippée » à deux reprises. Enfin une soudure est réalisée à proximité de la connexion stérile puis la tubulure est divisée en plusieurs échantillons grâce à la soudeuse. Les échantillons ainsi obtenus sont conservés au congélateur dans l'attente de traitement par un procédé d'inactivation.

*Ce protocole a été sélectionné afin de se rapprocher au plus près des conditions réelles de conservation du plasma (après collecte, le plasma est congelé dans les 8h, les procédés de viro-atténuation intervenant par la suite).*



**Figure III.16 :** Injection de la suspension de micro-organismes dans une poche de plasma

### III.3.5. Dénombrement

Avant et après traitement hautes pressions, un dénombrement des échantillons est réalisé afin de déterminer l'efficacité destructrice de ce traitement. Pour cela, des dilutions en cascade des échantillons sont réalisées dans du bouillon TS. Pour chaque dilution, deux boîtes de pétri sontensemencées de la manière suivante : 1 mL de la dilution est placé au fond de la boîte puis de la gélose TCS ou Sabouraud en surfusion est versée, la gélose étant choisie en fonction du micro-organisme. Après homogénéisation et gélification, les boîtes de pétri sont mises à l'étuve à 35°C pendant 48h (*S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*) ou 25°C pendant 72h (*C. albicans*, *A. niger*). Les boîtes contenant entre 15 et 300 colonies isolées sont ensuite sélectionnées pour le dénombrement. (Figure III.17)

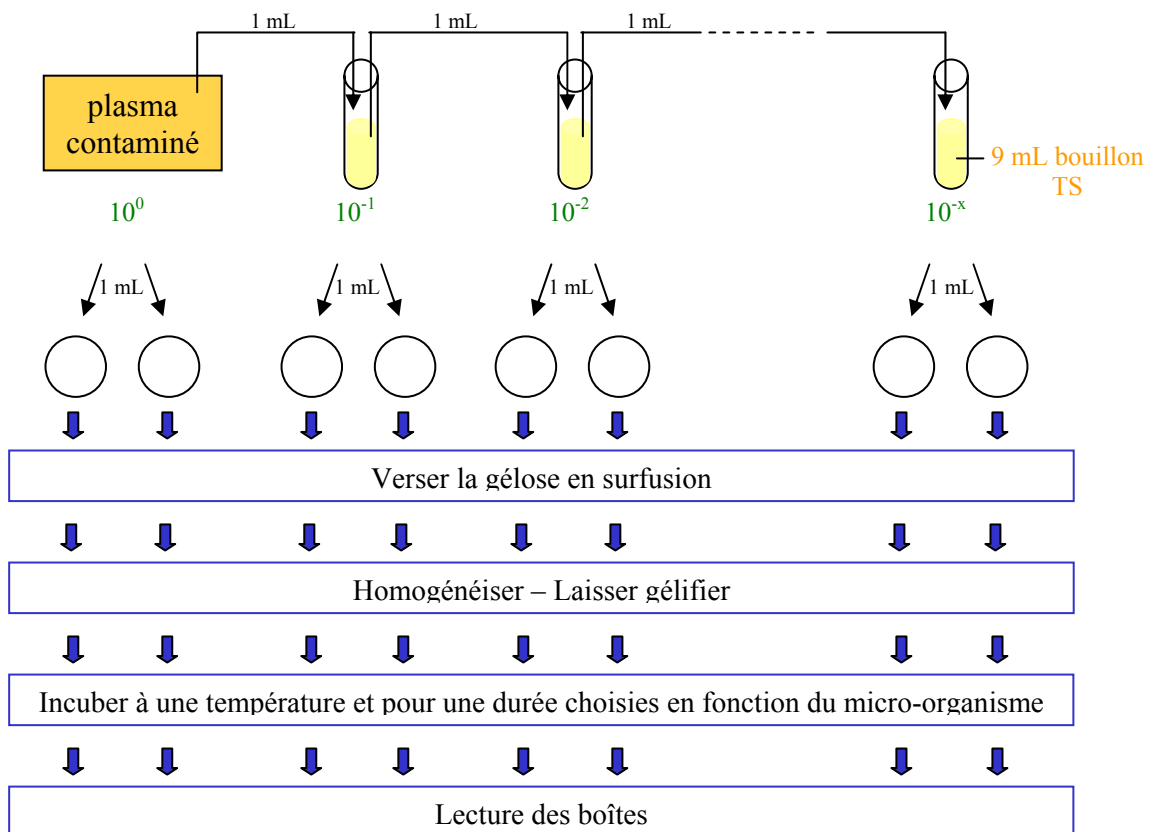


Figure III.17 : Principe du dénombrement

Après comptage des colonies, la concentration en micro-organismes est déterminée par le calcul suivant :

$$N = \frac{\Sigma c}{(n_1 + 0,1 \times n_2) \times d}$$

avec N : concentration en micro-organismes (en UFC/ml)

Sc : somme des colonies comptées sur toutes les boîtes retenues

n<sub>1</sub> : nombre de boîtes retenues à la première dilution

n<sub>2</sub> : nombre de boîtes retenues à la deuxième dilution

d : taux de dilution de la première dilution

Les concentrations en micro-organismes sont exprimées en Unités Formant Colonies par mL. Cette dénomination est basée sur le principe que chaque colonie isolée présente dans la boîte de pétri est issue d'un seul micro-organisme présent dans le volume (1 mL) de suspension ayant servi à l'ensemencement.

Afin de pouvoir comparer les résultats entre les différentes séries d'échantillons de plasma contaminé ainsi préparées, les résultats sont exprimés en efficacité destructrice (ED). L'efficacité destructrice du traitement est alors calculée de la façon suivante :

$$ED = -\log\left(\frac{N}{N_0}\right)$$

avec ED : efficacité destructrice

N : concentration en micro-organismes après traitement hautes pressions

N<sub>0</sub> : concentration en micro-organisme avant traitement hautes pressions

Pour chaque condition de traitement sous hautes pressions, les expériences ont été répétées deux fois de manière indépendante. La moyenne et l'écart-type ont ensuite été calculés en utilisant le logiciel « Excel ».

### ***III.3.6. Observations microscopiques***

Afin d'observer l'impact des hautes pressions sur la morphologie des différents micro-organismes, des observations microscopiques ont été réalisées avant et après traitement hautes pressions.

#### **III.3.6.1. Microscopie électronique à balayage (MEB)**

Les observations par microscopie électronique à balayage (microscope JEOL JSM 5200) ont été réalisées à l'ENSCP et ont permis de suivre l'évolution de la morphologie externe des micro-organismes en suspension dans du plasma, avant et après traitement sous hautes pressions.

Environ 2 mL de la suspension à observer a été filtrée (pores 0,1 µm), afin de retenir à la surface les micro-organismes. Après séchage, ce filtre est métallisé avant d'être observé sous MEB.

#### **III.3.6.2. Microscopie électronique à transmission (MET)**

Les observations par microscopie électronique à transmission (MET) ont été réalisées à la Plateforme de Microscopie Electronique (Université Victor Segalen – Bordeaux 2).

Les échantillons ( $V = 1$  mL), avant et après traitement hautes pressions, ont été centrifugés (6000 rpm – 5 min) avant d'être fixés pendant 3 h à température ambiante dans un mélange (1 mL) glutaraldéhyde (2,5 %), paraformaldéhyde (2 %) et tampon cacodylate (0,1 M). Ils sont ensuite à nouveau centrifugés puis lavés pour éliminer une partie du fixateur, avant d'ajouter du tampon cacodylate 0,1 M (500 µl). Ils sont alors conservés à 4°C toute la nuit. Les échantillons sont déshydratés par passage dans des bains successifs d'alcool (70° : 10 min, 95° : 2×15 min, 100° : 2×20 min, oxyde de propylène : 2×30 min). Puis ils sont imprégnés dans de la résine époxy (epon). Lorsque les blocs sont prêts, ils sont taillés à l'ultramicrotome avant d'être observés au MET.

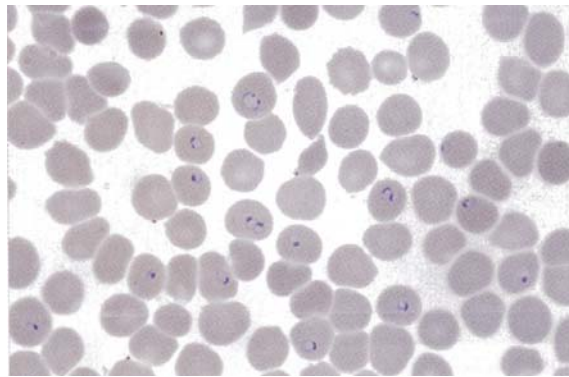


### **III.4. Parasitologie**

#### **III.4.1. Parasites utilisés**

##### III.4.1.1. *Plasmodium berghei*

*Plasmodium berghei* est le modèle murin de *Plasmodium falciparum* (Figure III.18), agent responsable du paludisme ou malaria. C'est un hématozoaire, c'est-à-dire que c'est un parasite du sang, constitué d'une seule cellule (protozoaire). *P. falciparum* est le *Plasmodium* le plus répandu dans le monde et est transmis par les moustiques femelles du genre *Anopheles* (Figure III.19). La physiopathologie du paludisme est encore mal connue, mais sa répercussion sur certains organes a été largement décrite. Ainsi, au niveau du sang, le paludisme est généralement accompagné d'une anémie due à une hémolyse et d'une thrombopénie. La rate est souvent hypertrophiée car elle tente de séquestrer et de détruire les globules rouges parasités. Le neuropaludisme, complication majeure du paludisme, est la conséquence de l'atteinte cérébrale au cours de l'accès palustre, et est caractérisé par des troubles de la conscience, des convulsions... Non traité, il est mortel en deux ou trois jours. Même avec une prise en charge rapide, la mortalité reste lourde (10 à 30 %). [299]



**Figure III.18** : Frottis de sang contaminé par *Plasmodium falciparum* (Parasitémie  $\approx$  12 %) [299]

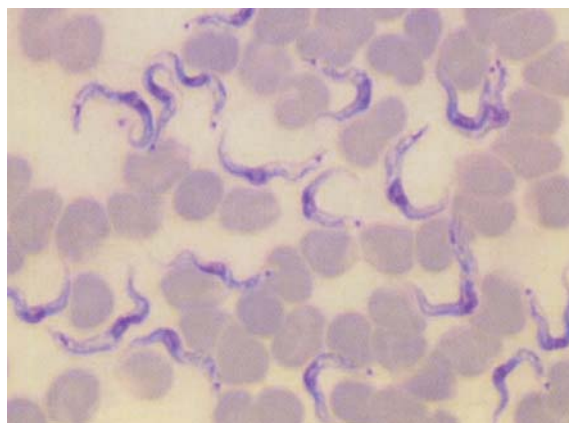


**Figure III.19** : Femelle du genre *Anopheles* [299]

#### III.4.1.2. *Trypanosoma brucei brucei*

*Trypanosoma brucei brucei* (*T.b.b.*) est le modèle murin de *Trypanosoma brucei gambiense*, protozoaire extracellulaire flagellé fusiforme (Figure III.20). Ce dernier est responsable de la maladie du sommeil (Trypanosomose humaine africaine), et est transmis à l'Homme après piqûre par la mouche tsé-tsé (Figure III.21). L'évolution de cette maladie est le plus souvent mortelle en l'absence de traitement, qui utilise d'ailleurs des médicaments toxiques.

Après piqûre infectante, une réaction inflammatoire locale se développe. Après une période d'incubation de quelques jours, la maladie diffuse à tout l'organisme par voie lymphaticosanguine. Elle aboutit à un état grabataire puis le patient sombre dans un coma d'évolution fatale. [299]



**Figure III.20** : Frottis de sang contaminé par *Trypanosoma brucei gambiense* [299]



**Figure III.21** : *Glossina* sp. Adulte (Mouche tsé-tsé) [299]

#### III.4.1.3. *Trypanosoma cruzi*

*Trypanosoma cruzi* est l'agent responsable de la trypanosomose humaine américaine (THAm) ou maladie de Chagas. C'est un protozoaire flagellé, existant sous une forme extracellulaire et mobile dans le sang et sous une forme intracellulaire et immobile (absence de flagelle). Ce parasite est transmis à l'Homme par l'intermédiaire d'un vecteur, qui est une punaise appartenant à la famille des Réduvidés, telle que *Triatoma infestans* (Figure III.22). *T. cruzi* est présent dans les déjections de son vecteur et pénètre de manière active au travers des muqueuses saines (conjonctivales ou buccales) ou de la peau (lésion de grattage...) L'infection débute généralement par un œdème au niveau du site d'entrée du parasite (phase aiguë) qui peut passer inaperçue. Elle est suivie par une phase indéterminée qui peut durer jusqu'à plusieurs dizaines d'années voire toute la vie dans deux tiers des cas. Dans le cas où la phase chronique se déclare (1/3 des cas), les systèmes cardiaques et digestifs des malades se dégradent. Cette phase est incurable et peut s'avérer mortelle (insuffisance cardiaque). [299]



**Figure III.22** : *Triatoma infestans* adulte. [299]

### **III.4.2. Méthodologie**

Les travaux sur l'effet des hautes pressions sur les parasites ont été réalisés en collaboration avec le laboratoire de Parasitologie de l'Université Bordeaux 2 (Professeur Ph. VINCENDEAU).

En ce qui concerne les études sur *Plasmodium berghei* et *Trypanosoma brucei brucei*, pour chaque parasite testé, du sang de souris parasitée est prélevé puis échantillonné en tubulures selon la méthode décrite au paragraphe III.2.2. Plusieurs échantillons ont alors servi de témoins :

- un « témoin de transport », qui a suivi le même parcours que l'ensemble des tubulures,
- un « témoin de température », qui a été plongé dans le bain cryothermostaté dans lequel était immergée l'enceinte hautes pressions. Ce témoin avait pour but d'observer l'effet de la température seule sur les parasites.

Les autres tubulures ont été soumises au traitement hautes pressions.

Pour l'ensemble des échantillons :

- d'une part, un frottis a été réalisé puis les lames ont été colorées au Giemsa avant d'être observées au microscope optique,
- d'autre part, une injection des produits traités et non traités a été faite à des souris saines afin de voir si tous les parasites ont bien été inactivés par le traitement hautes pressions. En l'absence d'inactivation, une telle injection conduit à la mort des souris.

Pour les expériences sur *Trypanosoma cruzi*, la viabilité des parasites a été évaluée par culture cellulaire. Comme pour *P. berghei* et *T.b.b.*, des témoins « transport » et « température » ont été préparés. L'ensemble des échantillons (témoins et ayant subi le traitement sous hautes pressions) a ensuite été cultivé dans du milieu LIT (Liver Infusion Tryptose). L'inactivation est alors observée par la perte de mobilité et l'absence de multiplication des parasites.

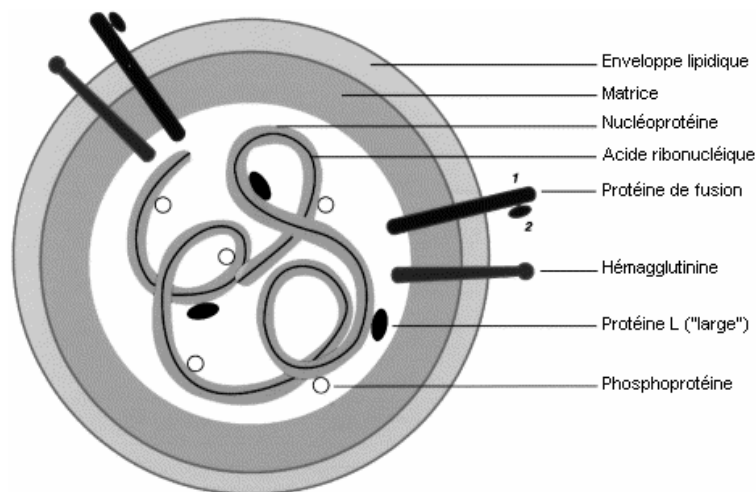
## III.5. Virologie

### III.5.1. *Virus utilisés*

#### III.5.1.1. Virus de la rougeole

- *Généralités*

Le virus de la rougeole est un des virus les plus répandus car il est très contagieux. Il s'agit d'un virus enveloppé à ARN, de 150 à 300 nm de diamètre. Il comporte une bicouche lipidique externe comprenant l'enveloppe et une matrice protéique entourant le génome viral. Des glycoprotéines (hémagglutinine et protéine de fusion) sont projetées vers l'extérieur. L'ARN simple brin est entouré par des nucléoprotéines et est associé à d'autres protéines (phosphoprotéine et « large protein »). (Figure III.23) [300, 301]



**Figure III.23** : Schéma représentatif de la structure du virus de la rougeole. D'après [300]

Le développement de la maladie se caractérise par les symptômes suivants : fièvre, malaises, rhume, toux, taches de Koplik dans la bouche apparaissant 10 à 12 jours après l'infection et persistant durant 2 à 4 jours, éruption cutanée se manifestant 14 jours post-infection. La rougeole entraîne un affaiblissement du système immunitaire, ce qui ouvre la voie à de nombreuses infections (otite, pneumonie, diarrhée). [300, 301]

- *Méthodologie*

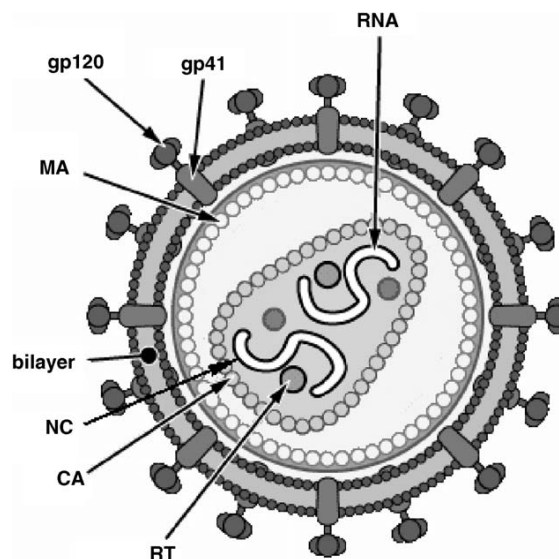
La suspension de particules virales de la rougeole a été préparée par le laboratoire de Virologie du Professeur FLEURY (Université Victor Segalen - Bordeaux 2). Elle a ensuite été placée dans des tubes stériles, étanches et souples afin de permettre la transmission de la

pression. Un premier tube a été soumis à la pression, le second a servi de témoin de température et a subi le traitement thermique le plus proche de l'échantillon traité sous pressions. Les échantillons ont ensuite été confiés au laboratoire de Virologie pour être analysés.

### III.5.1.2. Virus de l'immunodéficience humaine-1 (VIH-1)

- *Généralités*

Le VIH-1 est un rétrovirus et est le principal agent responsable du Syndrome de l'Immunodéficience Acquisée (SIDA). Les virions sont des particules circulaires de 100 à 120 nm de diamètre, constitués d'une membrane lipidique entourant une nucléocapside (core). Ce « core » contient les deux brins d'ARN, la protéase virale (PR), la transcriptase inverse (RT), l'intégrase (IN) et quelques facteurs cellulaires. (Figure III.24) [302]

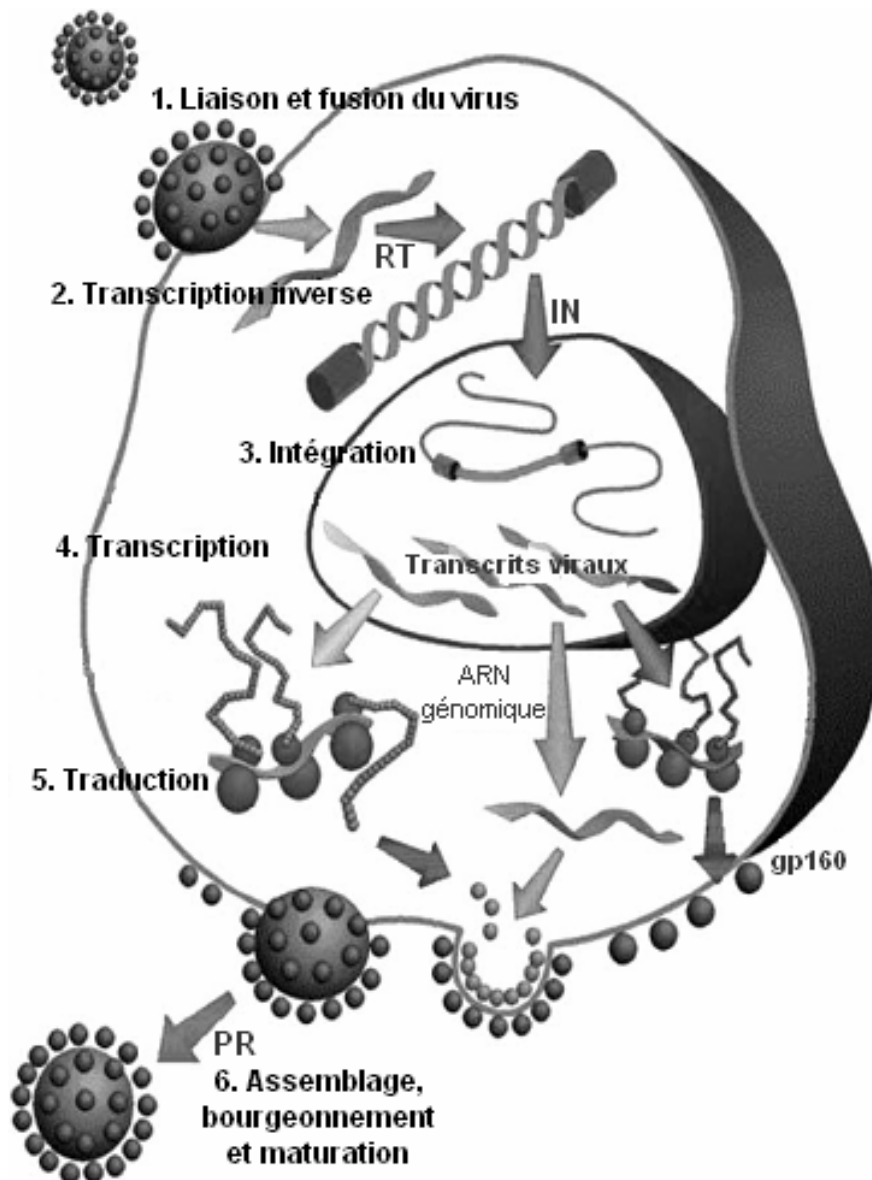


**Figure III.24** : Schéma de la structure d'un virion HIV mature.

*RNA* : acide ribonucléique – *MA* : matrice protéique – *bilayer* : enveloppe lipidique  
 – *NC* : nucléocapside – *CA* : capsid virale – *RT* : transcriptase inverse. [302]

L'infection par le VIH-1 débute par la liaison du virion à la surface de la cellule par l'intermédiaire de récepteurs cellulaires, et en particulier du CD4, avant de se poursuivre par la fusion des membranes virale et cellulaire. L'ARN viral est ensuite rétrotranscrit en ADN double brin grâce à la RT. Le complexe de pré-intégration se fixe alors à la membrane nucléaire et entre dans le noyau au travers des pores nucléaires. L'intégrase permet par la

suite d'insérer l'ADN double brin dans le génome de la cellule hôte. L'expression du génome viral se traduit notamment par la synthèse de protéine Tat, cette dernière activant alors la transcription des gènes du VIH-1. (Figure III.25) [302]



**Figure III.25** : Schéma du cycle de réplication du VIH-1.

*RT* : transcriptase inverse – *IN* : intégrase – *PR* : protéases virale. D'après [302]

La progression du SIDA est majoritairement due au déclin progressif des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, principales cellules infectées par le VIH. Les défenses immunitaires du malade sont alors affaiblies, ce qui le rend plus sensible aux infections opportunistes et peut conduire à la mort. [302]

- *Méthodologie*

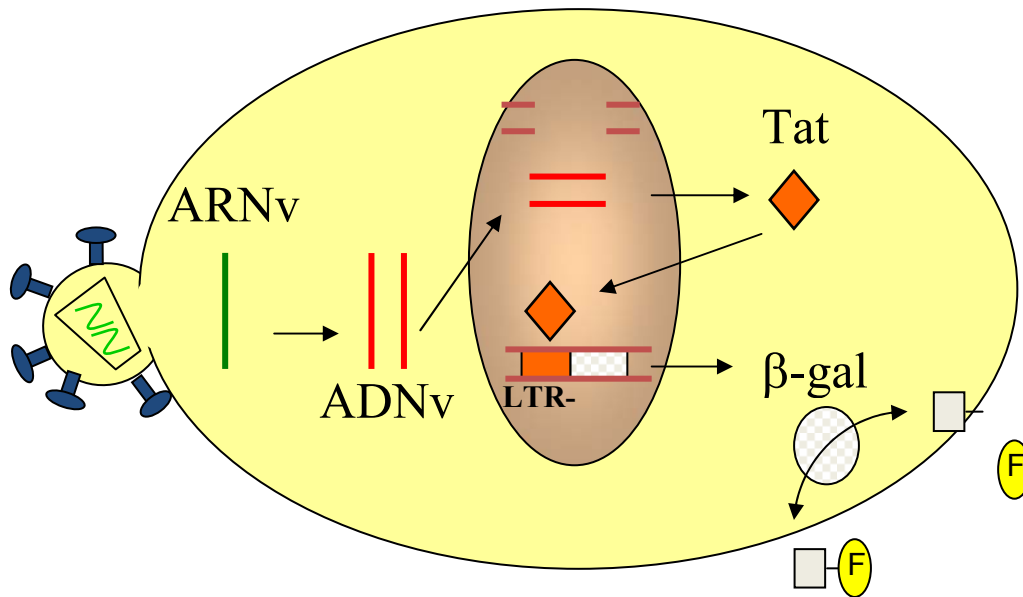
Pour des raisons de sécurité, l'ensemble des expériences sur le VIH-1 (traitements hautes pressions compris) se sont déroulées au sein du laboratoire P3 de l'Université Victor Segalen - Bordeaux 2. Pour cela, un équipement hautes pressions, de même principe de compression que celui mis en œuvre au CRHP, mais miniaturisé, a été installé dans ce laboratoire (Cf. III.1.4.1).

Le VIH-1 a été produit par co-culture de cellules MT<sub>4</sub> et H<sub>9</sub> Lai. Les surnageants viraux sont obtenus après centrifugation des suspensions cellulaires qui, après filtration (0,45 µm), sont conservés à -80°C.

L'effet des hautes pressions sur le VIH-1 a été évalué par le test du surnageant viral. Pour cela, une plaque de 96 puits a été préparée à raison de 10000 cellules HeLa P4 (dans du milieu DMEM) par puits puis mise à incuber pendant 24 h à 37°C et 5 % CO<sub>2</sub>. Le lendemain, les surnageants viraux sont décongelés, puis placés dans des tubes stériles, étanches et souples afin que la pression puisse être transmise. Deux tubes sont ainsi préparés, le premier servant de témoin « température » et le deuxième subissant le traitement « hautes pressions » sélectionné. En parallèle, les plaques 96 puits sont vidées, puis du milieu DMEM frais est rajouté à raison de 100 µL/puits. 100 µL de surnageant viral à tester sont ensuite placés dans la première colonne. Après homogénéisation, 100 µL de ce puits sont prélevés pour être mis dans la deuxième colonne, et ainsi de suite (principe des dilutions en cascade). Pour finir, chaque puits est complété avec 100 µL de milieu DMEM, puis les plaques sont mises à incuber à 37°C – 5 % CO<sub>2</sub> pendant 24 h.

L'infection par le VIH-1 est révélée par la méthode du 4-Méthylumbelliferyl β-D-galactopyranoside (4-MUG). La plaque 96 puits est vidée, puis lavée à trois reprises avec du NaCl 9g/L. Le tampon de révélation (Tris 1M pH8, 4-MUG, β-mercaptoéthanol, Triton 10 %, H<sub>2</sub>O) est ajouté dans chaque puits à raison de 200 µL/puits. La plaque est recouverte de papier collant puis décontaminée avant d'être sortie du laboratoire P3. Elle est ensuite mise à incuber pendant 24 h à 37°C et 5% CO<sub>2</sub>, avant d'être lue au cytofluor. (Figure III.26)





**Figure III.26** : Principe de la méthode de révélation au 4-MUG.

*ARNv* : ARN viral – *ADNv* : ADN viral – *LTR* : promoteur –  
*Tat* : protéine Tat (trans-activateur) – *β-gal* : β-galactosidase. [303]

## III.6. Etude sur le prion

### III.6.1. *Modèle du prion de hamster*

L'utilisation de modèles animaux est incontournable dans le cadre d'études sur les maladies à prions. Le modèle du hamster est le plus couramment utilisé notamment dans l'évaluation des nouveaux dispositifs de rétention du prion des produits sanguins labiles. Ces études utilisent la souche 263K qui est une souche de scrapie adaptée au hamster.

La protéine prion peut exister sous deux formes : une forme normale ( $\text{PrP}^{\text{C}}$ ) et une forme pathologique ( $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ ). Ces deux formes possèdent la même structure primaire (séquence en acides aminés identiques) mais diffèrent au niveau de leur structure secondaire, la  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  possédant davantage de feuillets  $\beta$ . La  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ , de par sa conformation, présente une résistance à la digestion par la protéinase K (PK), contrairement à la  $\text{PrP}^{\text{C}}$ . Cette différence de sensibilité est couramment utilisée pour déterminer la forme (pathologique ou normale) de la protéine prion étudiée. [203, 204, 304]

### ***III.6.2. Méthodologie***

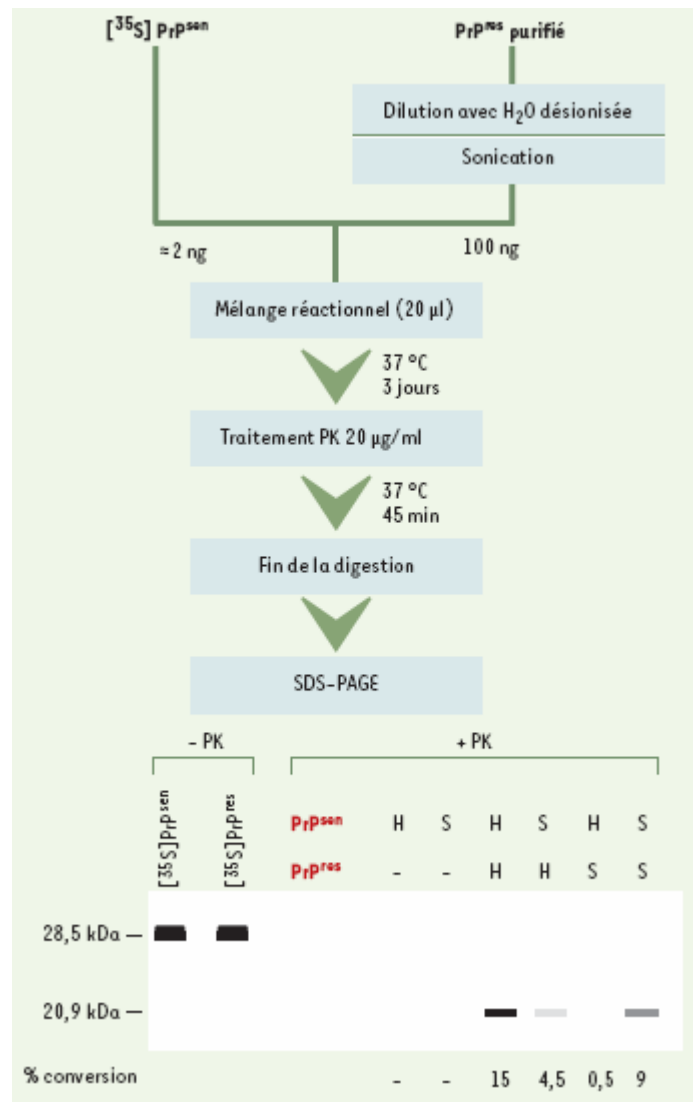
L'ensemble des travaux conduit sur l'effet des hautes pressions sur le prion a été réalisé en collaboration avec l'Etablissement Français du Sang Pyrénées-Méditerranée (Equipe de Mme J. COSTE).

Dans ces essais, l'évaluation du traitement selon le Procédé a été faite en comparant la quantité de PrP<sup>Sc</sup> (seul marqueur biochimique de la maladie) contenue dans l'échantillon avant et après traitement « hautes pressions ».

Des échantillons de plasma sanguin ont été contaminés artificiellement soit par du broyat de cerveau de hamsters infectés par la souche 263K (Infected Brain Homogenate ou IBH), soit par du broyat de cerveau de hamsters sains (Normal Brain Homogenate ou NBH) par l'équipe de l'EFS-PM. Ils ont été placés dans des tubulures Macopharma avant d'être envoyés au CRHP pour subir les différents traitements « hautes pressions ».

Les échantillons ont été traités par paire. Ainsi, pour chaque traitement « hautes pressions » réalisés, une tubulure contenant de l'IBH a été soumise à la pression en même temps qu'une autre renfermant du NBH. Après application du procédé, les échantillons sont retournés à l'EFS-PM pour analyse.

L'analyse des échantillons a été réalisée par la technique du Western Blot (anticorps utilisé 3F4) après extraction de la protéine prion du plasma par précipitation à l'acide phosphotungstique et digestion par la protéinase K (PK). Cette dernière permet d'éliminer la forme normale de la protéine prion contenue dans les échantillons. L'anticorps 3F4 détecte les résidus d'acides aminés 109-112 de la protéine prion de hamster. (Figure III.27)



**Figure III.27** : Principe de la détection de la PrP<sup>Sc</sup>.

*PrP<sup>sen</sup>* : protéine normale – *PrP<sup>res</sup>* : protéine pathologique – PK : protéinase K. [304]

## **CHAPITRE IV : IMPACT DU BAREME DE PRESSION ET DES PARAMETRES ASSOCIES SUR L'ACTIVITE DES FACTEURS DE COAGULATION ET L'INACTIVATION DES MICRO-ORGANISMES AU SEIN DU PLASMA SANGUIN HUMAIN**

L'influence du paramètre PRESSION sur l'activité des protéines a fait l'objet de nombreux travaux (Cf. § I.2.1). La plupart des études antérieures concernées impliquait uniquement le barème (c'est-à-dire la valeur) de la pression appliquée. Celles-ci mettaient en évidence qu'au travers de l'altération de la structure des protéines - notamment de leur structure tertiaire – leur activité était fortement diminuée, ce phénomène menant jusqu'à la dénaturation. Dans certains cas, l'existence de liaisons fortes telles que des ponts disulfure permettait de sauvegarder l'activité jusqu'à des pressions plus élevées (> 400 MPa). Dans d'autres cas, relativement rares, le volume de la protéine dénaturée étant plus important que celui de celle native, l'application de hautes pressions renforçait alors sa stabilité et donc maintenait son activité.

Si des travaux antérieurs, menés notamment à l'ICMCB [305, 306], avaient montré que le mode d'application (continu ou cyclique) de la pression facilitait l'inactivation de micro-organismes, en revanche peu de travaux concernent l'influence de ce paramètre associé à la pression sur l'activité des protéines [281]

L'objectif de notre étude était d'évaluer le rôle de paramètres associés au barème de pression d'une part sur la sauvegarde de l'activité de protéines du plasma, celles-ci jouant un rôle important sur ses propriétés thérapeutiques, et d'autre part sur l'inactivation d'agents pathogènes.

Dans une première étape, trois facteurs de coagulation (VIIIc, V et XI) ont été choisis comme marqueurs de l'activité thérapeutique du plasma sanguin. Dans une seconde partie, cinq micro-organismes (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger* et *Bacillus subtilis*) ont été sélectionnés pour évaluer l'effet inactivant des différents traitements hautes pressions.



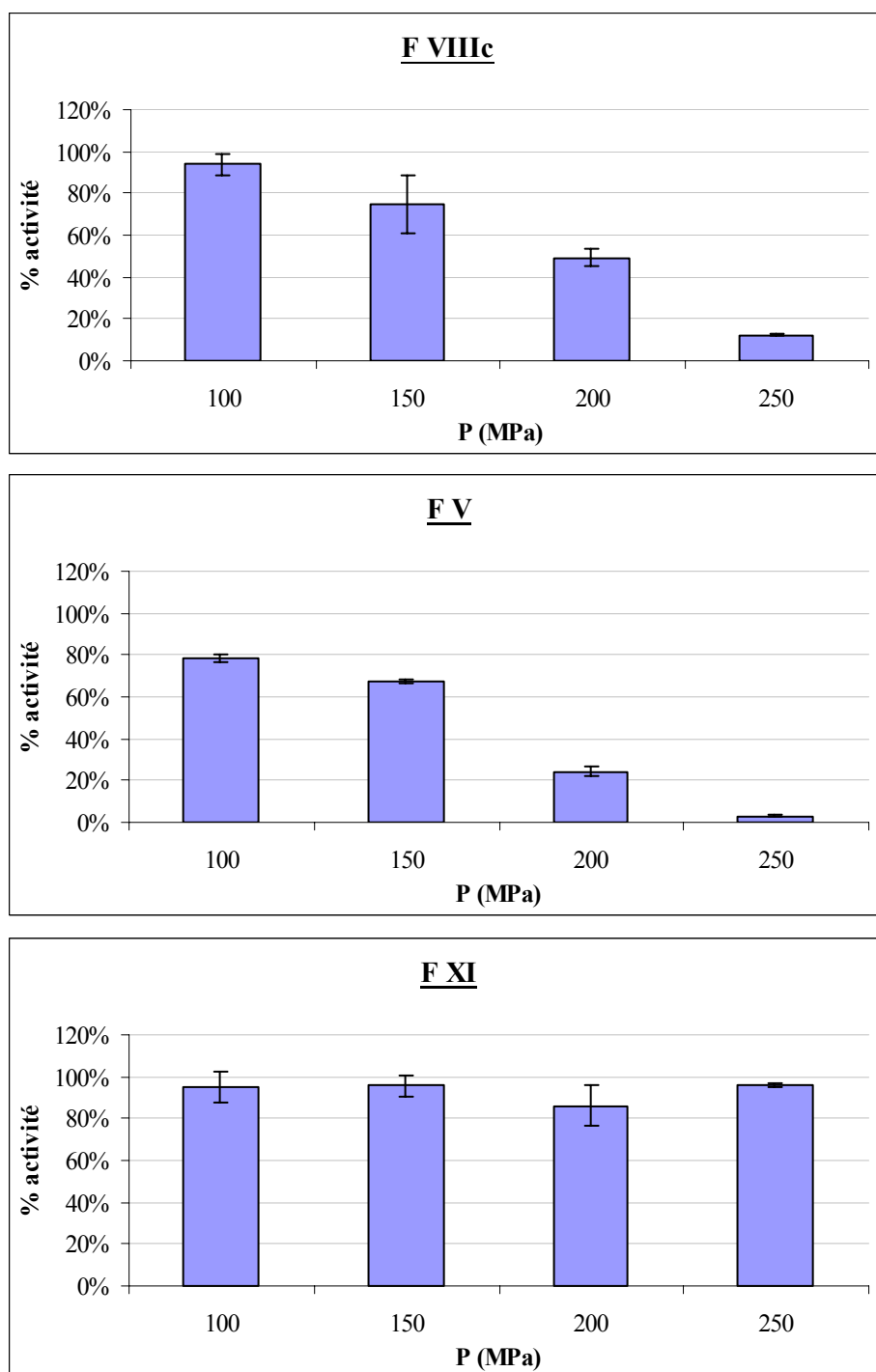
Trois paramètres associés au barème de pression ont été définis :

- la vitesse d'application de la pression (VA),
- le mode d'application de la pression (MA),
- la température (T).

La durée totale du traitement a été maintenue constante et égale à 10 min (ce qui est un temps relativement court dans la littérature faisant référence aux applications des hautes pressions dans le domaine des Biosciences).

Le choix de ces différents paramètres a été fait sur la base de plusieurs hypothèses et constats :

- en ce qui concerne la *vitesse d'application de la pression*, il est possible de supposer que la perte d'activité des protéines suite à l'application d'un traitement « hautes pressions » dépend entre autre du rapport entre la cinétique de dénaturation de cette protéine et la vitesse d'application de la pression,
- le *mode d'application cyclique*, quant à lui, a déjà démontré sa capacité à augmenter l'efficacité destructrice des traitements hautes pressions vis-à-vis des micro-organismes par rapport au mode d'application continu, probablement dû au fait de l'accumulation de stress,
- pour la *température*, il est généralement proposé que les premières couches de molécules d'eau environnant la protéine jouent un rôle important dans le phénomène de dénaturation sous pression au travers de l'altération des interactions hydrophobes. Une diminution de la température devrait limiter la diffusion de ces molécules et par conséquent minimiser le phénomène de dénaturation.



**Figure IV.1** : Effet du barème de pression sur l'activité des facteurs de coagulation  
 (VA = 3,3 MPa.s<sup>-1</sup>, MA = 10 min continu, T ≈ 25°C)

## **IV.1. Effet de traitements hautes pressions sur l'activité de facteurs de coagulation**

Afin d'étudier les conséquences des différents traitements hautes pressions sur les propriétés thérapeutiques du plasma sanguin, trois facteurs de coagulation ont été choisis comme marqueurs. Il s'agissait des facteurs VIIIc, V et XI, les législations française et européenne exigeant qu'ils soient dosés pour chaque don de plasma. Etant données les différences notables d'un individu à l'autre au niveau des concentrations en facteurs de coagulation, **l'ensemble des résultats a été exprimé en activité résiduelle relative**, c'est-à-dire en fonction du rapport entre l'activité après traitement hautes pressions et celle initiale avant traitement hautes pressions.

### ***IV.1.1. Rôle du barème de pression sur l'activité de facteurs de coagulation***

En utilisant une vitesse d'application de la pression (VA) généralement accessible par la plupart des équipements hautes pressions ( $3,3 \text{ MPa}\cdot\text{s}^{-1}$ ), une durée de traitement de 10 min en mode continu et une température ambiante ( $\approx 25^\circ\text{C}$ ), la figure IV.1 montre l'évolution de l'activité relative des trois facteurs de coagulation (F VIIIc, F V et F XI) en fonction de la pression dans un domaine de pressions moyennes ( $100 \text{ MPa} < P < 250 \text{ MPa}$ ).

