

► Une biopile enzymatique implantable est un dispositif produisant du courant uniquement à partir du glucose et de l'oxygène naturellement et constamment présents dans l'organisme. Les enzymes présentes aux électrodes oxydent le glucose et réduisent l'oxygène, ce qui génère un flux d'électrons dans un circuit électrique associé. Cette microcentrale électrique, qui peut fournir une tension de presque un volt, pourra alimenter sur une longue période la future génération de robots implantables. Tout dispositif médical implantable doit être stérilisé avant son implantation. Comme le principe actif de cette biopile est composé d'enzymes, la question de la stérilisation de ce nouveau type de dispositif s'est posée. ◀

Qu'est-ce qu'une biopile implantable ?

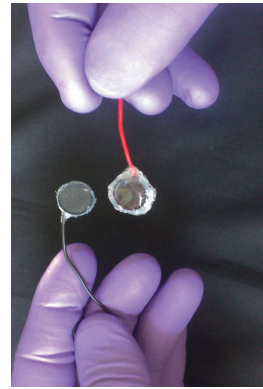
La biopile enzymatique implantable que nous développons permet de générer de l'énergie électrique grâce à des enzymes immobilisées sur des électrodes, à partir de glucose et d'oxygène, substrats présents dans l'organisme et potentiellement inépuisables. Tant que les enzymes fonctionnent, et que les substrats diffusent librement, il est possible de fournir du courant de façon quasi illimitée à des dispositifs médicaux électroniques pouvant suppléer des fonctions défaillantes chez l'homme. Le principe de fonctionnement est illustré par la *Figure 1*. Le glucose est oxydé à la bioanode par la glucose oxydase qui fournit des électrons au circuit. Après passage dans le circuit électrique, ces électrons sont récupérés au niveau de la biocathode. À ce niveau, la laccase¹ sert à réduire le dioxygène en eau. Ces bioélectrodes ont la forme d'une pastille contenant les enzymes immobilisées dans un réseau tridimensionnel de matériau nanostructuré. La preuve de concept *in vivo* a été réalisée par Cinquin *et al.* en 2010 [1]. Cette biopile fournit actuellement suffisamment d'énergie (40 µW) pour alimenter des dispositifs tels qu'un

¹ Oxydase avec du cuivre comme cofacteur.

La biopile enzymatique à glucose/oxygène

Quelques nuances de Grays...

Jean-Pierre Alcaraz¹, Sarra El Ichi-Ribault¹, Laurent Cortella², Catherine Guimier-Pingault³, Abdelkader Zebda¹, Philippe Cinquin¹, Donald K. Martin¹



¹Université Grenoble Alpes/CNRS/ Inserm/TIMC-IMAG UMR 5525, 38041 Grenoble, France ;

²ARC-Nucléart CEA-Grenoble, 17, rue des Martyrs, F38054 Grenoble Cedex 9, France ;

³Stérilisation centrale, CHU de Grenoble, 38700 La Tronche, France.

jean-pierre.alcaraz@imag.fr

pacemaker [2]. Notre équipe a récemment implanté chez le rat une bioélectrode modifiée qui a conservé son activité après une durée de 167 jours [3].

Utilisation de l'ionisation pour la stérilisation du dispositif

L'implantation d'un dispositif médical électronique alimenté par une biopile pose le problème de sa stérilisation. Pour les applications contenant du matériel biologique, ce qui est le cas de la biopile enzymatique, l'autoclavage est proscrit car les enzymes sont dénaturées par la chaleur. Deux types de stérilisation à froid restent alors possibles : l'une utilisant le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) sous vide d'air, l'autre les radiations ionisantes.

La stérilisation au H₂O₂ est un procédé couramment utilisé dans les hôpitaux pour les dispositifs médicaux implantables. Malheureusement, la structure des bioélectrodes est fortement dégradée sous l'effet du vide partiel. De plus, les enzymes sont presque totalement inactivées par la dose d'agent oxydant. Nous nous sommes donc intéressés à la stérilisation *via* les rayonnements ionisants (RI).

