

**TRAITEMENT DU CEFOTAXIME
PAR RADIOSTERILISATION GAMMA :
RECHERCHE DES EFFETS PRODUITS.
DETECTION PAR RESONANCE PARAMAGNETIQUE
ELECTRONIQUE DES RADICAUX LIBRES FORMES.
MODIFICATION DES VALEURS
DE CONCENTRATION MINIMALE INHIBITRICE.**

THESE

POUR LE

**DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

présentée et soutenue publiquement le 4 Décembre 1995

par

Thierry AUSSEUR

né le 19 Mars 1970 à Limoges (Haute-Vienne)

EXAMINATEURS de la THESE

Madame le Professeur BOSGIRAUD PRESIDENT
Monsieur DUROUX, *Maître de Conférences* JUGE
Monsieur LAGORCE, *Maître de Conférences* JUGE
Monsieur AUXEMERY, *Pharmacien industriel* JUGE

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE PHARMACIE

DOYEN DE LA FACULTE:

Monsieur le Professeur RABY Claude

ASSESSEURS:

Monsieur le Professeur GHESTEM Axel
Monsieur DREYFUSS Gilles - Maître de Conférences

PROFESSEURS:

BENEYTOUT Jean-Louis	BIOCHIMIE
BERNARD Michel	PHYSIQUE-BIOPHYSIQUE
BOSGIRAUD Claudine	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE PARASITOLOGIE
BROSSARD Claude	PHARMACOTECHNIE
BUXERAUD Jacques	CHIMIE ORGANIQUE CHIMIE THERAPEUTIQUE
CARDOT Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE
CHULIA Albert	PHARMACOGNOSIE
CHULIA Dominique	PHARMACOTECHNIE
DELAGE Christiane	CHIMIE GENERALE ET MINERALE
GHESTEM Axel	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
HABRIOUX Gérard	BIOCHIMIE FONDAMENTALE
LACHATRE Gérard	TOXICOLOGIE
MOESCH Christian	HYGIENE
OUDART Nicole	PHARMACODYNAMIE
RABY Claude	PHARMACIE CHIMIQUE ET CHIMIE ORGANIQUE

SECRETAIRE GENERAL DE LA FACULTE - CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS

POMMARET Maryse

Les faits n'appartiennent tous qu'au problème, non à sa solution.

Ludwig Wittgenstein

Nous tenons vivement à remercier Madame le Professeur Bosgiraud,
Professeur de **Bactériologie, Virologie et Parasitologie** à la Faculté de
Pharmacie de Limoges, pour nous avoir accueilli au sein de son laboratoire,
pour la disponibilité et l'intérêt que vous avez porté à notre travail
et pour l'honneur que vous nous faites en présidant ce jury de thèse.

Nous tenons à remercier Monsieur Duroux,

Maître de conférence de **Biophysique** à la Faculté de
Pharmacie de Limoges, pour la disponibilité
et l'intérêt que vous avez porté à notre travail.

Nous remercions profondément Monsieur Lagorce,
Maître de conférence de **Chimie Organique** à la Faculté de
Pharmacie de Limoges, pour votre gentillesse, votre sérieux
et la compétence avec laquelle vous avez proposé et encadré cette thèse.
Nous tenons à vous exprimer notre gratitude et notre profond respect.

Nous tenons à remercier Monsieur Auxemery,

Pharmacien industriel, pour l'honneur que vous nous faites
en siégant dans ce jury en y apportant la connaissance
de l'industrie pharmaceutique qui est la votre.

De nombreuses personnes ont contribué à ce travail, nous tenons à les en remercier, en particulier,

Messieurs Azlodi et Lampilas, des **Laboratoires Roussel-Uclaf**,

Mesdames Mounier et Javerliat du **CHUR Dupuytren**, Limoges,

Monsieur Vost des **Laboratoires Glaxo**,

Madame Labro du **CHUR Xavier Bichat**, Paris,

Monsieur Hénon de la **Société Gammaster Provence**,

Monsieur Vignoles, Maître de conférence d'**Informatique** à la Faculté de Pharmacie de Limoges,

Madame Dreyfuss et Monsieur Basly, Maîtres de Conférence de **Chimie Analytique** à la Faculté de Pharmacie de Limoges,

Mesdames Chabernaud, Claude, Martin, Mouzet, Ségur

et tout le personnel des laboratoires de Biophysique, Bactériologie et Chimie Organique de la Faculté de Pharmacie de Limoges.

A mes parents, qui m'ont soutenu et encouragé
tout au long de mes études.

A ma grand-mère, qui a su m'écouter et me
soutenir tout au long de ma formation.

A toute ma famille.

A tous mes amis, et en particulier,
Anne, Céline, Florence,
Gilles, Jean-Philippe et Philippe.

PLAN

INTRODUCTION

PREMIERE PARTIE : PRESENTATION BIBLIOGRAPHIQUE

- 1.1 Présentation du céfotaxime et du céfuroxime
 - 1.1.1 Le céfotaxime- Claforan*
 - 1.1.2 Le céfuroxime- Zinnat*
- 1.2 Les différentes méthodes de stérilisation
 - 1.2.1 Les méthodes non radiostérilisantes
 - 1.2.2 La radiostérilisation
- 1.3 Les radicaux libres
 - 1.3.1 Définition
 - 1.3.2 Les radicaux libres oxygénés
 - 1.3.3 La biologie des radicaux libres
- 1.4 La Résonance Paramagnétique Electronique
 - 1.4.1 Principes généraux
 - 1.4.2 Appareillage
- 1.5 Méthodes de dosage microbiologique et détermination de l'activité d'un antibiotique par la mesure de la CMI et de la CMB
 - 1.5.1 Titrage microbiologique d'un antibiotique selon la Pharmacopée française
 - 1.5.2 Détermination de la CMI et de la CMB d'un antibiotique

DEUXIEME PARTIE : MATERIELS ET METHODES

- 2.1 La radiostérilisation
- 2.2 Dosimétrie par RPE

2.3 Mesure du pouvoir scavenger

2.4 Mesures de CMI

2.4.1 Souches utilisées

2.4.2 Milieux de culture

2.4.3 Les solutions de céfotaxime

2.4.4 Protocole de détermination de la CMI

TROISIEME PARTIE : RESULTATS EXPERIMENTAUX

3.1 Dosimétrie du céfotaxime irradié par les rayons gamma

3.2 Pouvoir scavenger du céfotaxime

3.3 Résultats des mesures de CMI du céfotaxime

3.3.1 Résultat des dénombrements

3.3.2 Résultats des mesures de CMI

3.4 Autres caractères étudiés

3.4.1 RMN

3.4.2 Irradiation du céfuroxime

3.4.3 Caractères divers

QUATRIEME PARTIE : DISCUSSION

CONCLUSION

BIBLIOGRAPHIE

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION

Les rayonnements gamma sont aujourd'hui largement utilisés, notamment dans l'agro-alimentaire pour assurer une meilleure conservation des aliments et dans l'industrie pharmaceutique pour réduire la contamination microbienne ou stériliser le matériel médico-chirurgical en plastique et en élastomère. Mais ils sont encore peu employés pour stériliser les médicaments dans leur conditionnement final, utilisation qui répond pourtant à un véritable besoin.

En effet, le coût des procédures de filtration stérilisante de molécules thermosensibles et la toxicité associée à l'oxyde d'éthylène ouvrent une réelle opportunité à cette méthode alternative pour la stérilisation des formes solides. De nombreuses études sont alors nécessaires pour valider cette technique en Pharmacie industrielle et satisfaire aux exigences réglementaires des dossiers d'enregistrement des médicaments.

Il nous a semblé intéressant de proposer une étude de radiostérilisation gamma du céfotaxime sous forme pulvérulente.

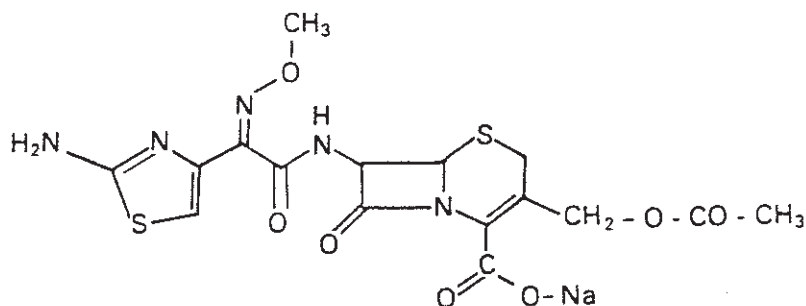
En effet cet antibiotique injectable coûteux est thermosensible et instable en solution aqueuse. Dans ce travail, nous nous proposons de l'irradier par une source de rayons gamma, d'en effectuer la dosimétrie par Résonance Paramagnétique Electronique, de montrer sa capacité à capter des radicaux libres (activité "scavenger") et de comparer son activité antibactérienne en fonction des doses d'irradiation reçues par mesure de la Concentration Minimale Inhibitrice.

PREMIERE PARTIE
PRESENTATION BIBLIOGRAPHIQUE

1.1 Présentation du céfotaxime et du céfuroxime

1.1.1 Le céfotaxime - Claforan* (laboratoires Roussel)

* Généralités



Dénomination commune : céfotaxime

$C_{16}H_{16}O_7S_2N_5Na$

P.M. = 477,5

Dénomination chimique :
(Additif n° 25 à la
Pharmacopée Française
9^e édition)

acide acétoxyméthyl-3 [(amino-2
thiazolyl-4)-2 méthoxyimino-2
acétamido-(2 Z)]-7 oxo-8 thia-5
aza-1 bicyclo [4.2.0.] octène-2
carboxylique-2- (6 R, 7 R).

Figure 1 - Formule chimique du céfotaxime (1)

Le céfotaxime est une céphalosporine hémisynthétique, dérivée de la céphalosporine C et appartenant au groupe des céphalosporines de troisième génération (figure 1). Cette molécule fut la première céphalosporine de troisième génération commercialisée en 1980. En 1993, elle reste la céphalosporine la plus utilisée dans le monde, avec 2 millions de patients traités annuellement. Cet antibiotique est commercialisé dans 110 pays.

Son succès est dû à l'efficacité clinique non démentie et à l'excellente tolérance du produit (2).

Le céfotaxime constitue le plus gros chiffre d'affaire du groupe Hoechst-Roussel-Uclaf avec 2,2 milliards de francs, ceci sous différents noms de spécialités. Cette molécule peut être considérée comme la céphalosporine de troisième génération la plus active sur les cocci à Gram positif. Elle est également active sur *Haemophilus influenzae*.

Elle présente en outre une excellente tolérance chez le sujet âgé et le nouveau-né, et ceci avec un recul de plus de dix ans (3) .

***Spectre d'activité**

Son activité antibactérienne est exceptionnelle, avec des CMI très basses vis à vis de nombreuses bactéries et avec une sensibilité des bactéries habituellement résistantes aux autres bêta-lactamines (1) .

Le motif amidine de l'aminothiazole intervient dans l'affinité vis à vis de l'enzyme bactérien cible, la transpeptidase, et le groupe méthoxy-imino dans sa configuration *syn*, apporte la stabilité par rapport aux bêta-lactamases.

Son poids moléculaire étant peu élevé, elle diffuse bien à travers la paroi bactérienne.

Cette molécule est active sur les streptocoques, à l'exclusion de ceux du groupe D, sur les pneumocoques, staphylocoques, *Bacillus subtilis* et *Bacillus mycoïdes*, *Corynebacterium diphtheriae*, gonocoques, méningocoques et autres *Neisseria*, sur les enterobactériacées (quelques cas de résistance) : *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Proteus indolee*+, *Salmonella*, *Citrobacter*, *Providencia*, *Shigella*, *Yersinia* et également sur *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus para influenzae* et *Clostridium perfringens* (tableaux 1 et 2 représentant deux études différentes) .

Espèces (nombre de souches)	Céfotaxime	
	CMI50 mcg/ml	CMI90 mcg/ml
Escherichia coli (28)	0,08	1
Klebsiella (22)	0,04	0,32
Enterobacter (25)	0,16	0,32
Serratia (27)	0,64	0,64
Proteus (39)	0,04	0,08
Citrobacter (4)	0,08	0,32
Providencia (4)	0,04	0,16
Pseudomonas (21)	16	32
Haemophilus producteurs de β -lactamase (18)	$\leq 0,02$	$\leq 0,02$
Haemophilus non producteurs de β -lactamase (21)	$\leq 0,02$	$\leq 0,02$

**Tableau 1 - Exemple 1 de l'activité
du céfotaxime (4)**

Micro-organismes (nombre testé)	Céfotaxime	
	CMI 50 ^a (mcg/ml)	CMI 90 ^b (mcg/ml)
Staphylococcus aureus (172)	1,6	1,6
Staphylococcus epidermidis (107)	0,8	6,2
Streptococcus, enterococci (116)	> 100	> 100
Streptococcus, non-enterococci (23)	$\leq 0,2$	0,8
Escherichia coli (425)	$\leq 0,2$	$\leq 0,2$
Klebsiella pneumoniae (171)	$\leq 0,2$	$\leq 0,2$
Enterobacter aerogenes (51)	$\leq 0,2$	$\leq 0,2$
Enterobacter cloacae (49)	$\leq 0,2$	1,6
Citrobacter diversus (25)	$\leq 0,2$	$\leq 0,2$
Citrobacter freundii (18)	$\leq 0,2$	$\leq 0,2$
Salmonella (7)	$\leq 0,2$	$\leq 0,2$
Proteus mirabilis (129)	$\leq 0,2$	$\leq 0,2$
Proteus, indole positif (17)	$\leq 0,2$	0,4
Providencia (3)	$\leq 0,2$	12,5
Serratia marcescens (37)	$\leq 0,2$	12,5
Pseudomonas aeruginosa (155)	6,2	25
Pseudomonas spp. (8)	12,5	50
Acinetobacter (22)	6,2	12,5

**Tableau 2 - Exemple 2 de l'activité
du céfotaxime (4)**

Cette molécule ne présente pas ou très peu d'augmentation des résistances bactériennes comme le tableau 3 le montre.

	1984	1985	1986
	%	%	%
<i>E. coli</i>	0,2 (3867)	0,2 (4109)	0,2 (3933)
<i>Klebsiella spp.</i>	1,3 (1115)	2,6 (971)	5,1 (1042)
<i>P. mirabilis</i>	0,3 (1045)	0,4 (1151)	0 (937)
<i>Proteus indole +</i>	1,6 (316)	1,4 (296)	3,8 (288)
<i>Enterobacter spp.</i>	17,4 (605)	18,4 (560)	17,1 (572)
<i>Citrobacter spp.</i>	18,5 (151)	15,7 (159)	7,9 (139)
<i>Providencia spp.</i>	0 (94)	0 (105)	0 (105)
<i>Serratia spp.</i>	27,2 (441)	24,4 (500)	36,3 (476)
<i>Salmonella spp.</i>	0 (73)	0 (51)	0 (57)
<i>Yersinia spp.</i>	0 (17)	0 (15)	0 (14)
<i>Shigella spp.</i>	0 (8)	0 (4)	0 (4)

Tableau 3 - Pourcentage de souches résistantes au céfotaxime

Le nombre de souches étudiées est indiqué entre parenthèses.

***Pharmacocinétique :**

L'**absorption** est naturellement immédiate par voie intraveineuse. La demi-vie d'élimination est de l'ordre de 40 minutes chez l'adulte, et d'une heure environ chez l'enfant. Elle est peu modifiée en cas d'insuffisance rénale, mais celle de son métabolite actif, le **désacétyl-céfotaxime** augmente et devient importante lorsque la clairance de la créatinine est inférieure à 5 ml par minute .

La **diffusion** est bonne dans le liquide d'ascite avec un maximum de 9,97 microgrammes par ml, après une injection IM de 1g, atteint au bout de la deuxième heure. Elle est également bonne dans le mucus bronchique avec un pic plasmatique de 2,2 microgrammes par ml, après injection de 2g en IV.

L'administration de 2g en IV donne un pic plasmatique de 7,5 microgrammes par ml dans les tissus bronchiques et pulmonaires.

Elle est également excellente dans le LCR, dans le liquide d'otite et dans l'os.

Le céfotaxime passe dans le lait maternel et traverse la barrière placentaire.

Sa **liaison aux protéines plasmatiques** est de l'ordre de 20 à 40%.

Le céfotaxime est **métabolisé** en dérivé désacétyl-céfotaxime, dérivé actif, mais dont l'activité varie suivant les germes de 20% à 50% de celle du céfotaxime. Il est la seule céphalosporine à posséder un métabolite synergique (1) .

L'**excrétion** est urinaire, de l'ordre de 1300 microgrammes par ml dans les 4 heures. L'élimination biliaire est faible.