La figure IV.1 montre clairement une différence de comportement entre les trois facteurs de coagulation testés. En effet, si le facteur XI est très résistant aux hautes pressions et conserve plus de 90 % de son activité initiale après un traitement à 250 MPa, en revanche les facteurs VIIIc et V sont plus sensibles et perdent plus de 90 % de leur activité à cette même pression. Cette différence de résistance au paramètre pression pourrait en partie s'expliquer par la structure des trois facteurs de coagulation. En effet, tous sont des multimères mais dans le cas du facteur XI, les sous-unités sont maintenues par un pont disulfure alors que pour les facteurs VIIIc et V l'association des sous-unités est stabilisée par un cation divalent. [287, 289, 293] Ce dernier type d'interaction étant plus fragile vis-à-vis de la pression que les ponts disulfure, il est probable que les sous-unités des facteurs VIIIc et V se dissocient à une pression plus faible que celles du facteur XI.

Après application d'une pression supérieure à 150 MPa, les valeurs d'activité résiduelle des facteurs VIIIc et V ne répondant pas aux normes imposées par les législations



française et européenne, l'objectif était alors de rechercher une optimisation globale des paramètres associés au traitement hautes pressions afin de maintenir une activité conforme à la réglementation.

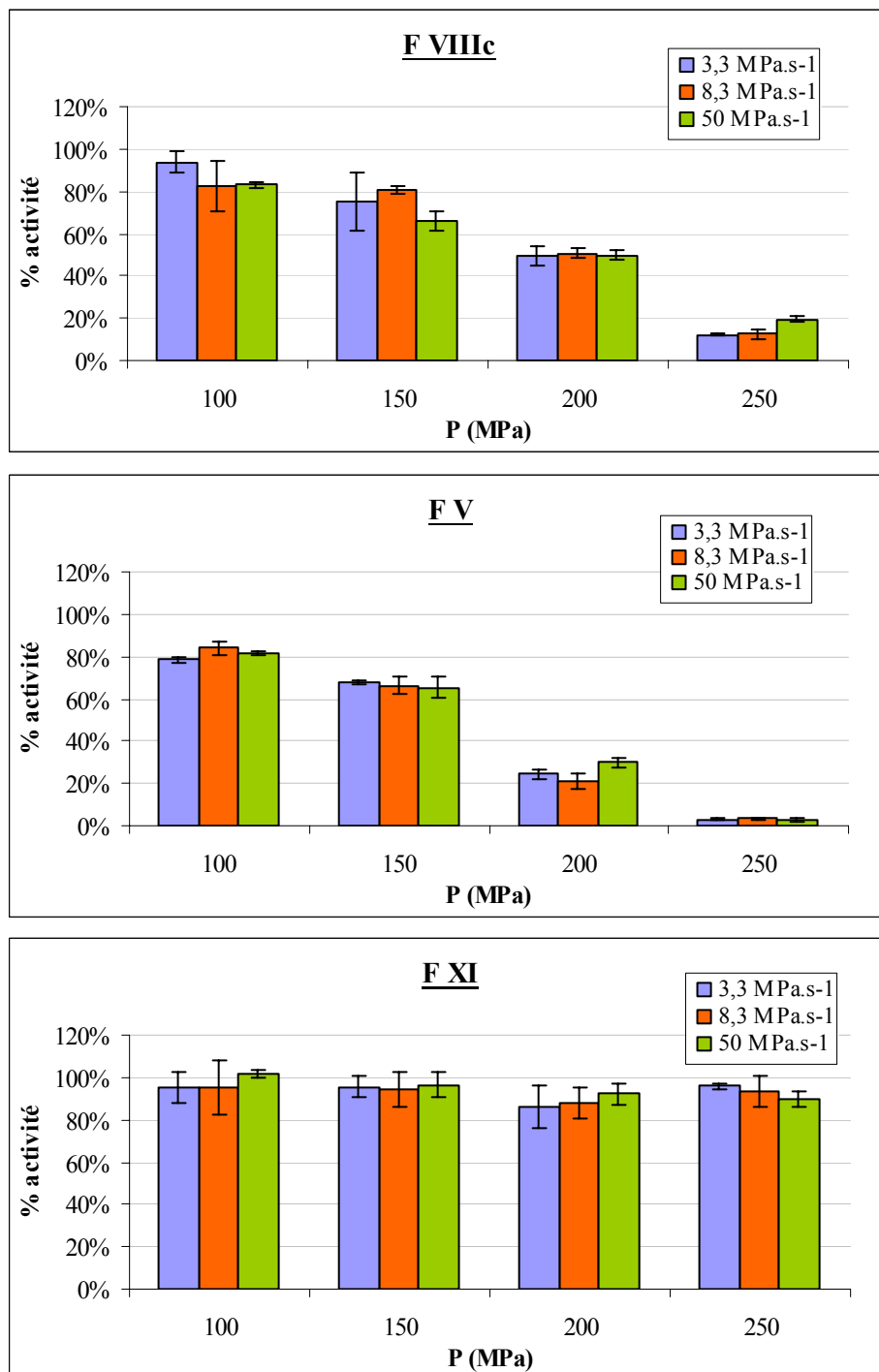


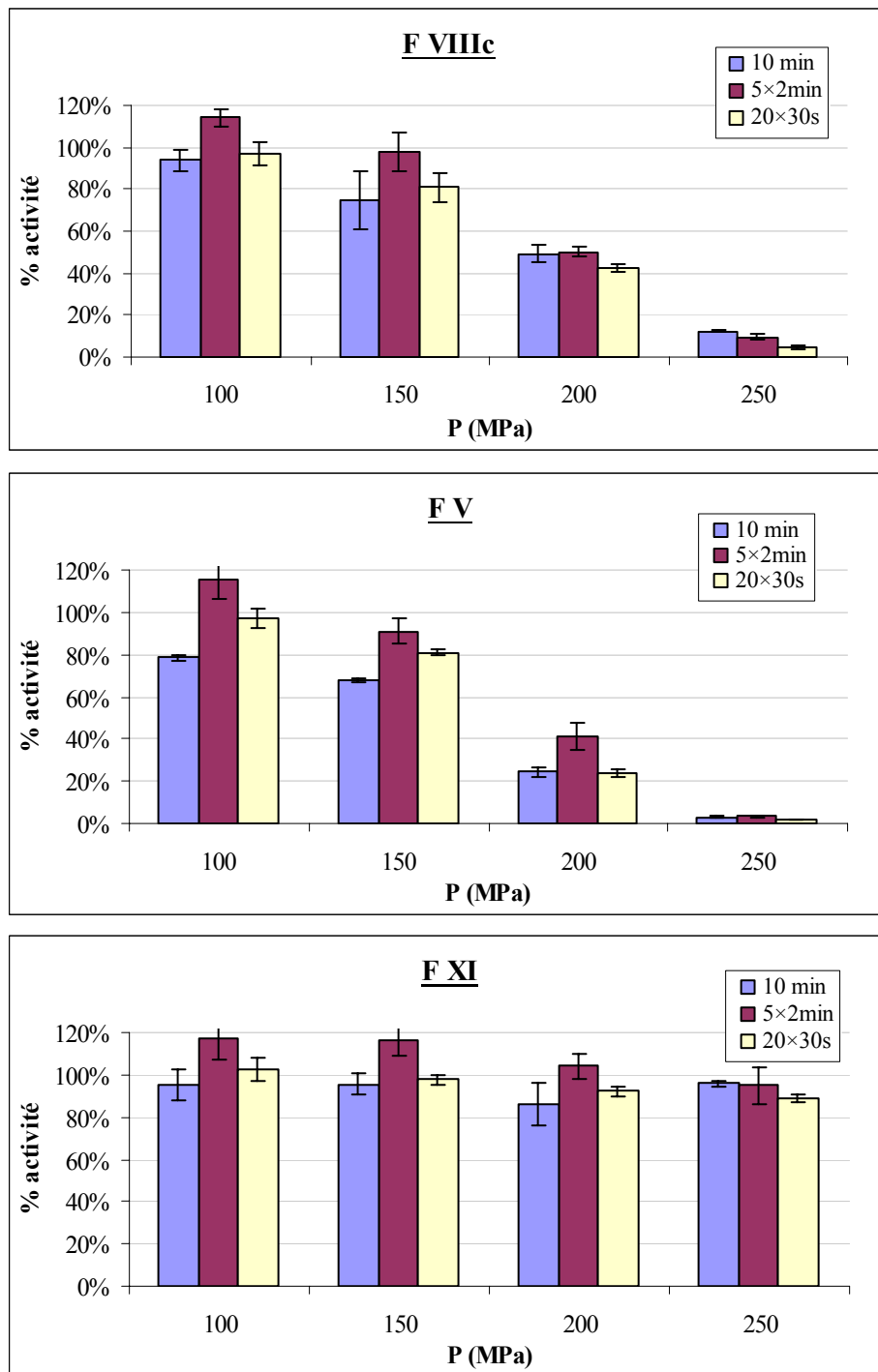
Figure IV.2 : Effet de la vitesse d'application de la pression sur l'activité des facteurs de coagulation (MA = 10 min continu, T ≈ 25°C)

### ***IV.1.2. Rôle de chacun des paramètres associés au barème de pression sur l'activité de facteurs de coagulation***

#### **IV.1.2.1. Influence de la vitesse d'application de la pression sur l'activité de facteurs de coagulation**

Le premier paramètre associé au traitement « hautes pressions » dont le rôle a été évalué était la vitesse d'application de la pression (VA). Trois vitesses ont été testées ( $3,3 \text{ MPa}\cdot\text{s}^{-1}$ ,  $8,3 \text{ MPa}\cdot\text{s}^{-1}$  et  $50 \text{ MPa}\cdot\text{s}^{-1}$ ) pour des valeurs croissantes de la pression (entre 100 MPa et 250 MPa) en conservant les autres paramètres constants, à savoir une durée de traitement de 10 min et une température ambiante. L'activité résiduelle des facteurs de coagulation à l'issue d'un tel traitement est donnée à la figure IV.2.

La figure IV.2 met en évidence que la vitesse d'application de la pression, utilisée seule comme paramètre associé, n'a peu ou pas d'effet (aux erreurs d'expérience près) sur la sauvegarde de l'activité des facteurs de coagulation au cours d'un traitement continu à température ambiante.

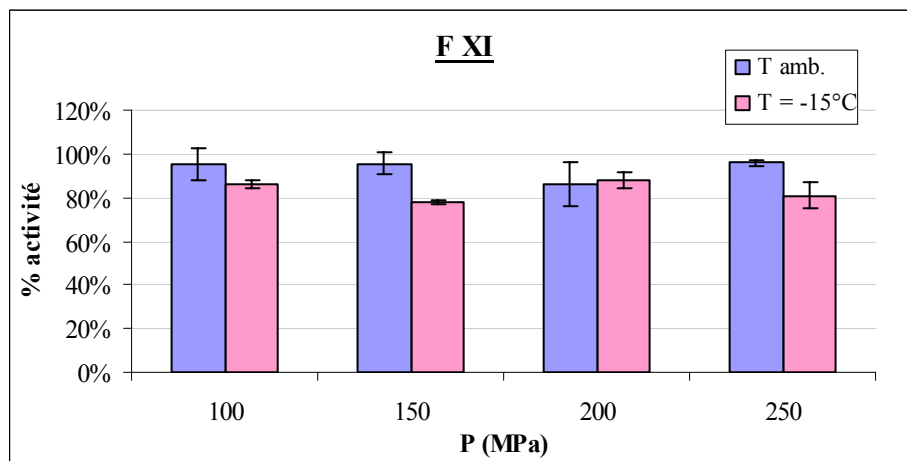
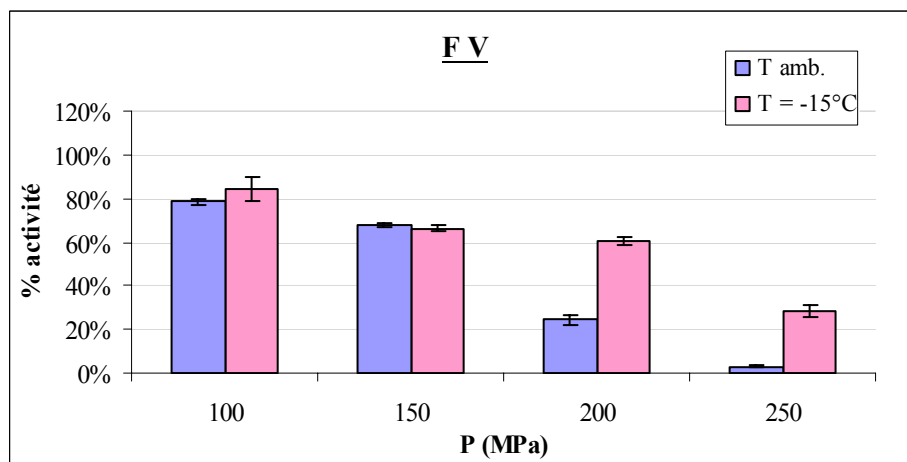
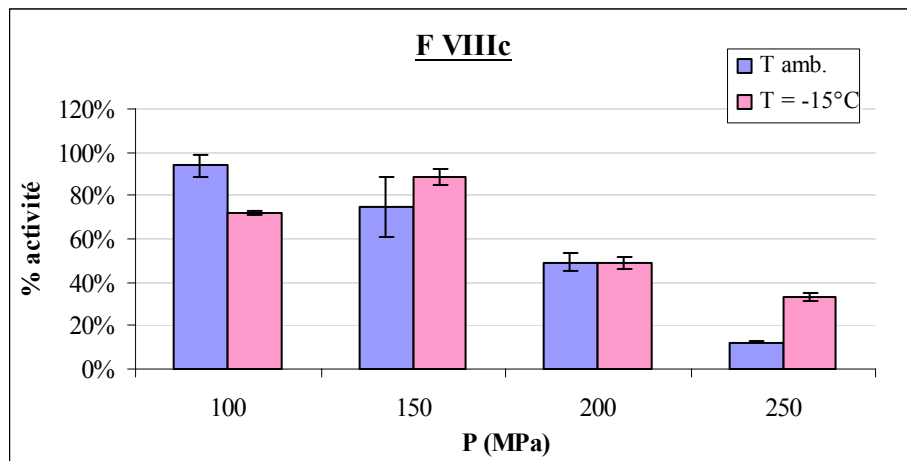


**Figure IV.3** : Effet du mode d'application de la pression sur l'activité des facteurs de coagulation  
 (VA = 3,3 MPa.s<sup>-1</sup>, T ≈ 25°C)

#### IV.1.2.2. Influence du mode d'application de la pression sur l'activité de facteurs de coagulation

De nombreux papiers décrivent que, pour une même durée d'application de la pression, le fait de diviser le traitement en plusieurs cycles permet d'augmenter l'effet inactivant vis-à-vis de nombreux agents pathogènes. [44, 307] Etant donné l'impact du cyclage sur l'efficacité destructrice, il était nécessaire de vérifier son effet sur les protéines plasmatiques. Pour cela, des échantillons de plasma ont été soumis à une pression comprise entre 100 MPa et 250 MPa à température ambiante, avec une vitesse d'application de 3,3 MPa.s<sup>-1</sup>. Deux types de modes d'application cyclique ont été évalués (5 cycles de 2 min ou 20 cycles de 30 s) et comparés au traitement continu (10 min).

L'analyse de la figure IV.3 montre que le mode d'application de la pression (MA) a peu d'effet sur la barorésistance des facteurs de coagulation. Seul un traitement de 5 cycles de 2 min aurait une légère tendance à augmenter leur activité résiduelle mais les erreurs d'expérimentation ne permettent pas de conclure avec certitude sur cet impact.



**Figure IV.4** : Effet de la température sur l'activité des facteurs de coagulation  
(VA = 3,3 MPa.s<sup>-1</sup>, MA = 10 min continu)

#### IV.1.2.3. Influence de la température du traitement sur l'activité de facteurs de coagulation

La troisième étape de cette étude sur l'influence de chacun des facteurs associés à la pression portait sur le rôle de la température. Ainsi, les différents traitements étaient appliqués pendant 10 min, avec une vitesse d'application de  $3,3 \text{ MPa.s}^{-1}$  à des pressions variant entre 200 et 250 MPa. En revanche, les traitements ont été réalisés pour deux valeurs de la température : l'ambiante et  $-15^{\circ}\text{C}$ .

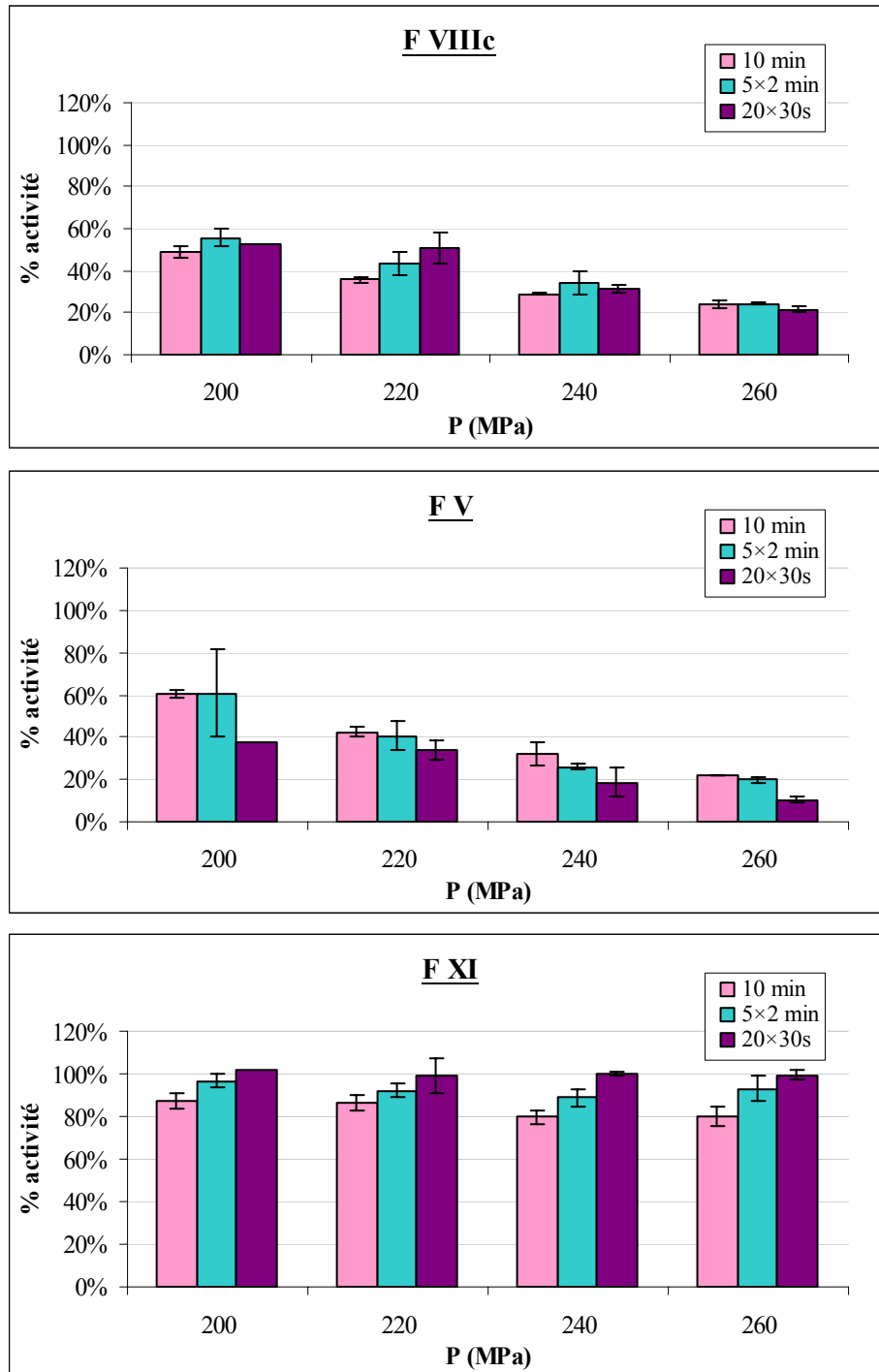
La figure IV.4 permet de mettre en évidence l'impact positif d'un traitement à température négative sur la sauvegarde de l'activité de certaines protéines, en particulier du facteur de coagulation V, quand la valeur de la pression est d'au moins 200 MPa. En effet, à 200 MPa, l'activité résiduelle du facteur V après un traitement à  $-15^{\circ}\text{C}$  est d'environ 60 % alors qu'elle avoisinait les 20 % après un traitement à température ambiante. En revanche, l'effet des basses températures est moins marqué pour le facteur VIIIc dont l'activité reste aux alentours de 50 % à cette même pression quelle que soit la température. Pour ce facteur, une faible baroprotection par les températures négatives n'apparaît qu'à 250 MPa. Quant au facteur XI, il reste toujours aussi insensible aux effets de pression. Ainsi, dans le développement d'un procédé de sécurisation du plasma sanguin, le choix d'une température négative semble devoir être privilégiée.

La baroprotection apportée par les basses températures pourrait en partie être due à la réduction de la mobilité des molécules d'eau dans ces conditions, restreignant ainsi l'altération des interactions hydrophobes. Celles-ci jouant un rôle important dans le maintien de la conformation des protéines, le fait de limiter leur dégradation doit également amoindrir le phénomène de dénaturation.

#### IV.1.2.4. Conclusion

L'ensemble des résultats précédents présentent l'effet de la conjugaison du barème de pression avec un des paramètres associés aux traitements « hautes pressions », à savoir : la vitesse d'application de la pression, le mode d'application de la pression et la température.

Parmi toutes les combinaisons testées, seule l'utilisation de températures négatives a montré sa capacité à augmenter la barotolérance des facteurs de coagulation, et principalement du facteur V. La suite du travail a alors consisté à associer deux paramètres au barème de pression afin de déterminer si une amplification de l'effet baroprotecteur pouvait être acquise.



**Figure IV.5 :** Effet du mode d'application de la pression sur l'activité des facteurs de coagulation au cours d'un traitement à température négative avec une vitesse d'application faible ( $VA = 3,3 \text{ MPa}\cdot\text{s}^{-1}$ ,  $T \approx -15^\circ\text{C}$ )

### ***IV.1.3. Influence de la conjugaison de paramètres associés à la pression sur l'activité de facteurs de coagulation***

#### **IV.1.3.1. Influence de l'association entre mode d'application cyclique et température négative sur l'activité de facteurs de coagulation**

Dans un premier temps, l'effet du mode d'application de la pression (MA) a été évalué au cours d'un traitement à température négative (-15°C) avec une vitesse d'application (VA) conventionnelle de 3,3 MPa.s<sup>-1</sup> et des valeurs de la pression variant entre 200 et 260 MPa. Cette dernière a été appliquée pendant 10 minutes, soit de façon continue, soit divisée en 5 cycles de 2 min ou en 20 cycles de 30 s chacun.

L'examen de la figure IV.5 montre que, lorsque le traitement « hautes pressions » est réalisé à température négative, le mode d'application de la pression a peu d'effet sur l'activité résiduelle des facteurs de coagulation testés. Seules deux tendances émergent de ces résultats mais ne peuvent pas être confirmées du fait des erreurs d'expérimentation :

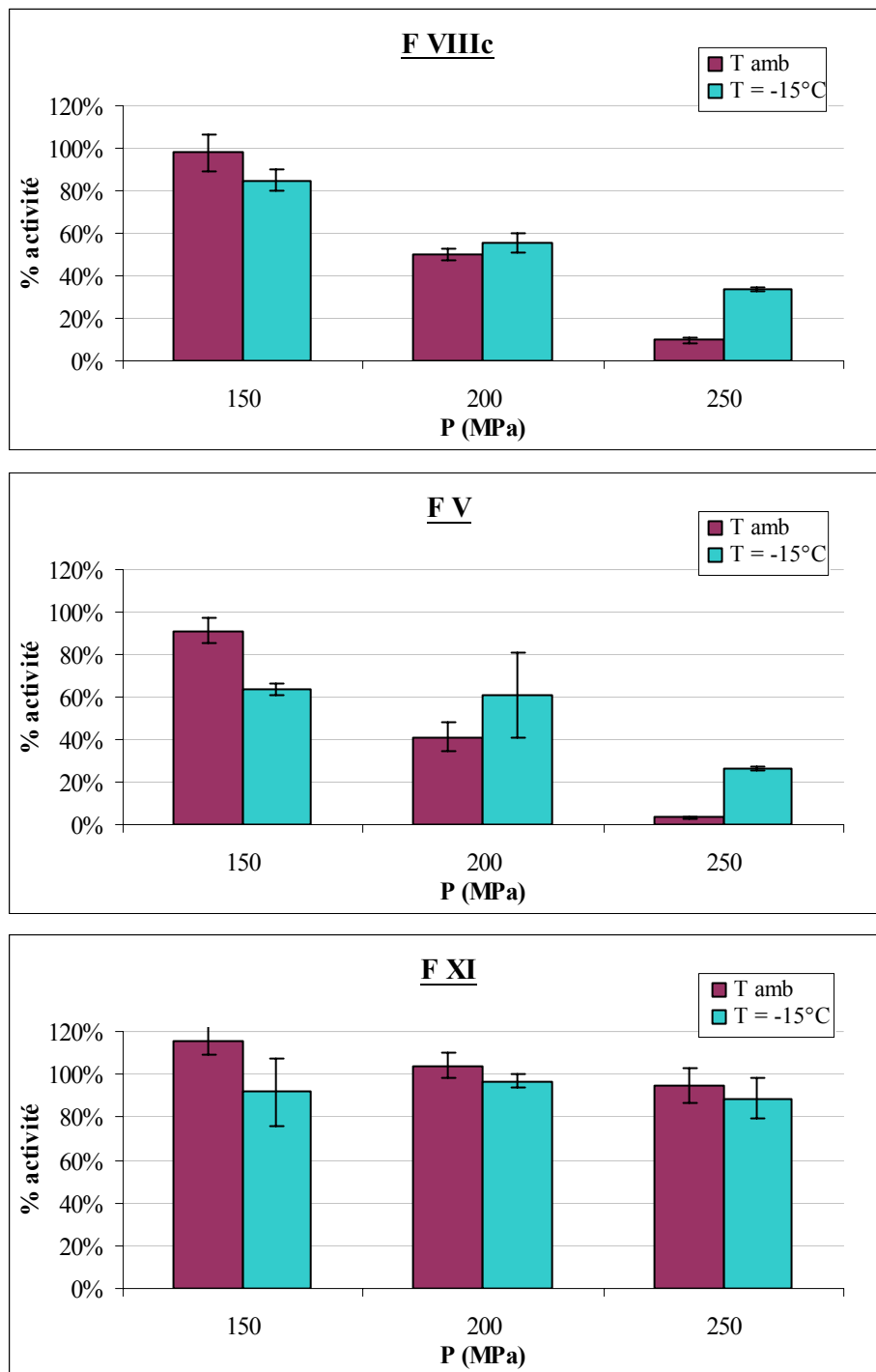
- pour le facteur de coagulation VIIIc, un traitement cyclique aurait éventuellement un léger effet baroprotecteur,
- en ce qui concerne le facteur V, le fait d'utiliser un traitement de 20 cycles de 30 s semble diminuer sa résistance à la pression.

*La superposition de ces deux résultats tendrait à montrer qu'à température négative, dans le cas du choix d'un traitement cyclique, celui-ci ne devrait pas comporter un trop grand nombre de cycles.*





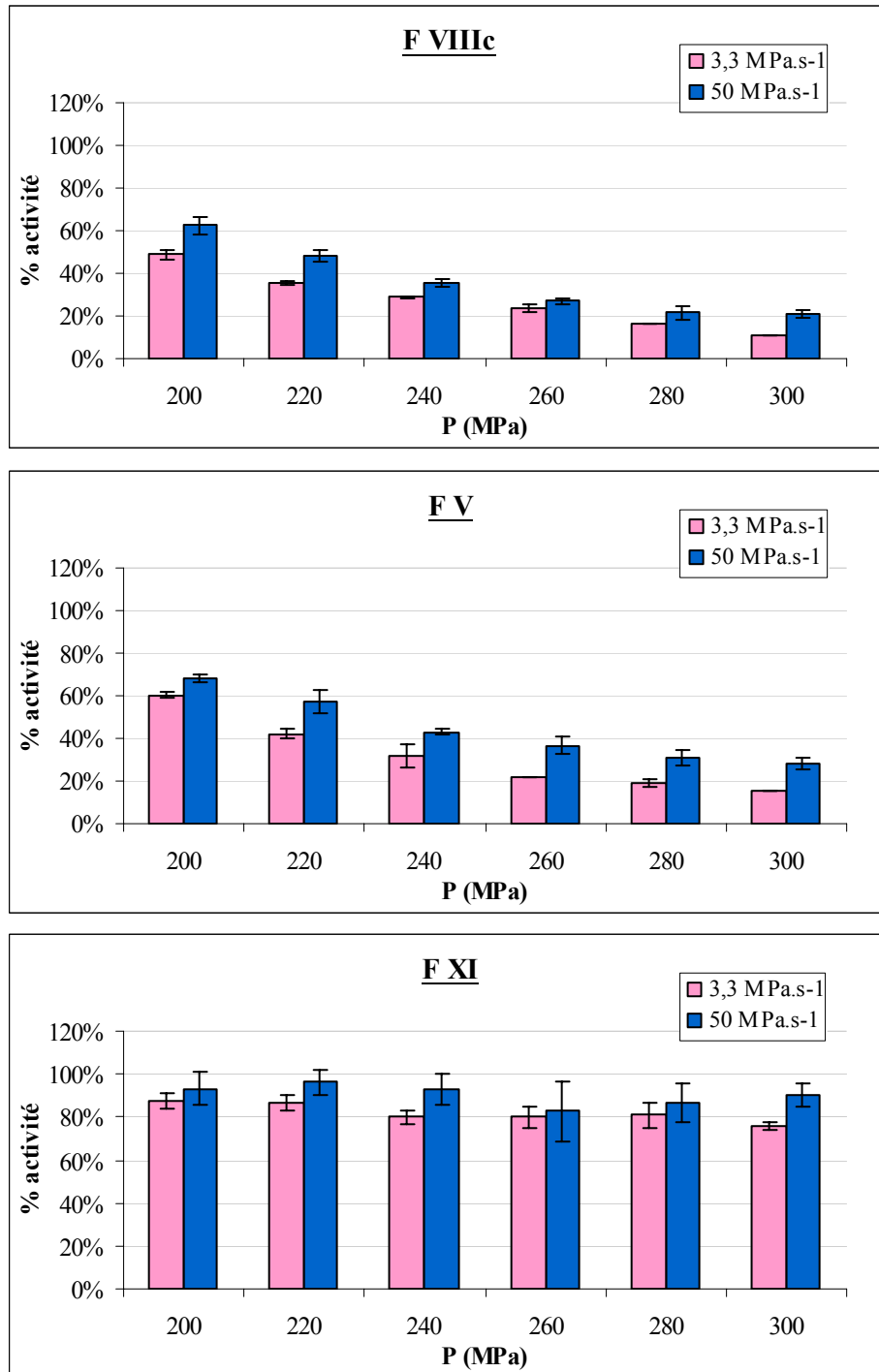
Dans une deuxième étape, le rôle de la température au cours d'un traitement cyclique (5 cycles de 2 min) avec une vitesse d'application de  $3,3 \text{ MPa}\cdot\text{s}^{-1}$  a été évalué.



**Figure IV.6 :** Effet de la température sur l'activité des facteurs de coagulation au cours d'un traitement cyclique avec une vitesse d'application faible (VA =  $3,3 \text{ MPa}\cdot\text{s}^{-1}$ , MA =  $5 \times 2 \text{ min}$ )

La figure IV.6 permet à nouveau d'observer un léger effet positif des températures négatives sur la sauvegarde de l'activité des facteurs de coagulation, et en particulier du

facteur V. Ainsi, après un traitement de 5 cycles de 2 min à  $-15^{\circ}\text{C}$ , l'activité du facteur V est augmentée de 20 % par rapport à un traitement avec le même mode d'application à température ambiante.



**Figure IV.7** : Effet de la vitesse d'application de la pression sur l'activité des facteurs de coagulation au cours d'un traitement continu à température négative (MA = 10 min continu,  $T \approx -15^{\circ}\text{C}$ )

#### IV.1.3.2. Influence de l'association entre vitesse d'application de la pression et température négative sur l'activité de facteurs de coagulation

Afin d'évaluer le rôle de la combinaison entre vitesse d'application de la pression (VA) et température négative, les échantillons de plasma ont été traités à  $-15^{\circ}\text{C}$  pendant 10 min de manière continue. Deux vitesses d'application ont été utilisées, l'une conventionnelle ( $3,3 \text{ MPa}\cdot\text{s}^{-1}$ ) et l'autre rapide ( $50 \text{ MPa}\cdot\text{s}^{-1}$ ).

Alors que la vitesse d'application ne semblait pas modifier de manière significative la barotolérance des facteurs de coagulation au cours d'un traitement continu à température ambiante (Figure IV.7), lorsque celui-ci est réalisé à  $-15^{\circ}\text{C}$ , une vitesse d'application de  $50 \text{ MPa}\cdot\text{s}^{-1}$  permet d'augmenter en moyenne de 10 % les activités résiduelles des protéines les plus sensibles à la pression : les facteurs VIIIc et V.

#### IV.1.3.3. Conclusion

L'examen des résultats obtenus concernant l'effet de la conjugaison de paramètres associés au traitement hautes pressions confirme l'effet baroprotecteur des températures négatives vis-à-vis des facteurs de coagulation. De plus, même si leur impact est moins marqué, un mode d'application cyclique et une vitesse d'application élevée ( $50 \text{ MPa}\cdot\text{s}^{-1}$ ) pourraient également favoriser la résistance des facteurs de coagulation sous pression. ***Néanmoins, quelles que soient les combinaisons de paramètres utilisées, et afin de répondre aux normes imposées par la Pharmacopée Européenne, le procédé hautes pressions de sécurisation du plasma sanguin devra faire appel à des pressions relativement basses, à savoir inférieures à 250 MPa.***

Tout procédé de sécurisation du plasma doit assurer le maintien de l'activité des protéines plasmatiques d'une part, tout en conduisant à l'inactivation des agents pathogènes d'autre part. Il était donc nécessaire de rechercher, dans une deuxième étape, les conditions de traitement permettant d'inactiver les micro-organismes contaminants même à plus faible pression. Pour cela, *Staphylococcus aureus* a été sélectionné comme modèle car il a été

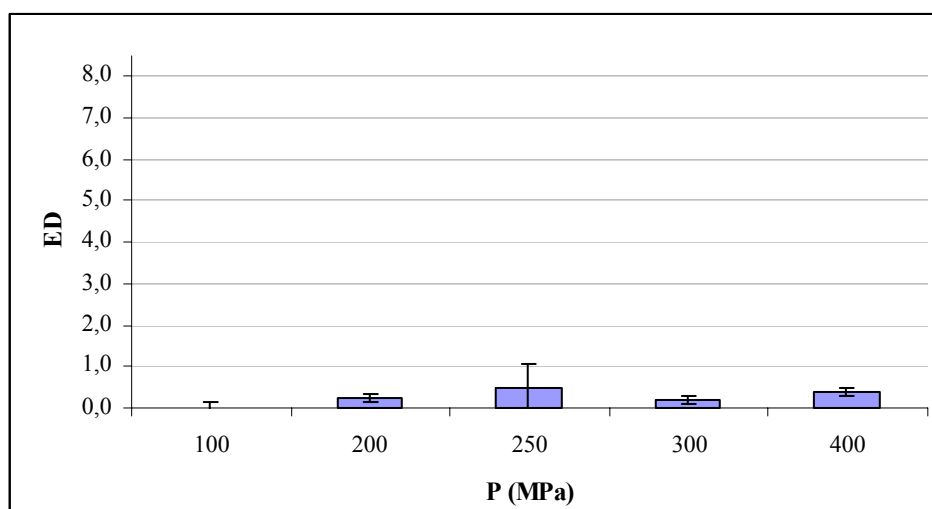
montré dans de nombreux articles que cette bactérie présentait une barorésistance assez élevée et n'était inactivée qu'à partir d'une pression minimum de 400 MPa. [308]

#### **IV.2. Effet de traitements hautes pressions sur l'inactivation de *Staphylococcus aureus***

Pour l'ensemble de cette étude, des échantillons de plasma sanguin ont été contaminés par une suspension de *Staphylococcus aureus* de façon à obtenir une concentration initiale de  $10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup> (équivalent à 8 log), puis conservés au congélateur (-18°C) dans l'attente du traitement hautes pressions. A l'issue de chaque traitement, un dénombrement dans la masse de la population initiale et résiduelle a permis de déterminer son efficacité destructrice (ED). Celle-ci est exprimée en log<sub>10</sub> du rapport entre la population bactérienne après traitement hautes pressions (N) et la population initiale (N<sub>0</sub>), soit  $ED = -\log\left(\frac{N}{N_0}\right)$ .

##### ***IV.2.1. Rôle du barème de pression sur l'inactivation de *Staphylococcus aureus****

Dans un premier temps, l'inactivation de *S. aureus*, mis en suspension dans du plasma sanguin, a été évaluée après un traitement hautes pressions dans des conditions conventionnelles, à savoir un traitement continu de 10 min à température ambiante, avec une vitesse d'application de 3,3 MPa.s<sup>-1</sup>, pour des pressions variant entre 100 et 400 MPa.



**Figure IV.8 :** Effet du barème de pression sur l'inactivation de *Staphylococcus aureus*  
(VA = 3,3 MPa.s<sup>-1</sup>, MA = 10 min continu, T ≈ 25°C)

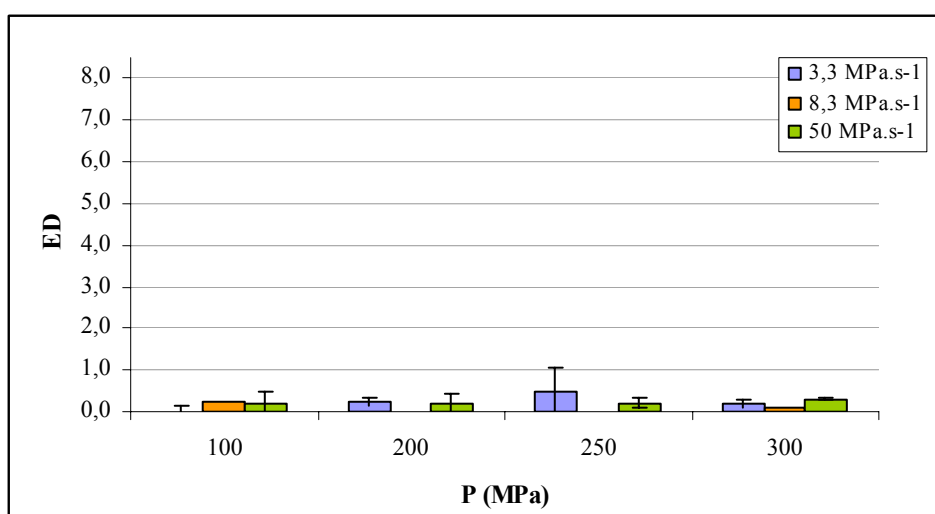
Les résultats présentés à la figure IV.8 soulignent la barorésistance d'un micro-organisme tel que *Staphylococcus aureus* (Gram positif). En effet, même suite à un traitement de 10 min à 400 MPa, seule une très faible diminution de la population initiale est observée.

#### ***IV.2.2. Rôle de chacun des paramètres associés au barème de pression sur l'inactivation de Staphylococcus aureus***

Dans une première phase, l'impact de chacun des paramètres associés au barème de pression a été évalué.

#### IV.2.2.1. Influence de la vitesse d'application de la pression sur l'inactivation de *Staphylococcus aureus*

La vitesse d'application de la pression (VA) ayant tout d'abord été choisie comme variable, trois valeurs ont été testées : 3,3 MPa.s<sup>-1</sup>, 8,3 MPa.s<sup>-1</sup> et 50 MPa.s<sup>-1</sup>. Les autres valeurs des paramètres associés demeurant constantes, les échantillons de plasma contaminé par *S. aureus* ont été soumis à un traitement continu de 10 min à température ambiante et à des pressions comprises entre 100 MPa et 300 MPa.

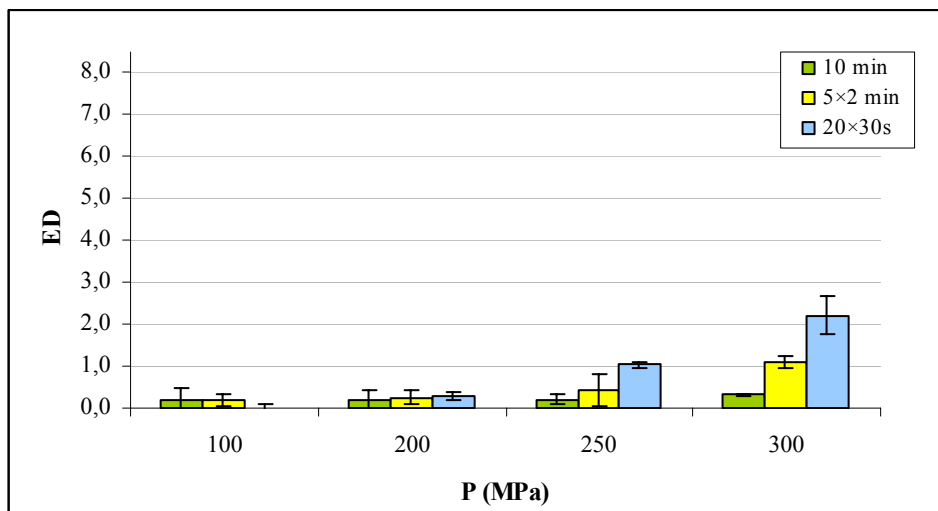


**Figure IV.9** : Effet de la vitesse d'application de la pression sur l'inactivation de *Staphylococcus aureus*  
(MA = 10 min continu, T ≈ 25°C)

La figure IV.9 met en évidence que le fait d'augmenter la vitesse d'application de la pression au cours d'un traitement continu de 10 min à température ambiante ne permet pas d'améliorer l'efficacité destructrice du traitement hautes pressions. En tenant compte de ce résultat, les traitements suivants ont été réalisés en maintenant une vitesse d'application rapide (50 MPa.s<sup>-1</sup>) et en combinant un à un les autres paramètres associés à la pression (MA et T).