L'action des RI sur la cellule a été théorisée il y a un siècle grâce aux travaux de Marie Curie [4] et s'utilise couramment lors des traitements en radiothérapie. La réponse cellulaire aux RI permet d'appréhender les mécanismes de radiosensibilité [5] (→) et d'optimiser les traitements (radiothérapie FLASH [6]) (→).

(→) Voir la Synthèse de N. Foray *et al.*, *m/s* n° 4, avril 2013, page 397

(→) Voir la Nouvelle de V. Favaudon *et al.*, *m/s* n° 2, février 2015, page 121

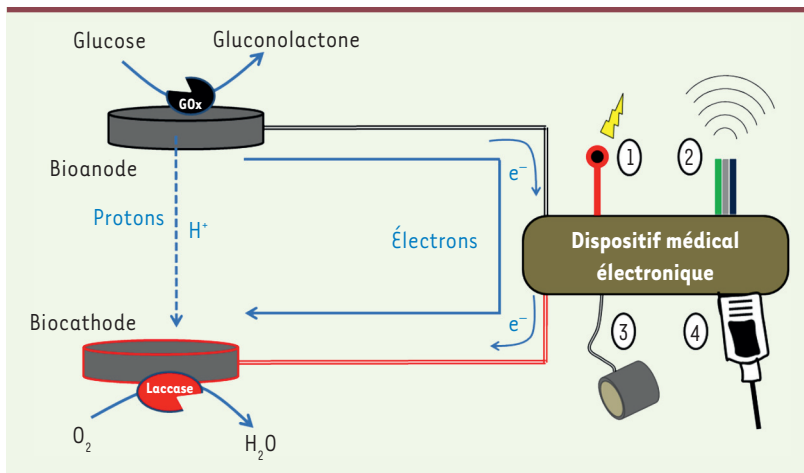


Figure 1. Principe de fonctionnement d'une biopile alimentant un dispositif médical électronique. Le dispositif est relié à des électrodes miniaturisées d'excitation (1), des biocapteurs physiologiques (2), des dispositifs gourmands en énergie comme un sphincter urinaire artificiel (3) ou un distributeur de drogues (4). GOx : glucose oxydase.

L'unité internationale de mesure de dose absorbée est le Gray (1Gy = 1J/kg). Alors que la dose moyenne lors d'une séance de radiothérapie est de 2Gy, la dose appliquée pour la stérilisation de dispositifs médicaux est 10 000 fois plus élevée, car les micro-organismes sont beaucoup plus résistants aux radiations ionisantes que nos cellules. Les photons de haute énergie interagissent avec la matière en ionisant les noyaux des atomes qu'ils rencontrent et en éjectant un électron. Les radicaux formés sont très réactifs et permettent de casser les liaisons chimiques ou d'en former de nouvelles. Les rayonnements ionisants sont couramment utilisés pour la stérilisation de dispositifs médicaux selon les normes ISO 11137 et EN 552 [7, 8].

La stérilisation de la biopile implantable a pour objectif de garantir un niveau d'assurance de stérilité de 10^{-6} (absence d'1 million de germe dans l'implant). À forte dose, c'est l'effet cumulé des RI sur les constituants cellulaires, en particulier les lipides membranaires, qui sont à l'origine de l'effet létal recherché sur les microorganismes. La radiolyse de l'eau, qui génère un grand nombre d'espèces réactives de l'oxygène, amplifie ce phénomène. Ces effets indirects sont loin d'être négligeables : la nature et l'état d'hydratation des échantillons peuvent mener à des résultats totalement différents. Les principales modifications observées sur les protéines concernent leurs structures tertiaire et quaternaire, les liaisons étant déstabilisées, voire rompues. Les conséquences sont dévastatrices pour l'activité des enzymes en solution.

La dose de 25 à 50 kGy utilisée en routine peut être diminuée si l'on peut toutefois garantir la stérilité du dispositif, en se basant sur la biomasse initiale et sa radiosensibilité. Dans notre application, un compromis est à trouver entre les différents paramètres influant la radiosensibilité des microorganismes (nature et quantité de la biomasse, hydratation, humidité, température, présence d'oxygène, etc.) et la sensibilité des composants de la biopile que les RI à forte dose pourraient altérer.