***Indications :**

Elles sont limitées aux infections sévères dues aux germes sensibles, en particulier les septicémies, les endocardites, et les méningites à l'exclusion de celles provoquées par *Listeria monocytogenes*. Le céfotaxime reste un traitement de choix dans de nombreuses infections hospitalières, notamment les pneumonies, les infections urinaires compliquées, les infections pédiatriques et les méningites (7) . Son utilisation par voie parentérale est réservée au milieu hospitalier. Cette molécule est administrée généralement associée à d'autres antibiotiques (1) .

***Contre indications :**

Des allergies aux céphalosporines, croisées avec les pénicillines dans 5 à 10% des cas, ont été rapportées. Elle contre-indique formellement le traitement. Il faut donc être vigilant, et toute prescription nécessite un interrogatoire préalable. Les réactions d'hypersensibilité (anaphylaxie) observées peuvent être graves et parfois fatales.

Des diarrhées sévères et persistantes ont été observées avec des manifestations de colite pseudomembraneuse. Cet accident, rare, impose l'arrêt immédiat du traitement et l'administration d'une antibiothérapie appropriée. L'administration de médicaments favorisant la stase fécale doit être absolument prohibée.

L'administration simultanée d'un autre antibiotique dans la même seringue ou la même perfusion est à éviter.

***Précautions d'emploi :**

Il est nécessaire d'adapter la posologie en cas d'insuffisance rénale, en tenant compte de la clairance à la créatinine.

Il est prudent de surveiller la fonction rénale en cours de traitement en cas d'association avec d'autres antibiotiques potentiellement néphrotoxiques en particulier les aminosides ou avec des diurétiques.

L'inocuité du céfotaxime chez la femme enceinte n'a pas été démontrée, il faut donc s'abstenir de le prescrire.

Le céfotaxime passant dans le lait maternel, il est conseillé de suspendre l'allaitement en cas de traitement.

***Interactions médicamenteuses :**

Une positivation du test de Coombs a été rapportée ainsi qu'une réaction faussement positive lors de la recherche du glucose dans les urines.

***Effets secondaires :**

Des manifestations allergiques, digestives, hématologiques, hépatiques et rénales, avec augmentation transitoire des ALAT et ASAT ont été rapportées.

D'autre part, des cas de néphrotoxicité et d'encéphalopathies métaboliques chez les insuffisants rénaux ont été constatés.

1.1.2 Le céfuroxime - Zinnat* (laboratoires Glaxo)

*** Généralités :**

Le céfuroxime est une céphalosporine de deuxième génération, dont la structure est représentée à la figure 2.

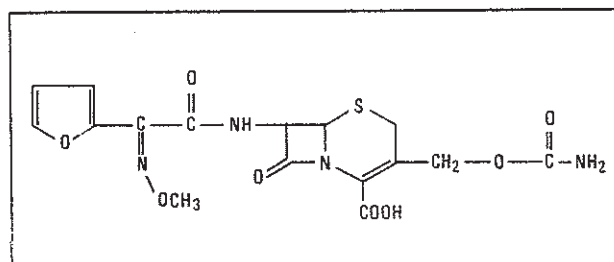


Figure 2 - Formule chimique du céfuroxime (8)

Les premières céphalosporines ont été découvertes en Sardaigne en 1945, quand un professeur de bactériologie, le Professeur Giuseppe Brotzu, réussit à isoler les métabolites de *Céphalosporium Acremonium*, souche mycologique isolée d'égout d'eau de mer. Les céphalosporines actuelles sont toutes issues par hémisynthèse de ces molécules.

En 1988, après plus de 10 ans de recherche dans le domaine des antibiotiques destinés au traitement des infections courantes, les laboratoires Glaxo introduisent, le Zinnat*, composé de sel de sodium de céfuroxime (figure 2).

*** Spectre d'activité :**

Cette nouvelle céphalosporine dispose d'un spectre élargi aux germes résistants sans adjonction d'inhibiteur de bêta-lactamases, comprenant les germes Gram positif et négatif y compris ceux qui sont rencontrés quotidiennement dans les infections ORL et bronchopulmonaires : staphylocoques, streptocoques, pneumocoques, *Haemophilus influenzae* et *Escherichia coli* (tableaux 4 à 6).

GERMES	Nombre de souches	CMI 50 (µg/ml)*	CMI 90 (µg/ml)*
Fusobacterium species	5	0,06	0,5
Clostridium perfringens	19	1	4
Propioni-bacterium species	11	0,125	0,25
Peptococcus species	92	<0,25	4
Peptostreptococcus species	30	0,3	3

Tableau 4 - Activité antibactérienne du Zinnat* vis à vis de germes anaérobies (8)

Souches	Nombre	CMI 50 (µg/ml)	CMI 90 (µg/ml)
Streptococcus pyogenes	200	<0,06	0,1
Streptococcus agalactiae	250	<0,06	0,3
Streptococcus pneumoniae	25	<0,06	0,18
Staphylococcus aureus	699	0,82	1,4
Streptococcus epidermidis	208	0,3	1
Propionibacterium species	33	0,13	0,5
Peptococcus species	92	0,13	4,0
Peptostreptococcus species	31	0,5	4,0

Tableau 5 - Activité antibactérienne du Zinnat* vis à vis des germes à Gram positif (8)

Nbre de souches/ CMI (µg/ml)	ZINNAT*	Pénicilline
0,006	0	0
0,012	189	0
0,030	58	162
0,060	1	75
0,125	0	1
0,250	2	0
0,5	0	0
1	0	2

Tableau 6 - Activité antibactérienne du Zinnat* vis à vis des streptocoques du groupe B (8)

***Pharmacocinétique :**

L'absorption est naturellement immédiate par voie intraveineuse, le pic étant atteint entre 30 et 60 minutes par voie intramusculaire. Des études ont montré que la biodisponibilité du céfuroxime augmentait avec la prise d'un repas.

Les concentrations sériques maximales sont de 30 microgrammes par ml pour 750 mg (dose adulte) en IM et de 53 à 73 microgrammes par ml pour 750 mg en IV. La demi-vie d'élimination est de 65 à 83 minutes en IM et de 62 à 66 minutes en IV chez l'adulte. Chez l'enfant de plus de trois semaines la demi-vie est comparable, avec 64 minutes en IM et 60 en IV, mais par contre, la demi-vie est très allongée chez l'enfant de moins de 3 semaines (figure 3).

Une forme galénique comprimé existe également, mais elle contient la forme axétile du céfuroxime, c'est à dire une forme estérifiée. L'existence de ces deux dosages permet une administration plus facile du céfotaxime. L'absorption se produit après l'hydrolyse intestinale de l'ester. Le pic plasmatique est observé 2 à 3 heures après la prise du médicament lorsque celui-ci est donné après un repas.

Les concentrations sériques obtenues sont alors de 4 à 6 mg par litre pour une dose de 250 mg et de 7 à 9 mg pour une dose de 500 mg. La demi-vie est de 1,2 heures.

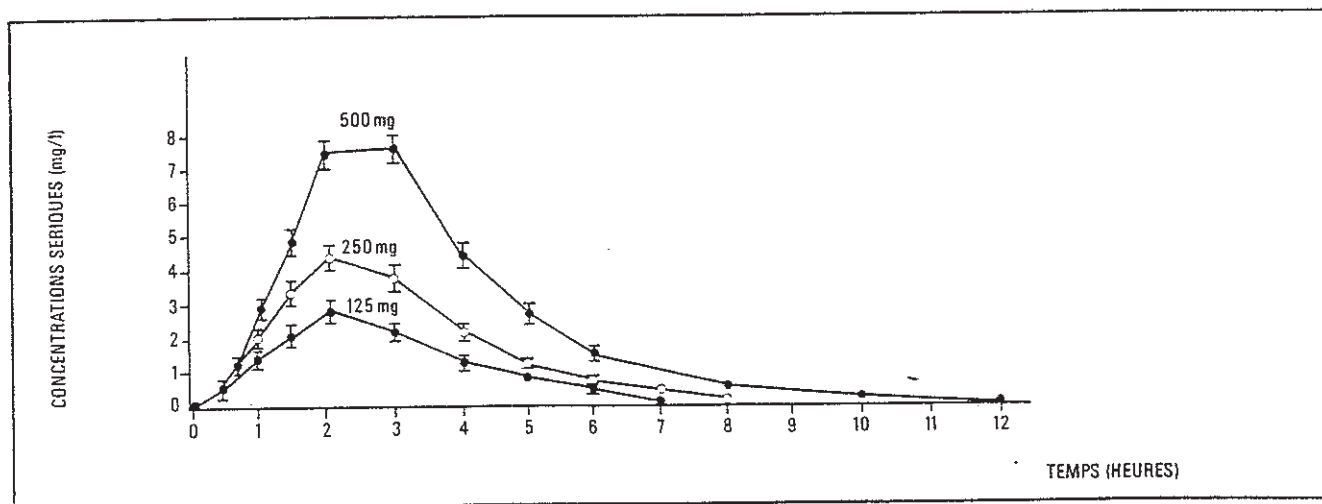


Figure 3 - Evolution des concentrations plasmatiques de céfuroxime après absorption orale (8)

La distribution tissulaire est large, en particulier dans la bile, les sécrétions bronchiques, les tissus osseux, articulaires et cardiaques, les yeux, les tissus interstitiels et la peau.

Cette molécule traverse également la barrière placentaire mais la barrière hémotoplacentaire seulement en cas d'inflammation (tableau 7) .

La liaison aux protéines plasmatiques est faible, environ 33%. Le céfuroxime n'est pas métabolisé dans l'organisme. Il est excrété tel quel par le rein, avec des concentrations urinaires élevées, avec un pic dans les deux heures de l'ordre de 4000 à 7000 microgrammes par ml pour 750 mg.

ORGANES ET LIQUIDES	CONCENTRATIONS OBTENUES	TEMPS	METHODOLOGIE
APPAREIL RESPIRATOIRE - Parenchyme pulmonaire - Sécrétions bronchiques - Liquide pleural	17 - 43 µg/g 3 - 5 µg/ml 6 µg/ml	0,5 h 1 h	- Pharmacologie animale (1) - Pharmacologie humaine (2) - Pharmacologie humaine (3)
ORL - Amygdales - Sinus	17,98 µg/ml 22,74 µg/ml	2 h 1 h	- Pharmacologie humaine (3) - Pharmacologie humaine (3)
SPHERE GENITO-URINAIRE - Utérus - Prostate - Urines	25 - 30 µg/ml 7000 µg/ml	30-46 min 2 h	- Pharmacologie humaine (3) - Pharmacologie humaine (3)
TISSU OSSEUX - Tête fémorale	12 - 32 µg/ml	2 - 4 h	- Pharmacologie humaine (3)

Tableau 7 - Distribution et concentrations tissulaires du céfuroxime (8)

***Indications :**

Le céfuroxime est utilisé notamment dans les infections de la sphère ORL : angines bactériennes, otites, sinusites, pharyngites, les infections des voies respiratoires inférieures, bronchites aiguës et chroniques et pneumopathies bactériennes.

***Contre indications :**

L'allergie aux céphalosporines contre-indique formellement le traitement. Il existe des allergies aux céphalosporines, croisées avec les pénicillines. Les réactions d'hypersensibilité peuvent être graves et parfois fatales.

***Précautions d'emploi :**

Il est nécessaire d'adapter la posologie, en cas d'insuffisance rénale. L'inocuité du céfuroxime, chez la femme enceinte n'a pas été démontrée, il faut donc s'abstenir de le prescrire. En l'absence de document sur son passage dans le lait maternel, il est conseillé de suspendre l'allaitement en cas de traitement.

***Interactions médicamenteuses :**

Il a été rapporté une positivité du test de Coombs ainsi qu'une réaction faussement positive lors de la recherche du glucose dans les urines.

***Effets secondaires :**

Le traitement peut occasionner des manifestations digestives, hématologiques, hépatiques et rénales. Chez l'insuffisant rénal, des cas de néphrotoxicité et d'encéphalopathie ont été constatés.

Le céfuroxime se distingue par son activité intrinsèque sur les souches produisant des bêta-lactamases.

Jusqu'ici, il était possible d'augmenter la posologie d'antibiotique, ce qui permettait de conserver en partie son efficacité, suivant l'importance de la colonisation bactérienne, c'est à dire l'effet inoculum (figure 6). Il était également envisageable d'utiliser un inhibiteur des bêta-lactamases comme l'acide clavulanique.

Cette molécule présente en effet deux spécificités chimiques : un radical méthoxime, qui empêche les bêta-lactamases d'atteindre leur site d'action (figure 4) et un noyau furyl, qui contribue de manière importante au renforcement de l'activité antibactérienne vis à vis des germes Gram négatif, fréquents dans les infections ORL et bronchopulmonaires.

Le passage du céfuroxime à travers la paroi bactérienne est représenté à la figure 5.

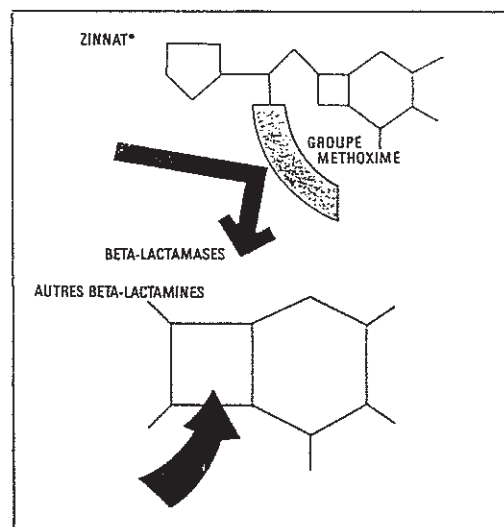


Figure 4 - Résistance aux bêta-lactamases du céfuroxime (8)

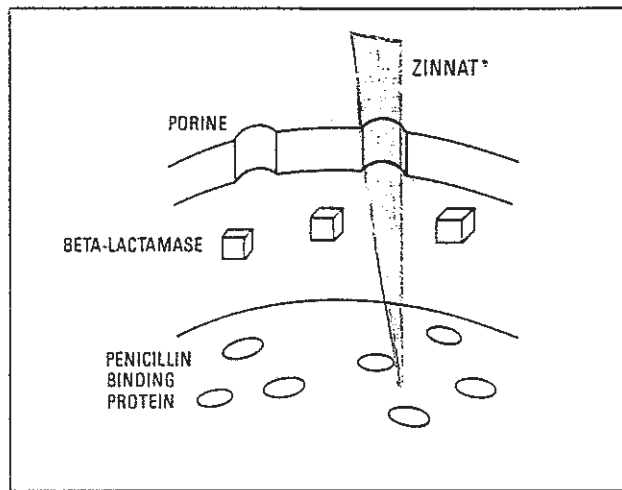


Figure 5 - Pénétration du céfuroxime dans la paroi bactérienne (8)

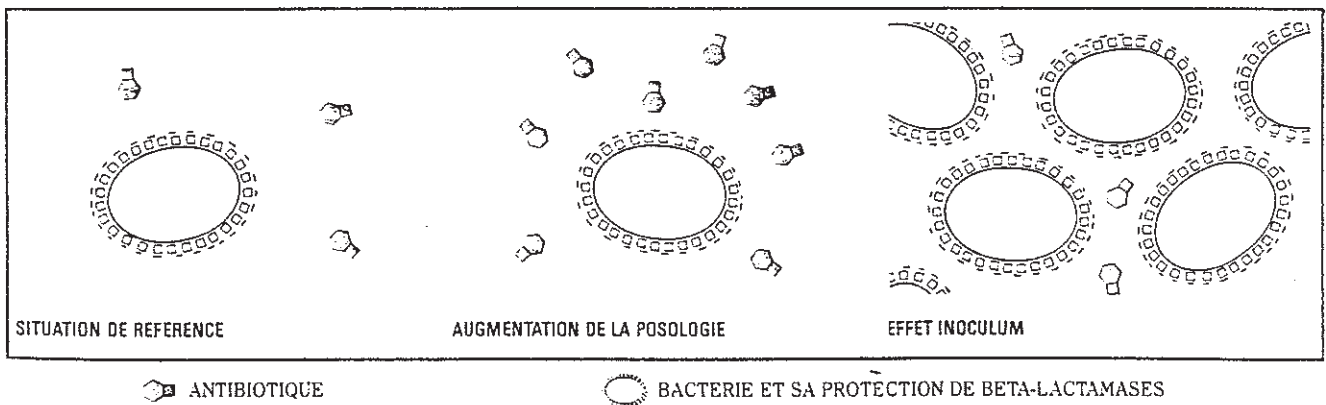


Figure 6 - Effet inoculum (8)

1.2 Les différentes méthodes de stérilisation

1.2.1 Les méthodes non radiostérilisantes

1.2.1.1 Généralités

La stérilisation consiste à mettre en oeuvre un ensemble de méthodes et de moyens visant à éliminer les microorganismes tels que des bactéries, des spores, des champignons, des levures ou des virus, portés par un objet ou contenus dans un liquide, un solide ou un gaz (9).