#### IV.2.2.2. Influence du mode d'application de la pression sur l'inactivation de *Staphylococcus aureus*

Afin d'examiner l'effet du mode d'application de la pression, les différents échantillons de plasma contaminé par *S. aureus* ont été traités à température ambiante avec une vitesse d'application de la pression de  $50 \text{ MPa}\cdot\text{s}^{-1}$ . La durée totale de maintien en pression était de 10 min, mais celle-ci était appliquée soit une seule fois de manière continue, soit divisée en plusieurs cycles (5 cycles de 2 min ou 20 cycles de 30 s).



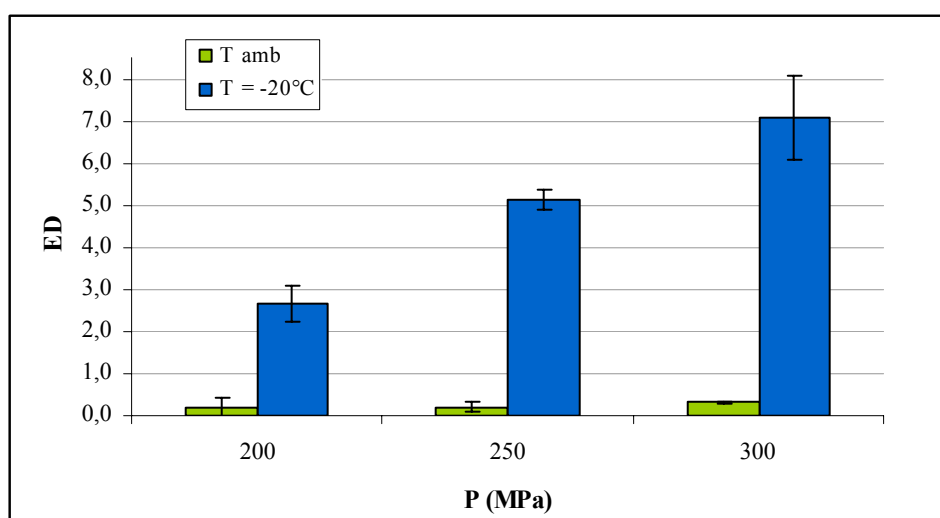
**Figure IV.10** : Effet du mode d'application de la pression sur l'inactivation de *Staphylococcus aureus* (VA =  $50 \text{ MPa}\cdot\text{s}^{-1}$ ,  $T \approx 25^\circ\text{C}$ )

La figure IV.10 montre l'effet positif du cyclage sur la capacité d'inactivation des hautes pressions. En effet, à 300 MPa, en conservant tous les autres paramètres (VA et T) constants, alors qu'un traitement continu de 10 min ne permettait pas d'inactiver *S. aureus*, le fait d'utiliser un traitement cyclique favorise son inactivation. Ainsi, après application de 20 cycles de 30 s ou de 5 cycles de 2 min, la valeur de l'efficacité destructrice atteint respectivement 2 et 1. Par conséquent, le fait de fractionner le traitement en plusieurs pulses rend *S. aureus* plus sensible et d'autant plus que le nombre de cycles augmente. Ce phénomène pourrait être expliqué par l'accumulation du nombre de stress sur les cellules bactériennes, ce qui les fragiliserait.



#### IV.2.2.2. Influence de la température sur l'inactivation de *Staphylococcus aureus*

Etant donné le rôle important que jouent les basses températures sur la barorésistance des facteurs de coagulation, il était nécessaire d'observer également leur effet sur l'inactivation de *S. aureus*. Pour cela, un mode d'application continu durant 10 min avec une vitesse d'application de  $50 \text{ MPa}\cdot\text{s}^{-1}$  a été utilisé. Deux températures de traitement ont été comparées : la température ambiante et une température d'environ  $-20^\circ\text{C}$ .



**Figure IV.11** : Effet de la température sur l'inactivation de *Staphylococcus aureus*  
(VA =  $50 \text{ MPa}\cdot\text{s}^{-1}$ , MA = 10 min continu)

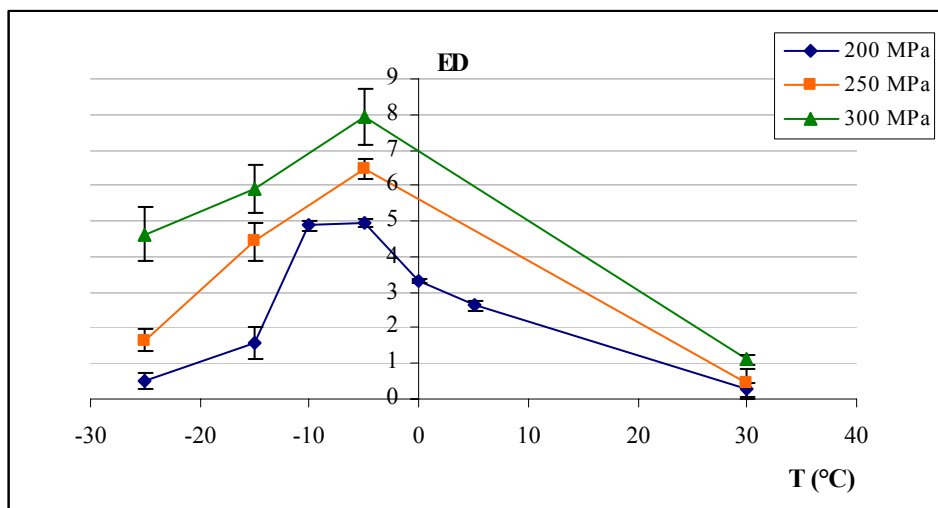
Les résultats reportés à la figure IV.11 attestent de l'impact important de l'association de températures négatives au traitement « hautes pressions » sur la fragilisation de *S. aureus*. En effet, après un traitement de 10 min à 250 MPa, alors qu'à température ambiante, l'efficacité destructrice était quasi nulle, à  $-20^\circ\text{C}$ , celle-ci atteint une valeur supérieure à 5. Un tel effet pourrait être lié à la réduction de la fluidité de la membrane bactérienne à basses températures, ce qui la rendrait plus sensible à l'action des hautes pressions. La membrane étant fragilisée, les cellules bactériennes sont alors plus facilement inactivées.

### IV.2.3. Rôle de la conjugaison de paramètres associés à la pression sur l'inactivation de *Staphylococcus aureus*

Les résultats précédents ont démontré que deux principaux paramètres permettaient d'augmenter l'efficacité destructrice du traitement hautes pressions vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* : un mode d'application cyclique et une température négative. Il était alors intéressant de les associer afin d'observer une éventuelle amplification de l'inactivation de ce micro-organisme.

#### IV.2.3.1. Influence de la température au cours d'un traitement cyclique avec une vitesse d'application rapide sur l'inactivation de *Staphylococcus aureus*

Afin de déterminer la température à laquelle l'efficacité destructrice d'un traitement associant un mode d'application cyclique (5 cycles de 2 min) et une vitesse d'application rapide ( $50 \text{ MPa}\cdot\text{s}^{-1}$ ) est maximale, des échantillons de plasma contaminé par *S. aureus* ont été soumis à plusieurs traitements pour des valeurs de la pression comprise entre 200 MPa et 300 MPa et une température variant de  $-25^\circ\text{C}$  à  $+30^\circ\text{C}$ .



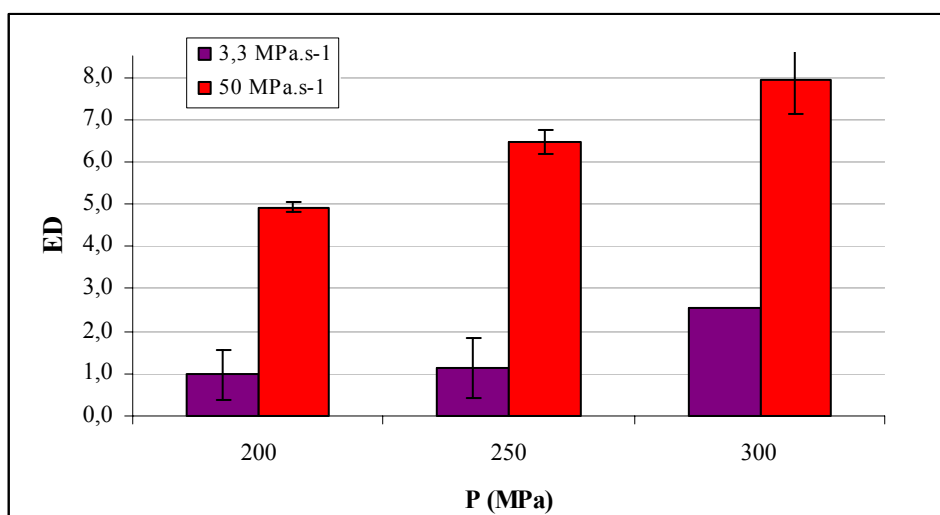
**Figure IV.12** : Effet de la température sur l'inactivation de *Staphylococcus aureus* au cours d'un traitement cyclique avec une vitesse d'application rapide (VA =  $50 \text{ MPa}\cdot\text{s}^{-1}$ , MA =  $5 \times 2 \text{ min}$ )

L'analyse de la figure IV.12, représentant l'évolution de l'efficacité destructrice en fonction de la température du traitement pour différentes valeurs de pression, montre qu'il existe un domaine de température où cette ED est maximale. En effet, à 300 MPa, lorsque la température est d'environ  $-5^{\circ}\text{C}$ , la valeur de l'ED atteint presque 8, ce qui correspond à l'inactivation de l'ensemble de la population de *S. aureus* initialement présente. Il faut également noter qu'à 200 MPa, c'est-à-dire dans un domaine de pression où les facteurs de coagulation conservent plus de 50% de leur activité, l'application d'un traitement de 5 cycles de 2 min avec une vitesse d'application de  $50 \text{ MPa}\cdot\text{s}^{-1}$  à une température comprise entre  $-10^{\circ}\text{C}$  et  $-5^{\circ}\text{C}$  permet d'aboutir à une valeur de l'ED de l'ordre de 5. Il existe donc un effet de synergie entre mode d'application cyclique ( $5 \times 2 \text{ min}$ ), vitesse d'application rapide ( $50 \text{ MPa}\cdot\text{s}^{-1}$ ) et température négative ( $-10^{\circ}\text{C} < T < -5^{\circ}\text{C}$ ) qui rend *S. aureus* plus barosensible.

*Il est probable que l'inactivation d'un micro-organisme sous pression faisant appel à des processus complexes mettant en jeu des réponses biomoléculaires, l'association de ces divers paramètres permettrait d'activer plusieurs processus à la fois et donc d'obtenir un maximum d'efficacité dans une gamme particulière de température.*

#### IV.2.3.2. Rôle de la vitesse d'application de la pression au cours d'un traitement cyclique à température négative sur l'inactivation de *Staphylococcus aureus*

Compte tenu des résultats précédemment obtenus, il était intéressant d'évaluer l'importance de chaque paramètre sur l'effet de synergie observé. Dans un premier temps, l'impact de la vitesse d'application sur l'inactivation de *S. aureus* en suspension dans le plasma au cours d'un traitement de 5 cycles de 2 min à  $-5^{\circ}\text{C}$  a été étudié pour des valeurs croissantes de la pression (de 200 MPa à 300 MPa). Deux vitesses d'application ont alors été utilisées :  $3,3 \text{ MPa}\cdot\text{s}^{-1}$  ou  $50 \text{ MPa}\cdot\text{s}^{-1}$ .

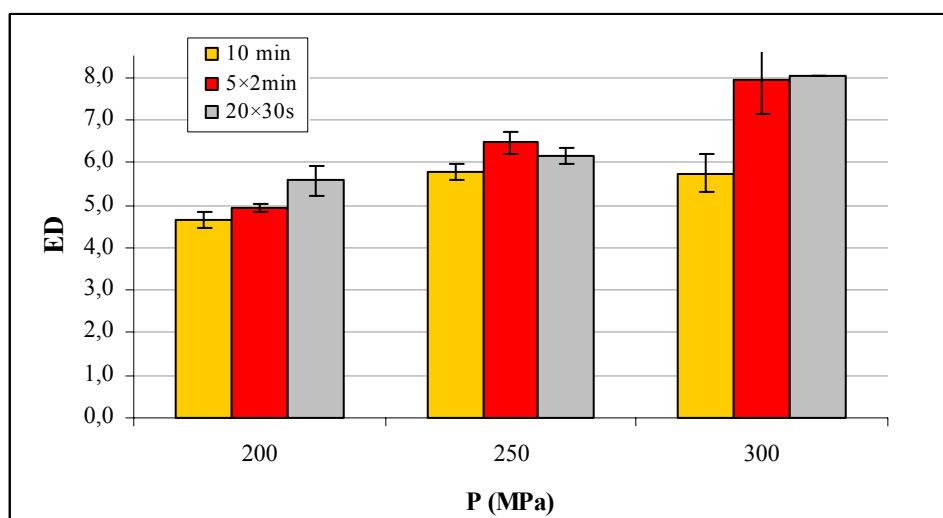


**Figure IV.13** : Effet de la vitesse d'application de la pression sur l'inactivation de *Staphylococcus aureus* au cours d'un traitement cyclique à température négative (MA = 5×2min, T ≈ -5°C)

Les résultats observés sur la figure IV.13 montrent sans ambiguïté l'importance du choix de la vitesse d'application. En effet, la mise en œuvre d'une vitesse d'application rapide (50 MPa.s<sup>-1</sup>) lors d'un traitement de 5 cycles de 2 min à -5°C permet d'augmenter considérablement l'efficacité destructrice vis-à-vis de *S. aureus* par rapport au même traitement réalisé avec une vitesse d'application plus lente (3,3 MPa.s<sup>-1</sup>). Ainsi, à 250 MPa, l'efficacité destructrice est accrue de plus de 5 unités en choisissant une vitesse d'application de 50 MPa.s<sup>-1</sup> au lieu de 3,3 MPa.s<sup>-1</sup>.

#### IV.2.3.3. Rôle du mode d'application de la pression au cours d'un traitement à température négative avec une vitesse d'application rapide sur l'inactivation de *Staphylococcus aureus*

Afin d'observer l'effet du mode d'application sur l'inactivation de *S. aureus* au cours d'un traitement à -5°C avec une vitesse d'application de 50 MPa.s<sup>-1</sup>, différents types de traitement (10 min continu, 5 cycles de 2 min ou 20 cycles de 30 s), en conservant une durée totale de maintien en pression de 10 min, ont été réalisés.



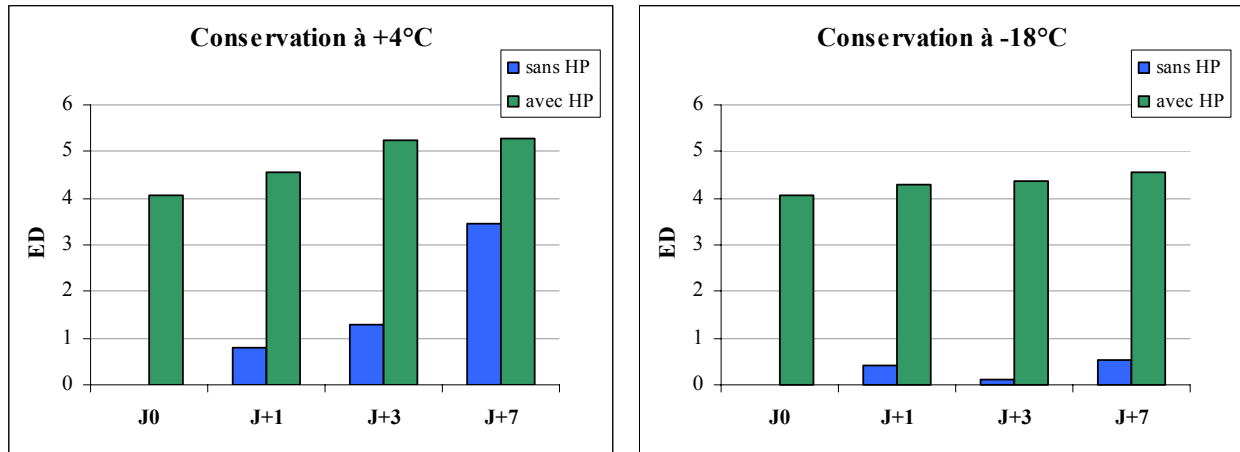
**Figure IV.14** : Effet du mode d'application de la pression sur l'inactivation de *Staphylococcus aureus* au cours d'un traitement cyclique avec une vitesse d'application rapide (VA = 50 MPa.s<sup>-1</sup>, T ≈ -5°C)

Les résultats présentés à la figure IV.14 mettent une nouvelle fois en évidence l'effet positif du traitement cyclique par rapport à celui en continu sur la barosensibilité de *S. aureus*. Ainsi, à 250 MPa, la valeur de l'efficacité destructrice passe de 5,8 à 6,5 en remplaçant un traitement de 10 min continu par un traitement de 5 cycles de 2 min. De plus, l'augmentation de la fréquence du cyclage permet d'accroître légèrement cette sensibilité. Néanmoins, le faible bénéfice acquis par l'utilisation d'un mode d'application de 20 cycles de 30 s est contrebalancé par la difficulté de mise en œuvre industrielle d'un tel traitement. Par conséquent, dans le développement d'un procédé de sécurisation du plasma sanguin, le choix d'un traitement de 5 cycles de 2 min semble plus judicieux.

#### ***IV.2.4. Essai de revivification après traitement hautes pressions de plasma contaminé par *Staphylococcus aureus****

Après un traitement à 200 MPa associé à une vitesse d'application de 50 MPa.s<sup>-1</sup>, un mode d'application de 5 cycles de 2 min et une température de -5°C, une efficacité destructrice proche de 5 pour *S. aureus* est observée. Il n'est cependant pas certain qu'un tel effet soit définitif. En effet, tout traitement d'inactivation de pathogènes peut provoquer des lésions sous-létales susceptibles d'être réparées à long terme, entraînant alors une reprise de croissance. Afin de vérifier une éventuelle revivification, les échantillons de plasma

contaminé par *S. aureus* traités selon le protocole décrit plus haut ont été conservés jusqu'à sept jours, soit à +4°C, soit à -18°C. Un dénombrement de la population résiduelle de *S. aureus* est alors réalisé à plusieurs intervalles de temps.



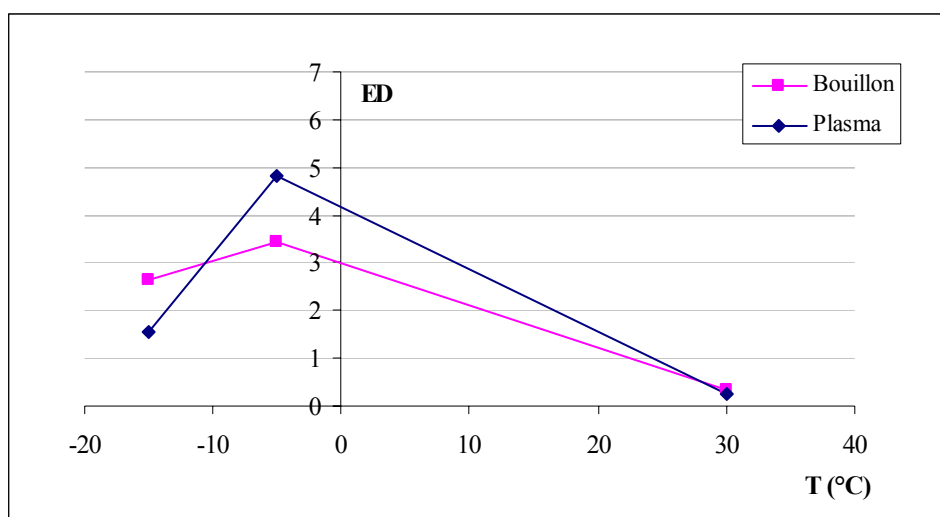
**Figure IV.15** : Effet de la durée et de la température de conservation sur la reprise de croissance de *Staphylococcus aureus* après inactivation par traitement « hautes pressions »  
(VA = 50 MPa.s<sup>-1</sup>, MA = 5×2min, T ≈ -5°C, P = 200 MPa)

La figure IV.15 met en évidence que, quelle que soit la température et la durée de conservation, aucune reprise de croissance de *S. aureus* n'a pu être observée. A l'inverse, plus le temps d'attente entre la conservation dans le plasma après traitement hautes pressions et le dénombrement dans une gélose nutritive est long, plus les valeurs d'efficacité destructrice augmentent. Cet effet pourrait être dû à la présence de bactéries sur lesquelles les hautes pressions ont eu un effet « sous-létal », et qui, si elles sont replacées dans des conditions favorables (dénombrement en milieu nutritif) peuvent déclencher des mécanismes de réparation permettant leur survie. Au contraire, si elles sont conservées dans le plasma, il est probable qu'elles ne soient alors pas dans un environnement favorable pour mettre en place ces mécanismes.

Il faut également remarquer que, lorsque le plasma est conservé à +4°C, une inactivation de *S. aureus* est constatée au cours du temps, même en l'absence de traitement hautes pressions (ED ≈ 3,5 à J+7). Ceci est probablement lié à la formation d'un caillot (coagulation) dans ces échantillons (de plus en plus important lorsque le temps de conservation s'allonge), qui pourrait renfermer une partie de la population de *S. aureus*. Cette proportion de bactéries ne peut alors pas être reprise pour les dilutions servant au dénombrement, ce qui pourrait expliquer l'augmentation de l'efficacité destructrice observée.

#### IV.2.5. Influence du milieu de suspension sur la sensibilité de *Staphylococcus aureus* vis-à-vis des hautes pressions

Afin d'évaluer l'impact du milieu sur l'inactivation de *S. aureus* par un traitement hautes pressions associant un mode d'application cyclique (5 cycles de 2 min) et une vitesse d'application rapide ( $50 \text{ MPa}\cdot\text{s}^{-1}$ ), deux milieux de suspension ont été testés : un bouillon Tryptone Sel et le plasma sanguin. Après préparation des échantillons, ceux-ci ont été soumis au procédé décrit ci-dessus pour une valeur de pression de 200 MPa et une température comprise entre  $-15^\circ\text{C}$  et  $30^\circ\text{C}$ .



**Figure IV.16** : Effet du milieu de suspension sur l'inactivation de *S. aureus* par un traitement « hautes pressions »  
(VA =  $50 \text{ MPa}\cdot\text{s}^{-1}$ , MA =  $5 \times 2 \text{ min}$ , P = 200 MPa)

La figure IV.16 met en évidence que le milieu de suspension joue un rôle important sur l'inactivation de *S. aureus* suite aux traitements hautes pressions testés. De plus, cet effet semble être en grande partie dépendant de la température. En effet, si à température ambiante, aucune différence n'est visible entre les deux milieux de suspension, à  $-5^\circ\text{C}$ , en revanche, *S. aureus* est plus barosensible dans le plasma que dans le bouillon TS, alors qu'à  $-15^\circ\text{C}$ , cette tendance s'inverse. Néanmoins, quelle que soit la nature du milieu (bouillon TS ou plasma sanguin), l'efficacité destructrice présente un maximum dans le même domaine de température ( $T \approx -5^\circ\text{C}$ ).

Ces résultats montrent que la mise au point d'un procédé hautes pressions de décontamination devra toujours prendre en compte le milieu environnant des agents pathogènes. Il sera donc

toujours difficile de transposer les résultats obtenus dans certaines conditions de milieu à d'autres produits.

#### ***IV.2.6. Conclusion***

L'analyse des divers résultats obtenus précédemment illustre l'intérêt d'utiliser un traitement cyclique à température négative avec une vitesse d'application rapide pour inactiver des bactéries telles que *Staphylococcus aureus*. En effet, ces conditions de traitement permettent d'atteindre une efficacité destructrice proche de 5 à 200 MPa et même d'inactiver la population totale ( $ED \approx 8$ ) à 300 MPa. De plus, l'inactivation obtenue est pérenne, étant maintenue pendant au moins sept jours, quelle que soit la température de conservation du plasma (+4°C ou -18°C).

*Ainsi, alors que S. aureus était considéré comme une bactérie hautement barorésistante, le choix et la combinaison appropriée de paramètres associés au traitement hautes pressions permettent d'abaisser cette résistance. En effet, un effet inactivant non négligeable ( $ED \approx 5$ ) est observé dès 200 MPa alors que de nombreux articles décrivent la nécessité d'utiliser une pression d'au moins 400 MPa pour atteindre une telle efficacité destructrice.*

### **IV.3. Effets de traitements hautes pressions sur l'inactivation des autres micro-organismes de la Pharmacopée Européenne**

Suite aux résultats obtenus sur l'inactivation de *Staphylococcus aureus* sous hautes pressions, une étude similaire a été menée sur quatre autres micro-organismes : *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger* et *Bacillus subtilis*.

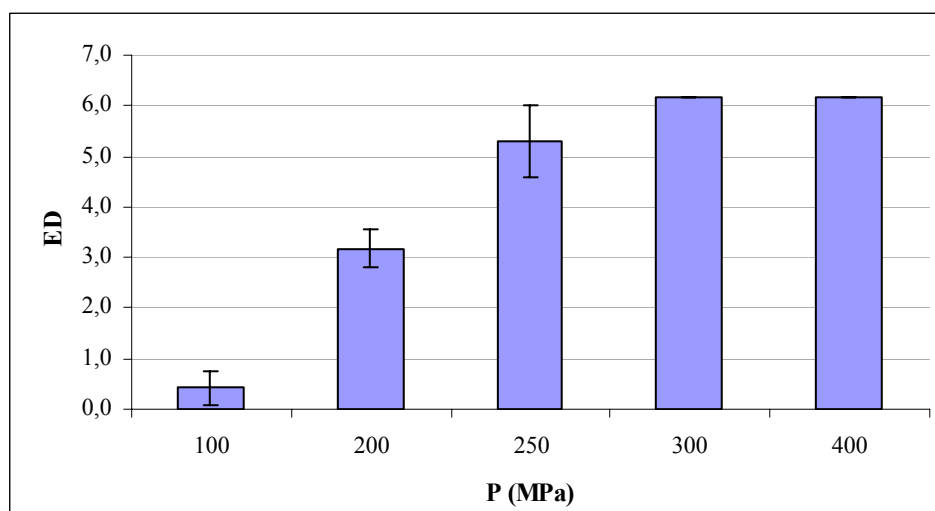


### IV.3.1. Effets de traitements hautes pressions sur l'inactivation de *Pseudomonas aeruginosa*

Afin d'étudier l'efficacité destructrice de traitements hautes pressions vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa*, du plasma sanguin humain a été inoculé par une suspension de cette bactérie. La concentration finale était alors d'environ  $1,5 \cdot 10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup> (6,2 log).

#### IV.3.1.1. Rôle du barème de pression sur l'inactivation de *Pseudomonas aeruginosa*

L'effet inactivant d'un traitement hautes pressions classique a tout d'abord été évalué sur *P. aeruginosa*. Pour cela, les échantillons de plasma sanguin contaminé par cette bactérie ont été traités pendant 10 min de façon continue, à température ambiante et avec une vitesse d'application de la pression de  $3,3 \text{ MPa}\cdot\text{s}^{-1}$ , pour des valeurs de pression comprises entre 100 MPa et 400 MPa.



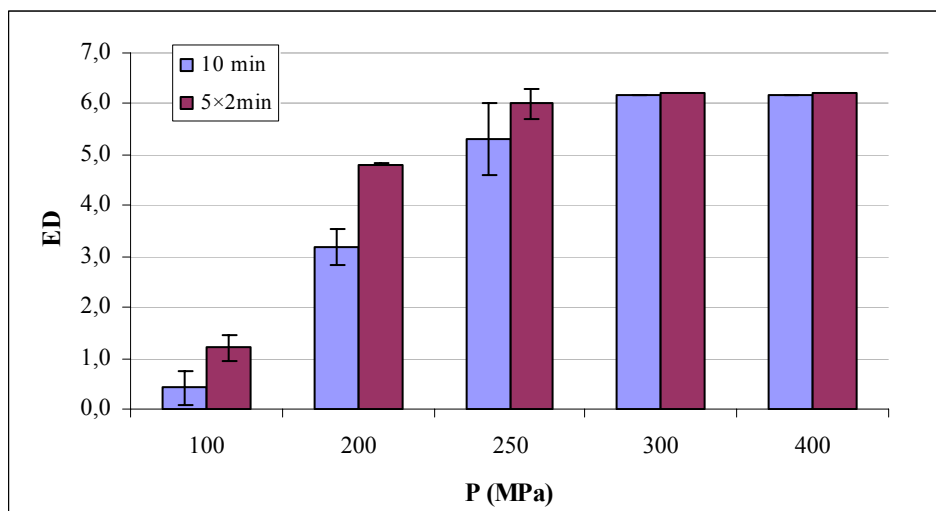
**Figure IV.17 :** Effet du barème de pression sur l'inactivation de *Pseudomonas aeruginosa*  
(VA =  $3,3 \text{ MPa}\cdot\text{s}^{-1}$ , MA = 10 min continu, T  $\approx 25^\circ\text{C}$ )

La figure IV.17 montre qu'une pression de 300 MPa suffit à inactiver la totalité de la population de *P. aeruginosa*, pour des conditions de traitement facilement accessibles. Cette bactérie est donc beaucoup plus sensible à la pression que *S. aureus*. Cette différence de barosensibilité peut en partie être expliquée par la différence de structure de la membrane

cellulaire de ces micro-organismes. En effet, *S. aureus* est une bactérie Gram positif tandis que *P. aeruginosa* est une bactérie Gram négatif. Or, les bactéries Gram négatif possèdent dans leur membrane une couche supplémentaire, la membrane externe, qui est plus fragile vis-à-vis de la pression que la membrane cytoplasmique. [169]

#### IV.3.1.2. Influence du mode d'application de la pression sur l'inactivation de *Pseudomonas aeruginosa*

Afin d'étudier l'effet du mode d'application de la pression, les échantillons de plasma contaminé par *P. aeruginosa* ont été soumis à un traitement d'une durée totale de 10 min, mais celui-ci a été appliqué soit de façon continue, soit divisé en cinq cycles de 2 min. Le traitement a été effectué à température ambiante, avec une vitesse d'application conventionnelle et égale à  $3,3 \text{ MPa}\cdot\text{s}^{-1}$ , et pour différentes valeurs de pression comprises entre 100 MPa et 400 MPa.

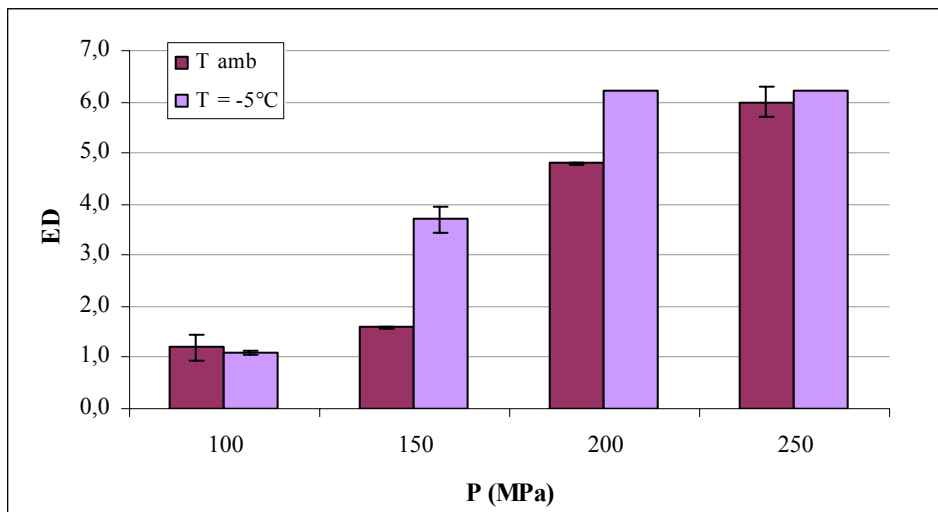


**Figure IV.18** : Effet du mode d'application de la pression sur l'inactivation de *Pseudomonas aeruginosa*  
(VA =  $3,3 \text{ MPa}\cdot\text{s}^{-1}$ , T  $\approx 25^\circ\text{C}$ )

La figure IV.18 met en évidence que le fait d'utiliser un mode d'application cyclique permet d'abaisser la valeur de la pression requise pour inactiver la totalité de la population initiale de *P. aeruginosa*. En effet, alors qu'un traitement continu nécessitait une pression de 300 MPa pour atteindre cet objectif, une valeur de 250 MPa est suffisante pour obtenir le même effet lors d'un traitement de 5 cycles de 2 min.

#### IV.3.1.3. Influence de la température au cours d'un traitement cyclique sur l'inactivation de *Pseudomonas aeruginosa*

Etant donné qu'un mode d'application cyclique permet d'augmenter l'efficacité destructrice, celui-ci a été conservé pour l'étude de l'influence de la température sur l'inactivation de *P. aeruginosa*. Les échantillons ont alors subi un traitement comportant de 5 cycles de 2 min avec une vitesse d'application de  $3,3 \text{ MPa}\cdot\text{s}^{-1}$ , soit à température ambiante, soit à  $-15^\circ\text{C}$ , pour des pressions variant entre 100 MPa et 250 MPa.

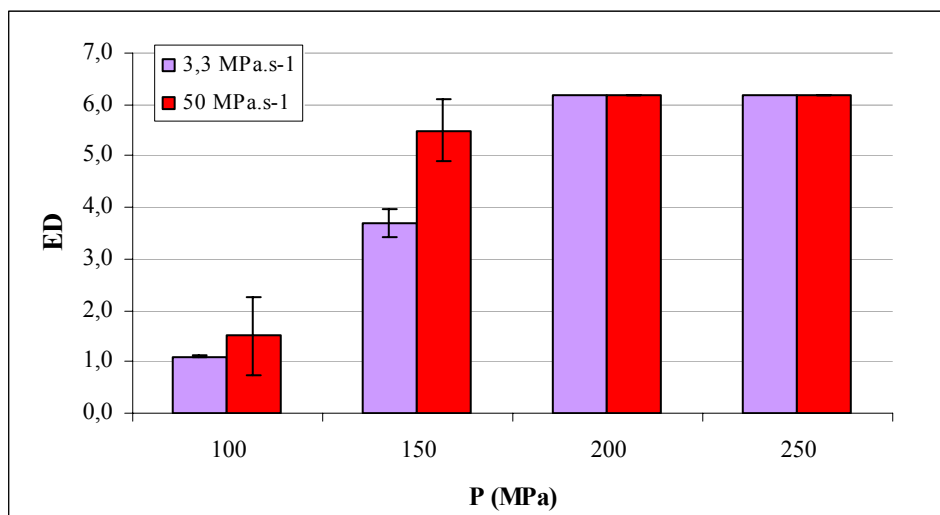


**Figure IV.19** : Effet de la température sur l'inactivation de *Pseudomonas aeruginosa* au cours d'un traitement cyclique (VA =  $3,3 \text{ MPa}\cdot\text{s}^{-1}$ , MA =  $5 \times 2 \text{ min}$ )

L'analyse de la figure IV.19 permet de confirmer l'intérêt d'associer le traitement « hautes pressions » en mode d'application cyclique avec une température négative pour augmenter l'efficacité destructrice. En effet, l'utilisation d'une température égale à  $-5^\circ\text{C}$  permet d'abaisser de 50 MPa la pression nécessaire pour inactiver complètement la population initiale de *P. aeruginosa* par rapport à un traitement à température ambiante, faisant passer sa valeur de 250 MPa à 200 MPa.

#### IV.3.1.4. Influence de la vitesse d'application de la pression au cours d'un traitement cyclique à température négative sur l'inactivation de *Pseudomonas aeruginosa*

Le traitement « hautes pressions » précédent associait un mode d'application cyclique (5×2 min) à une température négative (-5°C). Il était alors intéressant de voir l'impact que pourrait avoir l'ajout d'une vitesse d'application rapide à un tel traitement. Pour cela, les échantillons ont été exposés à des pressions comprises entre 100 MPa et 250 MPa, en utilisant deux vitesses d'application différentes : 3,3 MPa.s<sup>-1</sup> ou 50 MPa.s<sup>-1</sup>, tout en conservant constants le mode d'application (5×2min) et la température (-5°C).

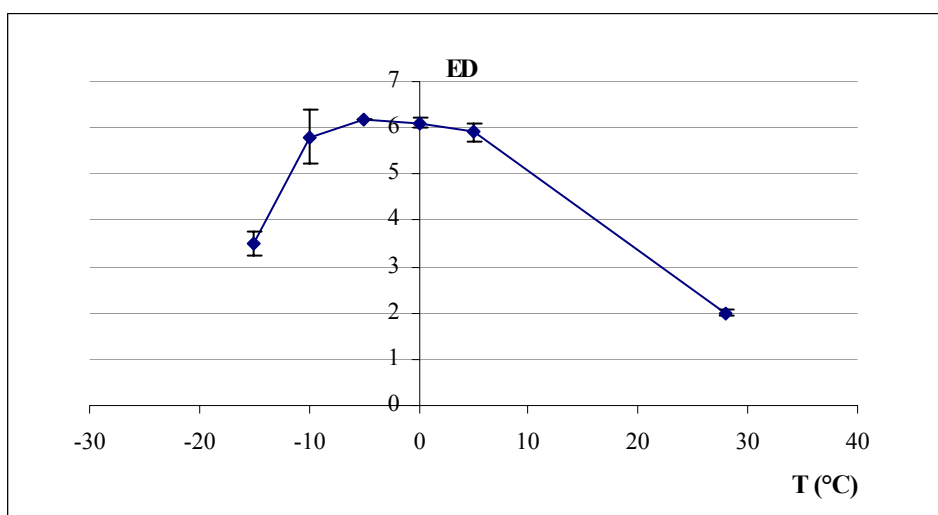


**Figure IV.20** : Effet de la vitesse d'application de la pression sur l'inactivation de *Pseudomonas aeruginosa* au cours d'un traitement cyclique à température négative (MA = 5×2min, T ≈ -5°C)

La figure IV.20 met en évidence la fragilisation de *P. aeruginosa* face à la pression lorsque le traitement est réalisé avec une vitesse d'application de 50 MPa.s<sup>-1</sup> au lieu de 3,3 MPa.s<sup>-1</sup>. En effet, si au niveau de l'inactivation aucune différence entre les deux vitesses d'application n'est visible à partir de 200 MPa du fait de la destruction complète de la population initiale du micro-organisme, à 150 MPa, en revanche, le fait d'utiliser une vitesse égale à 50 MPa.s<sup>-1</sup> permet d'augmenter de près de 2 unités l'efficacité destructrice du traitement.

#### IV.3.1.5. Influence de la température au cours d'un traitement cyclique avec une vitesse d'application rapide sur l'inactivation de *Pseudomonas aeruginosa*

Lors des expériences réalisées sur le plasma contaminé par *Staphylococcus aureus*, il avait été mis en exergue l'importance du choix de la température à laquelle était appliqué le traitement hautes pressions. En effet, l'efficacité destructrice de celui-ci était fortement amplifiée pour un domaine étroit de températures compris entre  $-10^{\circ}\text{C}$  et  $-5^{\circ}\text{C}$ . Il était donc nécessaire de vérifier si un tel effet pouvait être également observé sur *Pseudomonas aeruginosa* et si le domaine de températures où l'ED est maximale se superposait à celui constaté pour *S. aureus*. Pour cela, un traitement de 5 cycles de 2 min à 200 MPa, avec une vitesse d'application de  $50 \text{ MPa}\cdot\text{s}^{-1}$  a été mis en œuvre sur des échantillons de plasma contaminé par *P. aeruginosa*, à des températures comprises entre  $-15^{\circ}\text{C}$  et  $30^{\circ}\text{C}$ .



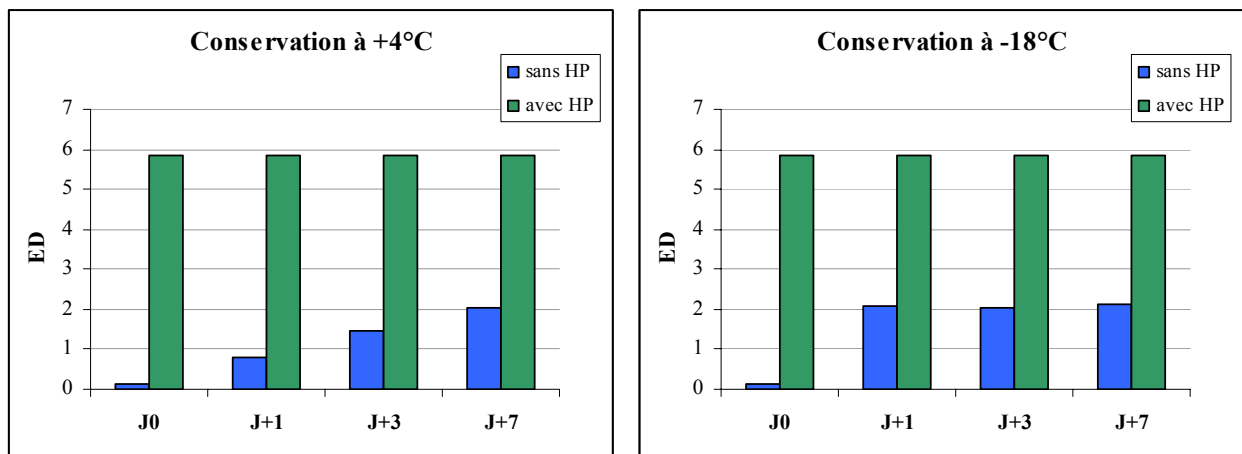
**Figure IV.21** : Effet de la température sur l'inactivation de *Pseudomonas aeruginosa* au cours d'un traitement cyclique avec une vitesse d'application rapide (VA =  $50 \text{ MPa}\cdot\text{s}^{-1}$ , MA =  $5 \times 2 \text{ min}$ , P = 200 MPa)

Sur la figure IV.21, il peut être observé que, pour *P. aeruginosa*, le domaine de températures pour lequel un traitement cyclique ( $5 \times 2 \text{ min}$ ) à 200 MPa avec une vitesse d'application de  $50 \text{ MPa}\cdot\text{s}^{-1}$  présente une efficacité destructrice maximale se situe aux alentours de  $-5^{\circ}\text{C}$ . Celui-ci recouvre donc le domaine de températures mis en évidence pour *S. aureus* ( $-10^{\circ}\text{C} < T < -5^{\circ}\text{C}$ ).