Les effets des RI sont plus rapidement visibles sur les enzymes en solution (Figure 2). À la dose faible de 6 kGy, la laccase en solution perd déjà la moitié de son activité. Par contre, lorsque la laccase est immobilisée dans une électrode, elle est beaucoup plus résistante. La délivrance d'une dose de 12 ou 42 kGy aux électrodes permet en effet de conserver une activité résiduelle de 70 %. Ces résultats valident donc notre choix de cette méthode pour la stérilisation. D'après la littérature, les doses de RI utilisées ont peu d'impact sur la structure des autres composants de l'électrode : le silicone est inerte [7], le chitosan² peu réactif [9] et les nanotubes de carbone ont même une action anti-radicalaire [10]. En revanche, l'effet des RI est important lorsque l'électrode est stérilisée en milieu aqueux : après une ionisation à une dose de 42 kGy, la perte d'activité est alors de presque 80 %. Il est donc primordial de tenir compte de la radiolyse de l'eau et d'éviter la présence d'eau au sein des électrodes au cours de l'ionisation.

Une dose minimale de RI pour garantir une biopile implantable stérile

Afin de tester l'efficacité de la stérilisation des bioélectrodes, nous avons utilisé des spores de *Geobacillus stearothermophilus* (bactérie à Gram positif). Les spores de bactéries contiennent moins d'eau (10-15 %) que les formes végétatives des bactéries (80 %), et sont donc plus résistantes aux radiations ionisantes. Nous avons utilisé ces spores pour évaluer la relation dose-effet des RI. La D_{10} (c'est-à-dire la dose nécessaire pour réduire la quantité d'un microorganisme d'un facteur 10) a été évaluée à 2,4 kGy. Une dose de 10 fois la D_{10} est préconisée pour stériliser un implant contaminé avec des spores bactériennes, soit 25 kGy. Une dose de 12 kGy est cependant suffisante pour à la fois éviter la dégradation de certains composants de l'électrode et garantir la stérilité de l'implant. Cette dose a été choisie pour stériliser des bioélectrodes implantées dans la cavité intra-abdominale de trois modèles animaux (rat, lapin, brebis). Les études de biocompatibilité des bioélectrodes réalisées [3] ou en cours de publication chez ces trois espèces montrent l'absence d'infection des implants.

² Polymère linéaire de glucosamine obtenu à partir de la désacétylation de la chitine.

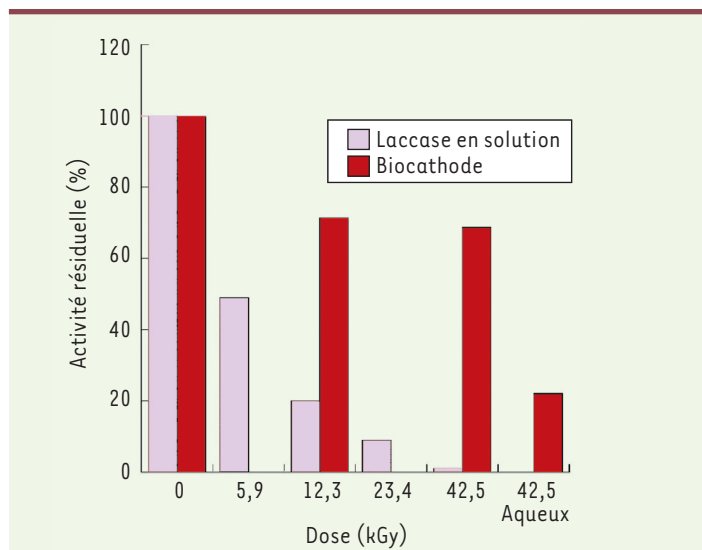


Figure 2. Activité résiduelle de la laccase en solution ou immobilisée dans la biocathode en fonction de la dose de rayonnements ionisants.