Cette notion absolue est remplacée au niveau pharmaceutique par une notion d'efficacité, qui tolère une probabilité d'unité souillée dans une population stérile de une sur un million.

Cette notion recoupe des conceptions plus larges de locaux, de maintenance et donc de **Bonnes Pratiques de Fabrication** et de procédures, avec qualification du matériel et validation des cycles de stérilisation. Les principales méthodes utilisées sont la stérilisation par la chaleur sèche, par la chaleur humide, par filtration, par les gaz et par les radiations ionisantes.

1.2.1.2 La stérilisation par la chaleur

*** la chaleur humide :**

Cette méthode consiste à mettre en contact l'objet à stériliser avec de la vapeur d'eau, saturée à une température supérieure à 100°C, et à une pression supérieure à la pression atmosphérique, ceci dans une enceinte fermée, en discontinu par autoclavage, ou en continu (9) .

L'action conjuguée de la chaleur et de l'humidité dénature les protéines microbiennes par hydrolyse partielle des liaisons peptidiques.

Les principaux paramètres intervenant dans un cycle de stérilisation qui doit être validé, sont le temps de stérilisation, la température, la pression et la résistance des germes.

Les contrôles de stérilisation consistent en des enregistrements de ces paramètres pendant le cycle, et à contrôler les indicateurs de passage, la vérification du passage de la vapeur d'eau (test de Bowie-Dick) et un examen des installations afin de qualifier et de valider la stérilisation en suivant les recommandations de la pharmacopée française (10) .

C'est la méthode de référence. Le temps de stérilisation de 15 minutes à 120°, à la surpression de 1 bar, est le plus largement employé.

Elle est peu coûteuse, mais elle ne s'applique qu'aux matériaux et aux médicaments thermostables et elle nécessite un contrôle régulier de l'intégrité de l'autoclave (11) .

***la chaleur sèche :**

Elle consiste à exposer les produits à stériliser à de l'air sec à 160-200 °C à la pression atmosphérique et pendant un temps plus ou moins long, tel que 30 mn à 180°C ou 1h minimum à 170°C dans une enceinte en discontinu, ou dans un tunnel à bande en continu. Les deux paramètres à prendre en compte sont le temps et la température. Les contrôles consistent à vérifier des indicateurs de passage, à un contrôle du temps, de la température et un examen régulier de l'installation afin de qualifier et valider la stérilisation. Cette méthode est moins efficace que la chaleur humide, elle est coûteuse en énergie.

Elle ne s'applique qu'aux produits stables à des températures élevées. Elle est surtout utilisée pour le matériel métallique.

1.2.1.3 La filtration stérilisante

Ce mode de stérilisation est applicable uniquement aux liquides et aux gaz. Il consiste à éliminer les germes au moyen de matériaux filtrants. Il impose de travailler aseptiquement.

Pour cela, un mélange fluide-solide pénètre à travers un matériau poreux qui retient les solides dans sa matrice ou à sa surface (11) .

Dans le cas le plus fréquent des liquides stérilisés, ceux-ci sont répartis aseptiquement dans des conditionnements stériles et utilisés directement sous forme liquide. Ces liquides peuvent aussi être lyophilisés : on obtient alors une forme solide.

La filtration est régie par différents paramètres tels que le gradient de pression, les caractéristiques physicochimiques du liquide, les caractéristiques du filtre, notamment sa capacité de rétention (quantité totale de particules susceptibles d'être retenues par unité de surface) , son efficacité de rétention (pourcentage de rétention de particules d'une taille déterminée) et sa porosité. Cette méthode a l'inconvénient de ne pas éliminer les virus.

Deux types de filtres stérilisants sont utilisés : * les filtres en profondeur. Ils sont constitués d'amas de fibres ou de verres frittés, qui agissent par criblage, adsorption, ou attraction électrostatique

* les filtres membranes en polymères, qui agissent par criblage uniquement. Ils sont en fait, souvent associés dans une combinaison préfiltration-filtration finale.

Les **filtres en profondeur** ont la particularité de retenir certains pyrogènes, mais ils peuvent relarguer des particules. Ils ont une grande capacité de rétention, mais les microorganismes peuvent s'y développer et pénétrer progressivement dans l'épaisseur du filtre. Ils absorbent une quantité importante de solution, ce qui peut être gênant pour les substances très coûteuses. Ils sont stérilisables à la chaleur. Ils peuvent relarguer des fibres et leur intégrité physique n'est pas contrôlable.

Les **filtres membranes** retiennent des particules de diamètre bien défini, supérieur à la taille des pores. Ils agissent par criblage et se colmatent rapidement, en l'absence d'un préfiltre. Ils ont une faible capacité de rétention et ils ne provoquent pas de développement bactérien. Leur diamètre est de 0,22 micromètres pour la filtration stérilisante, ou moins pour retenir les pyrogènes et de 0,45 micromètres pour les contrôles de stérilité. Ils sont stérilisés par la chaleur humide à 121°C.

Cette méthode de stérilisation exige un personnel qualifié et a donc un coût élevé. De plus elle oblige à lyophiliser les solutions filtrées des substances qui ne sont pas stables en solution. Elle est donc réservée aux substances thermolabiles.

1.2.1.4 Stérilisation chimique par les gaz

Ce mode de stérilisation est applicable au matériel dans des conditions définies de température, de durée, d'humidité et de concentration du gaz. Son efficacité est bonne, mais les gaz utilisés sont d'un emploi limité par leur toxicité.

Trois gaz sont actuellement utilisés :

***L'oxyde d'éthylène :**

Cette méthode est intéressante pour le matériel médico-chirurgical thermosensible qui ne supporte pas l'autoclavage (11) .

Elle consiste à mettre en contact les objets ou les substances déjà conditionnés dans des matières plastiques perméables à ce gaz, avec un mélange gazeux contenant de l'oxyde d'éthylène et des gaz inertes tels que les fréons, le CO₂ ou le N₂ dans des enceintes closes, en raison de sa toxicité, dans des conditions de température et d'hygrométrie définies pour un temps donné. En fonction du mélange gazeux utilisé, le cycle de stérilisation s'effectue soit en dépression soit en surpression. Une désorption est alors effectuée par la chaleur ou le vide, mais il reste toujours des résidus qu'il est nécessaire de doser. Son utilisation est délicate car le mélange oxyde d'éthylène-air est explosif à partir de 3%.

Ce gaz est stérilisant, par ses propriétés d'alkylation, en particulier au niveau des fonctions thiols. Il bloque de façon irréversible les réactions enzymatiques, les acides nucléiques et les protéines. Il est très pénétrant.

Son utilisation exige de contrôler de nombreux paramètres : la concentration du gaz, l'humidité relative, la température, la pression, la durée, le temps de désorption. L'oxyde d'éthylène est mélangé avec des mélanges gazeux divers pour son utilisation car il est explosif avec l'air. Des contrôles chimiques sont également nécessaires pour vérifier la bonne pénétration du gaz stérilisant. Des contrôles biologiques sont aussi effectués. La dose résiduelle tolérée après désorption par la Pharmacopée est de 2 ppm (10).

Cette méthode présente de nombreux inconvénients, certaines molécules sont sensibles à l'oxyde d'éthylène.

Elle nécessite un personnel entraîné et expérimenté, des installations spécifiques et une réglementation particulière, car son utilisation est dangereuse et impose des limites d'exposition.

Cette méthode était utilisée fréquemment, en particulier pour les drogues sèches, mais ses inconvénients, notamment en matière de résidus, ont conduit à son interdiction dans de nombreux pays pour les drogues sèches. Elle présente l'avantage de permettre une stérilisation dans le conditionnement définitif avec certains emballages plastiques perméables à ce gaz, à des températures inférieures à 70 ° C.

***Le formol :**

Cette technique utilise de manière synergique les propriétés stérilisantes du formol et de la vapeur d'eau (11) . L'autoclavage à vapeur de formol au cours d'un cycle de stérilisation se déroule à une température comprise entre 50 et 80° C à une certaine pression et à une hygrométrie définie pendant quelques heures. Le formol est éliminé par le vide à la fin de la stérilisation.

Ce gaz est stérilisant par ses propriétés alkylantes sur les acides nucléiques des bactéries. Les paramètres de stérilisation sont la température, la pression, l'hygrométrie, la concentration en formaldéhyde et le temps de contact.

Les contrôles effectués sont la vérification de la bonne pénétration du formol, la mesure des différents paramètres du cycle de stérilisation et le dosage du formol résiduel. La dose maximale de contact est de 2 ppm pour le personnel. Une dose maximale résiduelle de 5 ppm est réglementée. Cette méthode est très efficace mais nécessite une conception coûteuse avec des règles d'hygiène et de sécurité strictes ainsi qu'un personnel expérimenté et qualifié. De plus, elle pose des problèmes de résidus. Elle est récente et encore peu utilisée en France mais elle se développe actuellement (11) .

***L'acide peracétique :**

Ce gaz est parfois utilisé à la place de l'oxyde d'éthylène. Il agit par peroxydation et libération d'oxygène atomique très réactif. Il permet de stériliser le matériel en verre ou en plastique, mais il est corrosif pour les métaux. Il est peu utilisé.

1.2.2 La radiostérilisation

1.2.2.1 Deux types de rayonnement : bêta et gamma

Ici c'est la capacité stérilisante des rayonnements radioactifs bêta et gamma qui est exploitée. Le matériel ou les substances à stériliser sont conditionnés et placés dans le faisceau de radiation (10, 11) .

Deux catégories de rayonnements sont utilisés : les rayons bêta produits par un accélérateur électronique et les rayons gamma produits par une source radioactive, principalement le Cobalt 60.

La stérilisation par les **rayons bêta** est très rapide et moins coûteuse. Le rayonnement s'arrête instantanément mais le faisceau est moins pénétrant.

La stérilisation par les **rayons gamma**, c'est à dire des photons très énergétiques, est plus longue et plus coûteuse, avec une source radioactive permanente, mais ils sont très pénétrants.

Cette méthode se développe actuellement beaucoup, en particulier dans l'industrie agroalimentaire, mais également dans l'industrie pharmaceutique pour stériliser des poudres, du matériel médico-chirurgical en matière plastique et pour diminuer la contamination des drogues sèches. Elle est réservée au matériel thermosensible ou sensible à l'oxyde d'éthylène et aux solides. Par contre, les solutions aqueuses produisent de nombreux radicaux libres très actifs, ce qui altère leur structure moléculaire (12) .

La **législation** est particulièrement rigoureuse, ce qui tend à en limiter son utilisation à l'industrie (11) . Les installations sont soumises à des autorisations, le personnel devant être formé spécifiquement. Au niveau pharmaceutique, les documents de référence sont les codes de l'Agence Internationale de l'Energie Atomique, et les différentes pharmacopées, notamment anglaise et française (14, 15, 16) mais de nombreuses organisations telles l'OMS, l'OCDE, l'EURATOM, l' ISO (42), l'AIER et la CIPA sont concernées par ce sujet.

La Pharmacopée française (10) indique des précisions sur la contamination initiale qui doit être étudiée quantitativement et qualitativement en déterminant la contamination maximale tolérable Elle notifie également la conduite de l'irradiation en recommandant l'utilisation de dosimètres. Ils sont disposés sur chaque lot pour les électrons accélérés et sur les 5 premiers et les 5 derniers lots et toutes les 10 unités de conditionnement pour les sources radioactives. Pour les sources électroniques, elle demande de vérifier qu'aucune radioactivité n'est induite et pour les sources radioactives de mesurer avec précision le temps d'irradiation.

Des contrôles microbiologiques d'efficacité doivent également être réalisés. La conservation (date de péremption de 2 ans après irradiation) et l'étiquetage qui doit notamment comporter le nom de l'établissement d'irradiation ainsi que la dose minimale de rayonnement absorbée, sont également étudiés. Ces contrôles à effectuer restent assez simples.

Une **dose d'irradiation** de 25 kGy est souvent admise, mais elle n'est pas obligatoire. Il n'existe pas encore de consensus sur ce sujet. Des modifications physicochimiques sont parfois constatées au niveau des polymères, des verres de conditionnement et des principes actifs. Ces altérations augmentent avec la dose d'irradiation utilisée.

Ceci tend à limiter cette dose au minimum nécessaire à la stérilité, avec une marge de sécurité, ce qui impose la limitation du nombre de germes de départ (15) . L'utilisation de la dose recommandée de 25 kGy est un frein pour le développement de la radiostérilisation gamma ; il serait nécessaire d'envisager une méthodologie permettant de valider des doses de rayonnement inférieures, ce qui permettrait de réduire simultanément les coûts et l'altération des matières exposées (16, 17) . La tendance actuelle est d'étendre l'utilisation de la dose de 11 kGy autorisée pour les aliments à la stérilisation des médicaments. De nombreuses recherches sont à l'étude.

Ces méthodes sont en pleine expansion depuis l'utilisation des sources de **Cobalt 60**, l'apparition de nombreux polymères radiostables, et avec les contraintes pesant sur les résidus d'oxyde d'éthylène, comme en témoigne l'apparition de législations sur ce sujet.

De nombreux avantages existent : le rayonnement gamma permet une stérilisation à température ambiante, par voie sèche, sans traitement chimique, à travers l'emballage, avec la vérification d'un seul paramètre, le temps d'irradiation, et une simple dosimétrie de routine. Son efficacité est grande, elle exige peu d'énergie, et offre de nombreuses applications. Les conclusions du comité mixte AIEA - FAO - OMS prouvent la salubrité des produits ionisés.

Cependant, des inconvénients existent : il nécessite un matériel coûteux exigeant un personnel qualifié et des autorisations d'utilisation, ce qui conduit souvent à sous-traiter la radiostérilisation en faisant appel à un façonnier. Des altérations du principe actif, des excipients ou du conditionnement apparaissent parfois. Néanmoins aucune preuve d'effets résultant de l'ionisation n'a été démontrée par les études toxicologiques.

Les autres méthodes de stérilisation dégradent également les principes actifs : il est prouvé que la gélatine et la papaïne sont moins dégradées par cette méthode de stérilisation que par les méthodes utilisant la chaleur (19).

La nécessité de mener des études préalables longues, l'absence de standards officiels posent également des problèmes. Par ailleurs le refus psychologique est possible : le public associant la radiostérilisation au nucléaire, bien qu'aucune radioactivité ne soit induite. Les pyrogènes ne sont pas détruits par cette méthode ce qui exige de travailler sur un matériel peu souillé.

Les applications des principales méthodes de stérilisation sont repris dans le tableau 8.

Chaleur humide	Filtration	Oxyde d'éthylène	Rayons gamma
Solutions thermostables Poudres thermostables Métal Verrerie	Solutions hydrophiles thermosensibles Poudres thermosensibles à dissoudre puis à lyophiliser (Claforan*)	Matériel médico-chirurgical en plastique ou en caoutchouc Enceintes Médicaments avec un conditionnement plastique	Matériel médico-chirurgical Tout médicament dans son conditionnement avec un principe actif solide

Tableau 8 - Applications des différentes méthodes de stérilisation

La radiostérilisation gamma étant la plus largement utilisée, nous n'étudierons plus la stérilisation par les faisceaux d'électrons à partir de ce stade.

1.2.2 2 Principe de la radiostérilisation gamma

Les rayons gamma sont des radiations ionisantes, c'est à dire qu'ils possèdent suffisamment d'énergie pour qu'au moment de la collision avec la matière, un électron soit éjecté, provoquant la formation de radicaux libres ou la rupture des liaisons chimiques.

***Mode d'action :**

L'énergie des photons produits dépassant 4 à 10 Mev, l'effet Compton prédomine : le photon est alors considéré comme présentant les propriétés d'une particule.

Seule une partie de son énergie est communiquée à un électron chassé de son orbitale, alors que le photon diffusé conserve l'énergie résiduelle c'est à dire que l'énergie est insuffisante pour produire des paires électron-positon.

Le mécanisme d'action comprend quatre phases :

- * une **phase physique**, où le rayonnement interagit avec les atomes et les molécules provoquant des excitations et des ionisations

- * une **phase chimique** avec la formation de radicaux libres, et la dégradation éventuelle d'autres molécules

- * une **phase biochimique** avec la modification des molécules biologiques tels que les acides nucléiques

- * une **phase biologique** plus ou moins rapide.

* **Action sur les liquides :**

Les dérivés oxygénés comme l'eau, dont les rayons provoquent la radiolyse, sont extrêmement réactifs.