Ce résultat conforte le choix d'utiliser une température négative et proche de  $-5^{\circ}\text{C}$  dans le cadre du développement d'un procédé de sécurisation du plasma sanguin humain visant à éliminer le maximum d'agents pathogènes.

#### IV.3.1.6. Essai de revivification après traitement hautes pressions de plasma contaminé par *Pseudomonas aeruginosa*

Tout comme pour *Staphylococcus aureus*, il était intéressant de vérifier le maintien à long terme de l'inactivation de *Pseudomonas aeruginosa* après un traitement « hautes pressions ». Pour cela, le traitement choisi a été celui qui s'était révélé être le plus efficace (valeur de ED maximale), à savoir un traitement cyclique de 5 cycles de 2 min à  $-5^{\circ}\text{C}$  et 200 MPa, avec une vitesse d'application de  $50 \text{ MPa}\cdot\text{s}^{-1}$ . Les échantillons ainsi traités ont ensuite été conservés pendant sept jours, soit au réfrigérateur ( $+4^{\circ}\text{C}$ ), soit au congélateur ( $-18^{\circ}\text{C}$ ), puis la population résiduelle de *P. aeruginosa* a été dénombrée à différents intervalles de temps.



**Figure IV.22** : Effet de la durée et de la température de conservation sur la reprise de croissance de *Pseudomonas aeruginosa* après inactivation par traitement hautes pressions (VA =  $50 \text{ MPa}\cdot\text{s}^{-1}$ , MA =  $5 \times 2 \text{ min}$ , T  $\approx -5^{\circ}\text{C}$ , P = 200 MPa)

La figure IV.22 permet de mettre en évidence que, quelle que soit la température de conservation, aucune reprise de croissance de *P. aeruginosa* n'est observée, même sept jours après le traitement hautes pressions. Tout comme pour *S. aureus*, l'effet inactivant des hautes pressions conjuguées à des valeurs optimisées des paramètres associés (VA, MA et T) est

donc maintenu à long terme, ce qui est primordial pour tout procédé de sécurisation du plasma sanguin.

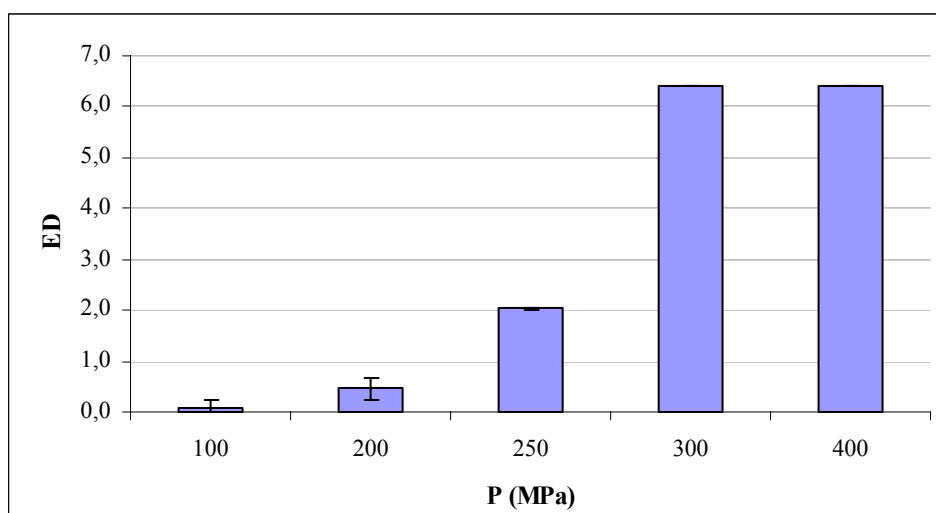
Il est également intéressant de noter que, même en l'absence de traitement hautes pressions, un effet inactivant du plasma sanguin sur *P. aeruginosa* est visible au cours du temps. Cet effet est immédiat lorsque les échantillons sont conservés à -18°C et évolue dans le temps quand ils sont stockés à +4°C. L'effet observé après conservation à -18°C pourrait s'expliquer par le stress induit par le cycle de congélation / décongélation. Quant à l'effet bactéricide du plasma sanguin après conservation à +4°C sur une bactérie telle que *P. aeruginosa*, il pourrait être justifié par l'association de protéines plasmatiques, comme par exemple le complément, à la membrane de ce micro-organisme [309, 310]. Ainsi, le plasma sanguin semble posséder un système de défense qui lui permet de lutter contre certains agents pathogènes.

#### ***IV.3.2. Effets de traitements hautes pressions sur l'inactivation de Candida albicans***

Du plasma sanguin a été inoculé par une suspension de *Candida albicans* de manière à obtenir une concentration finale d'environ  $3,2 \cdot 10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup> (6,5 log). Les échantillons ont ensuite été conservés au congélateur dans l'attente des traitements hautes pressions.

##### **IV.3.2.1. Rôle du barème de pression sur l'inactivation de *Candida albicans***

Les échantillons de plasma contaminé par *Candida albicans* ont tout d'abord été soumis à un traitement continu de 10 min à température ambiante avec une vitesse d'application égale à 3,3 MPa.s<sup>-1</sup>. Différents traitements ont été mis en œuvre dans ces conditions, pour des pressions comprises entre 100 MPa et 400 MPa.



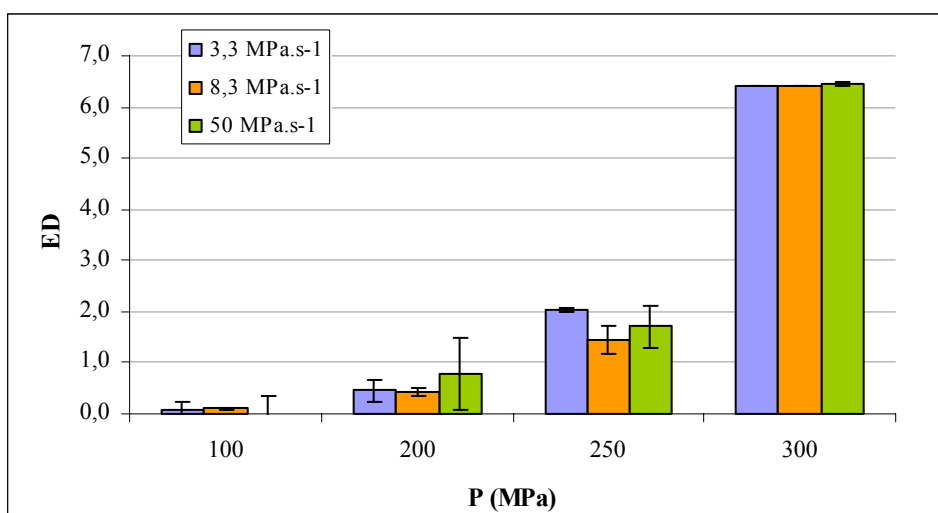
**Figure IV.23** : Effet du barème de pression sur l'inactivation de *Candida albicans*  
(VA = 3,3 MPa.s<sup>-1</sup>, MA = 10 min continu, T ≈ 25°C)

La figure IV.23 montre que *C. albicans* est assez sensible à la pression, étant inactivé totalement dès 300 MPa (ED ≈ 6,5). Ces résultats confirment que les levures sont des micro-organismes très sensibles à la pression, comme l'avait déjà montré Brul et al. [176] pour *Saccharomyces cerevisiae*. En effet, ils avaient constaté qu'un traitement de 15 min à 300 MPa et à température ambiante était suffisant pour entraîner des dommages létaux au niveau de la membrane de ce micro-organisme.

#### IV.3.2.2. Influence de la vitesse d'application de la pression sur l'inactivation de *Candida albicans*

Afin d'évaluer l'impact de la vitesse d'application sur l'efficacité destructrice d'un traitement hautes pressions vis-à-vis de *C. albicans*, les échantillons ont été exposés à des pressions comprises entre 100 MPa et 300 MPa pendant 10 min à température ambiante. Trois vitesses d'application différentes ont été testées : 3,3 MPa.s<sup>-1</sup>, 8,3 MPa.s<sup>-1</sup> et 50 MPa.s<sup>-1</sup>.



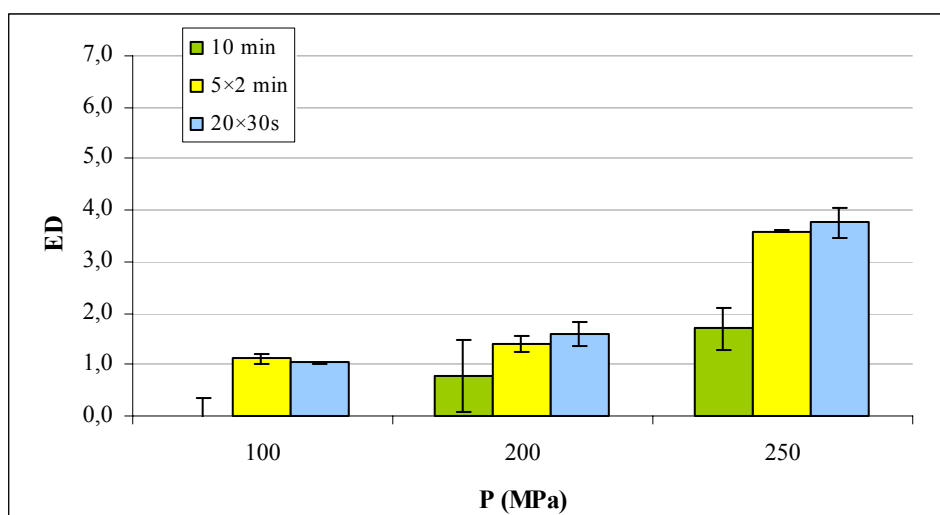


**Figure IV.24** : Effet de la vitesse d'application de la pression sur l'inactivation de *Candida albicans* (MA = 10 min continu, T  $\approx$  25°C)

L'observation de la figure IV.24 met en évidence que la vitesse d'application de la pression a peu d'impact sur l'inactivation de *C. albicans* dans les conditions de traitement utilisées. En effet, quelle que soit la valeur de la vitesse d'application, une pression de 300 MPa est nécessaire pour inactiver totalement la population initialement présente.

#### IV.3.2.3. Influence du mode d'application de la pression au cours d'un traitement avec une vitesse d'application rapide sur l'inactivation de *Candida albicans*

Les résultats précédents ayant démontré que la vitesse d'application de la pression avait peu d'influence sur l'inactivation de *C. albicans*, les expériences suivantes ont été réalisées avec une vitesse d'application rapide et égale à 50 MPa.s<sup>-1</sup>. Afin d'étudier l'effet du mode d'application sur l'efficacité destructrice des hautes pressions, les échantillons ont alors été soumis à des pressions comprises entre 100 MPa et 250 MPa à température ambiante, pendant 10 min, appliquées soit de façon continue soit de manière cyclique (5 cycles de 2 min ou 20 cycles de 30s).

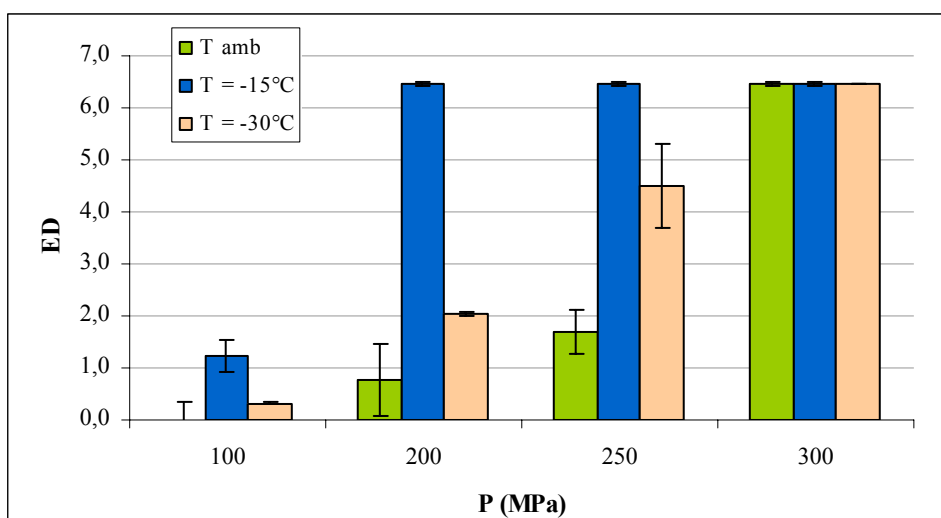


**Figure IV.25** : Effet du mode d'application de la pression sur l'inactivation de *Candida albicans* au cours d'un traitement avec une vitesse d'application rapide (VA = 50 MPa.s<sup>-1</sup>, T ≈ 25°C)

Sur la figure IV.25, l'impact du mode d'application de la pression sur l'inactivation de *C. albicans* n'est décelable qu'à 250 MPa. A cette pression, le fait d'utiliser un mode cyclique permet d'augmenter l'efficacité destructrice du traitement d'environ 2 unités par rapport à un traitement continu. Néanmoins, l'augmentation du nombre de cycles, de 5 cycles de 2 min à 20 cycles de 30 s, n'apporte aucun bénéfice, *C. albicans* étant inactivé à hauteur de 3,7 unités dans les deux cas (valeur éloignée de 6,5 correspondant à l'inactivation de la population totale).

#### IV.3.2.4. Influence de la température au cours d'un traitement avec une vitesse d'application rapide sur l'inactivation de *Candida albicans*

En conservant une vitesse d'application rapide (50 MPa.s<sup>-1</sup>) et un mode d'application continu durant 10 min, les expériences suivantes avaient pour objectif l'étude de l'effet de la température du traitement hautes pressions sur l'inactivation de *C. albicans* en suspension dans du plasma sanguin. Pour cela, les échantillons ont été traités à différentes valeurs de pression (de 100 MPa à 300 MPa), soit à température ambiante, soit à une température négative (-15°C ou -30°C).

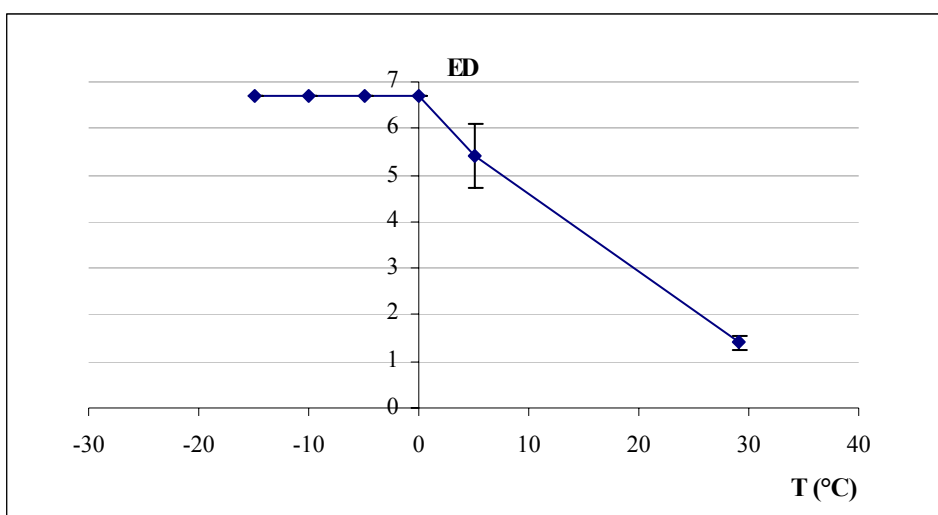


**Figure IV.26** : Effet de la température sur l'inactivation de *Candida albicans* au cours d'un traitement avec une vitesse d'application rapide (VA = 50 MPa.s<sup>-1</sup>, MA = 10 min continu)

Les résultats présentés à la figure IV.26 montrent une nouvelle fois que le choix de la température de traitement est primordial lors du développement d'un procédé de décontamination. En effet, si une valeur négative et égale à -15°C permet d'augmenter l'efficacité destructrice vis-à-vis de *C. albicans* par rapport à un traitement à température ambiante, le fait d'abaisser ce paramètre jusqu'à -30°C, en revanche, produit l'effet inverse. Ainsi, lors de l'utilisation d'un traitement continu de 10 min avec une vitesse d'application rapide, une température de -15°C semble appropriée pour l'inactivation de ce micro-organisme dès 200 MPa.

#### IV.3.2.5. Influence de la température au cours d'un traitement cyclique avec une vitesse d'application rapide sur l'inactivation de *Candida albicans*

Les expériences précédentes menées sur *S. aureus* et *P. aeruginosa* ont mis en évidence que l'efficacité destructrice d'un traitement de 5 cycles de 2 min à 200 MPa avec une vitesse d'application de 50 MPa.s<sup>-1</sup> était maximale pour une température d'environ -5°C. Par conséquent, il apparaissait nécessaire de vérifier si, en conservant de telles conditions de traitement, un domaine de température similaire permettait d'atteindre une inactivation optimale de *C. albicans*.



**Figure IV.27** : Effet de la température sur l'inactivation de *Candida albicans* au cours d'un traitement cyclique avec une vitesse d'application rapide (VA = 50 MPa.s<sup>-1</sup>, MA = 5×2min, P = 200 MPa)

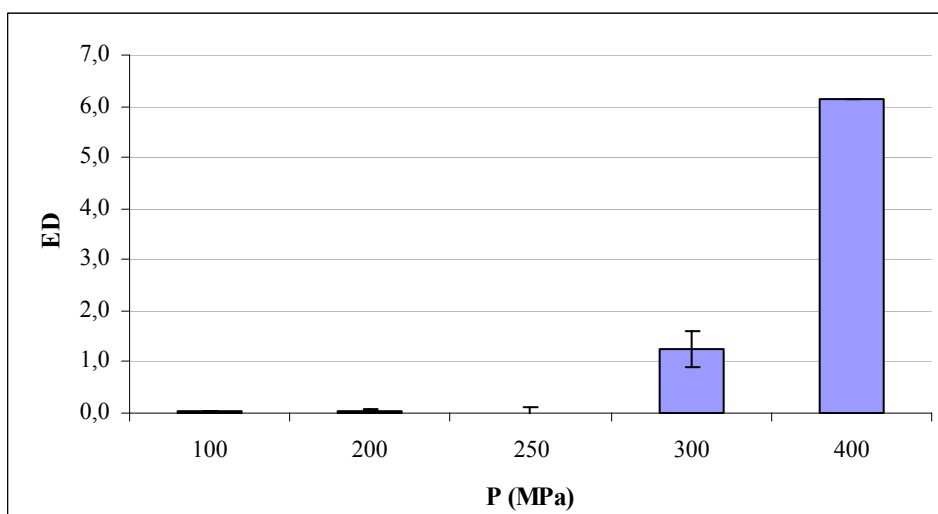
Pour éliminer totalement la population initiale de *C. albicans*, le traitement de 5 cycles de 2 min à 200 MPa avec une vitesse d'application de 50 MPa.s<sup>-1</sup> doit être réalisé à une température comprise entre -15°C et 0°C (Figure IV.27). *Ce domaine de température est donc beaucoup plus large mais recouvre ceux observés pour S. aureus et P. aeruginosa.*

### ***IV.3.3. Effets de traitements hautes pressions sur l'inactivation d'Aspergillus niger***

Les échantillons de plasma contaminé par des spores d'*Aspergillus niger* ont été préparés de manière à obtenir une concentration initiale de l'ordre de 3,3.10<sup>6</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> (6,2 log). Ils ont ensuite été conservés à -18°C avant de subir différents traitements hautes pressions.

#### **IV.3.3.1. Rôle du barème de pression sur l'inactivation d'Aspergillus niger**

Afin d'évaluer la sensibilité d'*A. niger* vis-à-vis des hautes pressions, un traitement conventionnel, caractérisé par un mode d'application continu durant 10 min, à température ambiante, avec une vitesse d'application de 3,3 MPa.s<sup>-1</sup>, a été appliqué sur des échantillons de plasma contaminé par ce micro-organisme. Différentes valeurs de pression ont été utilisées, allant de 100 MPa jusqu'à 400 MPa.

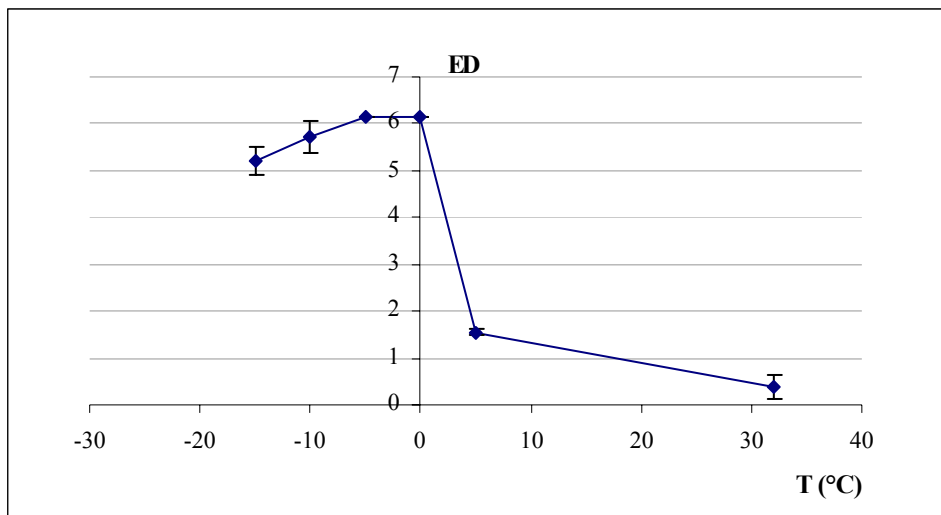


**Figure IV.28** : Effet du barème de pression sur l'inactivation d'*Aspergillus niger*  
(VA = 3,3 MPa.s<sup>-1</sup>, MA = 10 min continu, T ≈ 25°C)

Les résultats présentés à la figure IV.28 montrent qu'*Aspergillus niger* est plus résistant à la pression que *Candida albicans* ou *Pseudomonas aeruginosa*. En effet, une valeur de 400 MPa est nécessaire afin d'inactiver complètement la population bactérienne initialement présente (ED ≈ 6,2). Cette différence de barosensibilité est probablement due à la forme sporulée de ce micro-organisme, qui est généralement plus résistante que les formes végétatives correspondantes (conidies). [175]

#### IV.3.3.2. Influence de la température au cours d'un traitement cyclique avec une vitesse d'application rapide sur l'inactivation d'*Aspergillus niger*

Etant donné qu'il a été démontré qu'une température d'environ -5°C augmentait le pouvoir inactivant d'un traitement hautes pressions de 5 cycles de 2 min à 200 MPa avec une vitesse d'application de 50 MPa.s<sup>-1</sup>, il fallait évaluer si ces conditions permettaient également d'inactiver les spores d'*A. niger* mises en suspension dans du plasma sanguin. Les échantillons ont donc été soumis à ce traitement à des températures variables, comprises entre -15°C et +30°C.



**Figure IV.29** : Effet de la température sur l'inactivation d'*Aspergillus niger* au cours d'un traitement cyclique avec une vitesse d'application rapide (VA = 50 MPa.s<sup>-1</sup>, MA = 5×2min, P = 200 MPa)

*A. niger* présente un domaine de température pour lequel l'efficacité destructrice du traitement hautes pressions est maximale mais celui-ci est plus étroit ( $-5^{\circ}\text{C} < T < 0^{\circ}\text{C}$ ) que celui de *P. aeruginosa* et *C. albicans* (Figure IV.29).

#### ***IV.3.4. Effets de traitements hautes pressions sur l'inactivation de Bacillus subtilis***

*Bacillus subtilis* est une bactérie Gram positif capable de sporuler. Les spores de ce micro-organisme constituent une forme de résistance vis-à-vis de nombreux stress environnementaux (chaleur, pH, solvant...). L'amplitude de résistance des spores dépend de nombreux facteurs. Ainsi, des spores d'une même espèce de *Bacillus* peuvent avoir des caractéristiques différentes de germination en fonction des conditions de sporulation.

Plusieurs études ont montré que le processus de germination des spores pouvait être induit par l'application d'une pression modérée (50 MPa à 300 MPa) (Cf. § I.3.1.3). Les formes végétatives ainsi obtenues présentent alors une barosensibilité similaire à celles des bactéries Gram positive. La première partie de cette étude a donc porté sur l'effet d'un traitement hautes pressions en deux étapes sur l'inactivation de spores de *Bacillus subtilis*. La première étape, à une pression basse, visait à déclencher la germination, et la seconde, à une pression plus élevée, avait pour objectif d'inactiver les formes végétatives ainsi obtenues.

#### IV.3.4.1. Effet d'un traitement hautes pressions en deux étapes sur l'inactivation de spores de *Bacillus subtilis*

Afin d'éviter tout problème de variation des conditions de sporulation et d'avoir une référence, une suspension « prête-à-l'emploi » de spores de *Bacillus subtilis* a été obtenue auprès de la société AES Chemunex. Cette suspension a servi à contaminer du plasma sanguin humain, de façon à obtenir une concentration proche de  $10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup> (soit  $\approx 6$  log).

Dans un premier temps, différents profils de traitements « hautes pressions » ont été utilisés, chacun d'eux étant constitué d'une première étape à pression modérée (étape de germination) et d'une seconde étape à pression plus élevée (étape d'inactivation).

Les paramètres qui ont été évalués étaient les suivants :

- *pour l'étape de germination :*

- la valeur de la pression,
- la vitesse d'application de la pression,
- le mode d'application de la pression,
- la durée du pré-traitement,

- *pour l'étape d'inactivation :*

- la valeur de la pression,
- la vitesse d'application de la pression,
- le mode d'application de la pression,
- la durée du traitement,

- *le temps d'attente entre les deux étapes.*

L'ensemble des traitements a été réalisé à température ambiante, à l'exception du traitement 23. Pour ce dernier, similaire au traitement 22, la température de l'étape d'inactivation a été fixée à -5°C. (Tableau IV.1)

Trait. n°	Germination		Inactivation		Profil
	VA	T (°C)	VA	T (°C)	
1	50	amb.	50	amb.	$[(150s, 20 \text{ MPa}) + (30s, 0,1 \text{ MPa}) + (120s, 200 \text{ MPa}) + (30s, 0,1 \text{ MPa})] \times 5$
2	50	amb.	50	amb.	$[(150s, 20 \text{ MPa}) + (120s, 200 \text{ MPa}) + (30s, 0,1 \text{ MPa})] \times 5$
3	50	amb.	50	amb.	$[(150s, 20 \text{ MPa}) + (120s, 200 \text{ MPa})] \times 5$
4	50	amb.	50	amb.	$[(150s, 50 \text{ MPa}) + (120s, 200 \text{ MPa}) + (30s, 0,1 \text{ MPa})] \times 5$
5	50	amb.	50	amb.	$[(300s, 20 \text{ MPa}) + (120s, 200 \text{ MPa}) + (30s, 0,1 \text{ MPa})] \times 5$
6	50	amb.	50	amb.	$[(150s, 20 \text{ MPa}) + (120s, 200 \text{ MPa}) + (30s, 0,1 \text{ MPa})] \times 10$
7	50	amb.	50	amb.	$[(300s, 50 \text{ MPa}) + (120s, 200 \text{ MPa}) + (30s, 0,1 \text{ MPa})] \times 10$
8	50	amb.	50	amb.	$[(300s, 20 \text{ MPa}) + (120s, 300 \text{ MPa}) + (30s, 0,1 \text{ MPa})] \times 5$
9	50	amb.	50	amb.	$[(300s, 50 \text{ MPa}) + (120s, 300 \text{ MPa})] \times 5$
10	2	amb.	6,7	amb.	$[(150s, 10 \text{ MPa}) + (60s, 200 \text{ MPa})] \times 10$
11	2	amb.	6,7	amb.	$[(60s, 10 \text{ MPa}) + (60s, 200 \text{ MPa})] \times 10$
12	0,6	amb.	6,7	amb.	$[(60s, 20 \text{ MPa}) + (60s, 200 \text{ MPa})] \times 10$
13	0,6	amb.	6,7	amb.	$[(60s, 20 \text{ MPa}) \times 3 + (60s, 200 \text{ MPa})] \times 10$
14	50	amb.	50	amb.	$[(300s, 20 \text{ MPa}) + (120s, 200 \text{ MPa}) + (30s, 0,1 \text{ MPa})] \times 10$
15	50	amb.	50	amb.	$[(150s, 50 \text{ MPa}) + (120s, 200 \text{ MPa}) + (30s, 0,1 \text{ MPa})] \times 10$
16	50	amb.	50	amb.	$[(300s, 50 \text{ MPa}) + (120s, 200 \text{ MPa}) + (30s, 0,1 \text{ MPa})] \times 5$
17	50	amb.	50	amb.	$[(300s, 20 \text{ MPa}) + (300s, 50 \text{ MPa}) + (120s, 200 \text{ MPa}) + (30s, 0,1 \text{ MPa})] \times 5$
18	5,5	amb.	8,3	amb.	$[(300s, 50 \text{ MPa}) + (120s, 300 \text{ MPa}) + (30s, 0,1 \text{ MPa})] \times 5$
19	5,5	amb.	8,3	amb.	$[(300s, 50 \text{ MPa}) + (120s, 400 \text{ MPa}) + (30s, 0,1 \text{ MPa})] \times 5$
20	5,5	amb.	8,3	amb.	$[(300s, 50 \text{ MPa}) + (120s, 500 \text{ MPa}) + (30s, 0,1 \text{ MPa})] \times 5$
21	50	amb.	50	amb.	$(300s, 20 \text{ MPa}) + (300s, 50 \text{ MPa}) + [(120s, 200 \text{ MPa})] \times 5$
22	50	amb.	50	amb.	$(300s, 10 \text{ MPa}) + (300s, 20 \text{ MPa}) + (300s, 50 \text{ MPa}) + (600s, 0,1 \text{ MPa}) + [(120s, 200 \text{ MPa})] \times 5$
23	50	amb.	50	-5	$(300s, 10 \text{ MPa}) + (300s, 20 \text{ MPa}) + (300s, 50 \text{ MPa}) + (600s, 0,1 \text{ MPa}) + [(120s, 200 \text{ MPa})] \times 5$

Tableau IV.1 : Description des différents traitements hautes pressions

Les valeurs d'efficacité destructrice de chacun des traitements décrits dans le tableau IV.1 sont présentées sur la figure IV.30.

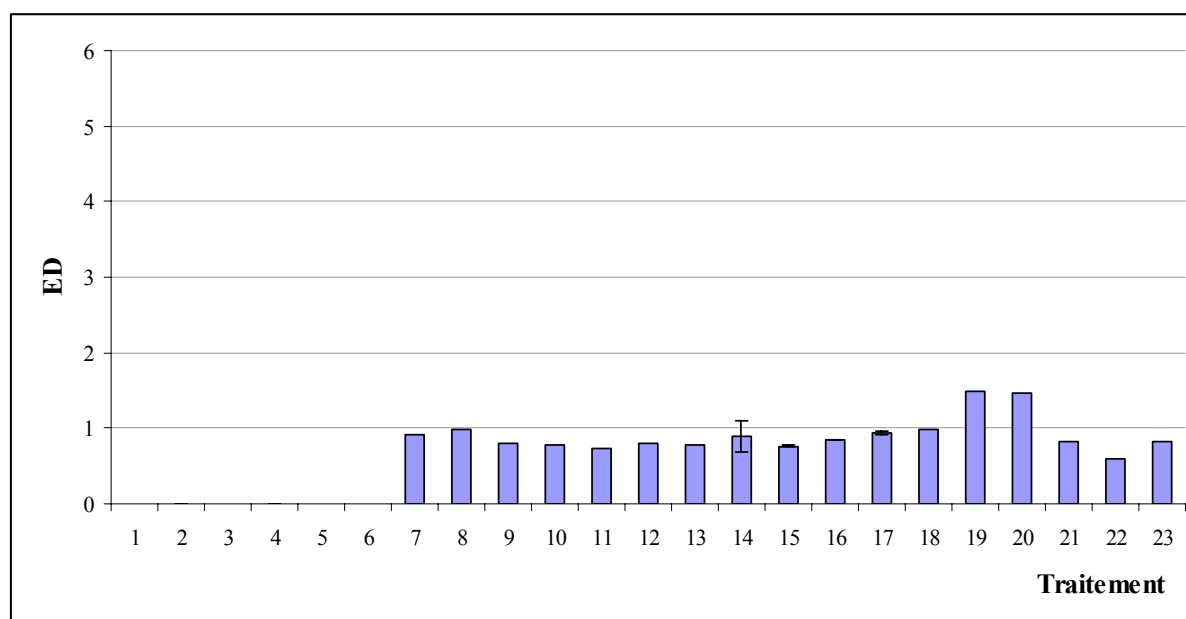


Figure IV.30 : Effets de différents profils de traitement « hautes pressions » sur l'inactivation de spores de *Bacillus subtilis*

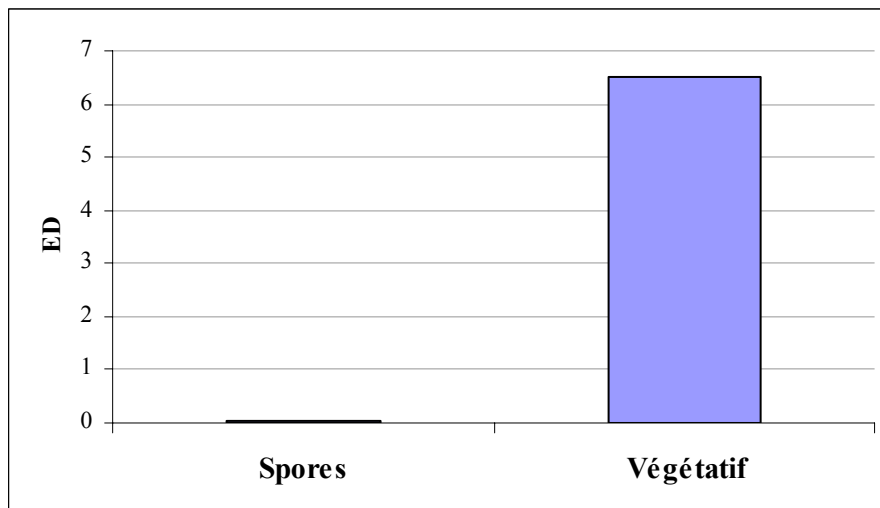


La figure IV.30 montre que, quel que soit le traitement « hautes pressions » utilisé, l'inactivation de spores de *Bacillus subtilis* reste très faible. En effet, même dans le cas où la pression de l'étape d'inactivation est la plus élevée (jusqu'à 500 MPa – Traitement 20), la valeur de l'efficacité destructrice ne dépasse pas 1,5. *Ceci confirme que les spores sont très barorésistantes et qu'il est probablement difficile de les faire germer sous l'effet de la pression pour des temps aussi courts de l'étape de germination.*

#### IV.3.4.2. Effet d'un traitement à température négative avec une vitesse d'application rapide sur l'inactivation des deux formes de *Bacillus subtilis*

Etant donné que les spores de *Bacillus subtilis* en suspension dans du plasma sont très peu inactivées sous l'effet de la pression, il était intéressant d'évaluer si la forme végétative possédait la même barorésistance. En effet, il était nécessaire de savoir si, en supposant qu'il existe des conditions pour lesquelles la germination des spores pourrait être induite sous pression, l'espèce végétative obtenue serait sensible à la pression.

Afin de faire germer l'ensemble des spores de *B. subtilis*, elles ont été remises en culture dans du bouillon cœur-cerveille. Après plusieurs repiquages, il a pu être observé par coloration de gram que l'ensemble de la population était sous forme végétative. La suspension ainsi préparée a alors servi à contaminer du plasma sanguin. Les échantillons ont ensuite été soumis à un traitement hautes pressions de 5 cycles de 2 min à 200 MPa et une température de -5°C, avec une vitesse d'application de 50 MPa.s<sup>-1</sup>. Ce traitement ne comportait donc que l'étape d'inactivation, l'étape de germination ayant été supprimée. A titre de comparaison, des échantillons de plasma contaminé par des spores de *B. subtilis* ont été soumis au même procédé.

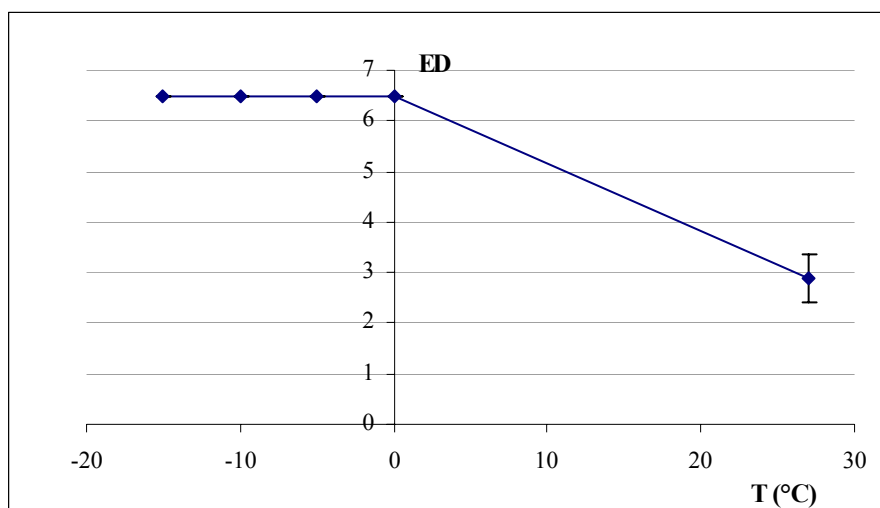


**Figure IV.31** : Effet d'un traitement cyclique à température négative avec une vitesse d'application rapide sur l'inactivation de *Bacillus subtilis*, en fonction de l'état du micro-organisme.  
(VA = 50 MPa.s<sup>-1</sup>, MA = 5×2min, T ≈ -5°C, P = 200 MPa)

Les résultats présentés sur la figure IV.31 montrent clairement que *Bacillus subtilis* à l'état végétatif peut être inactivé par un traitement hautes pressions, la valeur de l'efficacité destructrice étant supérieure à 6. Cette forme de *B. subtilis* présente donc une barosensibilité proche d'autres espèces bactériennes sous forme végétative, telle que *Pseudomonas aeruginosa*. Il est par conséquent envisageable d'inactiver les spores de *B. subtilis*, à condition de définir les conditions de l'étape de germination qui permettent de les faire transiter vers l'état végétatif.

#### IV.3.4.3. Influence de la température au cours d'un traitement cyclique avec une vitesse d'application rapide sur l'inactivation de la forme végétative de *Bacillus subtilis*

Etant donné qu'il vient d'être démontré que la forme végétative de *B. subtilis* pouvait être sensible à la pression, il était intéressant d'observer si, comme pour les quatre autres micro-organismes testés, il existait un domaine de température pour lequel l'efficacité destructrice liée au traitement (mode d'application : 5 cycles de 2 min, vitesse d'application  $50 \text{ MPa}\cdot\text{s}^{-1}$ , pressions : 200 MPa) était amplifiée. Pour cela, les échantillons de plasma contaminé par *B. subtilis* sous forme végétative ont été soumis à ce traitement à des températures variables, comprises entre  $-15^\circ\text{C}$  et  $+27^\circ\text{C}$ .



**Figure IV.32** : Effet de la température sur l'inactivation de *Bacillus subtilis* (forme végétative) au cours d'un traitement cyclique avec une vitesse d'application rapide (VA =  $50 \text{ MPa}\cdot\text{s}^{-1}$ , MA =  $5 \times 2 \text{ min}$ , P = 200 MPa)

Les résultats présentés à la figure IV.32 montrent que lorsque *B. subtilis* est sous forme végétative, ce dernier est très sensible à la pression. En effet, dès que le traitement « hautes pressions » est appliqué à une température inférieure ou égale à  $0^\circ\text{C}$ , l'ensemble de la population initialement présente est inactivée. Ainsi, ce domaine de température où l'efficacité destructrice est maximale est suffisamment large pour recouvrir ceux observés pour les quatre autres micro-organismes testés (*S. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*, *A. niger*).