Conclusion

Cette étude fait sauter un verrou important pour l'implantation de ce dispositif complexe. Une stérilisation à forte dose de radiation permet non seulement de stériliser efficacement la biopile mais également de conserver une activité biologique suffisante pour continuer son développement. Nous utilisons à l'heure actuelle une capsule électronique pour collecter les données de la biopile. Les rayonnements ionisants étant incompatibles avec les dispositifs électroniques, notamment les semi-conducteurs par passage d'électrons dans la bande de conduction, les deux parties du dispositif sont stérilisées séparément : la partie électronique par une stérilisation à basse température avec H_2O_2 et la partie biopile par une ionisation au rayonnement gamma. Les deux parties stérilisées sont ensuite connectées dans un environnement stérile par des fils isolés.

Cette méthode de stérilisation représente une étape importante dans l'optimisation de l'implantation de dispositifs médicaux de nouvelle génération. Le suivi du dispositif *in vivo* est en cours... affaire à suivre ! ♦

SUMMARY

Shades of grays for implanting an enzymatic biofuel cell

An implanted biofuel cell (IBFC) is a novel device that provides the means to create electricity from glucose and oxygen, using an original

architecture for the IBFC that provides efficient work inside a living organism. In the future these IBFCs will be required to power implanted devices to assist failing physiological functions in humans. The active ingredients of such IBFCs are glucose oxidase at the anode and laccase at the cathode. These enzymes are entrapped in a 3D network of conductive and insulated materials. This publication solves the issue of the sterilization of such a complex device, using gamma irradiation. A 12kGy dose was sufficient to show absence of implant infection in all the implantations performed. We also prove *in vitro* functioning of both bioelectrodes with a high dose of 42kGy.

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Cinquin P, Gondran C, Giroud F, et al. A glucose biofuel cell implanted in rats. *PLoS One* 2010 ; 5 : e10476.
2. Zebda A, Cosnier S, Alcaraz JP, et al. Single glucose biofuel cells implanted in rats power electronic devices. *Sci Rep* 2013 ; 3 : 1516.
3. El Ichi S, Zebda A, Alcaraz JP, et al. Bioelectrodes modified with chitosan for long-term energy supply from the body *Energy Environ Sci* 2015 ; 8 : 1017-26.
4. Gluszewski W, Zagórski ZP, Tran QK, Cortella L, Maria Skłodowska Curie: the precursor of radiation sterilization methods. *Anal Bioanal Chem* 2011 ; 400 : 1577-82.
5. Foray N, Colin C, Bourguignon M. Radiosensibilité : l'évidence d'un facteur individuel. *Med Sci (Paris)* 2013 ; 29 : 397-403.
6. Favaudon V, Fouillade C, Vozenin MC. La radiothérapie FLASH pour épargner les tissus sains. *Med Sci (Paris)* 2015 ; 31 : 121-3.
7. Borejka AJ, Kaluska IM. Materials used in medical devices. In : International atomic energy agency, eds. *Trends in radiations sterilization of health care products*. Vienna, Austria : International Atomic Energy Agency, 2008 : 159-74.
8. Da Silva Aquino KA. Sterilization by gamma irradiation. In : Adrovic F, ed. *Gamma radiation*. InTech, 2012.
9. Tahtat D, Mahlous M, Benamer S, et al. Effect of molecular weight on radiation chemical degradation yield of chain scission of γ -irradiated chitosan in solid state and in aqueous solution. *Radiat Phys Chem* 2012 ; 81 : 659-65.
10. Ghosh SK, Chaki TK, Khastgir D, Pinto R. Gamma irradiation effects on optical, thermal, and mechanical properties of polysulfone/MWCNT nanocomposites in argon atmosphere. *J Appl Polym Sci* 2015 ; 132 : 42017.

TIRÉS À PART

J.P. Alcaraz



Tarifs d'abonnement m/s - 2016

**Abonnez-vous
à médecine/sciences**

> Grâce à m/s, vivez en direct les progrès
des sciences biologiques et médicales

**Bulletin d'abonnement
page 724 dans ce numéro de m/s**