Ces radicaux libres ont une durée de vie très courte, et se recombinent très rapidement, en provoquant la dégradation des molécules présentes en **solution**.

Des études sur la stabilité des solutions ont montré qu'elle augmente avec les basses températures, et diminue avec la présence d'oxygène. La radiostérilisation des solutions est donc à proscrire (16).

* **Action sur les solides :**

Ils sont généralement plus stables vis à vis des rayonnements, lesquels n'interagissent qu'avec la molécule à stériliser. Les radicaux libres obtenus peuvent même avoir des durées de vie longues de l'ordre de quelques heures à quelques années. Les phénomènes permettant cette stabilité sont mal connus, mais ils dépendent de la température et de l'environnement chimique (20) .

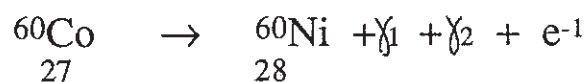
Cette méthode est donc envisageable pour les **solides**.

De nombreuses études fondamentales seront nécessaires pour maîtriser la chimie radicalaire, en particulier la dégradation des principes actifs (16) .

*Sources de rayonnements gamma

Le cobalt 60 est aujourd'hui le corps radioactif le plus utilisé pour produire industriellement le rayonnement gamma au détriment du Césium 137.

Il se transforme spontanément en nickel non radioactif pour revenir à son état stable, suivant l'équation suivante.



Sa demie-vie est de 5,27 années, l'énergie de l'électron est de 0,319 keV, celle du premier photon de 1,332 keV, et celle du second de 1,173 keV.

Nous ne considérons que le rayonnement électromagnétique produit, c'est à dire les deux photons très énergétiques de longueur d'onde telle, qu'ils rentrent dans la catégorie des rayons gamma (figure 7).

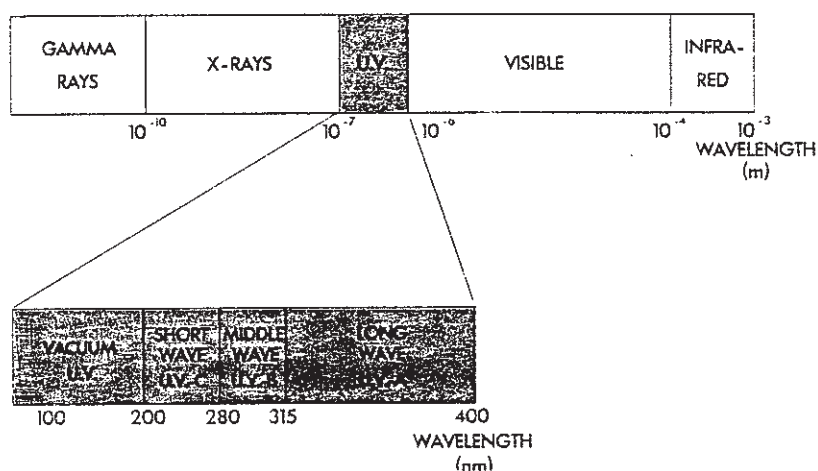


Figure 7 - Les différentes ondes électromagnétiques en fonction de leur longueur d'onde

***Aspect énergétique**

Le calcul de l'énergie E des photons est repris dans la formule suivante.

$$E = \frac{h \cdot c}{\lambda}$$

avec E, l'énergie en Joule, c, la vitesse de la lumière soit $3 \cdot 10^8 \text{ m.s}^{-1}$, λ la longueur d'onde en mètre et h la constante de Planck.

La quantité d'énergie qu'ils déposent par unité de masse définit la **dose** et s'exprime en Gray, ou en **kiloGray**. Dix kiloGrays correspondent à 1 **Mégarad**, ou à 10 kiloJoules d'énergie absorbée par kilogramme de matière.

L'irradiation est donc quantifiée par la mesure de la dose d'énergie absorbée.

Ce rayonnement n'affecte pas le noyau. L'irradiation n'est donc pas un phénomène nucléaire et n'induit aucune radioactivité.

***Action stérilisante**

L'effet stérilisant repose sur la **sensibilité de l'ADN** des microorganismes qui contaminent le produit. Les lésions que le rayonnement gamma induit sont principalement des dimérisations des bases azotées, des modifications de liaisons du squelette sucre-phosphate par la production de radicaux libres et la rupture des liaisons hydrogène et des ponts disulfure. Les métabolismes et la multiplication des microorganismes sont ainsi inactivés. En résumé ce rayonnement provoque l'inhibition de la réplication de l'ADN, la destruction des protéines membranaires et l'arrêt de la synthèse des protéines.

Les microorganismes étant génétiquement plus ou moins bien "outillés" pour réparer ces lésions, la sensibilité et les courbes d'inactivation varient.

La sensibilité des microorganismes est indépendante du débit de dose. Les autres molécules sont nettement moins sensibles que l'ADN.

***Sensibilité des microorganismes**

L'étude de l'efficacité de la radiostérilisation est réalisée en traçant les courbes d'inactivation des populations bactériennes.

Un exemple de courbe est représenté à la figure 8. Il est alors possible de déterminer la dose diminuant d'un facteur 10 cette population, D10, comme le tableau 9 le montre.

En général, la courbe du logarithme de la population bactérienne par rapport à la dose d'irradiation est linéaire, c'est à dire exponentielle sans le logarithme, mais il y a parfois un épaulement. Cela n'est pas sans rappeler les courbes d'inactivation par la chaleur. L'atmosphère, en particulier la concentration en oxygène, la température et l'hygrométrie peuvent modifier les courbes d'irradiation, ce qui oblige à travailler en atmosphère contrôlée.

Il paraît essentiel de connaître la contamination initiale et les populations bactériennes envisagées, pour déterminer la dose nécessaire et obtenir la stérilité avec une garantie de sécurité.

La stérilisation peut être contrôlée par une recherche bactériologique, après contamination volontaire d'un échantillon avec des germes de référence, notamment *Bacillus prumilus* (épreuve du tout ou rien : aucune spore irradiée n'est viable) et *Bacillus sphaericus* (détermination du facteur d'inactivation, c'est à dire le rapport entre le nombre de spores vivantes avant irradiation et le nombre de spores vivantes après irradiation, il doit être de 10^3 environ) .

Les virus sont plus résistants que les levures, elles mêmes plus résistantes que les bactéries.

Microorganisme	Forme de la courbe d'inactivation	Dose de réduction décimale (kGy)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Exponentielle	0,02
<i>Staphylococcus aureus</i>	Exponentielle	0,10
<i>Streptococcus faecium</i>	Epaulement	0,5
<i>Bacillus pumilus</i> spores	Exponentielle	1,7
<i>Bacillus sphaericus</i>	Exponentielle	4,6

Tableau 9 - Dose de réduction décimale en kGy de différentes bactéries (12)

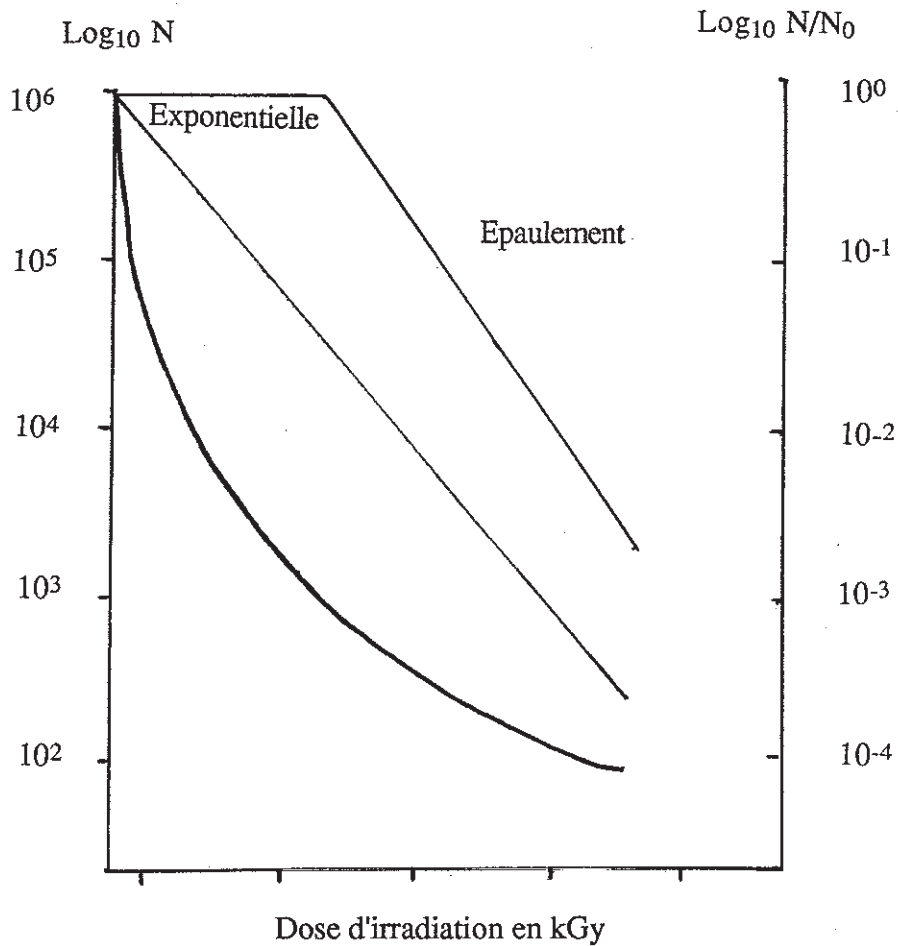


Figure 8 - Effectif des populations bactériennes en fonction de la dose d'irradiation (20)

***Sensibilité de la matière**

Certaines matières subissent des modifications de structure (réticulation, dégradation) avec des modifications mécaniques (souplesse, résistance à la traction), de couleur, d'odeur ou de pureté. Cet effet est dose dépendant, d'où l'intérêt de réduire la dose d'irradiation au minimum nécessaire.

Une dose inférieure à 25 kGy apparaît souvent suffisante en limitant la contamination initiale lors des mises au point des procédés de validation de la stérilisation.

Les effets du rayonnement gamma sont aussi applicables aux matériaux de conditionnement.

Des matériaux radiorésistants existent aujourd'hui (tableaux 10 et 11).

Pour le verre, il est nécessaire d'inclure des sels de Césium dans sa formule (Saint-Gobain Desjonquière) pour qu'il ne brunisse pas. La structure électronique de la structure amorphe est alors modifiée.

Pour le caoutchouc, les formes butylées sont stables à 25 kGy.

Nature du polymère	Stabilité	Remarque
* <u>Elastomères</u> :		
Caoutchouc de polyuréthane	+++	Elastomère le plus stable
EPDM	+++	
Néoprène	++	Plastifiants arom. >
Caoutchouc naturel	++	
Silicones	++	Phényl-méthyl > méthyl
Butyl caoutchouc	0	
Polyacryliques	0	
PE chlorosulfoné	0	
* <u>Thermoplastiques</u> :		
Polystyrène	+++	Plastique le plus stable
Polysulfone	+++	
Polyéthylène (HD et BD)	++	Réticulation
Polyamides	++	Durcit à fortes doses
ABS	++	
SAN	++	
PVDC	+	
PVC	+	Brunit si pas stabilisé

Tableau 10 - Exemple 1 de matériaux radiostables (12)

Nature du polymère	Stabilité	Remarque
Polycarbonate	+	Cassant à forte dose
Acétate de cellulose	+	
Nitrate de cellulose	0	
Polypropylène	0	Devient cassant stocké air
Polytétrafluoroéthylène	0	Dégagement gazeux
Polyacétals	00	Propriétés méca. altérées
* <u>Résines</u> :		
Polyimides	+++	
Polyuréthane	+++	Peut s'assombrir
Epoxy	++	
Phénoliques	++	
Polyesters	++	
* <u>Non tissés/tissés</u> :		
Dacron (marque déposée)	+++	
Nomex (marque déposée)	+++	
Tyvek (marque déposée)	+++	
Nylon	++	
Viscose	+	

Tableau 11 - Exemple 2 de matériaux radiostables (12)

*Technologie

Les installations de traitement nécessitent un investissement important, et seuls quelques grands utilisateurs pharmaceutiques en sont équipés, la grande majorité faisant appel à des façonniers.

Une casemate avec des murs de béton-armé de 2 mètres d'épaisseur abrite la source de rayonnement. Pour pouvoir entrer dans la casemate, la source de Cobalt 60 doit plonger au fond d'un bassin rempli d'eau protégeant du rayonnement émis en permanence.

Le temps de traitement est long (quelques heures). Il est proportionnel à la dose d'irradiation si la décroissance radioactive est négligée. Généralement un programme informatique réajuste en permanence la dose émise par la source, qui décroît de 1 % environ chaque mois.

Trois installations existent actuellement en France :

*Gammaster (Marseille)

*Conservatome

*ORIS

Les installations ont beaucoup évolué depuis trente ans :

1/ leur taille s'accroît pour permettre des économies d'échelle.

2/ les convoyeurs permettent le traitement de palettes complètes, ce qui diminue les coûts et les dommages dûs à la manutention, et augmente la sécurité humaine.

3/ l'informatique et l'automatisation ont bouleversé les modes d'exploitation.

4/ les systèmes de sécurité sont devenus extrêmement sophistiqués et permettent de répondre à une réglementation exigeante.

Un modèle d'installation industrielle d'irradiateur est représenté aux figures 9 et 10 (gammaster Provence s.a.) .

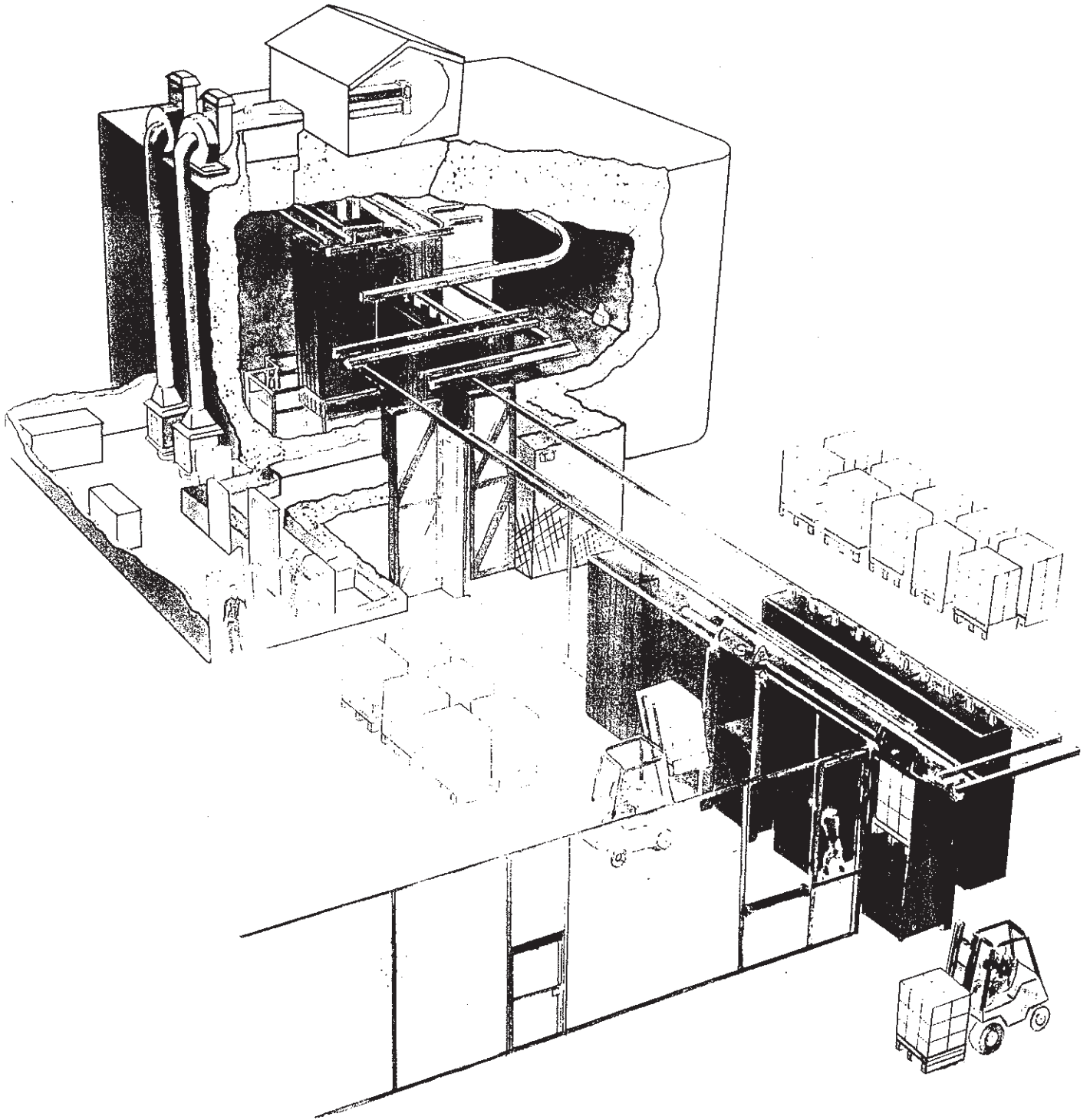


Figure 9 - Un irradiateur gamma industriel (18)