#### IV.3.4.4. Discussion sur le choix de l'espèce

Les spores de *Bacillus subtilis* (ou *B. anthracis*) constituent l'un des indicateurs biologiques de stérilisation. [311] Néanmoins, le risque de contamination de produits sanguins par cette forme de *Bacillus* reste peu probable, et sa pathogénicité est généralement considérée comme faible ou absente. [312] Tout d'abord, au niveau médical, les contaminations par *Bacillus* sont rares, et dans les cas cités dans la littérature, il s'agit majoritairement des espèces *B. anthracis* ou *B. cereus*. [313] De plus, au cours de l'infection, il est précisé que seule la forme végétative est présente dans le sang, et non la forme sporulée. [314]

L'ensemble de ces réflexions explique probablement pourquoi, dans le cadre du développement de nouveaux procédés d'inactivation de pathogènes dans les produits sanguins, il n'est jamais fait référence à une espèce de *Bacillus*. En effet, lors de la validation des méthodes Intercept ou Theraflex – MB, ces procédés ont toujours été testés sur de nombreux virus (VIH, Virus de l'hépatite A, Parvovirus B19, Virus de l'herpès...), quelques parasites (*Trypanosoma cruzi*, *Leishmania mexicana*) et des bactéries (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*...), mais jamais sur une espèce de *Bacillus*, qu'elle soit sporulée ou végétative. [315, 316]

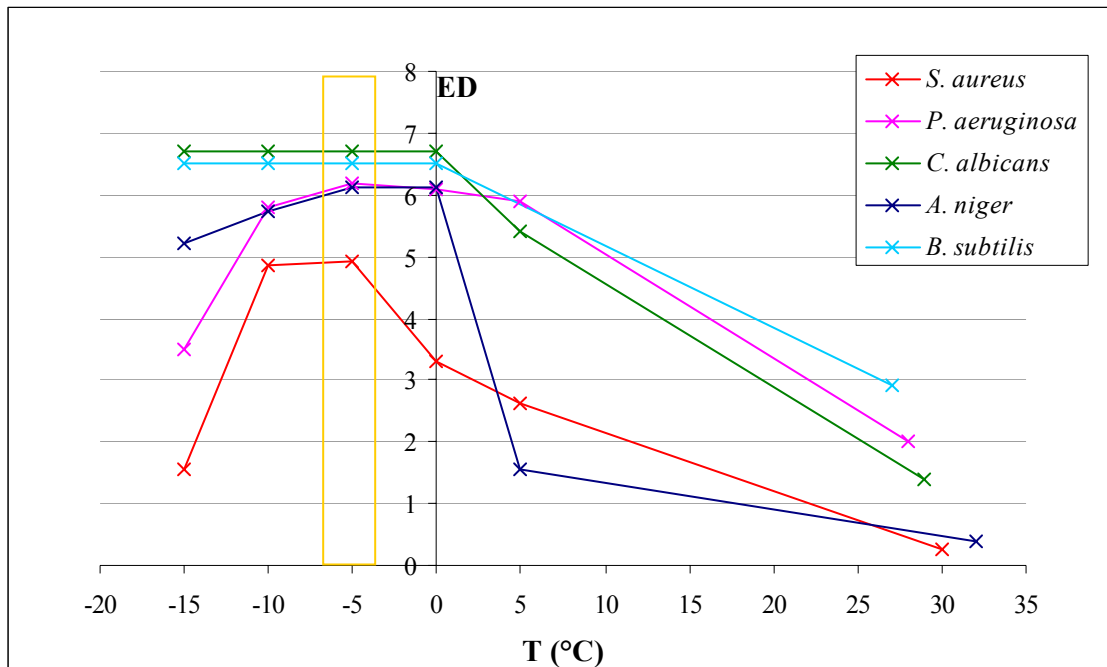
*Etant donné que, d'une part, les conditions expérimentales utilisées sont aptes à inactiver, avec une valeur de l'efficacité destructrice supérieure à 6, la forme végétative de Bacillus subtilis, et d'autre part, seule cette forme est présente dans le sang, il apparaît que les hautes pressions seraient appropriées à la sécurisation du plasma sanguin vis-à-vis de ce bacille.*

#### IV.3.5. Choix de la température optimale du traitement sous hautes pressions

Pour l'ensemble des micro-organismes testés (*S. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*, *A. niger* et *B. subtilis*), l'effet inactivant d'un traitement sous hautes pressions caractérisé par :

- une vitesse d'application de la pression de  $50 \text{ MPa}\cdot\text{s}^{-1}$ ,
- un mode d'application de la pression de 5 cycles de 2 min,
- une pression égale à 200 MPa,

a été évalué à différentes températures, comprises entre  $-15^\circ\text{C}$  et  $+30^\circ\text{C}$ . Il était alors possible de superposer ces résultats afin de définir le domaine de température pour lequel un tel traitement « hautes pressions » s'avérait être le plus efficace.



**Figure IV.33** : Effet de la température sur l'inactivation des cinq micro-organismes sélectionnés (*S. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*, *A. niger*, *Bacillus subtilis* végétatif) au cours d'un traitement cyclique avec une vitesse d'application rapide (VA =  $50 \text{ MPa}\cdot\text{s}^{-1}$ , MA =  $5 \times 2 \text{ min}$ , P = 200 MPa)

Les courbes représentées sur la figure IV.33 montrent l'effet de la température sur l'inactivation de cinq micro-organismes, à savoir *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*, *A. niger* et *Bacillus subtilis* sous forme végétative, au cours de l'application d'un traitement sous hautes pressions avec un mode d'application cyclique et une vitesse d'application rapide.

Celles-ci mettent en évidence un domaine de température, aux alentours de  $-5^{\circ}\text{C}$ , pour lequel l'efficacité destructrice d'un tel traitement est amplifiée, quel que soit le micro-organisme.

*Par conséquent, il existe un domaine de températures, compris entre  $-8^{\circ}\text{C}$  et  $-3^{\circ}\text{C}$ , pour lequel les micro-organismes testés (*S. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*, *A. niger* et *B. subtilis*) semblent plus sensibles à la pression lorsque cette dernière est associée à un mode d'application cyclique et une vitesse d'application rapide. Ce phénomène est surprenant du fait des différences de structures entre chacun de ces agents pathogènes. En effet, *S. aureus* et *B. subtilis* sont des bactéries Gram positif, *P. aeruginosa* une bactérie Gram négatif, *C. albicans* une levure, et *A. niger* une moisissure sous forme sporulée. L'effet produit par une température d'environ  $-5^{\circ}\text{C}$ , associé à ceux induits par une vitesse d'application rapide et un mode cyclique, doit donc fragiliser une structure ou un mécanisme communs entre ces cinq micro-organismes, comme par exemple la double couche phospholipidique de leur membrane, ou encore une étape essentielle du métabolisme, les rendant alors plus barosensibles.*

#### **IV.4. Conclusion**

*Les travaux décrits dans ce chapitre ont permis de montrer que dans certaines conditions de pression et de température, en sélectionnant judicieusement les divers paramètres associés tels que la vitesse d'application ou le mode d'application, il était possible de sauvegarder l'activité de trois facteurs de coagulation (VIIIc, V et XI) et d'inactiver les cinq micro-organismes de la Pharmacopée Européenne (*S. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*, *A. niger* et *B. subtilis*).*

*L'étape suivante consistera donc à définir, en croisant l'ensemble de ces résultats, un procédé hautes pressions de sécurisation du plasma sanguin humain, puis à évaluer celui-ci vis-à-vis d'autres agents pathogènes.*



## **CHAPITRE V : DEFINITION D'UN PROCEDURE HAUTES PRESSIONS DE SECURISATION DU PLASMA SANGUIN HUMAIN ET EVALUATION SUR DIVERS AGENTS PATHOGENES**

Le chapitre précédent avait pour objectif d'évaluer l'effet de chaque paramètre pouvant être associé à un traitement « hautes pressions » sur la sauvegarde des propriétés thérapeutiques du plasma sanguin humain (en particulier l'activité des facteurs de coagulation VIIIc, V, et XI) d'une part, et sur l'inactivation de micro-organismes d'autre part.

Compte tenu de ces observations, la seconde partie du travail a consisté à définir les conditions de traitement hautes pressions permettant d'établir un équilibre entre maintien des propriétés thérapeutiques du plasma sanguin et inactivation maximale des agents pathogènes. Une fois ces paramètres fixés, le procédé de sécurisation a alors été appliqué à d'autres catégories de pathogènes tels que les parasites, les virus et un agent pathogène particulier : le prion.

### **V.1. Définition du Procédé de Sécurisation du Plasma Sanguin Humain**

#### ***V.1.1. Rappel des résultats antérieurs***

Les travaux présentés au Chapitre IV avaient pour objectif d'analyser l'effet de chaque paramètre associé au traitement hautes pressions à la fois sur l'activité de trois facteurs de coagulation (V, VIIIc et XI) et sur l'inactivation de cinq micro-organismes : *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger* et *Bacillus subtilis*.

Il a alors été montré, d'une manière générale, que :

- les températures négatives permettaient de maintenir l'activité des facteurs de coagulation tandis qu'elles fragilisaient les micro-organismes vis-à-vis de la pression,
- un mode d'application cyclique et une vitesse d'application rapide augmentaient la sensibilité des micro-organismes face à la pression tout en ayant peu d'effet sur les facteurs de coagulation.



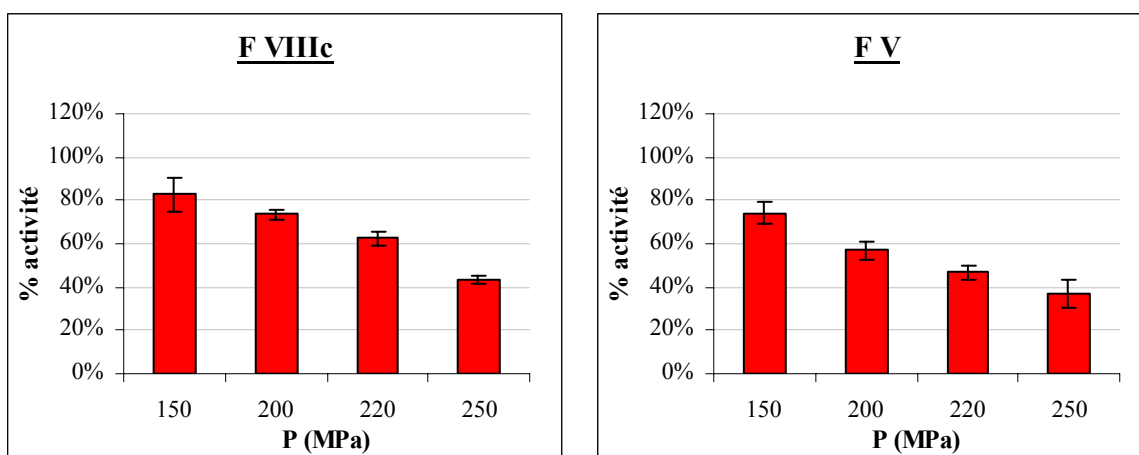
Le choix de la température de traitement s'était avéré être le point le plus sensible, notamment de par son influence importante sur l'inactivation des pathogènes. En effet, il a été mis en évidence qu'un traitement « hautes pressions » réalisé à  $-5^{\circ}\text{C}$  présentait une efficacité destructrice décuplée, quel que soit le micro-organisme testé. Il en avait été déduit qu'un traitement caractérisé par une vitesse d'application de  $50 \text{ MPa}\cdot\text{s}^{-1}$ , un mode d'application de 5 cycles de 2 min, une température égale à  $-5^{\circ}\text{C}$  pourrait constituer une base intéressante pour le développement d'un « **Procédé hautes pressions de sécurisation du plasma sanguin humain** ».

### *V.1.2. Effet du procédé de sécurisation du plasma sanguin humain sur l'activité des facteurs de coagulation*

Etant donné que le « Procédé de sécurisation du plasma sanguin humain » a tout d'abord été défini vis-à-vis des micro-organismes, et en particulier de *Staphylococcus aureus*, il était nécessaire d'observer son effet sur l'activité des facteurs de coagulation les plus fragiles, à savoir les facteurs VIIIc et V. De plus, il était important d'étudier l'impact de chaque paramètre caractérisant ce procédé afin d'évaluer l'impact de chacun d'entre eux et ainsi d'ajuster au mieux les conditions permettant de préparer un plasma sanguin répondant aux normes imposées par les législations française et européenne.

#### V.1.2.1. Influence d'un traitement cyclique à température négative avec une vitesse d'application rapide sur l'activité de facteurs de coagulation

Dans une première étape, différents traitements à des pressions comprises entre 150 MPa et 250 MPa ont été appliqués à des échantillons de plasma sanguin humain, en utilisant comme valeurs des paramètres associés celles définies pour le procédé de sécurisation du plasma sanguin. Chaque traitement hautes pressions était donc caractérisé par une vitesse d'application rapide ( $50 \text{ MPa}\cdot\text{s}^{-1}$ ), un mode d'application cyclique ( $5 \times 2 \text{ min}$ ) et une température égale à  $-5^{\circ}\text{C}$ . Les facteurs VIIIc et V ont été choisis comme marqueurs car il a été montré qu'ils étaient plus sensibles à la pression que le facteur XI.



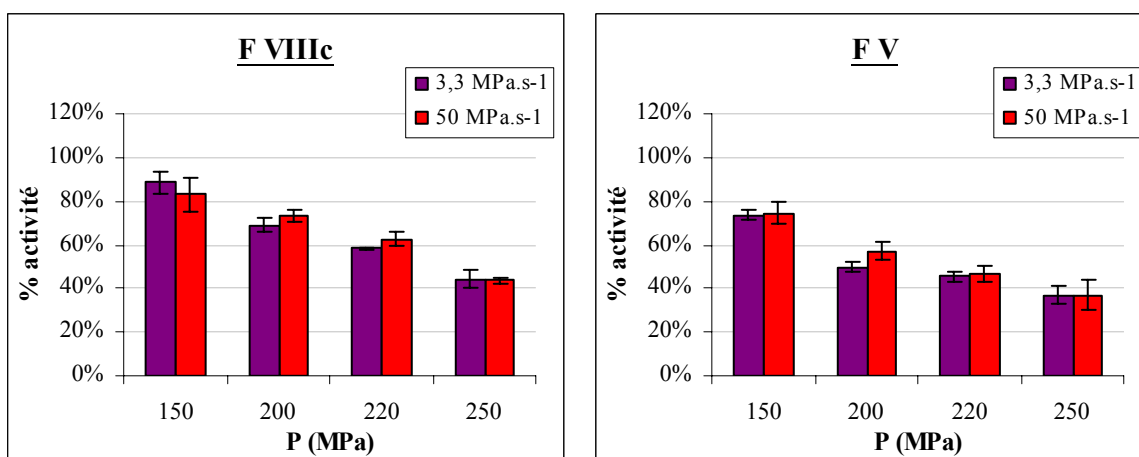
**Figure V.1** : Effet d'un traitement cyclique à température négative avec une vitesse d'application rapide sur l'activité de facteurs de coagulation  
(VA = 50 MPa.s<sup>-1</sup>, MA = 5×2min, T ≈ -5°C)

La figure V.1 met en évidence qu'une pression de 200 MPa serait appropriée dans le cadre de la sécurisation du plasma sanguin par un procédé « hautes pressions », dans les conditions définies plus haut. En effet, après un traitement à 200 MPa, les activités résiduelles des facteurs de coagulation VIIIc et V sont respectivement de 73 % et 57 %. Or, la législation française impose une concentration minimale en facteur VIIIc de 70 % et en facteur V de 50 %, tandis que la Pharmacopée Européenne exige que ces deux activités soient supérieures à 50 %.

*Par conséquent, un traitement « hautes pressions » de 5 cycles de 2 min à 200 MPa et -5°C avec une vitesse d'application de 50 MPa.s<sup>-1</sup> permet de produire un plasma sanguin humain contenant des taux en facteur VIIIc et V répondant aux normes de ces deux législations.*

#### V.1.2.2. Choix de la vitesse d'application de la pression dans le développement d'un procédé de sécurisation du plasma sanguin

Afin d'évaluer si le fait d'utiliser une vitesse d'application rapide dans le cadre du procédé de sécurisation a une incidence sur les propriétés thérapeutiques du plasma sanguin traité, des échantillons ont été soumis à des traitements de 5 cycles de 2 min à -5°C, avec deux valeurs de vitesse d'application différentes : 3,3 MPa.s<sup>-1</sup> et 50 MPa.s<sup>-1</sup> (*Il faut souligner qu'une vitesse d'application rapide impose des conditions technologiques particulières*). Les pressions utilisées variaient entre 150 MPa et 250 MPa.

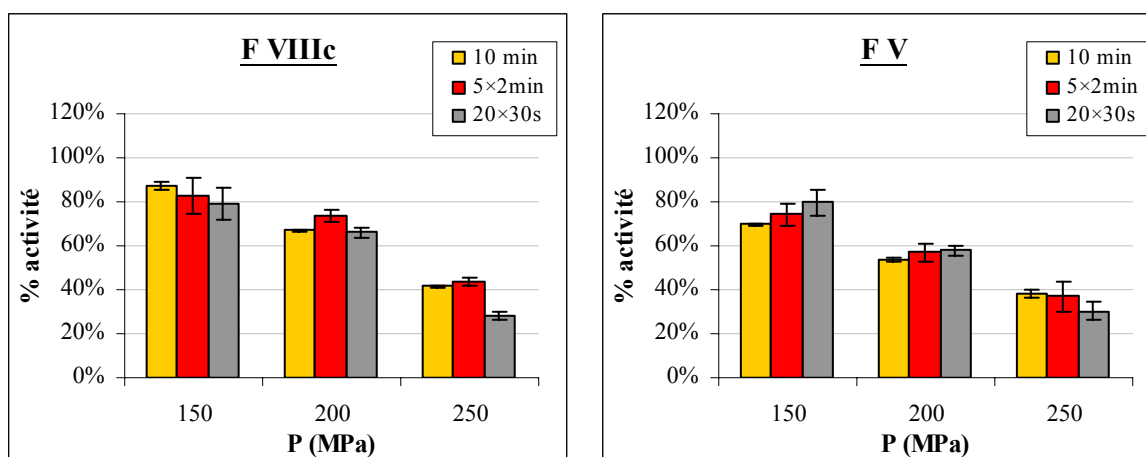


**Figure V.2 :** Effet de la vitesse d'application de la pression au cours d'un traitement cyclique à  $-5^{\circ}\text{C}$  sur l'activité de facteurs de coagulation (MA =  $5 \times 2\text{min}$ ,  $T \approx -5^{\circ}\text{C}$ )

Au regard des résultats présentés sur la figure V.2, aucun effet de la vitesse d'application de la pression ne peut être distingué. En effet, quelle que soit sa valeur, les taux d'activité résiduelle en facteur VIIIc et V restent similaires et au-delà des normes fixées par les réglementations française et européenne lorsque le traitement est réalisé à 200 MPa.

#### V.1.2.3. Choix du mode d'application de la pression dans le développement d'un procédé de sécurisation du plasma sanguin

Le deuxième paramètre définissant le procédé de sécurisation du plasma sanguin est le mode d'application de la pression, qui a été choisi cyclique. Afin d'évaluer son impact, les échantillons de plasma sanguin ont été traités selon le procédé de décontamination décrit en conservant l'ensemble des paramètres ( $VA = 50 \text{ MPa.s}^{-1}$ ,  $T \approx -5^{\circ}\text{C}$ ) à l'exception du mode d'application, qui était soit continu, soit cyclique ( $5 \times 2\text{min}$  ou  $20 \times 30\text{s}$ ). Quant à la pression, elle était comprise entre 150 MPa et 250 MPa.

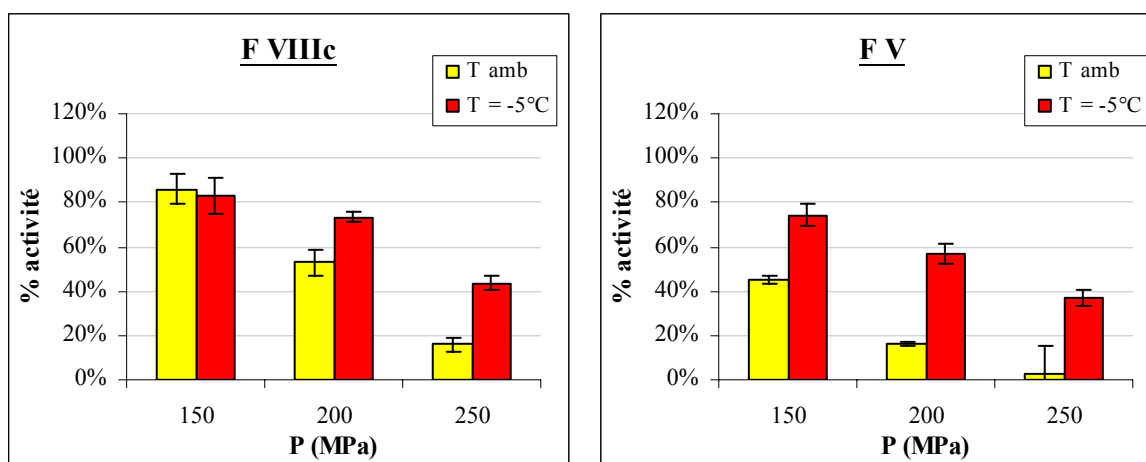


**Figure V.3** : Effet du mode d'application de la pression au cours d'un traitement à  $-5^{\circ}\text{C}$  avec une vitesse d'application rapide sur l'activité de facteurs de coagulation ( $VA = 50 \text{ MPa}\cdot\text{s}^{-1}$ ,  $T \approx -5^{\circ}\text{C}$ )

La figure V.3 montre que le mode d'application de la pression a peu d'influence sur le maintien de l'activité des facteurs VIIIc et V. Néanmoins, il faut remarquer que celui permettant, suite à un traitement à 200 MPa, d'obtenir un plasma qui réponde aux exigences des législations française et européenne est caractérisé par 5 cycles de 2 min.

#### V.1.2.4. Choix de la température de traitement dans le développement d'un procédé de sécurisation du plasma sanguin

Comme dernier paramètre, la température sélectionnée pour le procédé de sécurisation du plasma sanguin était égale à  $-5^{\circ}\text{C}$ . Il fallait donc vérifier les conséquences de ce choix sur les activités résiduelles des facteurs de coagulation. Pour cela, différents traitements caractérisés par une vitesse d'application de  $50 \text{ MPa}\cdot\text{s}^{-1}$ , un mode d'application de 5 cycles de 2 min, et des pressions comprises entre 150 MPa et 250 MPa, ont été appliqués à des échantillons de plasma sanguin. Les traitements à température ambiante ont été comparés aux mêmes traitements effectués à  $-5^{\circ}\text{C}$ .



**Figure V.4** : Effet de la température au cours d'un traitement cyclique avec une vitesse d'application rapide sur l'activité de facteurs de coagulation (VA = 50 MPa.s<sup>-1</sup>, MA = 5×2min)

La figure V.4 souligne clairement l'intérêt d'utiliser une température négative dans le cadre du développement d'un procédé hautes pressions de sécurisation du plasma sanguin. En effet, le fait de travailler à -5°C permet d'augmenter les activités résiduelles en facteurs VIIIc et V respectivement de 20 % à 40 % par rapport aux valeurs obtenues après un traitement à température ambiante.

### V.1.3. Conclusion

Le procédé hautes pressions de sécurisation du plasma sanguin est défini principalement par quatre paramètres : la valeur de la pression, la vitesse d'application de la pression, le mode d'application de la pression et la température de traitement (la durée totale étant fixée à 10 min). Chacun de ces paramètres joue un rôle important sur chaque côté de l'équilibre à trouver entre *maintien des propriétés thérapeutiques du plasma sanguin* et *inactivation des micro-organismes*.

#### - La vitesse d'application de la pression :

Les derniers résultats obtenus ont montré qu'une vitesse d'application rapide (VA = 50 MPa.s<sup>-1</sup>) n'avait aucun impact sur les activités résiduelles des facteurs de coagulation au cours d'un traitement de 5 cycles de 2 min à -5°C. En revanche, dans les mêmes conditions de traitement, une telle vitesse permet d'accroître considérablement l'efficacité destructrice vis-à-vis des micro-organismes. Cet effet est particulièrement remarquable sur *Staphylococcus*

*aureus*, avec une efficacité destructrice augmentée de 4 unités par rapport à un traitement identique mais avec une vitesse d'application plus lente (Cf. § IV.2.3.2).

Il apparaît donc que, malgré les contraintes technologiques induites, ce paramètre est un point clé du procédé.

- Le mode d'application de la pression :

Du côté des facteurs de coagulation, il vient d'être montré qu'un mode d'application (MA) correspondant à 5 cycles de 2 min au cours d'un traitement réalisé à -5°C avec une vitesse d'application rapide était celui qui apportait le meilleur équilibre entre les activités résiduelles des facteurs VIIIc et V. Du côté des micro-organismes, il est généralement observé qu'un mode d'application cyclique permet d'atteindre une inactivation plus importante qu'un traitement en mode continu. Dans les conditions du procédé, ce phénomène est moins marqué, mais permet néanmoins d'augmenter l'efficacité destructrice d'un peu moins d'une unité pour *S. aureus* (Cf. § IV.2.3.3).

- La température du traitement :

La température du traitement s'est révélée être un autre paramètre clé lors de la définition du procédé de sécurisation du plasma sanguin humain. En effet, en ce qui concerne les facteurs de coagulation, le fait de conjuguer le traitement « hautes pressions » à une température négative conduit à augmenter la stabilité de ces protéines. Quant aux micro-organismes, il a été montré qu'ils sont beaucoup plus sensibles à la pression quand elle est appliquée à température négative, et en particulier – de manière surprenante - dans un domaine étroit, centré autour de -5°C (Cf. § IV.2.3.1, IV.3.1.5, IV.3.2.5, IV.3.3.2). De plus, cette température de -5°C est également suffisante pour protéger de façon efficace les facteurs de coagulation soumis à un traitement hautes pressions.

- La valeur de la pression :

L'ensemble des résultats obtenus sur les facteurs de coagulation a permis de mettre en évidence qu'il était difficile d'utiliser une pression supérieure à 200 MPa afin de rester dans les limites imposées par les législations française et européenne. Si cette valeur de la pression est couplée à un mode d'application de 5 cycles de 2 min, une vitesse d'application de 50 MPa.s<sup>-1</sup> et une température de -5°C, les activités résiduelles des facteurs VIIIc et V répondent aux normes des deux réglementations, tandis que les populations de *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger* et *Bacillus subtilis* sont complètement

inactivées ( $ED > 6$ ) et celle de *Staphylococcus aureus* (forme végétative) diminuée d'environ 5 log (Cf. § IV.2.3.1, IV.3.1.5, IV.3.2.5, IV.3.3.2, IV.3.4.3).

Ainsi, les conditions du traitement hautes pressions pour le **Procédé de sécurisation du plasma sanguin humain** permettant à la fois d'inactiver les cinq micro-organismes issus de la Pharmacopée Européenne et de maintenir les valeurs des activités des facteurs de coagulation (choisis comme marqueurs des protéines plasmatiques) dans les exigences de la réglementation, ont été définies comme suit :

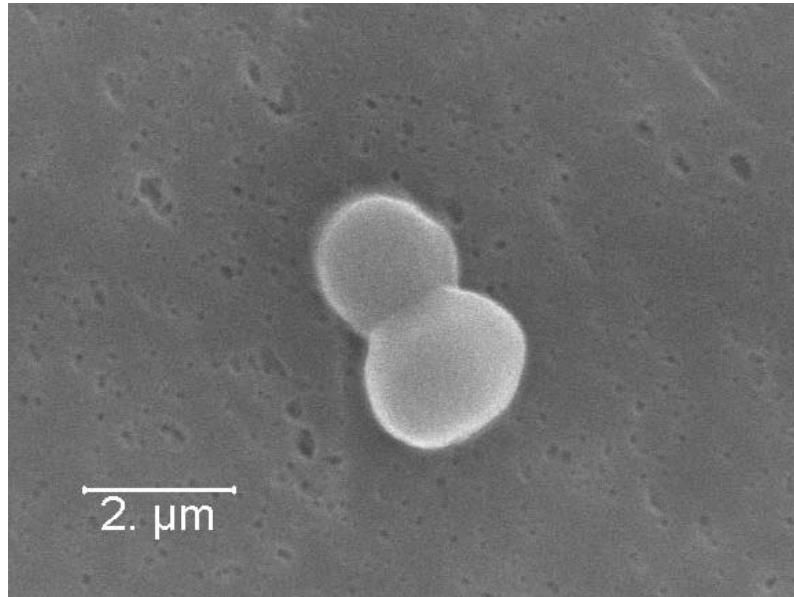
- une **valeur de la pression** de **200 MPa**,
- une **vitesse d'application de la pression** de **50 MPa.s<sup>-1</sup>**,
- un **mode d'application de la pression** de **5 cycles de 2 min**,
- une **température** égale à **-5°C**.

*La suite du travail a alors consisté à évaluer l'effet d'un tel procédé sur d'autres agents pathogènes tels que les parasites, les virus et le prion.*

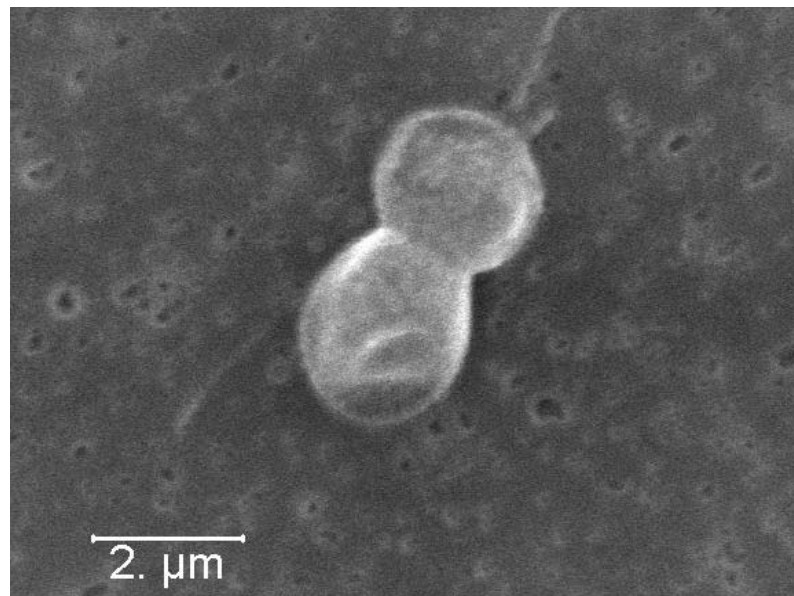
## **V.2. Visualisation de l'effet du Procédé Hautes Pressions de Sécurisation du Plasma Sanguin Humain sur les micro-organismes de la Pharmacopée Européenne**

### ***V.2.1. Effet du Procédé sur *Candida albicans****

Des observations au Microscope Electronique à Balayage (MEB) ont été réalisées sur des échantillons de plasma contaminé par *C. albicans*, avant (Figure V.5) et après (Figure V.6) application du Procédé.



**Figure V.5 :** Observation en MEB de *C. albicans* en suspension dans du plasma avant application du Procédé



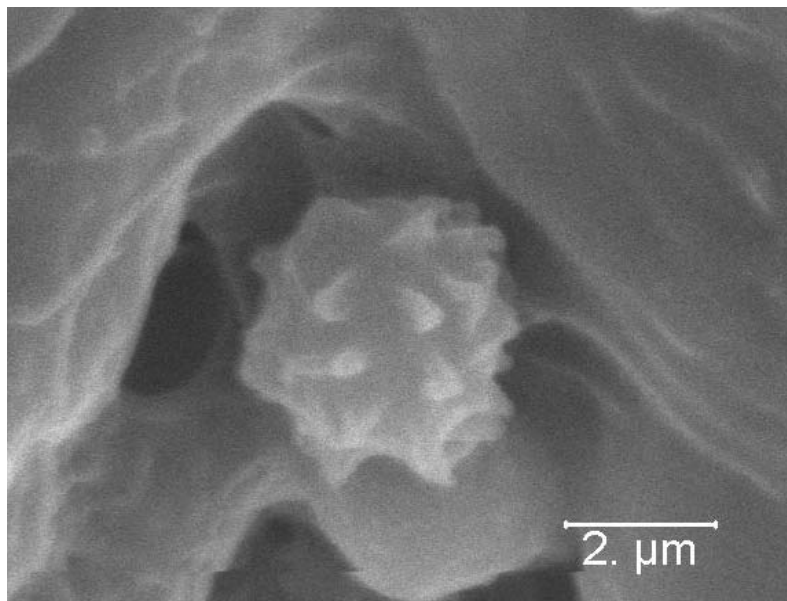
**Figure V.6 :** Observation en MEB de *C. albicans* en suspension dans du plasma après application du Procédé

Par comparaison avec les levures non traitées (dont la surface externe est sphérique, lisse et régulière), celles ayant été soumises au Procédé présentent un aspect irrégulier, bosselé. Cette différence pourrait être due à la compressibilité de la membrane. En effet, si cette dernière est plus compressible que le milieu intracellulaire, lors du traitement hautes pressions, la diminution du volume interne – induisant une fuite d'ions ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ) vers le milieu extérieur – serait partiellement irréversible. Ainsi, après retour à pression ambiante, la membrane reviendrait vers son état initial alors que le volume intracellulaire serait plus faible, ce qui expliquerait la formation de plissements à la surface des cellules. [317]

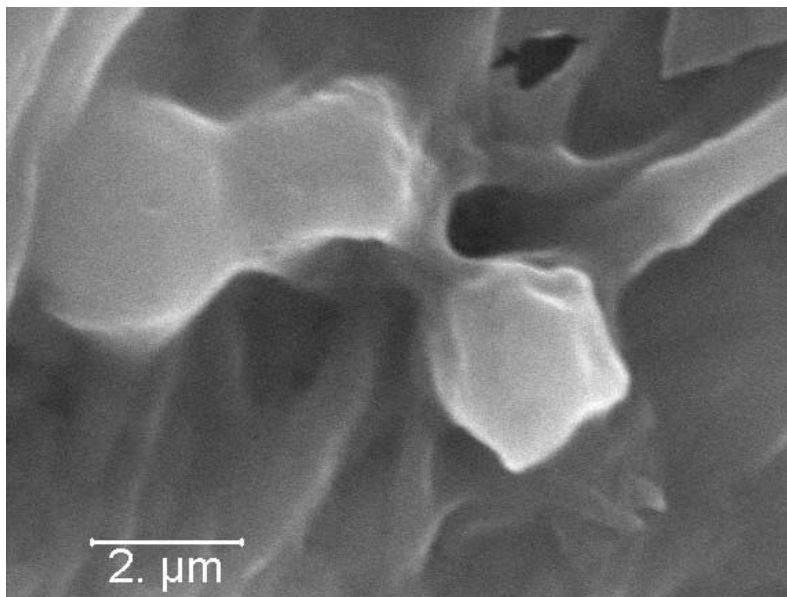


### V.2.2. Effet du Procédé sur *Aspergillus niger*

Les spores d'*Aspergillus niger*, en suspension dans du plasma sanguin humain, ont été soumises au non au Procédé. Ces échantillons ont ensuite été filtrés avant d'être observés en MEB.



**Figure V.7 :** Observation en MEB d'*A. niger* en suspension dans du plasma avant application du Procédé

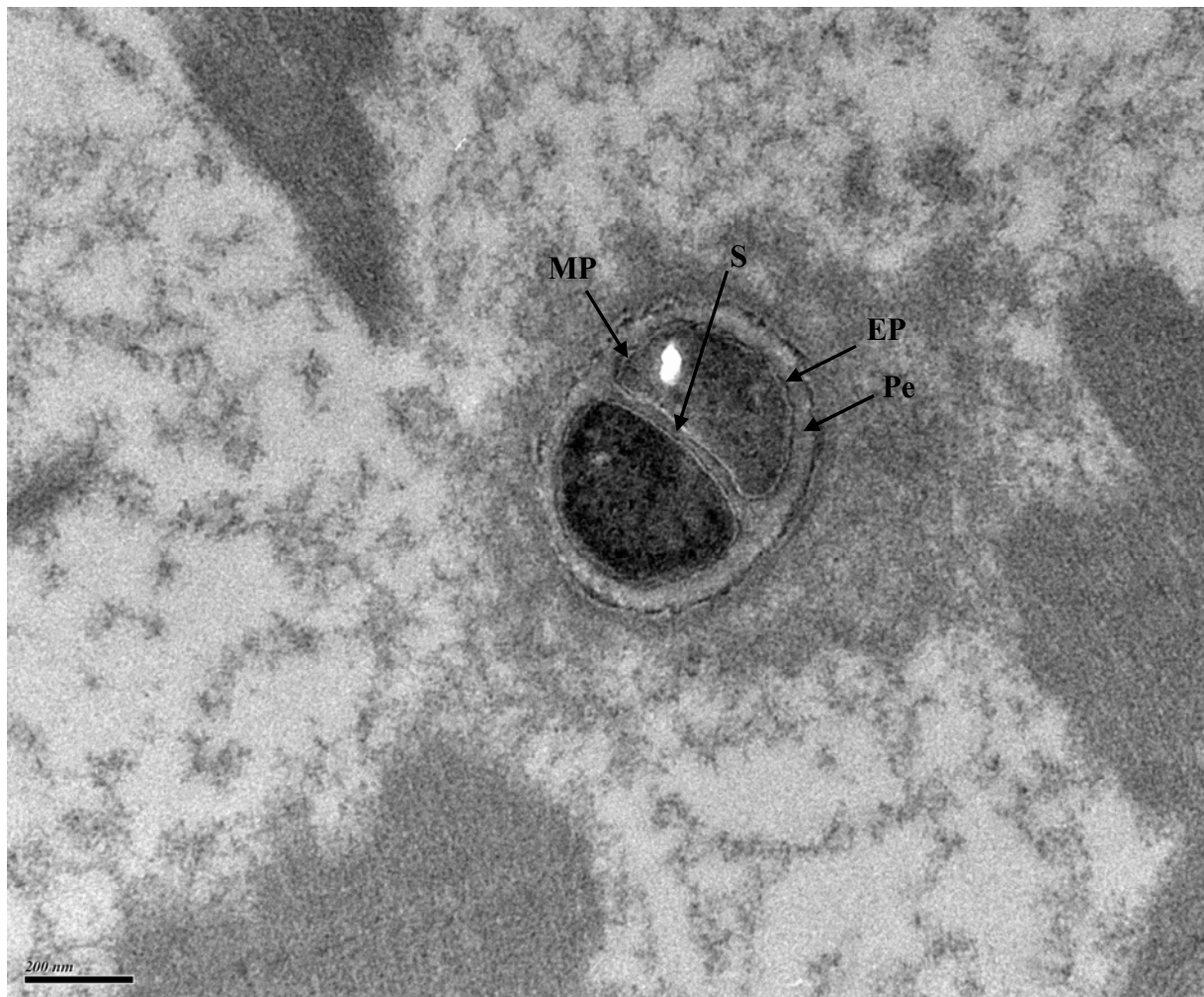


**Figure V.8 :** Observation en MEB d'*A. niger* en suspension dans du plasma après application du Procédé

Avant application du Procédé (Figure V.7), les spores d'*A. niger* sont parfaitement reconnaissables avec la présence de petits spicules à la surface. Après traitement hautes pressions (Figure V.8), la localisation des spicules initialement présents est encore visible mais ceux-ci sont moins marqués, laissant supposer que l'exosporium entourant les spores a subi quelques dommages lors de la compression.

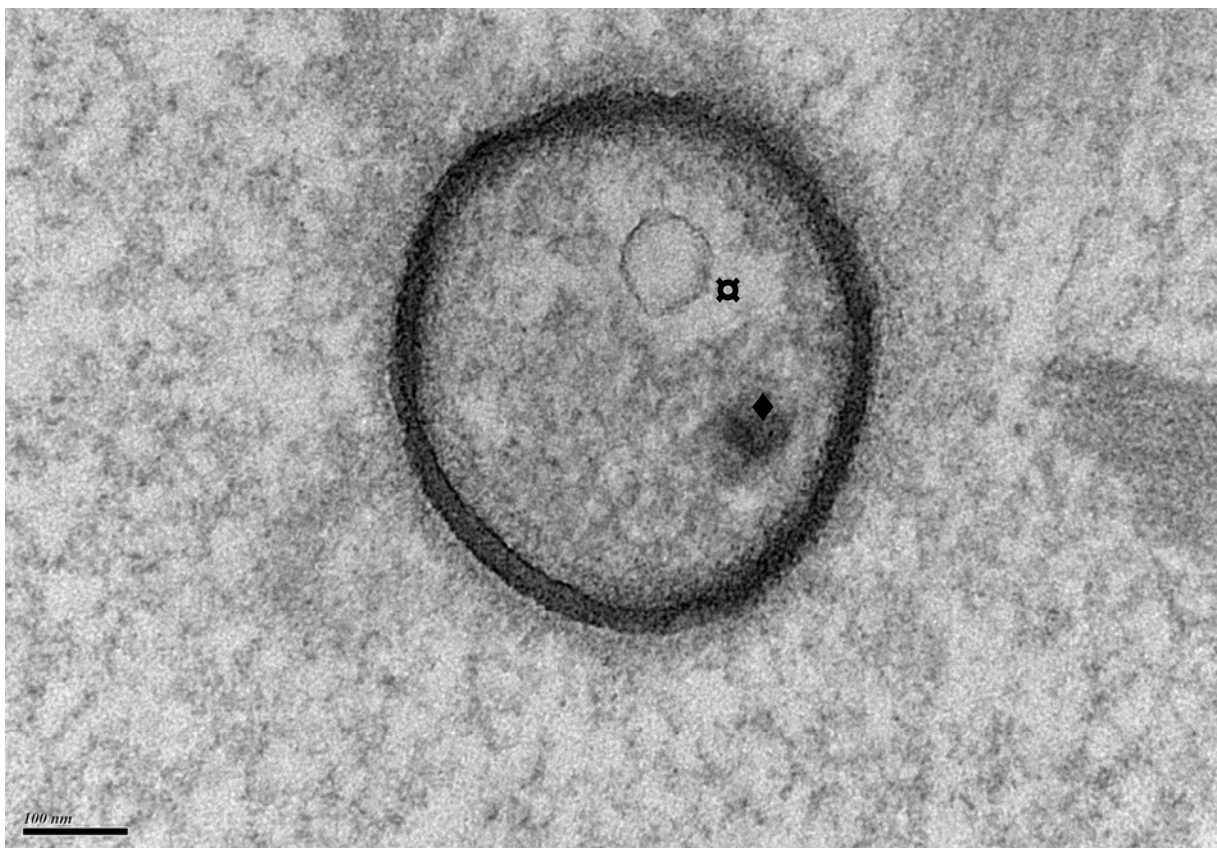
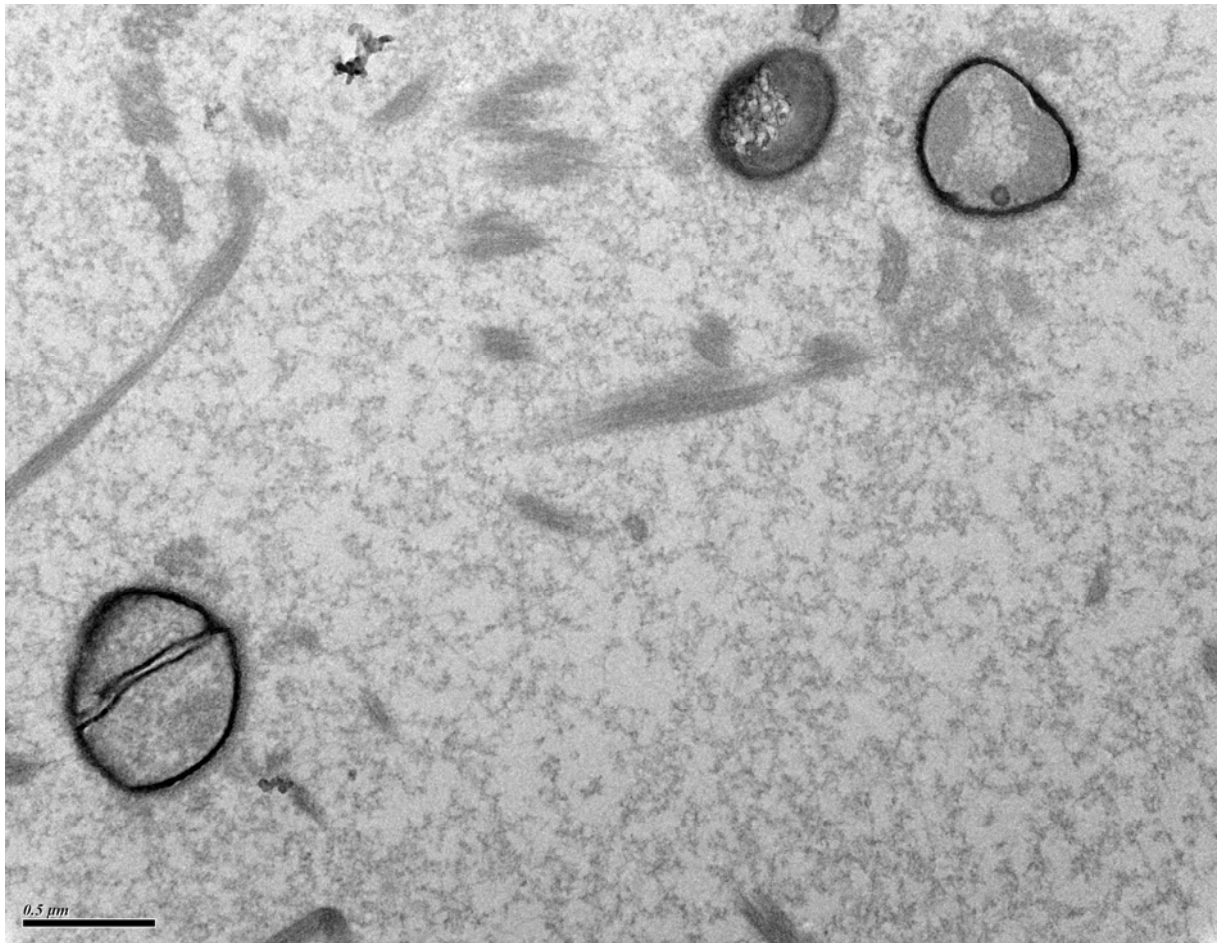
### V.2.3. Effet du Procédé sur *Staphylococcus aureus*

Des observations en microscopie électronique à transmission (MET) ont été réalisées sur des suspensions (dans le plasma sanguin) de *Staphylococcus aureus* avant (Figure V.9) et après (Figure V.10) application du Procédé.



**Figure V.9** : Observation en MET de *S. aureus* en suspension dans du plasma avant application du Procédé.

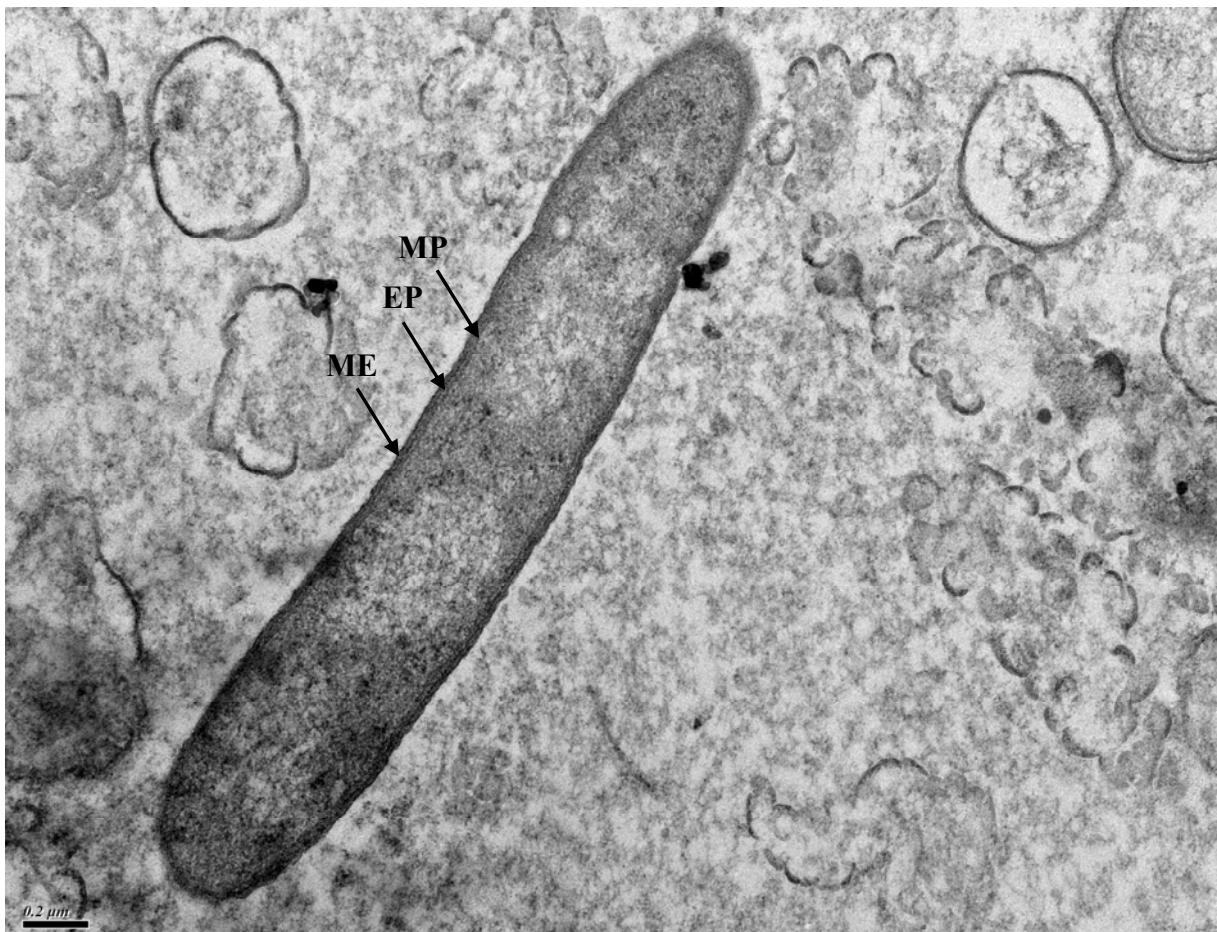
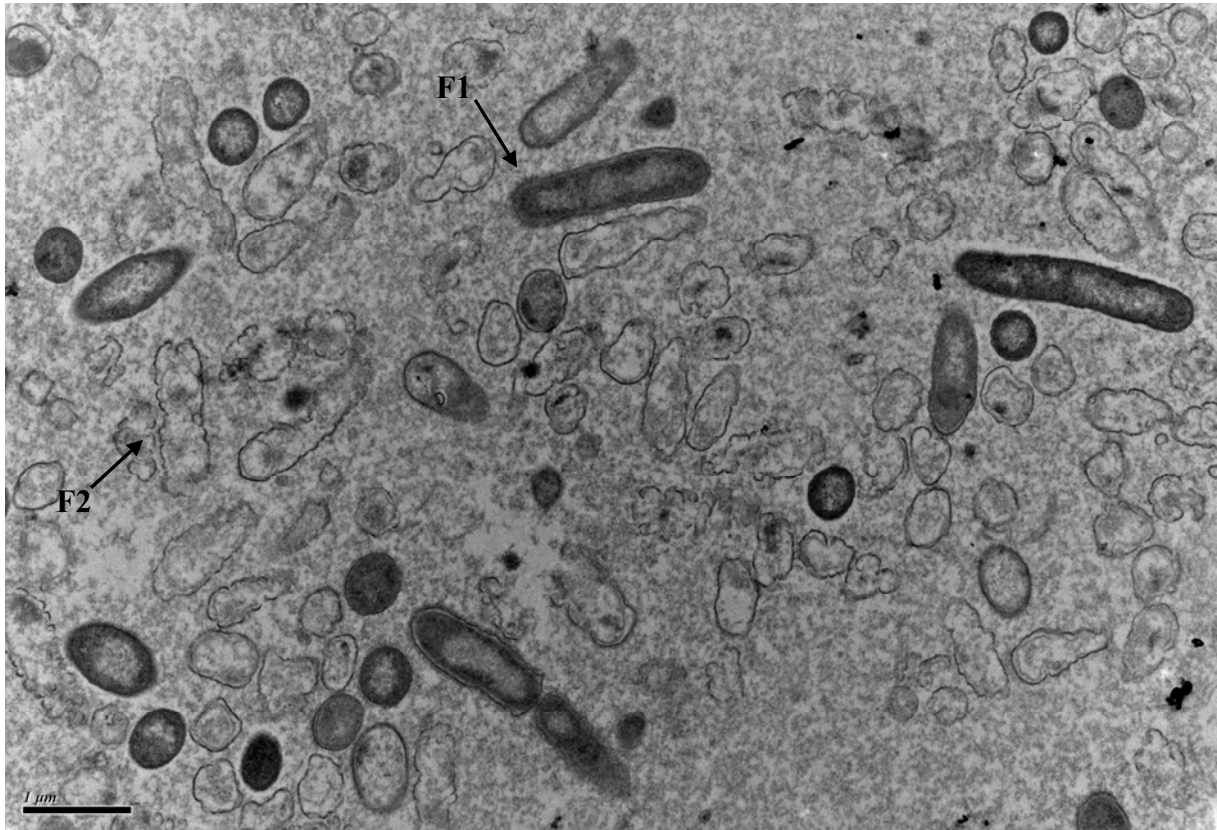
MP : membrane plasmique, S : septum, EP : espace périplasmique, Pe : peptidoglycane



**Figure V.10** : Observation en MET de *S. aureus* en suspension dans du plasma après application du Procédé

Sur la figure V.9, représentant deux cellule de *S. aureus* en fin de division avant application du Procédé, les principales ultrastructures de ce micro-organisme sont clairement visualisées : la membrane plasmique (MP), l'espace périplasmique (EP) qui la sépare des nombreuses couches de peptidoglycane (Pe) constituant la paroi. Cette organisation est caractéristique des bactéries Gram positif. Le septum (S) qui s'est formé avant la séparation des deux cellules est également visible.

Après application du Procédé (Figure V.10), le milieu intracellulaire de *S. aureus* s'est fortement éclairci par comparaison avec les cellules non traitées. Une répartition hétérogène des zones sombres (◆) et claires (■) est visible, ce qui constitue la preuve d'une altération irréversible du matériel intracellulaire.



**Figure V.11** : Observation en MET de *P. aeruginosa* dans du plasma avant application du Procédé  
(ME : membrane externe, EP : espace périplasmique, MP : membrane plasmique)

#### ***V.2.4. Effet du Procédé sur Pseudomonas aeruginosa***

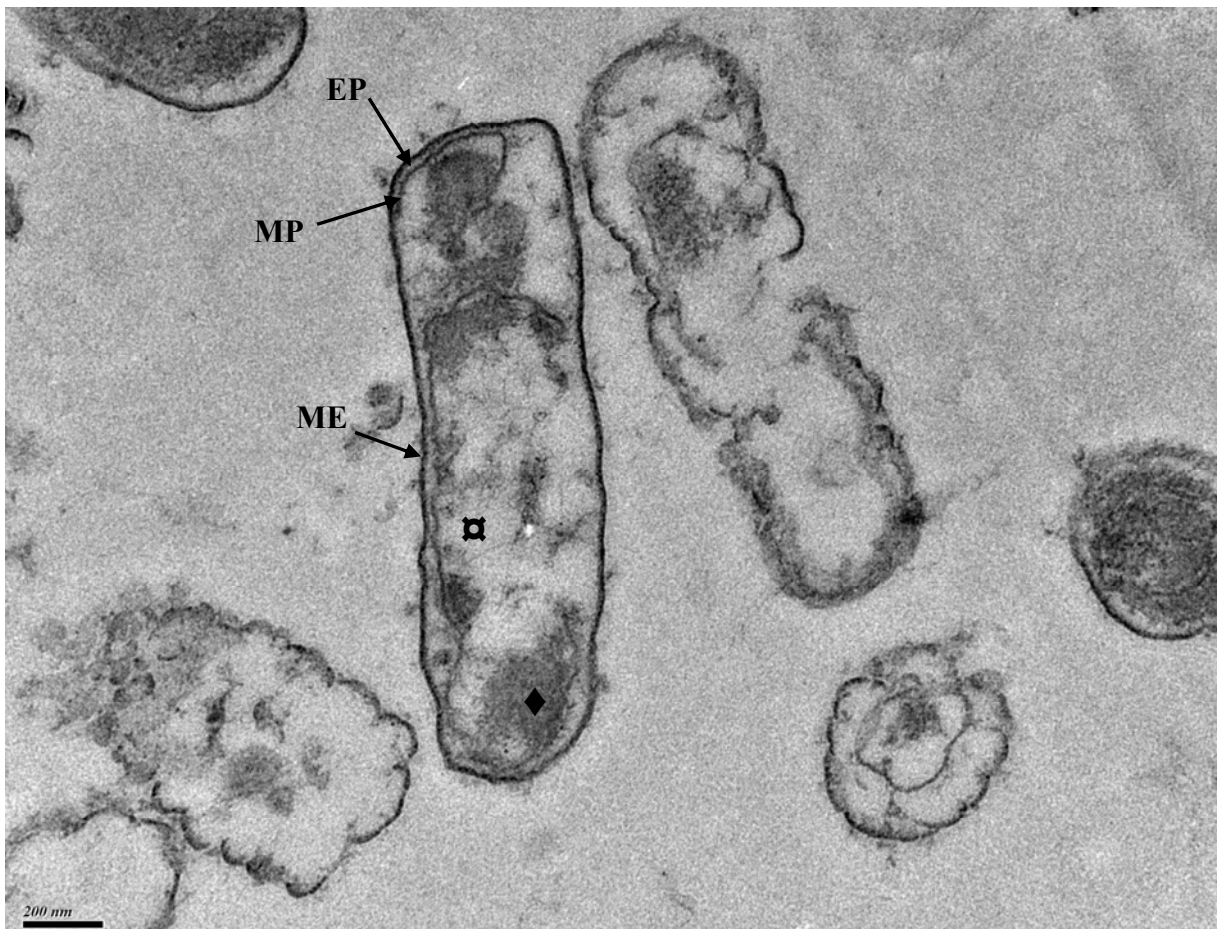
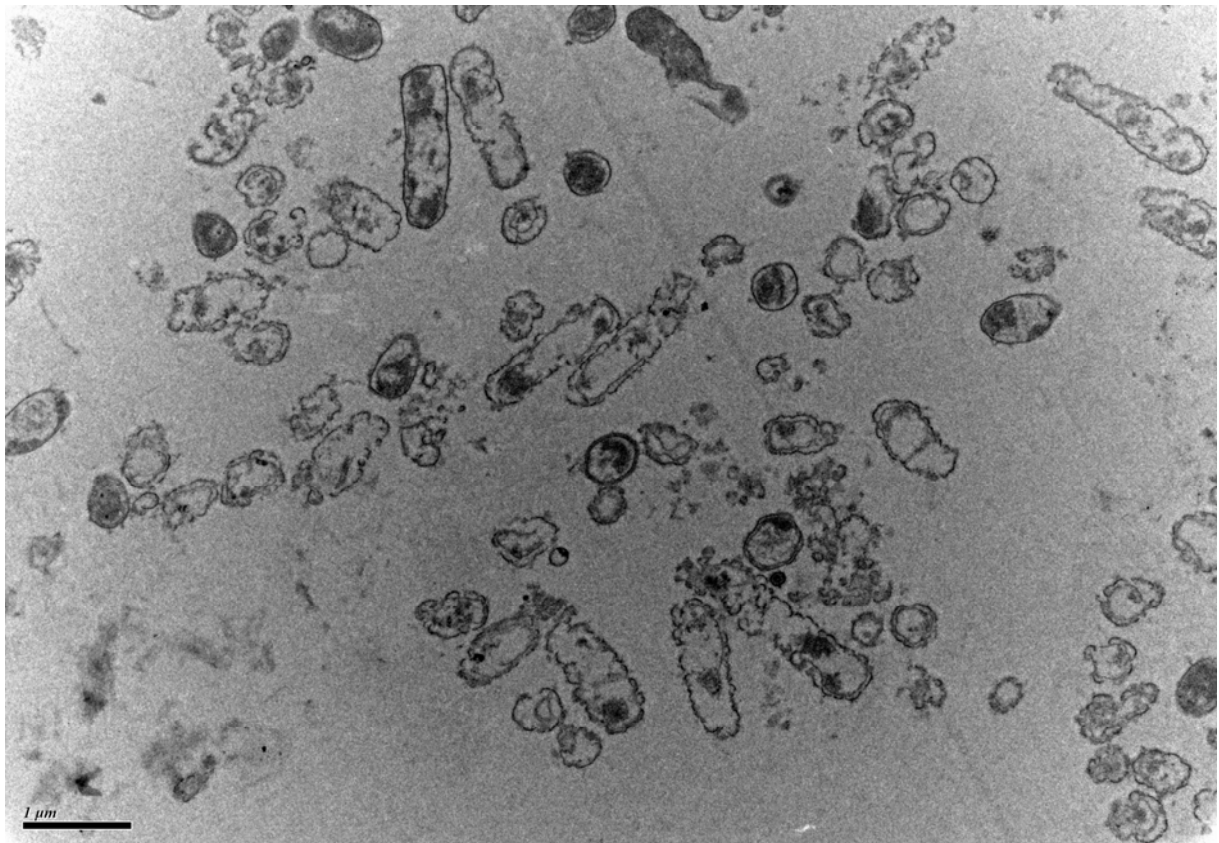
Des échantillons de plasma contaminé par *Pseudomonas aeruginosa* avant et après application du Procédé ont été observés en MET.

Avant traitement hautes pressions (Figure V.11), les observations mettent en évidence deux formes distinctes de *P. aeruginosa* :

- la première (F1), caractéristique de ce micro-organisme (et des bactéries Gram négatif), où une zone légèrement plus claire – l'espace périplasmique (EP) – entre la membrane plasmique (MP) et la membrane externe (ME) est visible,
- une seconde (F2), présentant un aspect plus déstructuré, pour laquelle la membrane semble déjà être altérée.

L'observation de cette seconde forme, très représentée au sein de la population bactérienne, semble confirmer l'effet particulier du plasma sanguin sur un micro-organisme tel que *P. aeruginosa*. En effet, il avait été montré (§ IV.3.1.6) que ce dernier était en partie inactivé en le mettant en suspension uniquement dans le plasma sanguin. Au regard de l'aspect déstructuré de la membrane, il peut être supposé que certains composés plasmatiques (tels que le complément) auraient pu s'y lier et créer des pores, entraînant ainsi la mort d'une partie des cellules.





**Figure V.12** : Observation en MET de *P. aeruginosa* en suspension dans du plasma après application du Procédé  
MP : membrane plasmique, EP : espace périplasmique, ME : membrane externe

Suite à l'application du Procédé, l'aspect général de *P. aeruginosa* est complètement déstructuré (Figure V.12). Certaines cellules présentent une discontinuité au niveau de leur membrane. Les autres, pour lesquelles il est encore possible de distinguer la membrane plasmique et la membrane externe, renferment un milieu intracellulaire hétérogène, dans lequel des zones claires peu denses (■) et sombres très denses (◆) peuvent être distinguées. Ces zones sont caractéristiques d'une altération importante du matériel intracellulaire.

### **V.3. Evaluation du Procédé Hautes Pressions de Sécurisation du Plasma Sanguin Humain sur divers agents pathogènes**

#### ***V.3.1. Effet du Procédé hautes pressions de sécurisation du plasma sanguin humain sur les parasites***

Les parasites sanguicoles posent un problème pour les transfusions et injections de produits dérivés du sang. En effet, des parasitoses post-injection de ces produits ont été reportées, notamment le paludisme, plus exceptionnellement la leishmaniose, et en Amérique du Sud : la maladie de Chagas.

Afin d'étudier l'effet du procédé de sécurisation du plasma sanguin décrit au paragraphe précédent sur des parasites, une collaboration a été mise en place avec le laboratoire de Parasitologie de l'Université Victor Ségalen - Bordeaux 2 (Professeur P. VINCENDEAU). L'ensemble des expériences a consisté à prélever du sang à des souris contaminées par le parasite à tester. Les échantillons de sang ont ensuite été séparés en trois lots :

- le premier échantillon correspondait au « témoin non traité »,
- le deuxième consistait en un « témoin de transport », c'est-à-dire qu'il a suivi le même parcours que les échantillons traités mais est resté toute la journée à température ambiante,
- le troisième, le « témoin de température », a été plongé dans le bain réfrigéré dans lequel était placée l'enceinte « hautes pressions » afin d'évaluer l'effet de la congélation seule sur les parasites,



- le dernier lot, composé de 10 échantillons de sang contaminé, a été traité sous hautes pressions, en utilisant les paramètres caractérisant le procédé de sécurisation du plasma ( $P = 200 \text{ MPa}$ ,  $VA = 50 \text{ MPa}\cdot\text{s}^{-1}$ ,  $t = 5 \times 2 \text{ min}$ ,  $T \approx -5^\circ\text{C}$ ).

Chacun des échantillons : témoin ou ayant subi le traitement « hautes pressions », a été observé par microscopie optique puis injecté à des souris saines. Le nombre de souris survivantes un mois après l'injection a ensuite permis de conclure sur l'effet inactivant de l'application de ce traitement.

#### V.3.1.1. Effet sur *Plasmodium berghei*

Le premier parasite testé a été *Plasmodium berghei*, un parasite servant communément de modèle d'étude de la malaria chez la souris. Il s'agit d'un parasite hématozoaire, présent principalement dans les globules rouges et non dans le plasma. Néanmoins, il s'agissait d'un premier modèle de parasite intéressant à étudier de par la prévalence de sa forme humaine dans le monde.

Les échantillons de sang de souris ayant servi de témoins ou soumis au traitement « hautes pressions » ont été injectés à des souris. Les résultats concernant les observations microscopiques et le nombre de souris survivantes un mois après l'injection sont présentés dans le tableau V.1.

	<b>Témoin non traité</b>	<b>Témoin "transport"</b>	<b>Témoin "température"</b>	<b>Echantillons traités sous HP</b>
<b>Observation microscopique</b>	Parasites nombreux et vivaces	Parasites moins vivaces que le témoin non traité	Parasites moins nombreux, moins vivaces que le témoin non traité	Pas de parasites Hématies lysées
<b>Nombre de souris survivantes</b>	0/1	0/1	0/1	10/10

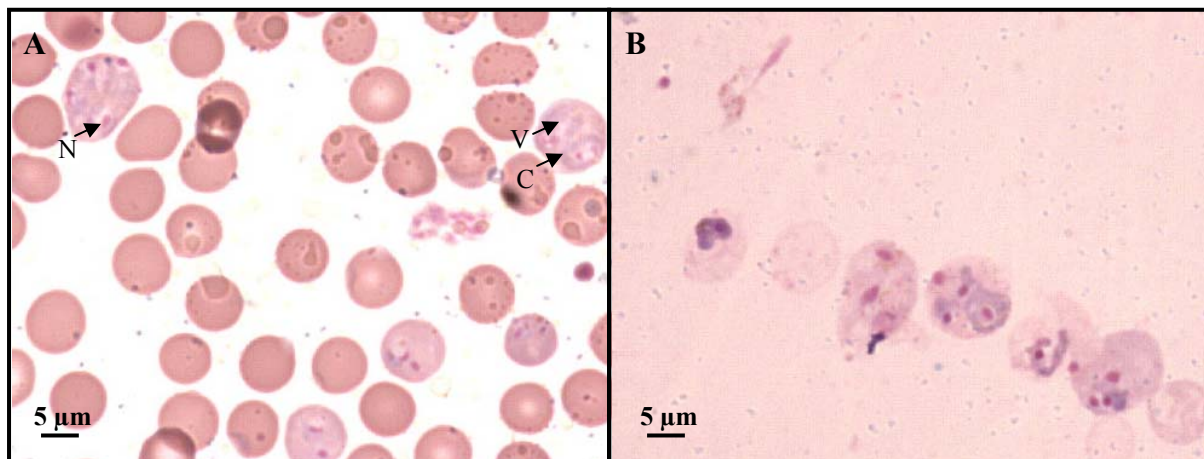
**Tableau V.1** : Conclusions de l'observation microscopique et des essais in vivo réalisés sur *Plasmodium berghei*

Les résultats reportés dans le tableau V.1 montrent que l'application d'un traitement « hautes pressions » de 5 cycles de 2 min à  $-5^\circ\text{C}$  et  $200 \text{ MPa}$  avec une vitesse d'application de  $50 \text{ MPa}\cdot\text{s}^{-1}$  permet d'inactiver complètement *Plasmodium berghei*. En effet, seules les souris auxquelles ont été injectés les échantillons de sang contaminé traités sous hautes pressions ont

survécu. Ainsi, même si à l'observation microscopique les parasites ayant subi un cycle de congélation / décongélation (témoin "température") semblait déjà affaibli, cela n'a pas suffi à supprimer leur pouvoir infectieux et il a fallu lui associer le Procédé « hautes pressions » pour observer un tel effet.

D'autre part, des photographies des observations microscopiques ont été prises pour le témoin non traité et les échantillons soumis au traitement « hautes pressions » (Figure V.13). Sur ces images, les parasites présents dans l'échantillon « témoin » sont bien visibles à l'intérieur des hématies, avec une structure caractéristique de « bague à chaton ». En revanche, après traitement hautes pressions, les hématies sont lysées et seuls les noyaux des *Plasmodium* peuvent encore être distingués.

*Le Procédé de sécurisation du plasma a donc totalement modifié la structure des Plasmodium ainsi que leur environnement, ce qui explique la perte de leur pouvoir infectieux.*



**Figure V.13** : Observation au microscope optique de sang contaminé par *Plasmodium berghei* avant (A) et après (B) traitement par le « Procédé Hautes Pressions de Sécurisation du Plasma ».  
(N : Noyau, C : Cytoplasme, V : Vacuole)

#### V.3.1.2. Effet sur *Trypanosoma brucei brucei*

La deuxième série d'essais sur les parasites a porté sur *Trypanosoma brucei brucei* (*Tbb*), qui est un parasite extracellulaire. *Tbb* est le modèle animal de *Trypanosoma brucei*, agent responsable de la « maladie du sommeil ». Tout comme pour *Plasmodium berghei*, les échantillons de sang prélevé sur des souris contaminées par *Tbb* ont été divisés en plusieurs lots : témoin non traité, témoin « transport », témoin « température » et échantillons soumis au

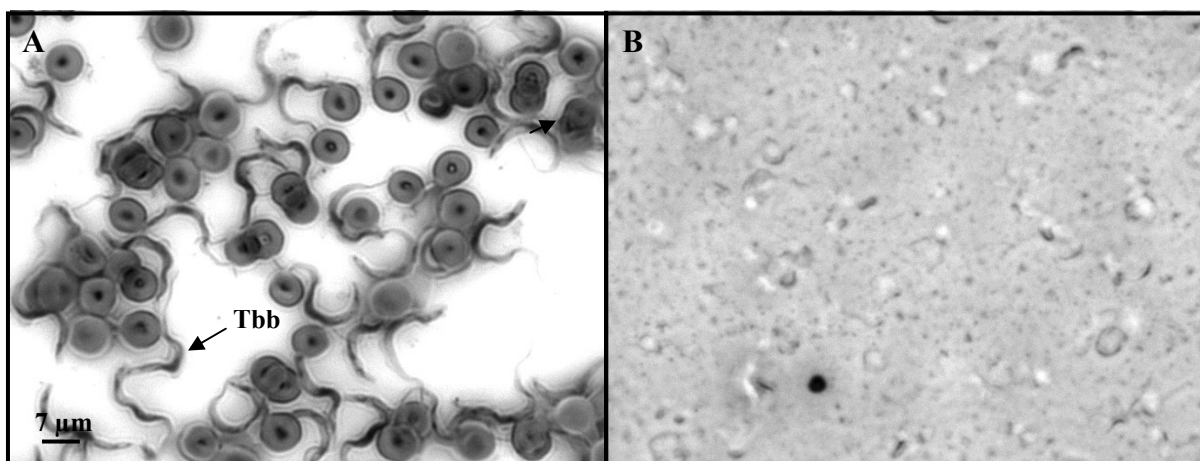
Procédé de sécurisation du plasma. Ils ont ensuite été observés par microscopie optique puis injectés à des souris. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau V.2.

	Témoin non traité	Témoin « transport »	Témoin « température »	Echantillons traités sous HP
<b>Observation microscopique</b>	Parasites nombreux et vivaces	Parasites moins vivaces que le témoin non traité	50 % de parasites, moins vivaces que le témoin non traité	Pas de parasites
<b>Nombre de souris  survivantes</b>	0/1	0/1	0/1	10/10

**Tableau V.2** : Conclusions de l'observation microscopique et des essais in vivo réalisés sur *Trypanosoma brucei brucei*

Ces résultats mettent une nouvelle fois en évidence l'effet létal du Procédé de sécurisation du plasma sur des parasites, et en particulier sur *Trypanosoma brucei brucei*. En effet, alors que l'injection des échantillons « témoin » a conduit à la mort des souris, celles ayant reçu les échantillons traités sous hautes pressions ont, quant à elles, survécu.

De plus, les observations microscopiques des frottis réalisés avant et après traitement confirment l'effet létal de ce Procédé sur *Trypanosoma brucei brucei*. En effet, si ces parasites sont clairement visibles dans les échantillons non traités, ils ne sont ensuite plus décelables après application des hautes pressions (Figure V.14).



**Figure V.14** : Observation au microscope optique de sang contaminé par *Trypanosoma brucei brucei* (Tbb) avant (A) et après (B) traitement par le « Procédé Hautes Pressions de Sécurisation du Plasma ».

### V.3.1.3. Effet sur *Trypanosoma cruzi*

*Trypanosoma cruzi* est l'agent responsable de la maladie de Chagas. L'évaluation de l'effet du Procédé Hautes Pressions de Sécurisation du Plasma Sanguin Humain sur ce parasite a été réalisée par culture cellulaire dans du milieu LIT et non par injection à des souris. L'inactivation des parasites se traduit alors par une perte de mobilité et l'absence de multiplication. Comme pour les parasites précédemment étudiés, un témoin non traité, un témoin « transport » et un témoin « température » ont été préparés. En parallèle, huit échantillons ont été soumis au Procédé. Les résultats de l'observation microscopique et de la culture cellulaire sont présentés dans le tableau V.3.

	<b>Témoin non traité</b>	<b>Témoin « transport »</b>	<b>Témoin « température »</b>	<b>Echantillons traités sous HP</b>
<b>Observation microscopique</b>	Parasites nombreux et vivaces	Parasites nombreux et vivaces	Parasites nombreux et vivaces	Pas de parasites
<b>Culture cellulaire</b>	Multiplication des parasites	Multiplication des parasites	Multiplication des parasites	Absence de parasites

**Tableau V.3 :** Conclusions de l'observation microscopique et de la culture cellulaire réalisées sur *Trypanosoma cruzi*

Les résultats obtenus (Tableau V.3) montrent l'effet létal du Procédé de Sécurisation du Plasma Sanguin sur *Trypanosoma cruzi*. En effet, alors que pour l'ensemble des échantillons « témoins », les parasites sont encore capables de se multiplier, ceux ayant été soumis au Procédé sont morts.

### ***V.3.2. Effet du Procédé hautes pressions de sécurisation du plasma sanguin humain sur les virus***

#### V.3.2.1. Effet sur le virus de la rougeole

La première évaluation de l'effet du « Procédé hautes pressions de sécurisation du plasma sanguin humain » sur les virus a été menée en collaboration avec le laboratoire de virologie du Professeur H. FLEURY (Université Victor Segalen – Bordeaux 2).

Le virus de la rougeole a été sélectionné comme modèle du fait que la manipulation des tubulures contenant une suspension de celui-ci ne nécessitait pas de travailler dans un laboratoire de niveau P3.

Ces premiers essais avaient pour objectif d'obtenir rapidement une première évaluation de l'impact du Procédé sur un virus enveloppé. Une titration du virus de la rougeole a donc été réalisée avant et après application du traitement « hautes pressions » définissant le procédé de sécurisation du plasma sanguin (Tableau V.4).

	<b>Titre (Unités.mL<sup>-1</sup>)</b>
<b>Avant HP</b>	$2 \times 10^3$
<b>Après HP</b>	$\approx 0$

**Tableau V.4** : Résultats de la titration du virus de la rougeole avant et après application du Procédé hautes pressions de sécurisation du plasma sanguin

Un traitement « hautes pressions » appliqué dans les conditions définies pour le Procédé permet donc d'inactiver totalement une population de virus de la rougeole de  $2 \times 10^3$  particules.mL<sup>-1</sup>.

Etant donné les résultats observés pour ce virus, il apparaissait alors indispensable de valider le « Procédé hautes pressions de sécurisation du plasma sanguin » vis-à-vis d'un virus important, requis pour une validation plus approfondie : le **VIH-1**.

#### V.3.2.2. Effet sur le Virus de l'Immunodéficience Humaine

La manipulation de ce micro-organisme étant strictement réglementée, cette étude nécessitait de réaliser les expériences hautes pressions dans un laboratoire de niveau de sécurité P3 (Docteurs M. VENTURA et M. L. ANDREOLA – Université Victor Ségalen – Bordeaux 2). Un équipement miniaturisé a donc été conçu et réalisé sur le même principe que celui disponible au CRHP (ICMCB – Bordeaux), puis installé dans ce laboratoire (Cf. § III.1.4).

- Rappels sur le VIH-1

Le VIH est un rétrovirus qui infecte les cellules CD4+. Au début de l'infection, il se fixe sur ces récepteurs, puis fusionne avec la membrane de la cellule hôte. Ses deux brins d'ARN sont alors rétrotranscrits en ADN double brin grâce à sa transcriptase inverse. L'intégrase permet ensuite à cet ADN de s'intégrer dans le génome de la cellule hôte (Cf. § III.5.1.2).

- Principe du test de détection du VIH

L'inactivation du VIH par le Procédé de sécurisation du plasma sanguin a été évaluée par le test au 4-MUG. Ce dernier est basé sur l'expression de la protéine virale Tat, qui est un activateur de transcription des gènes du VIH-1. Pour ce test, l'infection est réalisée sur des cellules HeLa P4, qui possèdent un gène rapporteur Lac Z dont l'expression est sous le contrôle d'un promoteur activé par la protéine Tat. Ainsi, si le VIH n'est pas inactivé, il va pénétrer dans ces cellules, s'intégrer dans le génome, exprimer la protéine Tat qui va alors activer la transcription du gène Lac Z. Ceci conduit à la synthèse de  $\beta$ -galactosidase, qui catalyse la dégradation du 4-MUG en un produit fluorescent. L'intensité de la fluorescence est alors mesurée et est proportionnelle à l'infectivité virale (Cf. § III.5.1.2).

- Déroulement des expériences

Les expériences ont été réalisées directement sur des surnageants viraux préparés par co-culture de cellules MT<sub>4</sub> et H<sub>9</sub> Lai. Un premier échantillon a été soumis au traitement hautes pressions dans les conditions du Procédé, tandis que le second a été placé dans le bain réfrigéré dans lequel plongeait l'enceinte d'expérience (« témoin de température »). A la fin de ces traitements, les surnageants viraux ont été récupérés pour infecter des plaques 96 puits dans lesquels ont été cultivées des cellules HeLa P4, selon le schéma reporté dans le tableau V.5 (ce tableau représente la plaque 96 puits et contient les valeurs des dilutions de la suspension virale).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	1/4	1/16	1/64	1/256	1/1024	1/4096	1/16384	1/65536	1/ 262144	1/ 1048576	1/ 4194304	
<b>B</b>	1/4	1/16	1/64	1/256	1/1024	1/4096	1/16384	1/65536	1/ 262144	1/ 1048576	1/ 4194304	
<b>C</b>	1/4	1/16	1/64	1/256	1/1024	1/4096	1/16384	1/65536	1/ 262144	1/ 1048576	1/ 4194304	
<b>D</b>	1/4	1/16	1/64	1/256	1/1024	1/4096	1/16384	1/65536	1/ 262144	1/ 1048576	1/ 4194304	
<b>E</b>	1/6	1/36	1/216	1/1296	1/7776	1/46656	1/ 279936	1/ 1679616	1/ 10077696	1/ 60466176	1/ 362797056	
<b>F</b>	1/6	1/36	1/216	1/1296	1/7776	1/46656	1/ 279936	1/ 1679616	1/ 10077696	1/ 60466176	1/ 362797056	
<b>G</b>	1/6	1/36	1/216	1/1296	1/7776	1/46656	1/ 279936	1/ 1679616	1/ 10077696	1/ 60466176	1/ 362797056	
<b>H</b>	1/6	1/36	1/216	1/1296	1/7776	1/46656	1/ 279936	1/ 1679616	1/ 10077696	1/ 60466176	1/ 362797056	

**Tableau V.5** : Schéma des dilutions de suspension virale utilisées pour infecter les cellules HeLa P4.

« Témoin de température », Suspension traitée sous HP, Cellules non infectées

Après la première infection, les plaques ont été incubées pendant 72 h à 37°C et 5 % CO<sub>2</sub>, puis elles ont été révélées par la méthode du 4-MUG. En parallèle, les surnageants viraux ont été récupérés pour infecter une nouvelle plaque 96 puits, qui a été placée à l'étuve pour quelques heures, le temps que les virus éventuellement présents puissent infecter les cellules. Elle a ensuite été lavée afin d'éliminer tous les éléments qui auraient pu être transportés avec les surnageants viraux, puis remise à l'étuve pendant 72 h. Une révélation au 4-MUG a alors été réalisée.

- Résultats

Pour chaque plaque, la moyenne des intensités de fluorescence mesurées dans les puits contenant les cellules non infectées (bruit de fond) a été soustraite aux valeurs détectées dans chaque autre puits. Les résultats obtenus après 72 h d'incubation sont présentés dans le tableau V.6.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<b>A</b>	29776	22827	12072	5872	1656	815	861	84	84	55	97
<b>B</b>	30394	23852	13903	8081	3027	1780	959	1158	3	161	-127
<b>C</b>	2259	937	444	246	99	75	-20	231	100	28	-107
<b>D</b>	2590	1819	980	634	199	144	29	52	58	75	17
<b>E</b>	22732	10846	5336	2566	294	81	20	167	147	34	-15
<b>F</b>	21392	10555	3859	1725	536	55	212	212	72	119	32
<b>G</b>	1183	596	208	413	79	1	22	23	44	34	-32
<b>H</b>	1564	347	49	26	10	6	-27	-57	22	19	10

**Tableau V.6 :** Valeurs des fluorescences lues 72 h après infection des cellules HeLa P4 par les surnageants viraux soumis ou non au procédé de sécurisation du plasma sanguin humain

Les résultats reportés dans le tableau V.6 montrent une diminution du signal détecté dans les puits ayant été infectés par les surnageants viraux soumis au traitement hautes pressions (lignes **C**, **D**, **G** et **H**) par rapport à ceux ayant reçu les surnageants viraux du « témoin de température » (lignes **A**, **B**, **E**, **F**). Il y a donc eu une inactivation du VIH-1 par le « Procédé de sécurisation du plasma sanguin » mais celle-ci semble insuffisante pour assurer la sécurité des produits sanguins traités.

Les surnageants viraux de cette plaque ont tout de même été récupérés afin d'infecter de nouvelles cellules. Les résultats observés 72 h après cette réinfection sont reportés dans le tableau V.7.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<b>A</b>	2472	1771	805	179	208	112	61	56	20	10	-38
<b>B</b>	5366	4568	1606	414	168	240	232	135	88	115	26
<b>C</b>	74	103	180	207	147	175	168	140	173	157	10
<b>D</b>	-20	25	157	143	201	165	201	218	187	204	55
<b>E</b>	772	562	232	156	168	157	150	180	371	190	77
<b>F</b>	905	461	238	201	177	113	158	153	142	127	46
<b>G</b>	78	107	155	132	94	75	96	197	138	191	69
<b>H</b>	50	57	50	72	22	25	55	30	32	31	16

**Tableau V.7 :** Valeurs des fluorescences lues 72 h après la réinfection de cellules HeLa P4 par les surnageants viraux soumis ou non au « procédé de sécurisation du plasma sanguin humain »



Les résultats de la réinfection (Tableau V.7) révèlent qu'aucun signal n'a pu être détecté dans les puits ayant reçu les échantillons soumis à la pression. Ainsi, *l'ensemble de la population virale initiale semble avoir été inactivé par le « Procédé de sécurisation du plasma sanguin »*.