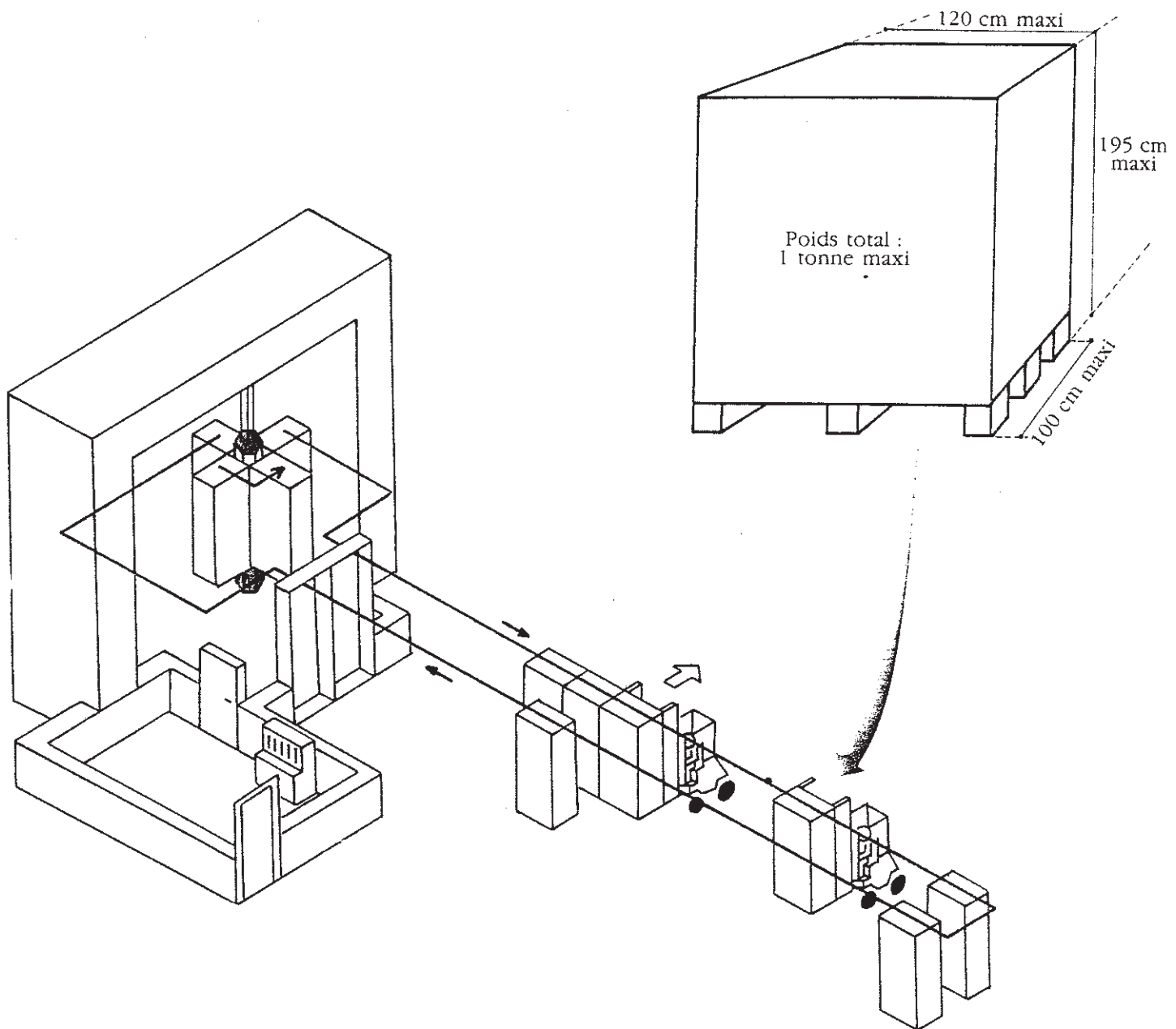


Figure 10 - Schéma du circuit d'irradiation d'une palette industrielle (18)

***Dosimétrie**

La reproductibilité de la radiostérilisation est excellente car seul le paramètre temporel intervient.

En fait, trois paramètres sont importants :

*la **dose stérilisante**, qui correspond à une valeur définie en fonction des études préalables et de la contamination initiale, vérifiée en permanence,

*la **dose absorbée**, vérifiée à chaque irradiation par des dosimètres,

*la **durée d'exposition**, dont la valeur est calculée pour que la dose absorbée corresponde à la dose stérilisante.

Une cartographie dosimétrique permet de définir les points où se trouvent la dose minimale et la dose maximale ainsi que le temps d'irradiation nécessaire pour l'assemblage considéré.

La dose est vérifiée à posteriori en plaçant des dosimètres en certains points particuliers : ils subissent des transformations chimiques comme la méthode de Fricke (oxydation des ions Fe^{++} en Fe^{+++} , délicate à mettre en oeuvre dans un contrôle continu) ou des modifications physiques comme des plaquettes en polyméthacrylate de méthyle (PMMA) , sensibles au rayonnement. L'absorbance à certaines longueurs d'onde du PMMA est mesurée au spectrophotomètre (méthode la plus utilisée en routine) : la dose absorbée se déduit simplement de la variation de densité optique, après étalonnage (49) .

Une dosimétrie par résonance magnétique paramagnétique est également envisageable (21) .

***Applications**

Quatre pays dominent la recherche et les applications en matière de radiostérilisation gamma, les USA, le Royaume uni, l'Allemagne et la France, toujours en pointe dans les recherches sur la radioactivité.

Après les premières applications sur des pommades ophtalmiques en 1955, la radiostérilisation gamma représente aujourd'hui une méthode de choix, en particulier pour le matériel médico-chirurgical, et pour les matières premières solides (20 ,22, 23) . Des études ont ainsi été réalisées sur de la carboxy-méthyl-cellulose, de l'amidon, de la cellulose microcristalline et du lactose (24, 25) .

Elle est également utilisée pour des médicaments conditionnés, tels que des antibiotiques et des protéines (tableaux 12, 13 et 14).

Mais la sensibilité des molécules stérilisées à la dose recommandée de 25 kGy et le manque de données pharmacotoxicologiques sur les composés secondaires formés en limitent l'utilisation (25).

Cette dose de 25 kGy n'est pas obligatoire et il apparaît qu'une dose souvent inférieure peut suffire, à condition qu'une étude préalable prouve la stérilité obtenue expérimentalement. La responsabilité incombe alors au fabricant.

De nombreuses études sur ce sujet sont aujourd'hui réalisées.

Champs opératoires Casaque et masques de chirurgiens Hémodialyseurs Connecteurs Gants de chirurgiens Pipettes Electrodes Prothèses et implants Cathéters Couvertures pour brûlés Collecteurs (urine, colostomie) Dispositifs intra-utérins	Seringues Aiguilles hypodermiques Poches Canules Pansements cornéens Récipients à prélèvement Ecouvillons Abaisse-langues Articles de salle blanche Oxygénateurs Pansements cornéens Matériel de pansement
---	---

Tableau 12 - Matériel médico-chirurgical radiostérilisé (12)

<u>Matières premières :</u> Enzymes Extraits de glandes animales Plantes médicinales (poudres et extraits) Gommés Talc, kaolin Collagène Minéraux et vitamines Lactoprotéines	<u>Produits élaborés :</u> Anticorps monoclonaux Peptides Antibiotiques Onguents ophtalmiques
	<u>Articles de conditionnement :</u> Flacons Bouchons, bague, opercules, capsules Valves d'aérosol Gélules dures et molles Tubes métallo-plastiques

Tableau 13 - Produits radiostérilisés utilisés en pharmacie (12)

EUROPE :

- Debrisan
- Decapeptyl
- Tetracyclin (injectable powder -IV ou IM)
- Eye ointment with neomycin
- Eye ointment with corticosteroids
- Eye ointment with chloramphenicol
- Burn patches with chlorhexidin
- Saline aerosols for contact lenses
(Veterinary products)

U.S.A. :

- Injectable antibiotics
- Eye drops
- Ophtalmic ointments
- Herbal teas
(Veterinary products)

AUTRES PAYS

- Gaviscon
- Catalin sodium tablets
- Eye ointments with tetracyclin

Tableau 14 - Formes pharmaceutiques radiostérilisées (12)

La radiostérilisation gamma est également largement utilisée dans la décontamination des drogues sèches, des aromates et des épices (18). Des études sur les huiles essentielles et les principes actifs de ces drogues ont montré des pertes négligeables. La dose la plus couramment employée est de 11 kGy.

Une réglementation particulière existe en France, et dans de nombreux pays, à l'exception de l'Allemagne, qui permet l'irradiation jusqu'à 11 kGy d'épices, d'aromates et de drogues sèches d'une liste limitative.

Des applications moins courantes existent aussi telles que la conservation d'objets anciens, en particulier en bois, la désinfection de matériel horticole ou la réticulation des polymères.

1.3 Les radicaux libres

1.3.1 Définition

Un radical libre est une espèce chimique (molécule ou atome) neutre ou chargée, dont la couche périphérique contient un électron non couplé dit célibataire (27). Cet électron célibataire lui confère une extrême réactivité visant à s'associer dans un doublet électronique. Pour retrouver la stabilité, les radicaux libres tendent à ne plus avoir d'électron célibataire dans leur cortège électronique. Ce résultat peut être atteint :

- * soit par perte d'un électron : le radical est alors réducteur comme RCOO^\bullet
- * soit par gain d'un électron : le radical est alors oxydant comme OH^\bullet

Il est à noter que certains radicaux libres peuvent aussi bien avoir un comportement réducteur qu'un comportement oxydant et ceci en fonction du composé avec lequel ils sont en présence. Si on prend l'exemple de l'anion superoxyde (28) :

- en présence d'ions cuivriques, il aura un comportement réducteur,



- en présence d'ions ferreux, il aura un comportement oxydant,



La notation d'un radical libre se fait par convention, par un point à côté du symbole chimique. En effet un doublet électronique est plus stable que deux électrons isolés car l'appariement de deux électrons de spin opposé permet l'annulation de leur champ magnétique réciproque. Un radical libre peut naître de tout atome ou molécule par gain d'un électron générant un radical négativement chargé, ou perte d'un de ses électrons avec création d'un radical à charge positive. Une molécule peut également générer des radicaux libres à l'occasion de sa dissociation par scission homolytique d'une liaison covalente.

Le radical produit va alors interagir avec son environnement pour générer de nouveaux radicaux, qui vont eux même réagir sur leur entourage, induisant une réaction en chaîne. Différentes terminaisons sont possibles pour ces réactions en chaîne :

- *le radical peut se réappairier avec un autre radical, donnant une molécule stable
- *il peut aussi réagir avec un piègeur de radicaux libres.

Les liaisons insaturées contribuent à stabiliser l'électron célibataire des radicaux libres. Les radicaux libres sont oxydants ou réducteurs suivant leur nature, parfois même les deux, entre autre lors des réactions de dismutation. La cinétique de leurs réactions est très rapide, de l'ordre de 10^{-4} s. Leur électron célibataire favorise le rapprochement avec les autres molécules lors des collisions intermoléculaires, car la répulsion coulombienne intervenant sur les couches périphériques est plus faible. Les radicaux libres sont notamment produits par les rayonnements UV, gamma, X, par la chaleur ou le broyage mais aussi au cours de divers processus biologiques.

Les "spin-trap" sont des molécules capteurs de radicaux libres, qui les transforment en spin-adduct, c'est à dire en formes radicalaires stables. Les radicaux libres primaires ou les radicaux secondaires, stabilisés par "spin-trapping" sont détectés directement par résonance paramagnétique électronique (RPE) , ou indirectement par la mesure de leurs dérivés secondaires par différentes méthodes d'analyses physiques, chimiques ou biologiques.

1.3.2 Les radicaux libres oxygénés

Les formes chimiques des radicaux libres sont nombreuses, mais ce sont les radicaux libres oxygénés qui sont les plus importants et les plus toxiques. L'oxygène est un élément indispensable à la vie terrestre aérobie et il se trouve partout en grande quantité. Cet élément est à l'origine de la formation de radicaux libres au cours du métabolisme cellulaire. Cette formation de radicaux libres oxygénés est physiologique, mais ceux-ci peuvent s'avérer toxiques (28) .

Les principaux radicaux libres oxygénés sont l'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$, le radical neutre hydroxyle OH^\bullet , les radicaux alcoyles RO^\bullet et peroxydes ROO^\bullet (29).

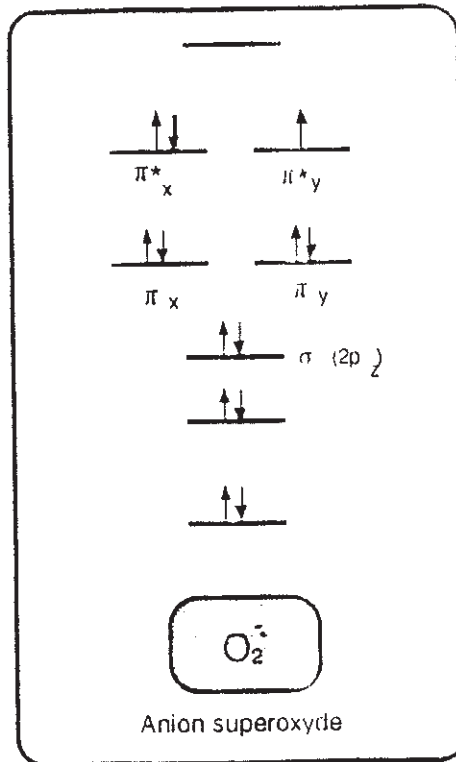
***le radical superoxyde :**

Il est le produit de la réduction monovalente de l'oxygène moléculaire. Par acquisition d'un électron célibataire et moyennant un apport d'énergie, la molécule d' O_2 se transforme en anion superoxyde.



La figure 11 montre la structure des orbitales moléculaires de ce radical. Il peut être obtenu électrochimiquement en milieu aprotique (diméthylsulfoxyde). L'électrolyse de l'oxygène à pH contrôlé fournit des solutions très pures de ce radical. Il peut également être obtenu par voie biologique en particulier par la réduction de O_2 par le système xanthine-xanthine oxydase ou encore par les flavines réduites (figure 12).

Des herbicides, comme le Paraquat* peuvent également fournir des radicaux superoxydes. De même, certains médicaments à structure quinoniques tels l'adriamycine ou la daunomycine fournissent des radicaux superoxydes ce qui expliquerait leur activité antitumorale.



Ordo de liaison : 1,5

Longueur de liaison = 1,33 Å

$\nu(\text{O-O}) = 1145 \text{ cm}^{-1}$

Figure 11 - Les orbitales moléculaires de l'anion superoxyde (30)

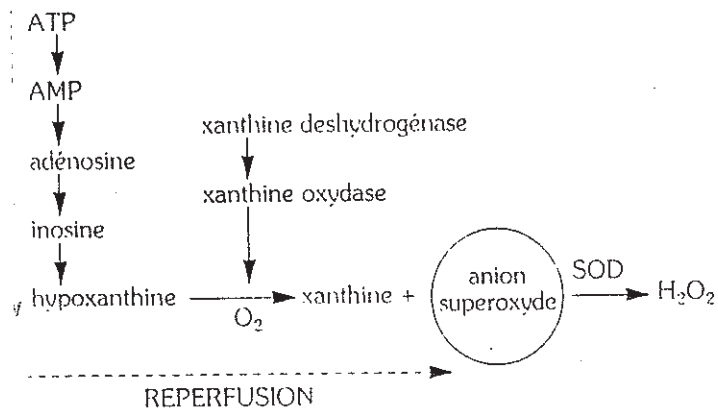


Figure 12 - Exemple de production biochimique de l'anion superoxyde (29)

Un certain nombre de composés désactive l'anion superoxyde en le piégeant, comme le β -carotène et certaines amines tertiaires. Les capteurs les plus spécifiques sont les anthracènes et le cholestérol, qui donnent un 5-hydroperoxyde. En milieu acide, ce radical donne une réaction de dismutation en formant du peroxyde d'hydrogène et de l'oxygène diatomique.