Cependant, ces observations conduisent à deux remarques :

- (i) Compte tenu des différences de valeurs de fluorescence entre l'essai de réinfection (pas de signal avec les surnageants viraux les plus concentrés traités sous pression) et la plaque lue 72 h après la première infection (détection d'un signal pour les surnageants viraux soumis à la pression – Tableau V.6), il est probable que la fluorescence mesurée dans le second cas ne soit pas causée par une infection virale mais plutôt par la présence de protéine Tat qui aurait pu être encapsidée dans le virion lors de sa libération. Le système de révélation reposant sur l'activation du gène Lac Z par cette protéine, cette hypothèse pourrait expliquer les variations de signaux obtenus avec les surnageants viraux soumis à la pression entre les deux plaques. Dans ce cas, soit la protéine Tat a pu diffuser dans les cellules HeLa P4 sans qu'il y ait entrée de VIH-1, soit les virions ont pénétré dans les cellules mais n'ont pas pu s'intégrer dans le génome.
- (ii) Les valeurs de fluorescence évaluées pour les échantillons « témoins de température » sont relativement basses alors que les surnageants viraux initiaux présentent généralement une concentration d'environ  $10^8$  particules.mL<sup>-1</sup>. Il est donc possible que le cycle décongélation (pour la mise dans les contenants en forme de tubulure) – recongélation (lors de la plongée dans le bain réfrigéré) – décongélation (avant l'infection des plaques) puisse inactiver en partie le VIH-1, ce qui expliquerait ces signaux faibles.

L'ensemble de ces résultats tend à montrer que le VIH-1 peut être inactivé par application du « Procédé de sécurisation du plasma sanguin ». Néanmoins, les deux hypothèses émises devront être confirmées par de nouveaux essais, introduisant notamment une infection par un surnageant viral qui ne subirait pas de cycle de congélation supplémentaire (dans ce cas, les cellules seront infectées immédiatement après la décongélation d'un surnageant viral stocké à -80°C).

Différents travaux ont été menés ces dernières années sur le VIH afin d'évaluer le rôle des hautes pressions sur son inactivation. Il faut cependant souligner que les conditions

expérimentales mises en œuvre : soit de très hautes pressions (400 MPa à 650 MPa) [318], soit des valeurs modérées (200 MPa à 250 MPa) mais associées avec de très basses températures (-20°C à -30°C) (dans le domaine de la Glace III ou proche de ce dernier) [319], sont peu compatibles – dans le cadre d’un Procédé de sécurisation du plasma sanguin humain – avec à la fois le maintien de l’activité des protéines et l’inactivation des micro-organismes issus de la Pharmacopée Européenne (tel que *S. aureus*).

Les premiers résultats obtenus en collaboration avec le Laboratoire de Virologie sont très encourageants dans la mesure où ils soulignent que les paramètres associés à la pression (vitesse et mode d’application) pourraient jouer un rôle particulier dans l’inactivation de virus. Il apparaît également important de mieux appréhender les phénomènes biologiques induits par la pression et chacun des paramètres pouvant lui être associée, notamment au niveau des enzymes permettant la diffusion de l’infectivité (transcriptase inverse, intégrase...). [320]

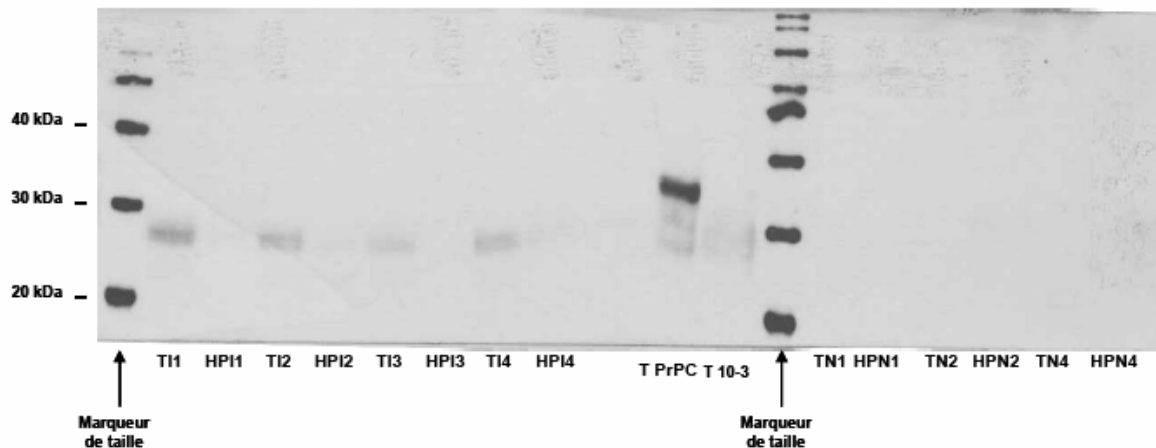
### ***V.3.3. Effet du procédé hautes pressions de sécurisation du plasma sanguin humain sur un agent pathogène particulier : le prion***

Le risque de transmission de la protéine prion pathologique (PrP<sup>Sc</sup>) par transfusion sanguin (plasma compris) fait toujours l’objet d’un débat. Actuellement, les moyens de prévention mis en œuvre par l’EFS reposent uniquement sur la sélection des donneurs et la déleucocytation des produits sanguins labiles. Aucun procédé de viro-atténuation du plasma n’inclut une étape d’inactivation du prion, à l’exception du développement d’une chromatographie d’affinité qui n’est pas encore mise sur le marché et qui nécessiterait une étape supplémentaire dans le processus de sécurisation. (Cf. § III.3.3.2 et III.3.3.3)

Les travaux précédents visant à inactiver la PrP<sup>Sc</sup> sous hautes pressions impliquaient souvent l’association de très hautes pressions et de températures élevées (Cf. § I.3.1.6). L’objectif de cette première étude était d’évaluer si l’adjonction, au barème de pression, de paramètres associés, tels que la vitesse (VA) et le mode d’application (MA) de la pression, pouvait permettre – au travers d’un changement de conformation de la protéine PrP<sup>Sc</sup> – de réduire son infectiosité. Il faut en effet rappeler que la PrP<sup>Sc</sup> et la PrP<sup>C</sup> ne diffèrent que par leurs structures tridimensionnelles.

Dans le but d'analyser les effets du « Procédé de sécurisation du plasma sanguin » sur un agent particulier : le prion, une collaboration avec l'Etablissement Français du Sang Pyrénées Méditerranée (Equipe de Mme J. COSTE) a été instaurée. La méthodologie utilisée est décrite au paragraphe III.6.2.

- Résultats



**Figure V.15** : Résultat du western blot

(Tix : Témoin Infecté non traité par le procédé, HPIx : Echantillon infecté traité par le procédé, TNx : Témoin Négatif non traité par le procédé, HPNx : Témoin négatif traité par le procédé)

La figure V.15 représente les résultats obtenus sur les différents échantillons de plasma sanguin contaminés par du broyat de cerveau sain ou infecté, traités sous hautes pressions ou non.

Etant donné qu'une étape de digestion à la protéinase K a été insérée dans le protocole, et que la protéine prion normale ( $\text{PrP}^{\text{C}}$ ) est sensible à une telle digestion contrairement à la  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ , l'anticorps 3F4 a pu se fixer uniquement à la protéine  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ . C'est pourquoi aucun signal n'est détecté pour les échantillons contenant du broyat de cerveau sain (échantillons TNx et HPNx).

En revanche, les échantillons contaminés par du broyat de cerveau de hamster infecté par la souche 263K (avant traitement) montrent une bande visible correspondant au signal attendu. En comparant deux à deux les signaux détectés entre les échantillons infectés traités et non traités par le Procédé, une diminution significative de la quantité de  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  est observée après traitement par le Procédé de sécurisation du plasma sanguin humain (échantillons HPIx). Ces résultats semblent reproductibles pour les quatre couples d'échantillons testés (Tix + HPIx).

*Bien que les résultats obtenus lors de cet essai soient préliminaires, il apparaît que la mise en œuvre de ce Procédé conduit à une réduction significative de la quantité de protéine pathologique PrP<sup>Sc</sup> détectée.*

La protéine a probablement été modifiée lors du traitement « hautes pressions », ce qui a pu entraîner une non reconnaissance de l'épitope par l'anticorps 3F4 et/ou une suppression de la résistance à la protéinase K.

Les connaissances actuelles et els techniques d'étude du prion développées jusqu'à présent ne permettent pas encore d'identifier ou de caractériser les mécanismes réellement impliqués lors de l'action des hautes pressions sur cet agent transmissible non conventionnel.

*Les résultats obtenus devront être confirmés avant de poursuivre l'étude de l'effet du Procédé de sécurisation du plasma sanguin sur la diminution de l'infectiosité due au prion dans ce produit.*

#### **V.4. Conclusion**

*Une évaluation du « Procédé hautes pressions de sécurisation du plasma sanguin humain » vis-à-vis de divers agents pathogènes tels que des parasites (*Plasmodium berghei*, *Trypanosoma brucei brucei*), des virus (virus de la rougeole et HIV-1) ou le prion a été menée. Il apparaît que ce procédé permet d'inactiver les parasites ainsi que les virus étudiés. En outre, il faut souligner que pour la première fois, dans un domaine de pression relativement modérée et en l'associant avec divers paramètres (vitesse et mode d'application) ainsi qu'avec une température négative, une réduction importante de la quantité de protéine infectieuse PrP<sup>Sc</sup> est observée.*

*Les résultats obtenus pour une pression de l'ordre de 200 MPa permettent de souligner que si la valeur de ce paramètre thermodynamique joue un rôle indéniable, les paramètres associés, notamment la vitesse d'application de la pression, le mode d'application de la pression et les températures négatives, ont un impact très important. Cet effet de synergie agit probablement sur les mécanismes mis en jeu tant au niveau des modifications de conformation des protéines que de l'inactivation des agents pathogènes.*

*Ces premiers résultats nécessiteront sur le plan fondamental des études plus approfondies afin de mieux appréhender le rôle spécifique de chacun de ces paramètres sur les mécanismes d'action lors de leur association avec les hautes pressions, la valeur de 200 MPa étant relativement modérée par rapport aux travaux antérieurs.*

## CONCLUSIONS

Le paramètre thermodynamique **PRESSION**, du fait de ses deux principales caractéristiques : (i) la faible énergie mise en jeu lors de son application - notamment en phase liquide -, et (ii) l'effet de condensation menant à une valeur négative de  $\Delta V$ , a été depuis ces trente dernières années impliqué dans diverses études dans le domaine des Biosciences.

Si durant les décennies 1980 et 1990 la principale cible était le développement de nouveaux procédés de sécurisation des aliments associant inactivation des agents pathogènes et sauvegarde des propriétés organoleptiques, depuis une dizaine d'années un intérêt croissant pour les applications des hautes pressions dans les secteurs de la Biologie et de la Santé a été observé. C'est dans cette optique particulière que se sont inscrits les travaux soutenant cette thèse.

Des travaux antérieurs menés au laboratoire au début des années 2000 (thèse de Y. RIGALDIE, 1999-2002) avaient porté sur l'inactivation d'agents pathogènes sous hautes pressions dans un milieu modèle de type bouillon tryptone-sel. Du fait de la mise en évidence de l'impact des caractéristiques du milieu sur la sensibilité à la pression des micro-organismes, il apparaissait important de se rapprocher d'un problème réel afin d'évaluer les potentialités des hautes pressions dans la décontamination de produits de Santé.

La sécurisation des produits sanguins humains et notamment du plasma constitue un enjeu majeur en ce début du XXI<sup>ème</sup> siècle du fait de l'apparition d'agents pathogènes émergents. L'objectif de cette thèse était d'utiliser le plasma comme milieu réel et donc d'évaluer s'il était possible de définir un Procédé hautes pressions susceptible à la fois d'assurer l'inactivation de l'ensemble des agents pathogènes et le maintien de l'activité des protéines plasmatiques.

Compte tenu de travaux antérieurs portant sur la sensibilité de nombreuses protéines vis-à-vis de la pression dès 150 MPa d'une part et la barorésistance de certains micro-organismes en dessous de 400 MPa (par exemple *S. aureus*) d'autre part, cet objectif constituait un véritable défi.

Une voie d'accès pour tenter de résoudre ce dilemme était de considérer dans la définition d'un tel Procédé non seulement le barème de pression et la température (seuls

paramètres thermodynamiques généralement pris en compte dans les travaux antérieurs) mais un certain nombre de paramètres pouvant lui être associés tels que la vitesse d'application (VA) et le mode d'application (MA) de la pression et d'en évaluer l'impact sur la stabilité des protéines d'une part et l'inactivation de divers agents pathogènes d'autre part. Ainsi, en fixant une durée totale de traitement constante et égale à 10 min, quatre principaux paramètres pouvaient caractériser ces traitements : (i) la valeur de la pression (**P**), (ii) la vitesse d'application de la pression (**VA**), (iii) le mode d'application de la pression (**MA**) et (iv) la température (**T**).

Dans une première étape, une optimisation de l'ensemble des paramètres caractérisant un tel traitement a été menée avec l'objectif de maintenir l'activité des protéines plasmatiques. Du fait de leur grand nombre, les facteurs de coagulation V, VIIIc et XI ont été pris comme marqueurs puisque les législations française et européenne imposent un dosage de ces trois facteurs pour chaque lot de plasma.

L'impact de chacun des paramètres sur la sauvegarde de l'activité de ces facteurs de coagulation a tout d'abord été recherché. Puis le rôle de la conjugaison de ceux-ci pris deux par deux a été évalué. Il a été mis en évidence que si une vitesse d'application rapide ( $50 \text{ MPa}\cdot\text{s}^{-1}$ ) et un mode d'application cyclique avaient un léger effet positif, c'est principalement la mise en œuvre de températures négatives qui assurait le meilleur effet baroprotecteur. Cependant, dans tous les cas, une pression de l'ordre de 200 à 250 MPa semblait une limite à ne pas dépasser.

Dans une seconde étape, en suivant la même démarche que celle développée précédemment, les travaux se sont focalisés sur l'inactivation des agents pathogènes. Étant donné le nombre important de ces agents, cinq micro-organismes issus de la Pharmacopée Européenne ont été sélectionnés : *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger* et *Bacillus subtilis*.

Dans une première approche, *S. aureus*, du fait de sa barorésistance, a fait l'objet d'une étude particulière. Il a été souligné que parmi l'ensemble des quatre paramètres pris en compte (la durée de traitement étant toujours constante), ce sont les températures négatives qui induisaient la plus grande fragilisation de ce micro-organisme vis-à-vis de la pression. Par exemple, pour une même valeur de la pression (250 MPa), l'efficacité destructrice était augmentée de 5 unités en abaissant la température de l'ambiante à  $-20^\circ\text{C}$  (les valeurs des autres paramètres étant maintenues constantes).

Cependant, il faut souligner que c'est en conjuguant l'action des divers paramètres ( $VA = 50 \text{ MPa}\cdot\text{s}^{-1}$ ,  $MA = 5$  cycles de 2 min) qu'un effet de synergie surprenant a été mis en évidence dans un faible intervalle de température ( $-10^\circ\text{C} < T < -3^\circ\text{C}$ ) puisque l'efficacité destructrice était considérablement amplifiée dans ces conditions, étant accrue d'environ 3,5 unités en utilisant une température de  $-10^\circ\text{C}$  au lieu de  $-15^\circ\text{C}$ .

Les autres micro-organismes ont ensuite été soumis à divers traitements hautes pressions en conservant la même méthodologie. Un phénomène d'augmentation de la barosensibilité dans un domaine étroit de température a de nouveau été mis en évidence, notamment pour *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, et *Aspergillus niger*. De plus, ces domaines plus ou moins larges selon les micro-organismes, présentaient une zone de recouvrement, ce qui montrait que, malgré la différence de nature et de structure entre ces agents pathogènes, l'association de ces paramètres altérait un mécanisme fondamental commun menant à leur inactivation.

Le recoupement des travaux menés sur le maintien de l'activité des trois facteurs de coagulation d'une part et ceux concernant l'inactivation des cinq micro-organismes sélectionnés comme références d'autre part a mis en évidence que dans certaines conditions de pression et de température, en sélectionnant judicieusement les divers paramètres associés tels que la vitesse d'application (VA) ou le mode d'application (MA) de la pression, il était possible de remplir ces deux objectifs et donc de suggérer une optimisation permettant de définir un Procédé.

Une réoptimisation globale de l'ensemble des paramètres gouvernant les conditions de traitement visant l'équilibre subtil mais obligatoire entre la sauvegarde de l'activité des protéines plasmatiques et l'inactivation des micro-organismes a conduit à la proposition d'un ***Procédé de sécurisation sous hautes pressions du plasma sanguin humain***. Ce Procédé original est défini par les valeurs suivantes de ses quatre paramètres caractéristiques (i) une **valeur de la pression de 200 MPa**, (ii) une **vitesse d'application de la pression de 50 MPa.s<sup>-1</sup>**, (iii) un **mode d'application de la pression de 5 cycles de 2 min** et (iv) une **température égale à -5°C**.

La nature des agents pathogènes susceptibles de contaminer le plasma étant très variée, il était nécessaire d'évaluer vis-à-vis de certains d'entre eux l'efficacité de ce Procédé. Ainsi ont été successivement testés :

- (i) des parasites (*Plasmodium berghei*, *Trypanosoma brucei brucei*), (ii) quelques virus (virus de la rougeole, VIH) ainsi que (iii) un agent infectieux particulier « le prion ».



Pour les parasites, une inactivation complète a été observée. Dans le cas des virus choisis des résultats originaux très prometteurs ont été mis en évidence. En ce qui concerne le « prion », il apparaît que l'application du Procédé conduit à une perte de sa résistance à la protéinase K (probablement liée à un changement de conformation), ce qui semble assez surprenant compte tenu des conditions sévères décrites dans les publications antérieures, comparées à celles mises en œuvre dans ces travaux. Ces évaluations sur divers agents pathogènes soulignent l'importance de l'association des paramètres précités caractérisant le Procédé, pouvant mener - dans une gamme de pressions modérées (de l'ordre de 200 MPa) - à une grande efficacité d'inactivation.

A l'issue de ce parcours de thèse et compte tenu des résultats obtenus, deux principaux axes de développement s'offrent en termes de prospective.

1) Des validations réglementaire (AFSSAPS) et industrielle doivent être envisagées afin que le Procédé décrit dans ces travaux puisse être affiné et développé dans le futur à l'échelle industrielle par notre partenaire : l'Etablissement Français du Sang.

2) L'approfondissement de la connaissance des mécanismes induits par la température, la pression et ses paramètres associés (vitesse et mode d'application) devrait permettre de mieux maîtriser ces effets et ainsi d'ouvrir de nouvelles perspectives d'applications biologiques des hautes pressions.

Le développement de ces deux axes, impliquant applications industrielles pour le premier et recherche fondamentale pour le second, fera appel à un recouvrement optimisé de compétences et une passion partagée.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Erber M. *La mesure des pressions*. Paris: Masson; 1983.
2. Nellis WJ. *Dynamic compression of materials: metallization of fluid hydrogen of high pressures*. Reports on Progress in Physics 2006; **69**: 1479-1580.
3. Fortov VE. *Intense shock waves and extreme states of matter*. Physics-Uspekhi 2007; **50**: 333-353.
4. Blank VD, Deribas AA, Lvova NA, Bagramov RH, Kulnitsky BA, Perezhugin IA, Prokhiriv VM, Silvestrov VV, Yunoshev AS. *Properties of cubic Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> obtained by shock synthesis*. Materials Science Forum 2008; **566**: 129-134.
5. Kanel GI, Fortov VE, Razorenov SV. *Shock waves in condensed-state physics*. Physics-Uspekhi 2007; **50**: 771-791.
6. Somero GN. *Adaptations to high hydrostatic pressure*. Annual Review of Physiology 1992; **54**: 557-577.
7. Di Giulio M. *The Universal Ancestor and the Ancestor of Bacteria Were Hyperthermophiles*. Journal of Molecular Evolution 2003; **57**: 721-730.
8. Hazen RM, Boctor N, Brandes JA, Cody GD, Hemley RJ, Sharma A, Yoder HS. *High pressure and the origin of life*. Journal of Physics: Condensed Matter 2002; **14**: 11489-11494.
9. Daniel I, Oger P, Winter R. *Origins of life and biochemistry under high-pressure conditions*. Chemical Society Reviews 2006; **35**: 858-875.
10. Pradillon F, Gaill F. *Pressure and life: Some biological strategies*. Reviews in Environmental Science and Biotechnology 2007; **6**: 181-195.
11. Jayaraman A. *La cellule à haute pression à enclumes de diamant*. Pour la Science 1984; **80**: 35-46.
12. Wentorf RH. *High pressure Chemistry*. Chemical Engineering 1961; **68**: 177-186.
13. Demazeau G. *High pressure and chemical bonding in materials chemistry*. Zeitschrift Fur Naturforschung Section B-a Journal of Chemical Sciences 2006; **61**: 799-807.
14. Mertens B. *Hydrostatic pressure treatment of food: equipment and processing*. In: Gould GW (ed.) New Methods of Food Preservation. Glasgow: Blackie Academic and Professional; 1995: 135-158.
15. Bundy FP. *Direct Conversion of Graphite to Diamond in Static Pressure Apparatus*. The Journal of Chemical Physics 1963; **38**: 631-643.
16. Olander A, Liander H. *The phase diagram of sodium chloride and steam above the critical point*. Acta Chemica Scandinavica 1950; **4**: 1413-1445.
17. Bundy FP, Hall HT, Strong HM, Wentorf RH. *Man-made diamonds*. Nature 1955; **176**: 51-55.
18. Akimov GY. *Cold isostatic pressing as a method for fabricating ceramic products with high physicomechanical properties*. Refractories and Industrial Ceramics 1998; **39**: 283-287.
19. Knorr D, Heinz V, Buckow R. *High pressure application for food biopolymers*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics 2006; **1764**: 619-631.
20. Totosaus A, Montejano JG, Salazar JA, Guerrero I. *A review of physical and chemical protein-gel induction*. International Journal of Food Science and Technology 2002; **37**: 589-601.
21. Heremans K, Van Camp J, Huyghebaert A. *High pressure effects on proteins*. In: Damodaran APaS (ed.) Food proteins and their applications: Marcel Dekker; 1996: 473-502.

22. Van Eldik R, Asano T, Le Noble WJ. *Activation and reaction volumes in solution*. 2. Chemical Reviews 1989; **89**: 549-688.
23. Schettino V, Bini R. *Constraining molecules at the closest approach: chemistry at high pressure*. Chemical Society Reviews 2007; **36**: 869-880.
24. Demazeau G. *Solvothermal reactions: an original route for the synthesis of novel materials*. Journal of Materials Science 2008; **43**: 2104-2114.
25. Lambert Y, Demazeau G, Largeteau A, Bouvier JM. *Diffusion / Imprégnation sous hautes pressions*. In: La conservation de demain; 1997; Bordeaux, France. 153-154.
26. Andrews T. *On the effect of great pressures combined with cold on the six noncondensable gases*. British Association Reports 1861; 76.
27. Raoult F. *Annales de Chimie et de Physique* 1890; **2**: 297.
28. Amagat E-H. *Mémoires sur l'élasticité et la dilatation des fluides jusqu'aux très hautes pressions*. Annales de Chimie et de Physique 1893; **29**: 505-574.
29. Bridgman PW. *The physics of high pressure*, 2nd ed. London; 1949.
30. Basset J. *Appareil pour réaliser des expériences physiques ou chimiques à toutes températures variées sous des pressions liquides de 15000 kg/cm<sup>3</sup>*. Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des Sciences 1927; **185**: 343-345.
31. Eugster EP. *Minerals in hot water*. American Mineralogist 1986; **71**: 655-673.
32. Habashi F. *Pressure hydrometallurgy: key to better and non-polluting processes*. Engineering and Mining Journal 1971; **172**: 88-94.
33. Iwasaki F, Iwasaki H. *Historical review of quartz crystal growth*. Journal of Crystal Growth 2002; **237-239**: 820-827.
34. Liander H, Lundblad E. *Some observations on the synthesis of diamonds*. Arkiv foer Kemi 1960; **16**: 139-149.
35. Bovenkerk HP, Bundy FP, Hall HT, Strong HM, Wentorf RH. *Preparation of diamond*. Nature 1959; **184**: 1094-1098.
36. Travis AS. *High pressure industrial chemistry: the first steps, 1909-1913, and the impact*. In: Travis AS (ed.) Determinants in the evolution of the European chemical industry, 1900-1939: new technologies, political frameworks, markets and companies. London: Kluwer; 1998: 3-21.
37. Demazeau G. *La chimie sous hautes pressions : chimie minérale*. L'actualité chimique 1985: 46-53.
38. Klamer F-G, Wurche F. *The effects of pressure on organic reactions*. Journal fur Praktische Chemie 2000; **342**: 609-636.
39. Schreyer W. *High pressure researches in geosciences*. Schweizerbork'sche Verlagsbuchhandlung; 1982.
40. Balny C, Hayashi R, Heremans K, Masson P. *High pressure and biotechnology*. In: First European Seminar on High Pressure and Biotechnology, joint meeting with the Fifth Symposium on High Pressure and Food Science; 1992; La Grande Motte (France).
41. Regnard P. *Recherches expérimentales sur l'influence des très hautes pressions sur les organismes vivants*. Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des Sciences 1884; **98**: 745-747.
42. Regnard P. *Note sur les conditions de la vie dans les profondeurs de la mer*. Comptes rendus de la Société de Biologie 1884; **36**: 164-168.
43. Tauscher B. *Pasteurization of food by hydrostatic high pressure: chemical aspects*. Z Lebensm Unters Forsch 1995; **200**: 3-13.
44. Cheftel JC. *Review : High-pressure, microbial inactivation and food preservation*. Food Science and Technology International 1995; **1**: 75-90.
45. Earnshaw R. *High pressure food processing*. Nutrition and Food Science 1996; **96**: 8-11.

46. Masson P. *Action de la pression hydrostatique sur les protéines : émegence de la biotechnologie des hautes pressions, applications pharmaceutiques et médicales potentielles*. Annales Pharmaceutiques Françaises 1999; **57**: 49-55.
47. Balny C, Masson P, Heremans K. *High pressure effects on biological macromolecules: from structural changes to alteration of cellular processes*. Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology 2002; **1595**: 3-10.
48. Balny C. *What lies in the future of high-pressure bioscience?* Biochimica Biophysica Acta 2006; **1764**: 632-639.
49. Roger H. *Action des hautes pressions sur quelques bactéries*. Archives de Physiologie Normale et Physiologique 1895; **7**: 12-17.
50. Hite B. *The effect of pressure in the preservation of milk*. Bulletin of West Virginia University Agricultural Experimental Station 1899; **58**: 15-35.
51. Hite B, Giddings NJ, Weakly CE. *The effect of pressure on certain microorganisms encountered in the preservation of fruits and vegetables*. Bulletin of West Virginia University Agricultural Experimental Station 1914; **146**: 1-67.
52. Larsen WP, Hartzell TB, Diehl HS. *The effects of high pressure on bacteria*. Journal of Infectious Diseases 1918; **22**: 271-279.
53. Bridgman PW. *The coagulation of albumen by pressure*. Journal of Biological Chemistry 1914; **19**: 511-512.
54. Grant EA, Dow RB, Franks WR. *Denaturation of Egg Albumin by Pressure*. Science 1941; **94**: 616.
55. Basset J, M.-A. M. *Etude sur les effets biologiques des ultra-pressions : résistance des bactéries, des diastases et des toxines aux pressions très élevées*. Comptes rendus hebdomadaires des scéances de l'Académie des Sciences 1932; **195**: 1431-1433.
56. Basset J, M.-A. M. *Etudes sur les effets biologiques des ultra-pressions : action des pressions très élevées sur les bactériophages et sur un virus invisible (virus vaccinal)*. Comptes rendus hebdomadaires des scéances de l'Académie des Sciences 1933; **196**: 1138-1139.
57. Basset J, S. N, A. MM. *L'action de l'ultrapression sur l'activité pathogène de quelques virus*. Comptes rendus hebdomadaires des scéances de l'Académie des Sciences 1935; 200.
58. Atanasiu P, Barbu E, Basset J. [*Effect of very high pressure on Newcastle virus. I. Dissociation of infectious power and of hemagglutination*]. Annales de l'Institut Pasteur (Paris) 1951; **81**: 340-343.
59. Basset J, Lepine P, Chaumont L. [*Effects of high pressures on the poliomyelitis virus (Lansing strain)*]. Annales de l'Institut Pasteur (Paris) 1956; **90**: 575-593.
60. Basset J, M.-A. M. *Etudes sur les effets biologiques des ultra-pressions. Etudes sur l'immunité : influence des pressions très élevées sur certains antigènes et anticorps*. Comptes rendus hebdomadaires des scéances de l'Académie des Sciences 1933; **196**: 67-69.
61. Basset J, E. W, A. MM, M. B. *Etudes sur les effets biologiques des ultra-pressions : action des pressions élevées sur les tumeurs*. Comptes rendus hebdomadaires des scéances de l'Académie des Sciences 1935; 200.
62. Vignais P, Barbu E, Macheboeuf M, Basset M. [*Antigenic and vaccinal power of bacteria killed by pressure*]. Bulletin de la Société de Chimie Biologique (Paris) 1952; **34**: 43-46.
63. Timson WJ, Short AJ. *Resistance of microorganisms to hydrostatic pressure*. Biotechnology and Bioengineering 1965; **7**: 139-159.
64. Gould GW, Sale AJ. *Initiation of germination of bacterial spores by hydrostatic pressure*. Journal of General Microbiology 1970; **60**: 335-346.

65. Wilson DC. *High pressure sterilization*. In: 34th Annual Meeting of the Institute of Food Technologists.; 1974; New Orleans, LA.
66. Charm SE, Longmaid HE, 3rd, Carver J. *A simple system for extending refrigerated, nonfrozen preservation of biological material using pressure*. *Cryobiology* 1977; **14**: 625-636.
67. Marquis RE. *High-pressure microbial physiology*. *Advances in Microbial Physiology* 1976; **14**: 159-241.
68. Marquis RE, Matsumara P. *Microbial life under pressure*. In: Kushner DJ (ed.) *Microbial life in extreme environments*. New York: Academic Press; 1978: 105-157.
69. Elgasim EA, Kennick WH. *Effect of pressurization of pre-rigor beef muscles on protein quality*. *Journal of Food Science* 1980; **45**: 1122-1124.
70. Morild E. *The theory of pressure effects on enzymes*. *Advances in Protein Chemistry* 1981; **34**: 93-166.
71. Heremans K. *High pressure effects on proteins and other biomolecules*. *Annual Review of Biophysics and Bioengineering* 1982; **11**: 1-21.
72. Hoover DG, Metrick C, Papineau AM, Farkas DF, Knorr D. *Biological effects of high hydrostatic pressure on food microorganisms*. *Food Technology* 1989; **3**: 99-107.
73. Popper L, Knorr D. *Applications of high pressure homogenization for food preservation*. *Food Technology* 1990; **44**: 84-89.
74. Farr D. *High pressure technology in the food industry*. *Trends in Food Science & Technology* 1990; **1**: 16-18.
75. Hayashi R. *Application of high pressure to food processing and preservation: philosophy and development*. In: Schubert WELSaH (ed.) *Engineering and food*, vol. 2. London: Elsevier; 1989: 815-826.
76. Hayashi R. *Pressure processed food: research and development*. Kyoto - Japan: San-Ei Publishing; 1990.
77. Horie Y, Kimura K, Ida M, Yosida Y, Ohki K. *Jam preparation by pressurization*. *Nippon Nogei Kagakukaishi* 1991; **65**: 975-980.
78. Ogawa H, Fukuhisa K, Kubo Y, Fukumoto H. *Pressure inactivation of yeasts, molds, and pectinesterase in Satsuma mandarin juice: effects of juice concentration, pH, and organic acids, and comparison with heat sanitation*. *Agricultural and Biological Chemistry* 1990; **54**: 1219-1225.
79. Tanaka T, Hatanaka K. *Application of hydrostatic pressure to yoghurt to prevent its after-acidification*. *Journal of Japanese Society of Food Science and Technology* 1992; **39**: 173-177.
80. Knorr D. *Effects of high hydrostatic pressure processes on food safety and quality*. *Food Technology* 1993; **47**: 156-161.
81. Hoover DG. *Pressure effects on biological systems*. *Food Technology* 1993; **47**: 150-155.
82. Tonello C, Largeteau A, Jolibert F, Deschamps A, Demazeau G. *Destruction par hautes pressions de micro-organismes contaminant des produits laitiers*. In: *L'électricité dans l'agro-alimentaire*; 1993. 43-48.
83. Demazeau G. *Les hautes pressions : développements potentiels*. In: *L'avenir des hautes pressions dans l'industrie agro-alimentaire*; 1993; Nantes, France. 91-109.
84. Cheftel JC, Culioli J. *Effects of high pressure on meat: A review*. *Meat Science* 1997; **46**: 211-236.
85. Hayashi R. *An overview of high pressure in bioscience and biotechnology*. In: Hayashi R, Balny C (eds.), *High Pressure Bioscience and Biotechnology*. New York: Elsevier; 1996: 1-6.
86. Kunugi R. *Modification of biopolymer functions by high pressure*. *Progress in Polymer Science* 1993; **18**: 805-838.

87. San Martin MF, Barbosa-Canovas GV, Swanson BG. *Food processing by high hydrostatic pressure*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 2002; **42**: 627-645.
88. Matser AM, Krebbers B, van den Berg RW, Bartels PV. *Advantages of high pressure sterilisation on quality of food products*. Trends in Food Science & Technology 2004; **15**: 79-85.
89. Rastogi NK, Raghavarao KS, Balasubramaniam VM, Niranjana K, Knorr D. *Opportunities and challenges in high pressure processing of foods*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 2007; **47**: 69-112.
90. Zeece M, Huppertz T, Kelly A. *Effect of high-pressure treatment on in-vitro digestibility of [beta]-lactoglobulin*. Innovative Food Science & Emerging Technologies 2008; **9**: 62-69.
91. Nogami N, Joh T, Matsumo M, Nishiumi T, Hara T, Suzuki A. *Recent development in high pressure food processing*. Review of High Pressure Science and Technology 2006; **16**: 11-16.
92. Kelly A, Zeece M. *Applications of novel technologies in processing of functional foods*. Australian Journal of Dairy Technology 2009; **64**: 12-15.
93. Paschke A. *Aspects of food processing and its effects on allergen structure*. Molecular Nutrition and Food Research 2009; **53**: 959-962.
94. Oey I, Van der Plancken I, Van Loey A, Hendrickx M. *Does high pressure processing influence nutritional aspects of plant based food systems?* Trends in Food Science and Technology 2008; **19**: 300-308.
95. Tonello-Samson C. *Las aplicaciones industriales de las altas presiones*. In: Aplicación de Tecnologías Emergentes de Procesado Mínimo en el sector Pesquero, Centro Tecnológico del Mar - CETMAR 2007: 131.
96. Kalichevsky MT, Knorr D, Lillford PJ. *Potential food applications of high-pressure effects on ice-water transitions*. Trends in Food Science & Technology 1995; **6**: 253-259.
97. LeBail A, Chevalier D, Mussa DM, Ghoul M. *High pressure freezing and thawing of foods: a review*. International Journal of Refrigeration 2002; **25**: 504-513.
98. Urrutia Benet G, Schlüter O, Knorr D. *High pressure-low temperature processing. Suggested definitions and terminology*. Innovative Food Science & Emerging Technologies 2004; **5**: 413-427.
99. Luscher C, Balasa A, Frohling A, Ananta E, Knorr D. *Effect of High-Pressure-Induced Ice I-to-Ice III Phase Transitions on Inactivation of Listeria innocua in Frozen Suspension*. Applied and Environmental Microbiology 2004; **70**: 4021-4029.
100. Dumay E, Picart L, Regnault S, Thiebaud M. *High pressure-low temperature processing of food proteins*. Biochimica Biophysica Acta 2006; **1764**: 599-618.
101. Parton T, Bertucco A, Elvassore N, Grimolizzi L. *A continuous plant for food preservation by high pressure CO<sub>2</sub>*. Journal of Food Engineering 2007; **79**: 1410-1417.
102. Parton T, Elvassore N, Bertucco A, Bertoloni G. *High pressure CO<sub>2</sub> inactivation of food: A multi-batch reactor system for inactivation kinetic determination*. The Journal of Supercritical Fluids 2007; **40**: 490-496.
103. Garcia-Gonzalez L, Geeraerd AH, Spilimbergo S, Elst K, Van Ginneken L, Debevere J, Van Impe JF, Devlieghere F. *High pressure carbon dioxide inactivation of microorganisms in foods: the past, the present and the future*. International Journal of Food Microbiology 2007; **117**: 1-28.
104. Garcia-Gonzalez L, Geeraerd AH, Elst K, Van Ginneken L, Van Impe JF, Devlieghere F. *Influence of type of microorganism, food ingredients and food properties on high*

- pressure carbon dioxide inactivation of microorganisms*. International Journal of Food Microbiology 2009; **129**: 253-263.
105. Paul PL, Chawala SP, Thomas P, Kesavan PC. *Effect of high hydrostatic pressure, gamma-irradiation and combined treatments on the microbial quality of lamb meat during chilled storage*. Food Safety 1997; **16**: 263-271.
  106. Raso J, Pagan R, Condon S, Sala FJ. *Inactivation of Bacillus subtilis spores by combining ultrasonic waves under pressure and mild heat treatment*. Journal of Applied Microbiology 1998; **85**: 849-854.
  107. Roberts CM, Hoover DG. *Sensitivity of Bacillus coagulans spores to combinations of high hydrostatic pressure, heat, acidity and nisin*. Journal of Applied Bacteriology 1996; **81**: 363-368.
  108. Adegoke GO, Iwahashi H, Komatsu Y. *Inhibition of Saccharomyces cerevisiae by combination of hydrostatic pressure and monoterpenes*. Journal of Food Science 1997; **62**: 404-405.
  109. Minerich PL, Labuza TP. *Development of a pressure indicator for high hydrostatic pressure processing of foods*. Innovative Food Science & Emerging Technologies 2003; **4**: 235-243.
  110. Fonberg-Broczek M, Windyga B, Szczawinski J, Szczawinska M, Pietrzak D, Prestamo G. *High pressure processing for food safety*. Acta Biochimica Polonica 2005; **52**: 721-724.
  111. Torres JA, Velazquez G. *Commercial opportunities and research challenges in the high pressure processing of foods*. Journal of Food Engineering 2005; **67**: 95-112.
  112. Zobell CE, Johnson FH. *The influence of hydrostatic pressure on the growth and viability of terrestrial and marine bacteria*. Journal of Bacteriology 1949; **57**: 179-189.
  113. Zobell CE. *Hydrostatic pressure as a factor affecting the activities of marine microbes*. In: Maruzen (ed.) Recent researches in the fields of hydrosphere, atmosphere and nuclear geochemistry. Tokyo; 1964: 83-116.
  114. Zobell CE, Cobet AB. *Filament Formation by Escherichia Coli at Increased Hydrostatic Pressures*. Journal of Bacteriology 1964; **87**: 710-719.
  115. Zobell CE. *Pressure effects on morphology and life processes of bacteria*. In: Zimmerman AM (ed.) High pressure effects on cellular processes. London: Academic Press; 1970: 85-130.
  116. Yayanos AA. *Evolutional and ecological implications of the properties of deep-sea barophilic bacteria*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1986; **83**: 9542-9546.
  117. Yayanos AA. *Microbiology to 10500 meters in the deep sea*. Annual Review of Microbiology 1995; **49**: 777-805.
  118. Abe F, Kato C, Horikoshi K. *Pressure-regulated metabolism in microorganisms*. Trends in Microbiology 1999; **7**: 447-453.
  119. Bartlett DH. *Pressure effects on in vivo microbial processes*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology 2002; **1595**: 367-381.
  120. Simonato F, Campanaro S, Lauro FM, Vezzi A, D'angelo M, Vitulo N, Valle G, Bartlett DH. *Piezophilic adaptation: a genomic point of view*. Journal of Biotechnology 2006; **126**: 11-25.
  121. Braganza LF, Worcester DL. *Structural changes in lipid bilayers and biological membranes caused by hydrostatic pressure*. Biochemistry 1986; **25**: 7484-7488.
  122. Delong EF, Yayanos AA. *Adaptation of the membrane lipids of a deep-sea bacterium to changes in hydrostatic pressure*. Science 1985; **228**: 1101-1103.