* Le radical hydroxyle :

Il est paramagnétique et son spectre peut être obtenu dans la glace. Un de ses meilleurs "spin-trap" (piégeur de radicaux libres) est la 5,5'-diméthyl 1-pyrroline N-oxyde (DMPO).

Il peut être formé par l'irradiation hautement énergétique de l'eau mais aussi chimiquement par le rayonnement UV d'une solution de peroxyde d'hydrogène ou par réaction catalytique avec un complexe de fer(2) dans la **réaction de Fenton**, de Cu(1) ou de Ti(3).



Réaction de Fenton

De nombreux polluants induisent la formation du radical hydroxyle : Paraquat*, amiante, CCl_4 .

Il peut être aussi formé par la **réaction d'Haber-Weiss**, à partir de l'anion superoxyde selon la réaction suivante.



Réaction d'Haber-Weiss

Il s'agit d'une des espèces chimiques les plus réactives connues, car il est extrêmement instable. En milieu biologique, il réagit sur son site de formation en attaquant les lipides, les protéines et l'ADN en causant de nombreux dommages.

1.3.3 La biologie des radicaux libres

Le métabolisme normal de l'oxygène dans l'organisme se fait vers la production d'eau après une réduction tétravalente, l'oxygène jouant le rôle d'accepteur d'électrons. Les radicaux libres constituent les déchets de la respiration cellulaire lors de production d'ATP. Cette réaction est gérée par les enzymes de la voie des cytochromes oxydases au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale. Si la réduction tétravalente génère directement de l'eau à partir de l'oxygène, les réductions mono, di, et trivalentes donnent respectivement naissance à l'anion superoxyde, au peroxyde d'hydrogène et au radical hydroxyle.

Dans les conditions normales, l'organisme dégrade 95% de l'oxygène par réduction tétravalente au niveau des mitochondries par la chaîne des enzymes respiratoires. Les 5% restant produisent des radicaux libres. Cette création de radicaux libres est donc physiologique.

Mais l'anoxie bloque le transfert des électrons au niveau de la cytochrome oxydase, ce qui empêche la réduction tétravalente de l'oxygène.

La réoxygénation provoque alors la formation de radicaux libres. Ceux-ci sont également formés par les macrophages et les polynucléaires pour détruire les microorganismes, lors de l'anabolisme des prostaglandines, par l'action des rayonnements ionisants sur l'organisme et par le métabolisme de détoxification

(peroxyzome, cytochrome P450). Par contre, l'augmentation des quantités de radicaux libres formés, provoque le dépassement des mécanismes de protection physiologique et les rend pathologiques.

L'organisme développe des mécanismes protecteurs vis à vis des radicaux libres oxygénés les plus fréquents. Cela prouve tout à la fois leur nocivité potentielle et leur présence physiologique.

Deux systèmes de protection existent :

*** les systèmes enzymatiques :**

L'anion superoxyde est métabolisé par la superoxyde dismutase (SOD), qui donne naissance au peroxyde (figure 13). La vitesse de cette réaction est accélérée d'un facteur 10^9 par ce catalyseur biologique. Cette enzyme est présente dans toutes les cellules vivant en aérobiose. Il en existe deux formes chez l'homme, l'une renfermant du manganèse, présente dans les mitochondries, et l'autre du cuivre et du zinc, présente dans le cytosol et le plasma. Une forme de SOD renfermant du fer existe chez les bactéries (27) . Le peroxyde d'hydrogène est ensuite dégradé en eau par la catalase et la glutathion peroxydase (30) . Cette suite de réaction enzymatique évite ainsi le passage par le radical hydroxyle, particulièrement toxique pour l'organisme.

La catalase est une enzyme, située dans les peroxyzomes, organites intracellulaires. La glutathion peroxydase comporte du sélénium. Elle est présente dans le cytoplasme.

La catalase fonctionne avec le glutathion réduit, qui dérive de deux acides aminés, la méthionine et la cystéine. Elle agit également sur les radicaux hydroperoxydes et limite donc les réactions de peroxydation lipidique enclenchées.

Mais d'autres enzymes jouent également un rôle dans l'élimination des radicaux libres.

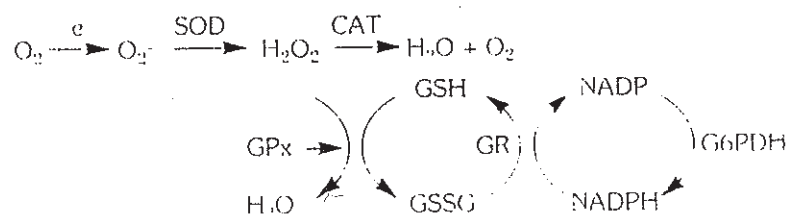


Figure 13 - Les systèmes enzymatiques protecteurs de radicaux libres chez l'homme (25)

***les systèmes non enzymatiques :**

Certaines métalloprotéines comme la céruléoplasmine ou la transferrine ont une activité sur la réaction de dismutation de l'anion superoxyde. L'alpha-tocophérol ou vitamine E interrompt les réactions radicalaires membranaires où il est présent, par sa lipophilie. Après avoir piégé des radicaux libres, il devient lui même radicalaire avec une faible réactivité, et il est recyclé par des substances tels le glutathion ou l'acide ascorbique (vitamine C) . La vitamines A semble aussi avoir un rôle protecteur.

Les molécules protectrices tels les acides aminés (le glutathion, la méthionine, la cystéine, la taurine) , les oligoéléments (le Sélénium, le Cuivre, le Zinc) et les composés polyphénoliques flavonoïdes sont fournies par l'alimentation.

Les organes les plus impliqués dans la production de radicaux libres et par voie de conséquence dans les systèmes de défense anti-radicalaire sont le foie et les poumons.

Le pouvoir pathogène des radicaux libres s'exerce surtout sur les lipides, mais ils peuvent également modifier l'ADN avec des conséquences mutagènes, ou modifier l'activité de certaines enzymes. Ils attaquent les protéines de structure, tels le collagène et l'acide hyaluronique, avec des conséquences pathologiques, notamment en rhumatologie. Le groupement thiol est particulièrement réactif aux radicaux libres: des fonctions thiols oxydées sont alors créées. L'action sur les **acides gras** s'explique par la réaction d'un radical OH^{\bullet} qui provoque l'arrachement d'un électron et la création d'un radical libre lipidique peroxyde.

Le radical ROO^{\bullet} va chercher à se stabiliser en arrachant à son tour un hydrogène à une autre molécule d'acide gras. L'insaturation fréquente des acides gras allonge leur demi-vie et augmente ainsi leur action. L'attaque se fait au niveau de la structure divinyl-méthane présente sur les acides gras polyinsaturés constituants des phospholipides membranaires. Les radicaux lipidiques vont ensuite subir un réarrangement sous la forme d'un **diène conjugué**, qui en présence d'oxygène génère un **radical peroxyde**.

Le nombre de cycles de peroxydation est proportionnel au nombre de doubles liaisons de l'acide gras.

La réaction va alors s'étendre en chaîne (figure 14) libérant au passage des dérivés hydroperoxyde, jusqu'à épuisement et entrainer des lésions diffuses considérables qui vont destructurer la membrane (figure 15) et les organites cellulaires. Ces réactions sont catalysées par les sels métalliques de fer ou de cuivre.

Les radicaux hydroperoxydes sont peu réactifs, mais ils vont pouvoir être transformés en radicaux alcoyles en présence de fer, qui sont beaucoup plus réactifs et plus stables. Ceux-ci vont amplifier les lésions en propageant l'agression. La perméabilité membranaire et le fonctionnement des récepteurs de surface sont alors profondément modifiés, et à terme la cellule peut en mourir.

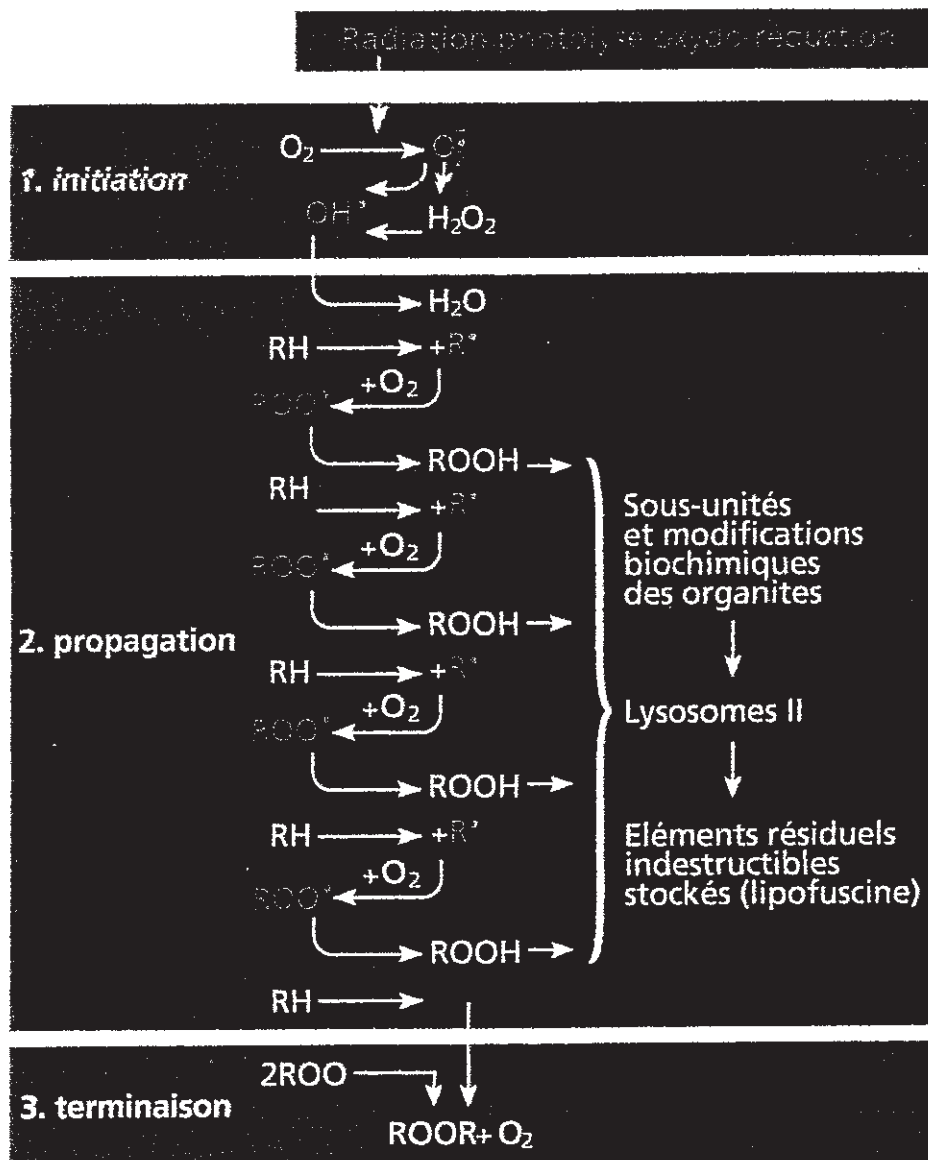


Figure 14 - Réaction en chaîne de la lipidoperoxydation membranaire (27)

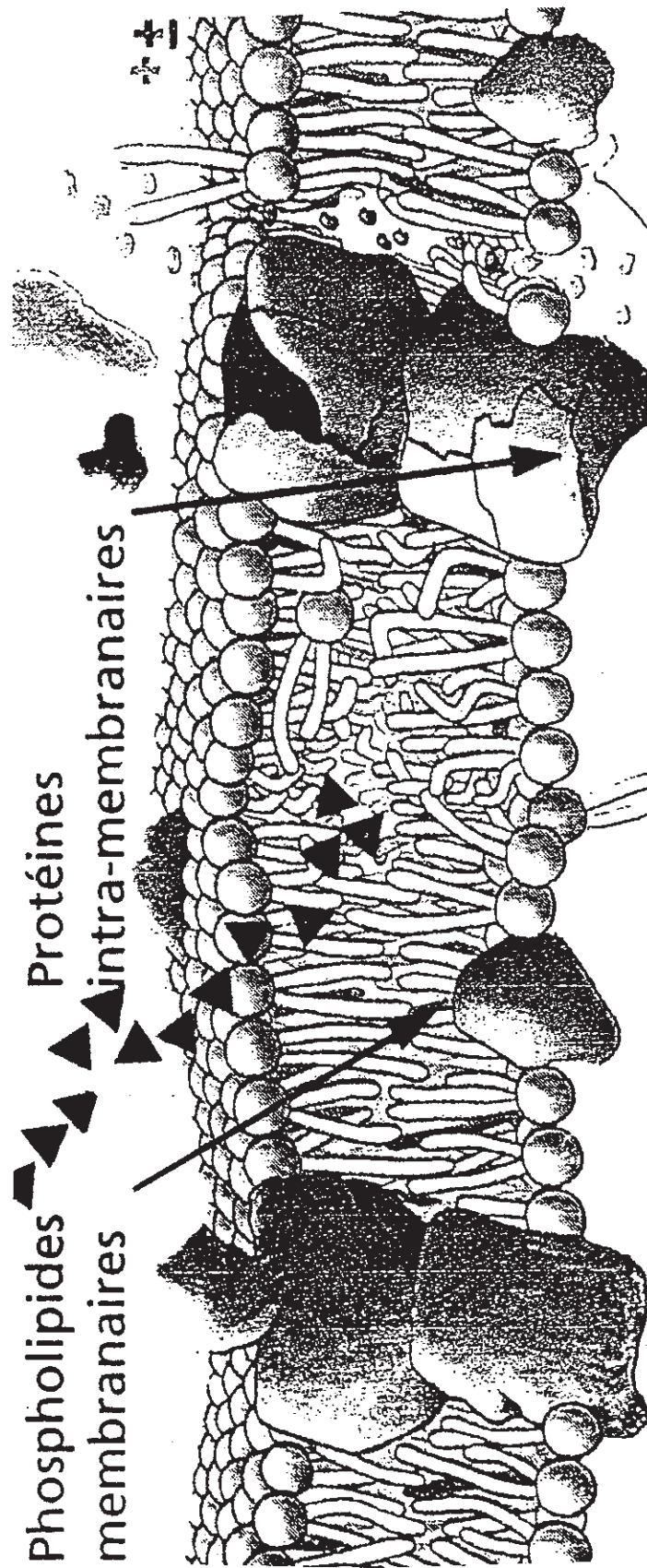


Figure 15 - Destruction de la membrane cellulaire sous l'effet des radicaux libres (27)

Les radicaux libres sont impliqués dans de nombreuses **pathologies humaines**, en particulier au niveau **cardiovasculaire**, dans le **vieillessement**, en cancérologie, dans les maladies auto-immunes et en **rhumatologie**.

Ils sont impliqués dans l'athérosclérose, l'infarctus du myocarde, la cataracte, la maladie d'Alzheimer, la polyarthrite rhumatoïde et l'arthrite (31). Une nouvelle classe thérapeutique voit actuellement le jour, les **antiradicalaires**.

1.4 La Résonance Paramagnétique Electronique

1.4.1 Principes généraux

Cette technique a été découverte par Zavoïski en 1945. La Résonance Paramagnétique Electronique (RPE) est une technique spectroscopique d'analyse, qui consiste à mesurer l'absorption d'une onde électromagnétique traversant un échantillon soumis à un champ magnétique (32, 33, 34).

La RPE permet d'étudier les espèces paramagnétiques stables, comme les radicaux libres, les semi-conducteurs ou les complexes des ions de transition. Cette méthode est très sensible : elle permet d'observer des radicaux libres à des concentrations de 10^{-8} M. Elle joue un rôle considérable dans les études de **dynamique moléculaire**, en chimie comme en biochimie ainsi que dans la quantification et l'analyse des **radicaux libres**. Elle a également été utilisée pour étudier le "flip-flap" des phospholipides membranaires, c'est à dire la diffusion transversale à travers la membrane plasmique cellulaire.

Seules les molécules possédant un moment magnétique sont détectées. En fait, les transitions d'énergie étudiées correspondent aux différences entre les deux états de spins des électrons. Ces transitions sont induites par une fréquence de résonance constante dans un champ magnétique variable.

*Théorie quantique de la RPE (35,36)

Un électron est caractérisé par sa masse, sa charge, son orbitale, son moment angulaire intrinsèque et son moment magnétique.

Quatre nombres quantiques lui sont associés : n caractérisant la couche électronique, s , p , d ou f la sous couche électronique, l le nombre quantique azimutal et m_s le nombre quantique magnétique.

Un électron est un corpuscule chargé électriquement qui par son mouvement de rotation sur lui-même induit un champ magnétique appelé spin. Ce spin ne peut prendre que deux valeurs : $+1/2$ et $-1/2$.