123. Prieur D. *Physiology and biotechnological potential of deep-sea bacteria*. In: Herbert RA, Sharp RJ (eds.), *Molecular biology and biotechnology of extremophiles*. New York: Chapman and Hall; 1992: 163-197.
124. Gross M, Jaenicke R. *Proteins under pressure*. The influence of high hydrostatic pressure on structure, function and assembly of proteins and protein complexes. *European Journal of Biochemistry* 1994; **221**: 617-630.
125. Kato C, Bartlett DH. *The molecular biology of barophilic bacteria*. *Extremophiles* 1997; **1**: 111-116.
126. Nakasone K, Ikegami A, Kato C, Usami R, Horikoshi K. *Mechanisms of gene expression controlled by pressure in deep sea microorganisms*. *Extremophiles* 1998; **2**: 149-154.
127. Balny C, Heremans K, P. M. *Haute pression et biologie : une démarche d'avenir*. *Biofutur* 1992; **112**: 37-42.
128. Mozhaev VV, Heremans K, Frank J, Masson P, Balny C. *Exploiting the effects of high hydrostatic pressure in biotechnological applications*. *Trends in Biotechnology* 1994; **12**: 493-501.
129. Rigaldie Y, Lemagnen G, Largeteau A, Larrouture D, Abba M, Durandeu C, Vallayer B, Grislain L, Demazeau G. *High hydrostatic pressure (HHP): an alternative method of sterilization and decontamination of fragile drugs?* *European Journal of Parenteral Sciences* 2001; **6**: 73-77.
130. Rigaldie Y, Demazeau G. [*Contribution of high pressure to pharmaceutical and medical science*]. *Annales Pharmaceutiques Françaises* 2004; **62**: 116-127.
131. Silva JL, Foguel D, Suarez M, Gomes AMO, Oliveira AC. *High-pressure applications in medicine and pharmacology*. *Journal of Physics: Condensed Matter* 2004; **16**: S929-S944.
132. Aertsen A, Meersman F, Hendrickx MEG, Vogel RF, Michiels CW. *Biotechnology under high pressure: applications and implications*. *Trends in Biotechnology* 2009; **27**: 434-441.
133. Gollwitzer H, Mittelmeier W, Brendle M, Weber P, Miethke T, Hofmann GO, Gerdesmeyer L, Schauwecker J, Diehl P. *High hydrostatic pressure for disinfection of bone grafts and biomaterials: an experimental study*. *Open Orthopaedics Journal* 2009; **3**: 1-7.
134. Winter R, Dzwolak W. *Exploring the temperature-pressure configurational landscape of biomolecules: from lipid membranes to proteins*. *Philosophical Transactions - Royal Society A* 2005; **363**: 537-563.
135. Makita T. *Application of high pressure and thermophysical properties of water to biotechnology*. *Fluid Phase Equilibria* 1992; **76**: 87-95.
136. Kowalczyk W, Hartmann C, Luscher C, Pohl M, Delgado A, Knorr D. *Determination of thermophysical properties of foods under high hydrostatic pressure in combined experimental and theoretical approach*. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 2005; **6**: 318-326.
137. Mozhaev VV, Heremans K, Frank J, Masson P, Balny C. *High pressure effects on protein structure and function*. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 1996; **24**: 81-91.
138. Federighi M, Vidon M, Mescle JF, Pilet MF. *Traitements hautes pressions et denrées alimentaires : Revue bibliographique*. *Microbiologie, Aliments, Nutrition* 1995; **13**: 115-125.
139. Saad-Nehme J, Silva JL, Meyer-Fernandes JR. *Osmolytes protect mitochondrial F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase complex against pressure inactivation*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 2001; **1546**: 164-170.



140. Boonyaratanakornkit BB, Park CB, Clark DS. *Pressure effects on intra- and intermolecular interactions within proteins*. *Biochimica et Biophysica Acta* 2002; **1595**: 235-249.
141. Balny C, Mozhaev VV, Lange R. *Hydrostatic pressure and proteins: basic concepts and new data - Chemical aspects*. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Physiology* 1997; **116**: 299-304.
142. Cevc G. *Phospholipids Handbook*. Dekker, M.; 1993.
143. Lipowsky R, Sackmann E. *Structure and dynamics of membranes*. Elsevier; 1995.
144. Winter R, Jonas J. *High pressure molecular science*. Dordrecht: Kluwer Academic; 1999.
145. Winter R, Czeslik C. *Pressure effects on the structure of lyotropic lipid mesophases and model biomembrane systems*. *Zeitschrift Fur Kristallographie* 2000; **215**: 454-474.
146. Cohen BJ, Taylor JJ. *Structure et fonctions du corps humain. Anatomie et physiologie*. Paris: Maloine; 2008.
147. Ogawa NH, Fukuhisa K, Kubo Y, Fukumoto H. *Effect of hydrostatic pressure on sterilization and preservation of citrus juice*. In: Balny C, Hayashi R, Heremans K, Masson P (eds.), *High Pressure and Biotechnology*, vol. **224**. London: John Libbey Eurotext; 1992: 269-278.
148. Moussard C. *Biochimie structurale et métabolique*. Bruxelles: De Boeck; 2006.
149. Pol D. *Caractérisation de l'amidon et du glycogène*. 2006. <http://www.didier-pol.net/2amidon.htm>
150. Jenkins PJ, Donald AM. *The influence of amylose on starch granule structure*. *International Journal of Biological Macromolecules* 1995; **17**: 315-321.
151. Svihus B, Uhlen AK, Harstad OM. *Effect of starch granule structure, associated components and processing on nutritive value of cereal starch: a review*. *Animal Feed Science and Technology* 2005; **122**: 303-320.
152. Stute R, Klingler RW, Boguslawski S, Eshtiaghi MN, Knorr D. *Effects of high pressures treatment on starches*. *Starch* 1996; **48**: 399-408.
153. Hibi Y, Matsumoto T, Hagiwara S. *Effect of high pressure on the cristalline structure of various starch granules*. *Cereal Chemistry* 1993; **70**: 671-676.
154. Katopo H, Song Y, Jane JL. *Effect and mechanism of ultrahigh hydrostatic pressure on the structure and properties of starches*. *Carbohydrate Polymers* 2002; **47**: 233-244.
155. Rubens P, Snauwaert J, Heremans K, Stute R. *In situ observation of pressure-induced gelation of starches studied with FTIR in the diamond anvil cell*. *Carbohydrate Polymers* 1999; **39**: 231-235.
156. Oh HE, Pinder DN, Hemar Y, Anema SG, Wong M. *Effect of high pressure treatment on various starch-in-water suspensions*. *Food Hydrocolloids* 2008; **22**: 150-155.
157. Mentré P, Hui Bon Hoa G. *Effects of high hydrostatic pressures on living cells: a consequence of macromolecules and macromolecule-associated water*. *International Review of Cytology* 2001; **201**: 1-84.
158. Yamaguchi T, Hashiguchi K, Katsuki S, Iwamoto W, Tsuruhara S, Terada S. *Activation of the intrinsic and extrinsic pathways in high pressure-induced apoptosis of murine erythroleukemia cells*. *Cellular and Molecular Biology Letters* 2008; **13**: 49-57.
159. Frey B, Janko C, Ebel N, Meister S, Schlucker E, Meyer-Pittroff R, Fietkau R, Herrmann M, Gaipl US. *Cells under pressure - treatment of eukaryotic cells with high hydrostatic pressure, from physiologic aspects to pressure induced cell death*. *Current Medicinal Chemistry* 2008; **15**: 2329-2336.
160. Takano KJ, Takano T, Yamanouchi Y, Satou T. *Pressure-induced apoptosis in human lymphoblasts*. *Experimental Cell Research* 1997; **235**: 155-160.

161. Agar A, Li S, Agarwal N, Coroneo MT, Hill MA. *Retinal ganglion cell line apoptosis induced by hydrostatic pressure*. Brain Research 2006; **1086**: 191-200.
162. Vogel R, Linke K, Teichert H, Ehrmann MA. *High pressure modulated transport and signaling functions of membrane proteins in models and in vivo*. Journal of Physics: Conference Series 2008; **121**: 1-7.
163. Kai L, Periasamy N, Ehrmann MA, Winter R, Vogel R. *Influence of high pressure on the dimerization of ToxR, a protein involved in bacterial signal transduction*. Applied and Environmental Microbiology 2008; **74**: 7821-7823.
164. Ritz M, Tholozan JL, Federighi M, Pilet MF. *Physiological damages of Listeria monocytogenes treated by high hydrostatic pressure*. International Journal of Food Microbiology 2002; **79**: 47-53.
165. Ananta E, Knorr D. *Comparison of inactivation pathways of thermal or high pressure inactivated Lactobacillus rhamnosus ATCC 53103 by flow cytometry analysis*. Food Microbiology 2009; **26**: 542-546.
166. Tholozan JL, Ritz M, Jugiau F, Federighi M, Tissier JP. *Physiological effects of high hydrostatic pressure treatments on Listeria monocytogenes and Salmonella typhimurium*. Journal of Applied Microbiology 2000; **88**: 202-212.
167. Yaldagard M, Mortazavi SA, Tabatabaie F. *The principles of ultra high pressure technology and its application in food processing/preservation: A review of microbiological and quality aspects*. African Journal of Biotechnology 2008; **7**: 2739-2767.
168. Kato M, Hayashi R. *Effects of high pressure on lipids and biomembranes for understanding high-pressure-induced biological phenomena*. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry 1999; **63**: 1321-1328.
169. Pilavtepe-Çelik M, Balaban MO, Yousef AE. *Image Analysis Based Quantification of Bacterial Volume Change with High Hydrostatic Pressure*. Journal of Food Science 2008; **73**: M423-M429.
170. Kalchayanand N, Frethem C, Dunne P, Sikes A, Ray B. *Hydrostatic pressure and bacteriocin-triggered cell wall lysis of Leuconostoc mesenteroides*. Innovative Food Science & Emerging Technologies 2002; **3**: 33-40.
171. Moussa M, Perrier-Cornet J-M, Gervais P. *Damage in Escherichia coli Cells Treated with a Combination of High Hydrostatic Pressure and Subzero Temperature*. Applied and Environmental Microbiology 2007; **73**: 6508-6518.
172. Davoust P. *La cellule bactérienne*. 2009.  
[http://www.ecosociosystemes.fr/cellule\\_bacterienne.html](http://www.ecosociosystemes.fr/cellule_bacterienne.html)
173. Moussa M, Perrier-Cornet J-M, Gervais P. *Synergistic and Antagonistic Effects of Combined Subzero Temperature and High Pressure on Inactivation of Escherichia coli*. Applied and Environmental Microbiology 2006; **72**: 150-156.
174. Perrier-Cornet J-M, Hayert M, Gervais P. *Yeast cell mortality related to a high-pressure shift: occurrence of cell membrane permeabilization*. Journal of Applied Microbiology 1999; **87**: 1-7.
175. Black EP, Setlow P, Hocking AD, Stewart CM, Kelly AL, Hoover DG. *Response of spores to high-pressure processing*. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 2007; **6**: 103-119.
176. Brul S, Rommens AJM, Verrips CT. *Mechanistic studies on the inactivation of Saccharomyces cerevisiae by high pressure*. Innovative Food Science & Emerging Technologies 2000; **1**: 99-108.
177. Setlow P. *Effects of high pressure on bacterial spores*. In: Michiels CW (ed.) High pressure microbiology: ASM; 2008: 35-51.
178. Reddy NR, Tetzloff RC, Solomon HM, Larkin JW. *Inactivation of Clostridium botulinum nonproteolytic type B spores by high pressure processing at moderate to*

- elevated high temperatures*. Innovative Food Science & Emerging Technologies 2006; **7**: 169-175.
179. Delacour H, Clery C, Masson P, Vidal DR. *Inactivation des spores bactériennes par les hautes pressions hydrostatiques*. Annales Pharmaceutiques Françaises 2002; **60**: 38-43.
  180. Ludwig H, Bieler D, Hallbauer K, Scigalla W. *Inactivation of microorganisms by hydrostatic pressure*. In: Balny C, Hayashi R, Heremans K, Masson P (eds.), High Pressure and Biotechnology, vol. 224. London: John Libbey Eurotext; 1992: 25-32.
  181. Black EP, Koziol-Dube K, Guan D, Wei J, Setlow B, Cortezzo D, Hoover DG, Setlow P. *Factors influencing germination of Bacillus subtilis spores via activation of nutrient receptors by high pressure*. Applied and Environmental Microbiology 2005; **71**: 5879-5887.
  182. Paidhungat M, Setlow B, Daniels WB, Hoover DG, Papafragkou E, Setlow P. *Mechanisms of Induction of Germination of Bacillus subtilis Spores by High Pressure*. Applied and Environmental Microbiology 2002; **68**: 3172-3175.
  183. Smelt JPPM. *Recent advances in the microbiology of high pressure processing*. Trends in Food Science & Technology 1998; **9**: 152-158.
  184. Oliveira AC, Gomes AMO, Lima SMB, Gonçalves RB, D. SW, Silva ACB, R. CJ. *Effects of hydrostatic pressure on viruses*. In: Michiels CW (ed.) High pressure microbiology: ASM; 2008: 19-34.
  185. Gaspar LP, Silva ACB, Gomes AMO, Freitas MS, Ano Bom APD, Schwarcz WD, Mestecky J, Novak MJ, Foguel D, Silva JL. *Hydrostatic Pressure Induces the Fusion-active State of Enveloped Viruses*. Journal of Biological Chemistry 2002; **277**: 8433-8439.
  186. Gaspar LP, Mendes YS, Yamamura AMY, Almeida LFC, Caride E, Gonçalves RB, Silva JL, Oliveira AC, Galler R, Freire MS. *Pressure-inactivated yellow fever 17DD virus: Implications for vaccine development*. Journal of Virological Methods 2008; **150**: 57-62.
  187. Silva JL, Luan P, Glaser M, Voss EW, Weber G. *Effects of hydrostatic pressure on a membrane-enveloped virus: high immunogenicity of the pressure-inactivated virus*. Journal of Virology 1992; **66**: 2111-2117.
  188. Kingsley DH, Holliman DR, Calci KR, Chen H, Flick GJ. *Inactivation of a norovirus by high-pressure processing*. Applied and Environmental Microbiology 2007; **73**: 581-585.
  189. Buckow R, Isbarn S, Knorr D, Heinz V, Lehmacher A. *Predictive Model for Inactivation of Feline Calicivirus, a Norovirus Surrogate, by Heat and High Hydrostatic Pressure*. Applied and Environmental Microbiology 2008; **74**: 1030-1038.
  190. Lindsay DS, Holliman D, Flick GJ, Goodwin DG, Mitchell SM, Dubey JP. *Effects of High Pressure Processing on Toxoplasma gondii Oocysts on Raspberries*. Journal of Parasitology 2008; **94**: 757-758.
  191. Slifko TR, Raghubeer E, Rose JB. *Effect of High Hydrostatic Pressure on Cryptosporidium parvum Infectivity*. Journal of Food Protection 2000; **63**: 1262-1267.
  192. Collins MV, Flick GJ, Smith SA, Fayer R, Croonenberghs R, O'Keefe S, Lindsay DS. *The effect of high-pressure processing on infectivity of Cryptosporidium parvum oocysts recovered from experimentally exposed Eastern oysters (Crassostrea virginica)*. Journal of Eukaryotic Microbiology 2005; **52**: 500-504.
  193. Shearer AEH, Wilkins GC, Jenkins MC, Kniel KE. *Effects of high hydrostatic pressure on Eimeria acervulina pathogenicity, immunogenicity and structural integrity*. Innovative Food Science & Emerging Technologies 2007; **8**: 259-268.

194. Lindsay DS, Collins MV, Jordan CN, Flick GJ, Dubey JP. *Effects of high pressure processing on infectivity of Toxoplasma gondii oocysts for mice*. Journal of Parasitology 2005; **91**: 699-701.
195. Rosypal AC, Bowman DD, Holliman D, Flick GJ, Lindsay DS. *Effects of high hydrostatic pressure on embryonation of Ascaris suum eggs*. Veterinary Parasitology 2007; **145**: 86-89.
196. Dong FM, Cook AR, Herwig RP. *High hydrostatic pressure treatment of finfish to inactivate Anisakis simplex*. Journal of Food Protection 2003; **66**: 1924-1926.
197. Brutti A, Rovere P, Cavallero S, D'Amelio S, Danesi P, Arcangeli G. *Inactivation of Anisakis simplex larvae in raw fish using high hydrostatic pressure treatments*. Food Control; In Press, Corrected Proof.
198. Molina-Garcia AD, Sanz PD. *Anisakis simplex Larva Killed by High-Hydrostatic-Pressure Processing*. Journal of Food Protection 2002; **65**: 383-388.
199. Ohnishi Y, Ono T, Shigehisa T. *Histochemical and morphological studies on Trichinella spiralis larvae treated with high hydrostatic pressure*. International Journal for Parasitology 1994; **24**: 425-427.
200. Prusiner SB. *Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie*. Science 1982; **198**: 134-144.
201. Segarra C, Lehmann S, Coste J. *Prion protein expression and processing in human mononuclear cells: the impact of the codon 129 prion gene polymorphism*. PLoS One 2009; **4**: e5796.
202. Coste J, Prowse C, Eglin R, Fang C. *A report on transmissible spongiform encephalopathies and transfusion safety*. Vox Sanguinis 2009; **96**: 284-291.
203. Shkundina IS, Ter-Avanesyan MD. *Prions*. Biochemistry (Mosc) 2007; **72**: 1519-1536.
204. Wilson DA, Nixon RA. *Sniffing out a function for prion proteins*. Nature Neuroscience 2009; **12**: 7-8.
205. Cardone F, Brown P, Meyer R, Pocchiari M. *Inactivation of transmissible spongiform encephalopathy agents in food products by ultra high pressure-temperature treatment*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics 2006; **1764**: 558-562.
206. Heindl P, Garcia AF, Butz P, Pfaff E, Tauscher B. *Protein conformation determines the sensibility to high pressure treatment of infectious scrapie prions*. Biochimica Biophysica Acta-Proteins and Proteomics 2006; **1764**: 552-557.
207. Heindl P, Garcia AF, Butz P, Trierweiler B, Voigt H, Pfaff E, Tauscher B. *High pressure/temperature treatments to inactivate highly infectious prion subpopulations*. Innovative Food Science & Emerging Technologies 2008; **9**: 290-297.
208. Manas P, Pagan R. *Microbial inactivation by new technologies of food preservation*. Journal of Applied Microbiology 2005; **98**: 1387-1399.
209. Cheftel JC. *Effects of high hydrostatic pressure on food constituents: an overview*. In: Balny C, Hayashi R, Heremans K, Masson P (eds.), High Pressure and Biotechnology, vol. 224. London: John Libbey Eurotext; 1992: 195-209.
210. Van der Plancken I, Grauwet T, Oey I, Van Loey A, Hendrickx M. *Impact evaluation of high pressure treatment on foods: considerations on the development of pressure-temperature-time integrators (pTTIs)*. Trends in Food Science & Technology 2008; **19**: 337-348.
211. De Champdoré M, Staiano M, Rossi M, D'Auria S. *Proteins from extremophiles as stable tools for advanced biotechnological applications of high social interest*. Journal of the Royal Society Interface 2007; **4**: 183-191.
212. Abe F. *Exploration of the effects of high hydrostatic pressure on microbial growth, physiology and survival: perspectives from piezophysiology*. Biosciences, Biotechnology, and Biochemistry 2007; **71**: 2347-2357.

213. Abe F, Horikoshi K. *The biotechnological potential of piezophiles*. Trends in Biotechnology 2001; **19**: 102-108.
214. Masson P, Tonello C, Balny C. *High-Pressure Biotechnology in Medicine and Pharmaceutical Science*. Journal of Biomedicine and Biotechnology 2001; **1**: 85-88.
215. Chicon R, Belloque J, Alonso E, Lopez-Fandino R. *Immuno reactivity and digestibility of high-pressure-treated whey proteins*. International Dairy Journal 2008; **18**: 367-376.
216. Chicón R, Belloque J, Alonso E, López-Fandiño R. *Antibody binding and functional properties of whey protein hydrolysates obtained under high pressure*. Food Hydrocolloids 2009; **23**: 593-599.
217. Brouillet M, Gautier H, Miegerville AF, Bouler JM, Merle C, Caillon J. *Inactivation of Staphylococcus aureus in calcium phosphate biomaterials via isostatic compression*. Journal of Biomedical Materials Research Part B Applied Biomaterials 2009; **91**: 348-353.
218. Diehl P, Schmitt M, Schauwecker J, Eichelberg K, Gollwitzer H, Gradinger R, Goebel M, Preissner KT, Mittelmeier W, Magdolen U. *Effect of high hydrostatic pressure on biological properties of extracellular bone matrix proteins*. International Journal of Molecular Medicine 2005; **16**: 285-289.
219. Diehl P, Steinhauser E, Gollwitzer H, Heister C, Schauwecker J, Milz S, Mittelmeier W, Schmitt M. *Biomechanical and immunohistochemical analysis of high hydrostatic pressure-treated Achilles tendons*. Journal of Orthopaedic Science 2006; **11**: 380-385.
220. Steinhauser E, Diehl P, Hadaller M, Schauwecker J, Busch R, Gradinger R, Mittelmeier W. *Biomechanical investigation of the effect of high hydrostatic pressure treatment on the mechanical properties of human bone*. Journal of Biomedical Materials Research Part B Applied Biomaterials 2006; **76**: 130-135.
221. Naal FD, Schauwecker J, Steinhauser E, Milz S, von Knoch F, Mittelmeier W, Diehl P. *Biomechanical and immunohistochemical properties of meniscal cartilage after high hydrostatic pressure treatment*. Journal of Biomedical Materials Research Part B Applied Biomaterials 2008; **87**: 19-25.
222. Balny C. *Future prospects in high pressure basic bioscience*. In: Hayashi R, Balny C (eds.), High Pressure Bioscience and Biotechnology. New York: Elsevier; 1996: 7-16.
223. Mozhaev VV, Lange R, Kudryashova EV, Balny C. *Application of high hydrostatic pressure for increasing activity and stability of enzymes*. Biotechnology and Bioengineering 1996; **52**: 320-331.
224. Silva JL, Foguel D, Da Poian AT, Prevelige PE. *The use of hydrostatic pressure as a tool to study viruses and other macromolecular assemblages*. Current Opinion in Structural Biology 1996; **6**: 166-175.
225. Torrent J, Balny C, Lange R. *High Pressure Modulates Amyloid Formation*. Protein and Peptide Letters 2006; **13**: 271-277.
226. Torrent J, Alvarez-Martinez MT, Heitz F, Liautard J-P, Balny C, Lange R. *Insights into alternative prion protein topologies induced under high hydrostatic pressure*. Journal of Physics: Condensed Matter 2004; **16**: S1059-S1065.
227. Meersman F, Dobson CM. *Probing the pressure-temperature stability of amyloid fibrils provides new insights into their molecular properties*. Biochimica Biophysica Acta 2006; **1764**: 452-460.
228. De Bernardez CE. *Protein refolding for industrial processes*. Current Opinion in Biotechnology 2001; **12**: 202-207.
229. Dobson CM. *Protein misfolding, evolution and disease*. Trends in Biochemical Sciences 1999; **24**: 329-332.

230. Horwich A. *Protein aggregation in disease: a role for folding intermediates forming specific multimeric interactions*. Journal of Clinical Investigation 2002; **110**: 1221-1232.
231. Sacchettini JC, Kelly JW. *Therapeutic strategies for human amyloid diseases*. Nature Reviews. Drug Discovery 2002; **1**: 267-275.
232. Caughey B, Lansbury PT. *Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders*. Annual Review of Neuroscience 2003; **26**: 267-298.
233. Lemay P. *The use of high pressure for separation and production of bioactive molecules*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology 2002; **1595**: 357-366.
234. Gavalda E, Degraeve P, Lemay P. *High-pressure-induced modulation of the antigenic interactions between two beta-galactosidases and anti-beta-galactosidase antibodies*. Enzyme and Microbial Technology 1996; **18**: 10-17.
235. Cheung CY, Green DJ, Litt GJ, Laugharn JA. *High-pressure-mediated dissociation of immune complexes demonstrated in model systems*. Clinical Chemistry 1998; **44**: 299-303.
236. Niemeyer B, Jansen J. *An innovative approach for sorptive separation of amphiphilic biomolecules applying high hydrostatic pressure*. Journal of Supercritical Fluids 2007; **39**: 354-361.
237. Hashiguchi T, Yamaguchi T, Terada S. *Cell-substratum adhesion is suppressed by high pressure*. Japanese Journal of Physiology 1999; **49**: 107-112.
238. Lima LTR, Foguel D, Silva JL. *DNA tightens the dimeric DNA-binding domain of human papillomavirus E2 protein without changes in volume*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2000; **97**: 14289-14294.
239. Silva JL, Oliveira AC, Gomes AMO, Lima LMTR, Mohana-Borges R, Pacheco ABF, Foguel D. *Pressure induces folding intermediates that are crucial for protein-DNA recognition and virus assembly*. Biochimica Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology 2002; **1595**: 250-265.
240. Silva CCM, Giongo V, Simpson AJG, Camargos ERS, Silva JL, Koury MC. *Effects of hydrostatic pressure on the Leptospira interrogans: high immunogenicity of the pressure-inactivated serovar hardjo*. Vaccine 2001; **19**: 1511-1514.
241. Vanlint D, Mebhratu MT, Michiels CW, Aertsen A. *Using mild high-pressure shock to generate bacterial ghosts of Escherichia coli*. Zeitschrift Fur Naturforschung Section B-a Journal of Chemical Sciences 2008; **63**: 765-768.
242. Patterson MF. *Microbiology of pressure-treated foods*. Journal of Applied Microbiology 2005; **98**: 1400-1409.
243. Leonard JN, Ferstl P, Delgado A, Schaffer DV. *Enhanced preparation of adeno-associated viral vectors by using high hydrostatic pressure to selectively inactivate helper adenovirus*. Biotechnology and Bioengineering 2007; **97**: 1170-1179.
244. Sharma A, Gautam S, Fotedar RK, Thomas P, Kesavan PC, Chidambaram R. *Ability of high hydrostatic pressure treated plasmids and cells of Escherichia coli to genetically transform*. Journal of General and Applied Microbiology 1997; **43**: 199-208.
245. Gross V, Carlson G, Kwan AT, Smejkal G, Freeman E, Ivanov AR, Lazarev A. *Tissue fractionation by hydrostatic pressure cycling technology: the unified sample preparation technique for systems biology studies*. Journal of Biomolecular Techniques 2008; **19**: 189-199.
246. Tao F, Lawrence NP, Miller WW, Li C, Tuzmen P, Behnke J, Nakhai B, Kakita A, Christian T, Reed D, Manak MM, Schumacher RT. *Biological sample preparation*

- system using Pressure Cycling Technology (PCT)*. In: *Advances in High Pressure Bioscience and Biotechnology II*; 2003; Dortmund, Germany. 413-417.
247. Gross V, Lazarev A, Lawrence N, Schumacher R. *Isolation of mitochondria from cell cultures by PCT for proteomic analysis*. *Biotechniques* 2008; **45**: 99-100.
  248. Pribenszky C, Molnar M, Horvath A, Kutvolgyi G, Harnos A, Szenci O, Dengg J, Lederer J. *Improved post-thaw motility, viability, and fertility are achieved by hydrostatic pressure-treated bull semen*. *Reproduction, Fertility and Development* 2007; **19**: 181-182.
  249. Pribenszky C, Du Y, Molnar M, Harnos A, Vajta G. *Increased stress tolerance of matured pig oocytes after high hydrostatic pressure treatment*. *Animal Reproduction Science* 2008; **106**: 200-207.
  250. Pribenszky C, Molnar M, Cseh S, Solti L. *Improving post-thaw survival of cryopreserved mouse blastocysts by hydrostatic pressure challenge*. *Animal Reproduction Science* 2005; **87**: 143-150.
  251. Pribenszky C, Molnar M, Ulrich P, Barbosa CC, Hatamoto LK, Santos CEP. *Pressure assisted cryopreservation: a novel possibility for IVP bovine blastocyst cryopreservation*. *Reproduction in Domestic Animals* 2005; **40**: 338.
  252. Richert L, Or A, Shinitzky M. *Promotion of tumor antigenicity in EL-4 leukemia cells by hydrostatic pressure*. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 1986; **22**: 119-124.
  253. Eisenthal A, Gonenne A, Skornick Y, Gelfand A, Kaver I, Yelin A, Yehoshua H, Lifschitz-Mercer B, Shinitzky M. *Th2 to Th1 cytokine shift in autologous peripheral blood mononuclear cells responding to autologous human tumor cells modified by hydrostatic pressure and cross-linking (PCL) in vitro*. In: *Annual Meeting of the American Association of Cancer Research*; 1996; Washington, D. C., USA. A3232.
  254. Goldman Y, Peled A, Shinitzky R. *Effective elimination of lung metastases induced by tumor cells treated hydrostatic pressure and N-acetyl-L-cysteine*. *Cancer Research* 2000; **60**: 350-358.
  255. Goldman Y, Shinitzky M. *Immunotherapy of cancer with a pressurized, surface reduced tumor-cell vaccine*. *Drug Development Research* 2000; **50**: 272-284.
  256. Giangrande PLF. *The history of blood transfusion*. *British Journal of Haematology* 2000; **110**: 758-767.
  257. *The history of blood transfusion medicine*. 2009. Bloodbook.com
  258. Watkins WM. *The ABO blood group system: historical background*. *Transfusion Medicine* 2001; **11**: 243-265.
  259. Dzik WH. *The James Blundell award lecture 2006: transfusion and the treatment of haemorrhage: past, present and future*. *Transfusion Medicine* 2007; **17**: 367-374.
  260. Greenwalt TJ. *Antibodies, antigens, and anticoagulants: a historical review of a lifetime in transfusion medicine - the Landsteiner Lecture 2004*. *Transfusion* 2005; **45**: 1531-1539.
  261. Schneider WH. *Blood transfusion between the wars*. *Journal of the History of Medicine* 2003; **58**: 187-224.
  262. Hess JR, Thomas MJG. *Blood use in war and disaster: lessons from the past century*. *Transfusion* 2003; **43**: 1622-1633.
  263. Lefrère J-J, Rouger P. *Transfusion sanguine : une approche sécuritaire*. 2000.
  264. Auby J-M. *Le sang humain et le droit*. Paris: Presses Universitaires de France; 1997.
  265. Robert C, Vincent P. *Biologie et physiologie humaines*. Paris: Vuibert; 1997.
  266. Rouger P. *La transfusion sanguine*. Paris: Presses Universitaires de France; 1997.
  267. Schaller J, Gerber S, Kampf U, Lejon S, Traschsel C. *Human blood plasma proteins: structure and function*. John Wiley and Sons; 2008.
  268. McCullough J. *Transfusion Medicine, 2nd edition*. Churchill Livingstone; 2005.

269. George J. Plasma Proteins. 2005.  
[http://users.bergen.org/dondew/bio/molbio/AAMB5\\_Lesson/StudentLessonIndex2006.html](http://users.bergen.org/dondew/bio/molbio/AAMB5_Lesson/StudentLessonIndex2006.html)
270. Muller J-Y, Avenard G, Martini E. *Les dérivés sanguins*. Paris; 1992.
271. Quinlan GJ, Martin GS, Evans TW. *Albumin: biochemical properties and therapeutic potential*. *Hepatology* 2005; **41**: 1211-1219.
272. *Antibody*. Encyclopaedia Britannica Online. 2009.
273. Jesty J. *Blood coagulation*. In: Sons JWa (ed.) *Encyclopedia of life sciences*. Chichester; 2005.
274. Pharmacopée Européenne 5.6. *Plasma humain (mélange de) trité pour viro-inactivation*. In: 01/2007:1646; 2007.
275. Naegelen C, Isola H, Dernis D, Maurel J-P, Tardivel R, Bois S, Vignoli C, Cazenave J-P. *Évolution des techniques de préparation des produits sanguins labiles (PSL) : inactivation des pathogènes dans les PSL*. *Transfusion Clinique et Biologique* 2009; **16**: 179-189.
276. Solheim BG, Seghatchian J. *The six questions of pathogen reduction technology: An overview of current opinions*. *Transfusion and Apheresis Science* 2008; **39**: 51-57.
277. Shigehisa T, Nakagami T, Ohno H, Otake T, Mori H, Kawahata T, Morimoto M, Ueba N. *Inactivation of HIV in blood plasma by high hydrostatic pressure*. In: Hayashi R, Balny C (eds.), *High Pressure Bioscience and Biotechnology*. New York: Elsevier; 1996: 273-278.
278. Bradley DW, Hess RA, Tao F, Sciaba-Lentz L, Remaley AT, Laugharn JA, Manak MM. *Pressure cycling technology: a novel approach to virus inactivation in plasma*. *Transfusion* 2000; **40**: 193-200.
279. Matser AM, Van Der Ven C, Gouwerok CWN, D. DK. *High-pressure processing for preservation of blood products*. *High Pressure Research* 2005; **25**: 37-41.
280. Hess RA, Manak MM, Dusing SK. *Pressure cycling inactivation of pathogens in biological materials used for therapeutics or vaccines*. WO 02/056824. 2002.
281. Bradley DW, Laugharn JA, Hess RA. *Rapid sterilization and vaccine preparation*. WO 03/089015. 2003.
282. Laugharn JA, Bradley DW, Hess RA. *Rapid cryobaric sterilization and vaccine preparation*. WO 00/468641. 2000.
283. Mertens B, Deplace G. *Engineering aspects of high-pressure technology in the food industry*. *Food Technology* 1993; **47**: 164-169.
284. El Khorassani M, Benkirane Agoumi N. *Le facteur VIII coagulant*. *Médecine du Maghreb* 1996; **55**: 11-13.
285. Fang H, Wang L, Wang H. *The protein structure and effect of factor VIII*. *Thrombosis Research* 2007; **119**: 1-13.
286. O'Donnell J, Laffan MA. *The relationship between ABO histo-blood group, factor VIII and von Willebrand factor*. *Transfusion Medicine* 2001; **11**: 343-351.
287. Wang W, Wang YJ, Kelner DN. *Coagulation factor VIII: structure and stability*. *International Journal of Pharmaceutics* 2003; **259**: 1-15.
288. Stoilova-McPhie S, Villoutreix BO, Mertens K, Kemball-Cook G, Holzenburg A. *3-Dimensional structure of membrane-bound coagulation factor VIII: modeling of the factor VIII heterodimer within a 3-dimensional density map derived by electron crystallography*. *Blood* 2002; **99**: 1215-1223.
289. Duga S, Asselta R, Tenchini MT. *Coagulation factor V*. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 2004; **36**: 1393-1399.
290. Nicolaes GAF, Dahlback B. *Factor V and thrombotic disease*. Description of a janus-faced protein. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2002; **22**: 530-538.



291. Mann KG, Kalafatis M. *Factor V: a combination of Dr Jekyll and Mr Hyde*. Blood 2003; **101**: 20-30.
292. Papagrigroriou E, McEwan PA, Walsh PN, Emsley J. *Crystal structure of the factor XI zymogen reveals a pathway for transactivation*. Nature Structural and Molecular Biology 2006; **13**: 557-558.
293. Cheng Q, Sun M-F, Kravtsov DV, Aktimur A, Gailani D. *Factor XI apple domains and protein dimerization*. Journal of Thrombosis and Haemostasis 2003; **1**: 2340-2347.
294. Fujikawa K. *Historical perspective of factor XI*. Thrombosis Research 2005; **115**: 441-450.
295. Diagnostica Stago. *Notice d'utilisation. STA - C.K. PREST*.
296. Bremer PJ, Fletcher GC, Osborne C. *Staphylococcus aureus*. New Zealand Institute for Crop and Food Research 2004.
297. Todar K. *Staphylococcus aureus and staphylococcal disease*. 2008. <http://www.textbookofbacteriology.net/staph.html>
298. Todar K. *Pseudomonas aeruginosa*. 2008. <http://www.textbookofbacteriology.net/pseudomonas.html>
299. Chabasse D, Danis M, Guigen C. *Parasitoses et mycoses des régions tempérées et tropicales*. Paris: Masson; 2007.
300. Hilleman MR. *Current overview of the pathogenesis and prophylaxis of measles with focus on practical implications*. Vaccine 2002; **20**: 651-665.
301. Drutz JE. *Measles: its history and its eventual eradication*. Seminars in Pediatric Infectious Diseases 2001; **12**: 315-322.
302. Sierra S, Kupfer B, Kaiser R. *Basics of the virology of HIV-1 and its replication*. Journal of Clinical Virology 2005; **34**: 233-244.
303. Andréola M-L, Ventura M. *Communication personnelle*. 2009.
304. Liautard J-P, Alvarez-Martinez MT, Féraudet C, Torrent J. *La protéine prion : dynamique et conversion in vitro*. Médecine / Sciences 2002; **18**: 62-69.
305. Lambert Y. *Application du paramètre pression dans les procédés de l'agro-alimentaire : pascalisation, transport de masse, congélation et mise au point d'une gamme d'emballage*. N° d'ordre : 2107. Université Bordeaux 1; 1999.
306. Rigaldie Y. *Sur l'impact des traitements sous hautes pressions dans la décontamination et la stérilisation de formes pharmaceutiques renfermant des molécules thérapeutiques sensibles aux procédés énergétiques*. N° d'ordre : 2526. Université Bordeaux 1; 2002.
307. Yuste J, Capellas M, Pla R, Fung DYC, Mor-Mur M. *High pressure processing for food safety and preservation: a review*. Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology 2001; **9**: 1-10.
308. Rigaldie Y, Largeteau A, Demazeau G, Lemagnen G, Grislain L. *Inactivation of Staphylococcus aureus using high hydrostatic pressure*. High Pressure Research 2007; **27**: 125-128.
309. Schiller NL, Joiner KA. *Interaction of complement with serum-sensitive and serum-resistant strains of Pseudomonas aeruginosa*. Infection and Immunity 1986; **54**: 689-694.
310. Kunert A, Losse J, Gruszyn C, Hühn M, Kaendler K, Mikkat S, Volke D, Hoffmann R, Jokiranta TS, Seeberger H, Moellmann U, Hellwage J, Zipfel PF. *Immune evasion of the human pathogen Pseudomonas aeruginosa: elongation factor Tuf is a factor H and plasminogen binding protein*. The Journal of Immunology 2007; **179**: 2979-2988.
311. European Pharmacopoeia Commission. *Indicateurs biologiques de stérilisation*. 2009.

312. Oggioni MR, Pozzi G, Valensin PE. *Recurrent septicemia in an immunocompromised patient due to probiotic strains of Bacillus subtilis*. Journal of Clinical Microbiology 1998; **36**: 325-326.
313. Dib EG, Dib SA, Korkmaz DA, Mobarakai NK, Glaser JB. *Nonhemolytic, nonmotile Gram-positive rods indicative of Bacillus anthracis*. Emerging Infectious Diseases 2003; **9**: 1013-1015.
314. Centers for Disease Control and Prevention. *Basic laboratory protocols for the presumptive identification of Bacillus anthracis*. 2001.
315. Sawyer L. *Inactivation of emergent blood-borne pathogens in plasma and platelets using the INTERCEPT blood system*. In: International Conference on Emerging Infectious Diseases; 2006; Atlanta.
316. Macopharma. Theraflex - MB plasma. *Inactivation des pathogènes par la méthode du bleu de méthylène et de la lumière*.
317. Beney L, Perrier-Cornet J-M, Hayert M, Gervais P. *Influence of bilayer compressibility on the morphological behavior of liposomes during high pressure treatment*. In: Heremans K (ed.) High Pressure Research in the Bioscience and Biotechnology. Leuven: Leuven University Press; 1997: 175-178.
318. Otake T. *Advance in the use of high pressure for food processing and preservation: high pressure viral inactivation and its application for blood preparations*. Foods and Food Ingredients 2005; **210**: 44-48.
319. Otake T, Kawahata T, Mori H, Kojima Y, Hayakawa K. *Novel method of inactivation of human immunodeficiency virus type 1 by the freeze pressure generation method*. Applied Microbiology and Biotechnology 2005; **67**: 746-751
320. Otake T, Mori H, Kawahata T, Kojima Y, Nishimura H, Oishi I. *Reduction of HIV-1 infectivity and reverse transcriptase activity by high hydrostatic pressure treatment*. Biocontrol Science 2000; **5**: 127-129



## ABBREVIATIONS

**Ac** : Anticorps

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**ATCC** : American Type Culture Collection

**ATNC** : Agent Transmissible Non Conventionnel

**ATP** : Adénosine triphosphate

**EFS** : Etablissement Français du Sang

**ESB** : Encéphalopathie Spongiforme Bovine

**ESST** : Encéphalopathies Spongiformes Subaiguës Transmissibles

**FV** : Facteur de coagulation V

**FVIIIc** : Facteur de coagulation VIIIc

**FXI** : Facteur de coagulation XI

**HP** : Hautes Pressions

**IBH** : Infected Brain Homogenate

**Ig** : Immunoglobuline

**kDa** : kilodalton

**LFB** : Laboratoire français du Fractionnement et des Biotechnologies

**MA** : mode d'application de la pression

**MCJ** : Maladie de Creutzfeldt-Jakob

**min** : minute

**mL** : millilitre

**MPa** : MégaPascal

**NBH** : Normal Brain Homogenate

**PFC** : Plasma Frais Congelé

**PK** : Protéinase K

**PrP<sup>c</sup>** : protéine prion normale

**PrP<sup>Sc</sup>** : protéine prion pathologique

**RMN** : Résonance Magnétique Nucléaire

**s** : seconde

**SI** : Système International d'unités

**SIDA** : Syndrome de l'ImmunoDéficiency Acquis

**T** : température

**Tbb** : *Trypanosoma brucei brucei*

**TF** : Tissue Factor

**TS** : Tryptone Sel

**UV** : Ultraviolet

**VA** : vitesse d'application de la pression

**VHB** : Virus de l'Hépatite B

**VHC** : Virus de l'Hépatite C

**VIH** : Virus de l'Immunodéficience Humaine

## **BREVET, PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS**

### **Brevet**

« Procédé d'inactivation d'au moins un agent pathogène dans un échantillon de plasma sanguin humain »

N° de dépôt français : 09/03292 le 03/07/2009

### **Publications soumises**

1. « Brief history of the development of high hydrostatic pressure in biosciences: pressure effect on biological structures and potential applications in biotechnology »

N. Rivalain, G. Demazeau, J. Roquain

Journal of Bacteriology

2. « Influence of various parameters associated with high pressure treatment and their combination on the inactivation of *Staphylococcus aureus* »

N. Rivalain, G. Demazeau, J. Roquain, A. Largeteau, J. M. Boiron, J. P. Maurel, Z. Ivanovic

Current Opinion in Biotechnology

### **Communication orale**

« Role of high pressure and various factors on the inactivation of pathogens in a biological medium »

N. Rivalain, G. Demazeau, J. Roquain, A. Largeteau, J. M. Boiron, J. P. Maurel, Z. Ivanovic

47th EHPRG International Conference, Paris (France), 6-11 septembre 2009

### **Poster**

« Impact of the composition of the biological medium on pressure inactivation of micro-organisms »

N. Rivalain, G. Demazeau, J. Roquain, A. Largeteau, J. M. Boiron, J. P. Maurel, Z. Ivanovic

47th EHPRG International Conference, Paris (France), 6-11 septembre 2009