L'énergie de l'électron dans un champ magnétique est donnée par l'équation :

$$E = -\mu_e \cdot H$$

où μ_e représente le moment magnétique de l'électron et H le champ magnétique

Le moment angulaire intrinsèque est lié au vecteur de spin S par la relation :

$$\mu_e = -g_e \cdot \beta_e \cdot S$$

avec g_e , le facteur spectroscopique (2,0023 SI) et β_e , le magnéton de Bohr ($-9,274 \cdot 10^{-24}$ A.m²).

Quand un électron est soumis à un champ magnétique externe H , son moment magnétique a deux orientations possibles, qui correspondent aux deux orientations du vecteur de spin S , parallèle et antiparallèle au champ magnétique appliqué H .

Ainsi, l'angle entre le vecteur moment magnétique d'un électron et la direction du champ magnétique n'a que deux valeurs possibles. Il a été établi que ces deux valeurs étaient $35^\circ 15'$ et $144^\circ 15'$. Le vecteur du moment magnétique de l'électron est de sens opposé à celui du vecteur de spin. L'orientation dans laquelle le moment magnétique est antiparallèle au champ, présente le maximum d'énergie suivant la figure 16.

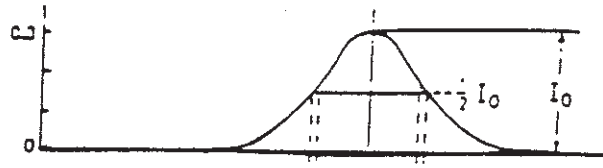


Figure 16 - Spectre d'absorption théorique RPE (35)

Nous déduisons des deux équations précédentes :

$$E = g_e \cdot \beta_e \cdot H \cdot S$$

avec g_e facteur spectroscopique de Landé égal à 2,0023, β_e le magnéton de Bohr $9,274 \cdot 10^{-24} \text{ A.m}^2$ et S le moment angulaire de l'électron.

Sachant que μ_e peut prendre deux valeurs opposées, il s'ensuit que l'électron, selon son spin, peut prendre deux valeurs d'énergie E_1 ou E_2 égales en valeur absolue.

$$E = 1/2 \cdot g_e \cdot \beta_e \cdot H$$

La différence entre les deux niveaux énergétiques est donnée par la formule suivante :

$$E = g_e \cdot \beta_e \cdot H$$

avec h la constante de Planck ($6,62 \cdot 10^{-34} \text{ J.s}$) et la fréquence du rayonnement électromagnétique.

La figure 17 représente un exemple des différents niveaux d'énergie d'un électron.

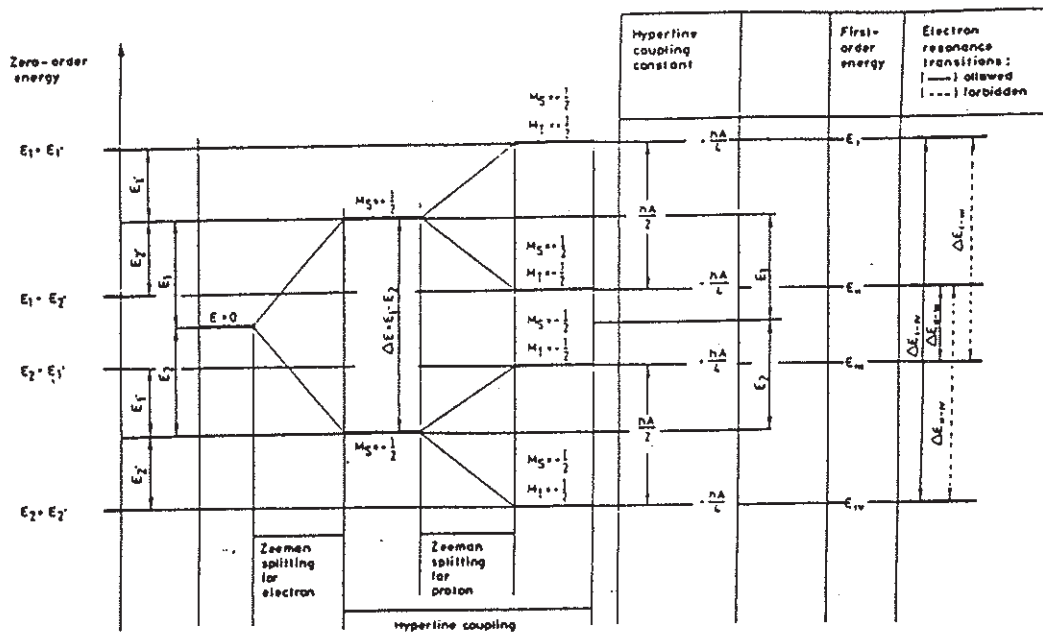


Figure 17 - Niveaux d'énergie dans le cas d'une interaction électron - proton

Seules deux transitions énergétiques résonantes sont permises (traits pleins) sur les quatre transitions possibles.

L'application d'un champ de radiofréquence perpendiculaire au champs magnétique H induit donc une transition entre les deux états de l'électron. Les ondes électromagnétiques utilisées pour provoquer cette transition appartiennent au domaine des **ondes radio**.

Lorsque l'énergie apportée par l'onde coïncide avec la transition énergétique entre les deux états de l'électron, apparaît la **résonance**.

Deux méthodes existent pour l'atteindre :

- garder une valeur de champ magnétique fixe et faire varier la valeur de la fréquence de l'onde radio.
- ou l'inverse, fixer une valeur pour la fréquence de l'onde radio et faire varier le champ magnétique. Il s'agit de la méthode utilisée dans pratiquement tous les appareils de RPE.

Les spectres obtenus représentent la première dérivée de la courbe d'absorption énergétique (figure 18).

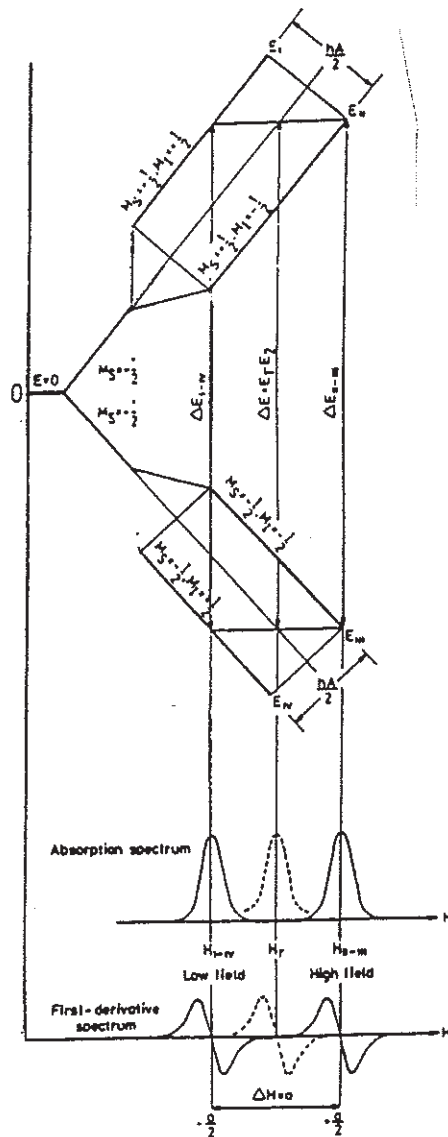


Figure 18 - Spectre d'absorption en RPE obtenu dans le cas d'un électron seul (traits pointillés) et dans le cas d'une interaction électron - proton (traits gras), (32)

Les spectres résultent de couplages hyperfins, c'est à dire d'interactions entre les spins nucléaires et les spins électroniques.

L'interprétation des spectres de RPE est délicate, car les signaux des différentes espèces radicalaires sont souvent superposés. Il est possible de les séparer en amont, ou d'utiliser des programmes informatiques pour interpréter les spectres des molécules organiques simples. Ces techniques s'appliquent aux radicaux libres stables.

Pour détecter les radicaux libres instables, les échantillons peuvent être irradiés à très faible température pour augmenter leur stabilité. Ils peuvent aussi être transformés en radicaux libres stables en étant piégés par des capteurs de radicaux libres, des "scavengers", tels que la 5, 5'-diméthyl 1-pyrroline N-Oxyde (DMPO) (figure 19) , par la méthode du "spin-trapping". Ces molécules les captent et les transforment en radicaux libres stables, détectables par RPE.

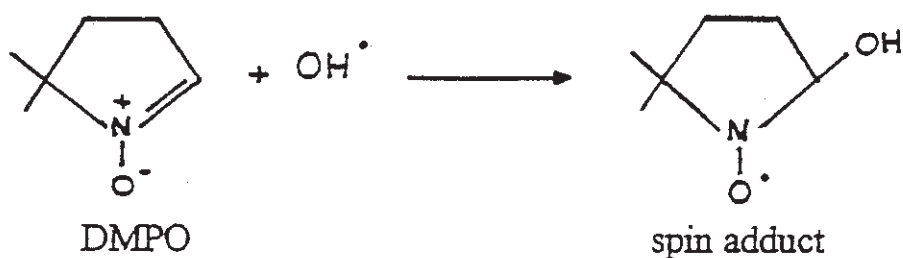


Figure 19 - Formule chimique de la DMPO (27)

Il existe également la technique du "spin-label", où un radical stable tel que la 1, 1'-diphényl -2-picryl -hydrazyle (DPPH, figure 20) est mis en contact avec une molécule étudiée, qui par sa capacité à capter les radicaux libres diminue l'intensité de la raie hyperfine, proportionnelle aux radicaux libres stables.

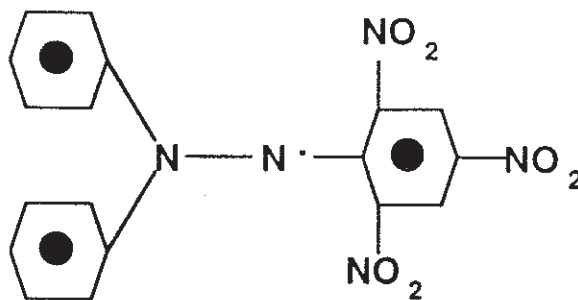


Figure 20 - Formule chimique de la DPPH (27)

1.5.2 Appareillage

Les principaux composants d'un spectromètre RPE sont (figure 21) :

- * un **émetteur hyperfréquence**, généralement un klystron stabilisé sur la fréquence de résonance de la cavité
- * une **cavité résonnante** contenant l'échantillon, placée dans la partie la plus homogène du champ magnétique
- * un **électro-aimant** dont le champ peut varier linéairement dans un domaine de quelques Gauss à plusieurs milliers de Gauss.
- * un **amplificateur** synchrone accordé sur la fréquence de modulation du champ magnétique, assurée par une bobine de Heimboltz fixée à la cavité.

Le klystron est relié à la cavité par un **pont hyperfréquence**, dont l'élément principal est un T magique, séparant l'onde incidente de celle réfléchie par la cavité. L'onde réfléchie est dirigée vers la **diode détectrice** du signal, connectée à l'amplificateur.

En absence de signal, la cavité est accordée de manière à réfléchir une partie de l'onde incidente pour optimiser la réponse de la diode. A la résonance, le taux de réflexion vers la diode augmente.

Les échantillons solides ou les liquides sont placés généralement dans des tubes de verre très pur contenant le composé étudié sur hauteur utile de 2 cm.

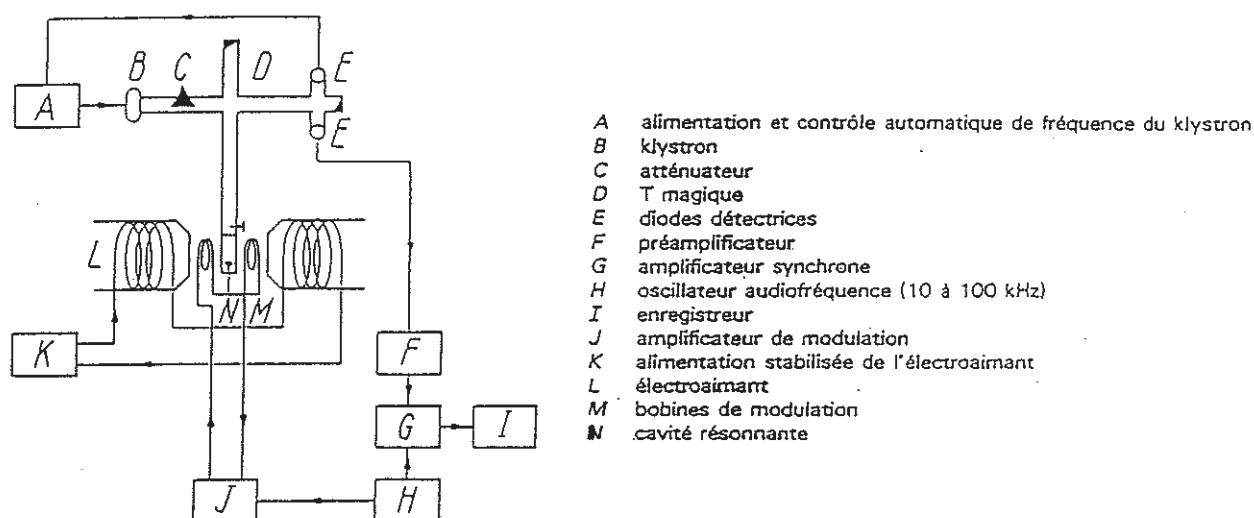


Figure 21 - Principe d'un spectromètre RPE (27)

1.5 Méthodes de dosage microbiologique et détermination de l'activité d'un antibiotique par mesure de la CMI et de la CMB

1.5.1 Titrage microbiologique d'un antibiotique selon la Pharmacopée française (10)

L'activité d'un antibiotique est estimée par l'inhibition de la croissance des microorganismes de référence, à différentes concentrations connues de la molécule à examiner, comparativement à l'antibiotique de référence. Les préparations de référence utilisées dans les titrages sont des substances dont l'activité a été déterminée avec précision par rapport à l'étalon international correspondant ou à la préparation de référence internationale.

Dans l'interprétation mathématique des résultats, le modèle sur lequel est basée l'équation de l'activité doit être précisé et validé.

La pharmacopée recommande deux méthodes de titrage microbiologique des antibiotiques. Chaque titrage d'un antibiotique est réalisé dans des conditions bien précises : méthodologie utilisée, milieu de culture, température, souche de référence, concentration de l'inoculum, mode opératoire, interprétation statistique. . .

*** Titrage par diffusion :**

Les microorganismes de référence, sensibles à l'antibiotique dosé, sont ensemencés dans la masse du milieu de culture gélosé approprié. Les solutions de l'antibiotique de référence et celles de l'antibiotique à doser sont disposées en solution dans des cylindres en porcelaine ou en acier stériles, posés à la surface de la gélose ou dans des cavités découpées à l'emporte-pièce dans la gélose ou à l'aide de disques en papier absorbant, imprégnés. Il faut utiliser au moins trois doses différentes de l'antibiotique de référence et de l'antibiotique à examiner.

Les diamètres d'inhibition sont mesurés après une incubation de 18 heures à 37 °C. Le calcul du titre de l'antibiotique à examiner est déterminé à l'aide de la courbe de référence et de méthodes statistiques appropriées.

***Titrage turbidimétrique :**

Ici la suspension connue du microorganisme choisi est disposée dans un milieu de culture liquide approprié. Sa concentration est choisie de façon à obtenir une diminution importante de la culture microbienne et une opacité facilement mesurable, après une durée d'incubation de 4 heures environ. Il faut utiliser au moins trois doses différentes pour l'antibiotique de référence et pour l'antibiotique à examiner.

Après incubation des milieux de culture, la croissance bactérienne est bloquée, par exemple par du formaldéhyde.

1.5.2 Détermination de la CMI et de la CMB d'un antibiotique

Définitions de la CMI et de la CMB :

La CMI est la plus faible concentration d'une gamme de dilution d'antibiotique de demi en demi, qui entraîne une inhibition de toute croissance bactérienne visible. C'est la méthode de référence pour la mesure de la sensibilité bactérienne aux antibiotiques.

La CMB est la plus faible concentration qui dans des conditions expérimentales données (temps de contact, milieu, température) , ne laisse viable qu'un pour 10000 germes (valeur donnée pour les antibiotiques) soumis à l'action de l'antibiotique.

*** Détermination de la CMI**

- par la technique de dilution : soit en milieu liquide, soit en milieu gélosé (méthode de référence)

- par diffusion en milieu gélosé : méthode des disques, utilisée pour la réalisation d'un antibiogramme

*** Détermination de la CMB**

en milieu liquide ou en milieu solide

DEUXIEME PARTIE
MATERIELS ET METHODES

2.1 La radiostérilisation

2.1.1 L'ionisateur IBL 460

L'ionisateur utilisé, à la Faculté de Pharmacie est un irradiateur de recherche de type IBL 460.

Il comprend : * une partie fixe, dite **corps de l'irradiateur**, contenant la source de Cobalt 60. Sa structure est composée de plomb et d'une enveloppe d'acier doublée d'une protection anti-feu et antichoc (copeaux d'inox et de plâtre) et assure, par un confinement des sources, une protection de l'opérateur vis à vis du rayonnement.

* une partie mobile, appelée "**ascenseur**", permettant la mise en contact entre les radiations gamma et la substance à irradier. Les produits sont chargés dans la cartouche d'irradiation de "l'ascenseur" quand il est en position haute. Cette cartouche a un diamètre de 12 cm et une hauteur de 30 cm. L'opérateur actionne mécaniquement ou électriquement la descente de l'ascenseur. La cartouche est alors mise au contact avec le corps de l'irradiateur et la source radioactive, quand la position basse est atteinte.

* un **habillage**, qui protège le corps de l'appareil et le dispositif mécanique. Une double porte permet l'accès à l'intérieur de la chambre d'irradiation. L'ascenseur ne peut descendre qu'une fois cette porte fermée. L'armoire de commande comporte un commutateur à clé marche-arrêt, une minuterie permettant de programmer la durée d'irradiation en seconde, une commande montée-descente de l'ascenseur avec possibilité d'arrêt momentané et une commande d'arrêt d'urgence.

2.1.2 L'ionisation

Le débit de dose de l'ionisateur IBL 460 était, pendant la période où les irradiations ont été effectuées, d'environ 2kGy par heure. Les poudres solides utilisées (céfotaxime et céfuroxime) sont prélevées directement dans leur conditionnement commercial en verre, puis pesées avec une balance électronique Mettler (40 mg).

Elle est répartie dans des tubes en matière plastique radiostable, obturés par un bouchon. Les échantillons sont irradiés dans la journée en étant disposés au centre de la chambre d'irradiation, dans un portoir en polyméthacrylate de méthyle. L'irradiateur est représenté à la figure 22. La durée d'ionisation est variable afin d'obtenir les doses d'irradiation indiquées dans le tableau 17.

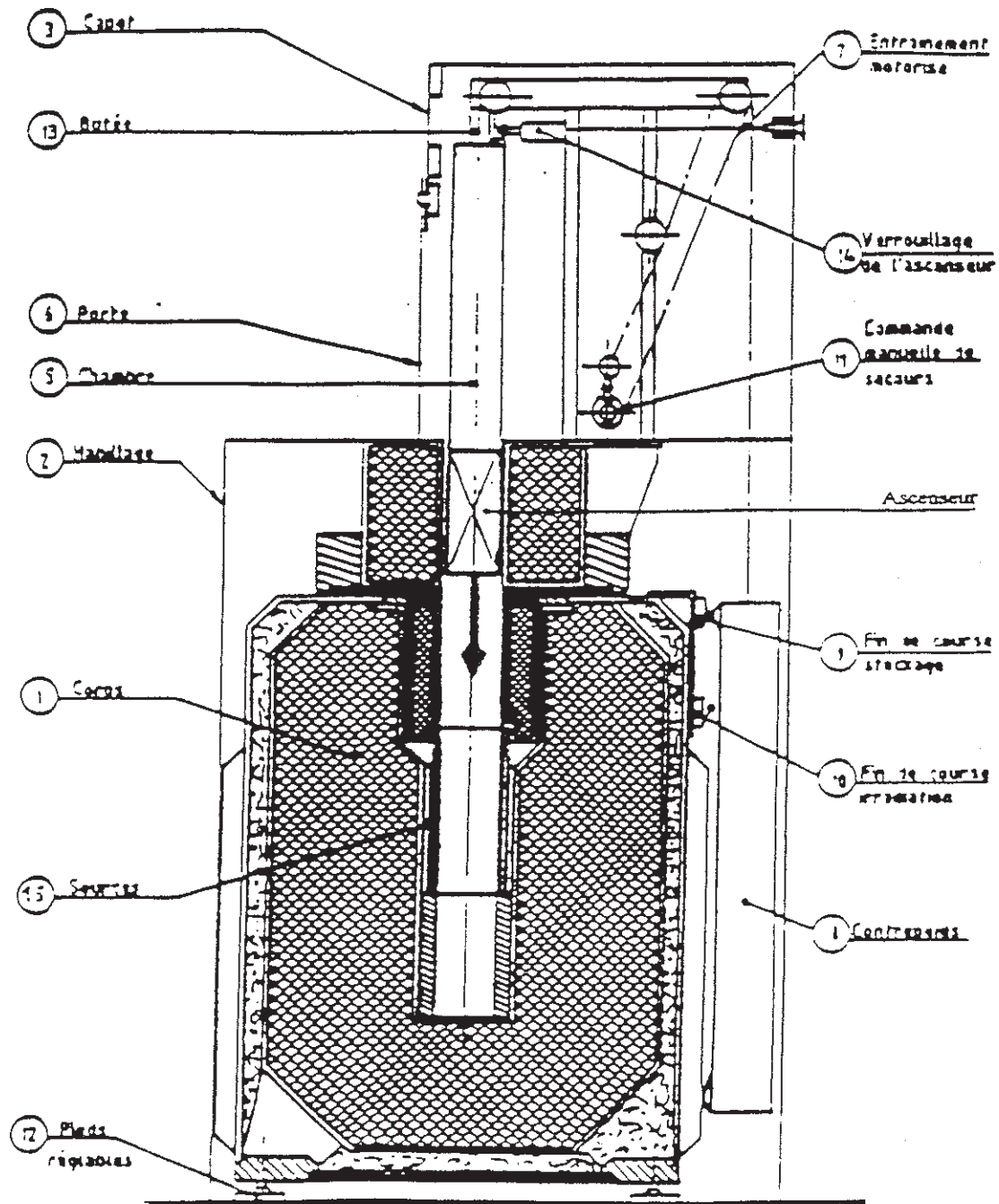


Figure 22 - Schéma de l'irradiateur IBL 460 (34)

2.2 Dosimétrie par RPE

Nous enregistrons les spectres à température ambiante, à l'aide d'un spectrophotomètre Brüker ESR 300 E.

Les spectres des formes solides sont enregistrés moins d'une heure après l'irradiation gamma, à l'exception des études de stabilité radicalaire au cours du temps effectuées 1 et 2 jours après l'irradiation. Nous disposons alors la poudre irradiée dans la cuve de mesure. La poudre est alors tassée. Nous considérons que le volume étudié et la masse de l'échantillon sont constants. Deux mesures sont réalisées pour chaque dose d'irradiation.

La poudre de céfotaxime utilisée provient des laboratoires Roussel*, celle de céfuroxime des laboratoires Glaxo*.

2.3 Mesure du pouvoir scavenger du céfotaxime

Le protocole utilisé est la méthode du "**spin-trap**", qui a été mise au point en 1960. Les radicaux libres oxygénés ont une demi-vie très courte, de l'ordre de 10^{-10} à 10^{-19} seconde.

Le principe consiste à utiliser une molécule très avide de ces radicaux libres oxygénés, qui devient à son tour une espèce radicalaire appelée "**spin-adduct**", dont la durée de vie est suffisamment importante pour permettre son étude en RPE. Le "**spin-trap**" utilisé ici est la DMPO, qui va réagir avec les radicaux libres hydroxyles OH^\bullet produits par photolyse UV du peroxyde d'hydrogène.

Le spectre témoin RPE en solution aqueuse du "**spin-adduct**" formé à partir de la DMPO est représenté à la figure 23.

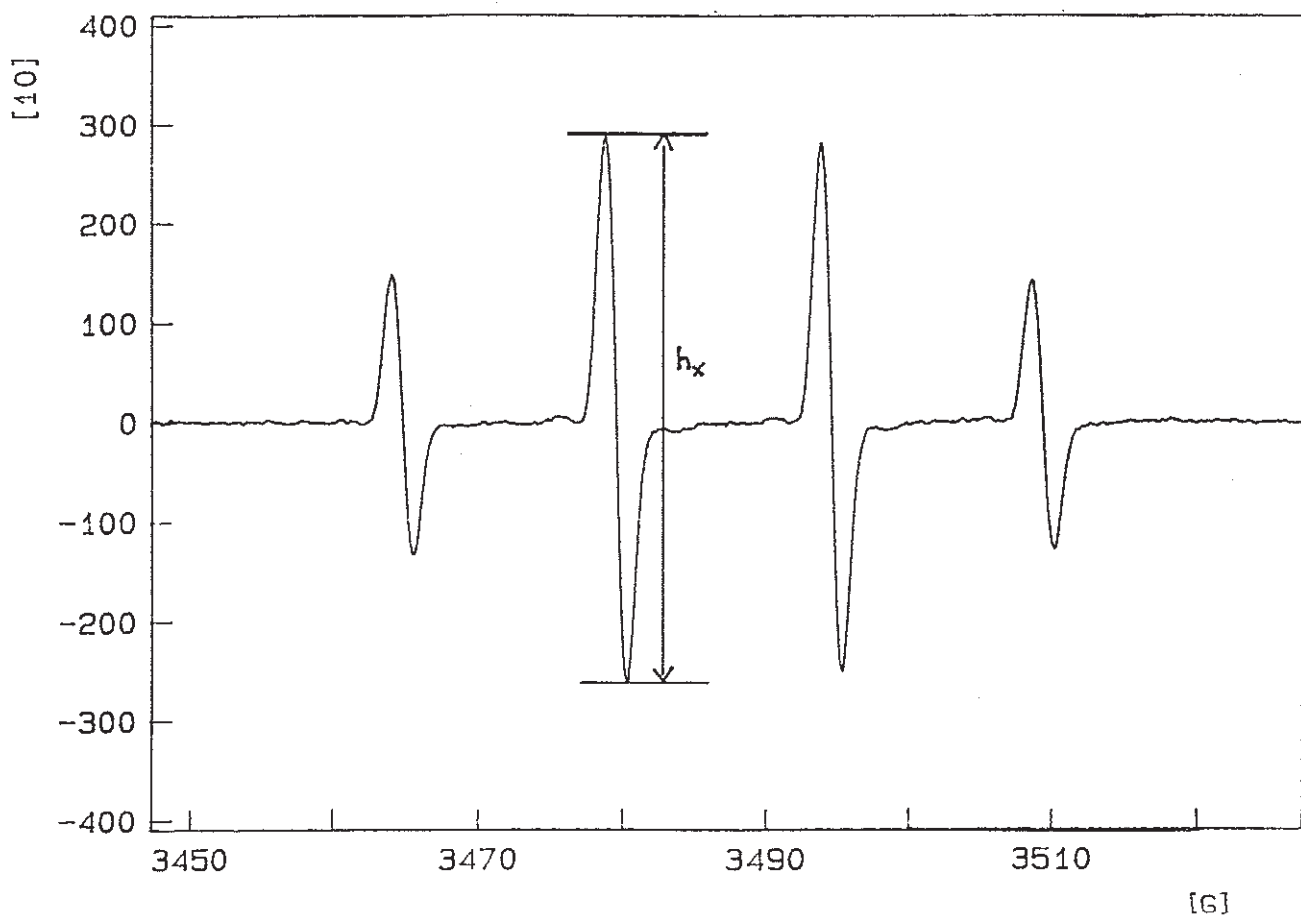


Figure 23 - Spectre RPE témoin de la DMPO (27)

Les conditions optimales de réalisation du spectre du "spin-adduct" dépendent :

- * du temps d'irradiation par les UV
- * du temps séparant la fin de l'irradiation et l'enregistrement du spectre

déterminé en fonction de la durée de stabilité du "spin-adduct" formé.

Les conditions opératoires au cours de notre étude sont les suivantes :

- * 11,8 μl H_2O_2 à 30 volumes
- * 5,9 μl de DMPO (sigma)
- * 88 μl de tampon Sorrensen pH 7 ou de solution de céfotaxime dans ce

même tampon

Nous utilisons une lampe émettrice de rayonnement Ultra Violet (Bioblock Scientifique) de longueur d'onde 254 nm et d'énergie 100W. Après 30 minutes de préchauffe de la lampe, pour obtenir un rayonnement constant, nous prélevons 100 microlitres de solution de céfotaxime à une concentration variable à l'aide d'une micropipette (Sartorius), (tableau 15).

La DMPO est un aliquote décongelé extemporanément, conservé dans de l'eau glacée à l'abri de la lumière pendant toute la durée de la manipulation ainsi que H_2O_2 .

Après mélange des solutions, la solution est irradiée pendant 4 minutes, 100 microlitres sont prélevés et disposés dans une cuve de mesure. L'acquisition du spectre de RPE est effectuée 3 minutes après la fin de l'irradiation.

Nous partons d'une solution 2.10^{-2} M de céfotaxime, obtenue en dissolvant 47,7 mg de céfotaxime dans 5 ml de tampon 0,1M pH 7.

Les différentes dilutions à effectuer sont reprises dans le tableau 15.

Nous rappelons que ces hauteurs de pic sont directement proportionnelles à la concentration en radicaux libres. Nous effectuons d'abord le spectre RPE de la solution de DMPO sans céfotaxime, puis les spectres avec les différentes concentrations de céfotaxime.

La hauteur de la deuxième raie est mesurée (hauteur pic à pic : h_x), et le **pourcentage d'inhibition** de la formation des radicaux libres est déterminé en fonction de la concentration en céfotaxime. Ce pourcentage d'inhibition représente le rapport entre la hauteur du deuxième pic de la raie hyperfine pour une concentration donnée en céfotaxime, et cette même hauteur en l'absence de céfotaxime. Différentes mesures sont réalisées pour différentes concentrations d'antibiotique. La courbe du pourcentage d'inhibition est réalisée en fonction du logarithme décimal de la concentration et la concentration inhibitrice de 50 % de l'intensité du pic de RPE (CI 50) est alors déterminée.

Solution initiale (M)	Solution mère (ml)	Volume de tampon (ml)	Concentration obtenue (M)
$2 \cdot 10^{-2}$	2	2	10^{-2}
10^{-2}	2	2	$5 \cdot 10^{-3}$
10^{-2}	1	1,5	$4 \cdot 10^{-3}$
$4 \cdot 10^{-3}$	2	2	$2 \cdot 10^{-3}$
$2 \cdot 10^{-3}$	2	2	10^{-3}
$4 \cdot 10^{-3}$	1	9	$4 \cdot 10^{-4}$

Tableau 15 - Dilutions des solutions de céfotaxime pour la mesure de son pouvoir "scavenger"

2.4 Mesure de la CMI du céfotaxime (37)

La méthode utilisée pour la détermination de la CMI en milieu solide pour les bactéries aérobies à croissance rapide est celle décrite par le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (37).

Ne disposant pas de la molécule de référence, nous avons comparé les mesures de CMI du céfotaxime commercialisé par les laboratoires Roussel* avant et après différentes doses d'irradiation et analysé les résultats.

2.4.1 Souches utilisées

Nous avons utilisé trois souches de référence :

* *Escherichia coli* ATCC 25922

* *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

* *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

2.4.2 Milieux de culture

Le milieu gélosé de Mueller-Hinton Difco AES a la composition suivante :

Infusion de viande de boeuf	300 ml
Peptone de caseïne (acide)	17,5g
Amidon	1,5g
Agar	13g
Eau distillée	qsp 1 litre

La gélose est stérilisée 20 minutes à 120°C puis stockée dans des tubes sous un volume de 18 ml. Au moment de l'emploi, les géloses sont coulées en boîtes de Pétri, après avoir ajouté 2 ml de solution de l'antibiotique à la concentration choisie.

Le milieu liquide de Mueller-Hinton DIFCO AES a la composition suivante :

* Infusion de viande de boeuf	300 ml
* Peptone de caseïne (acide)	17,5g
* Amidon	1,5g
* Eau distillée	qsp 1 litre

Le milieu de Mueller-Hinton liquide est préparé sous un volume de 50 ml , stérilisé 20 minutes à 120°C et stocké à 4°C.

Nous utilisons également de l'eau distillée comme diluant en conditionnement de 50 ml, stérilisée 20 minutes à 120°C.

2.4.3 Les inoculums

Nous avons préparé l'inoculum selon la méthode de culture en phase stationnaire décrite par le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (37) . Les trois souches de bactéries ATCC sont conservées dans des tubes gélosés. Après deux repiquages sur gélose de Mueller-Hinton, trois inoculums sont préparés à partir de colonies d'une culture de 18 à 24 heures. Quelques colonies sont émulsionnées dans 10 ml de milieu de Mueller-Hinton liquide.

La densité optique de la suspension bactérienne est mesurée à 550 nanomètres au spectrophotomètre Metrix-Stalabo et ajustée à 0,1, de manière à obtenir une population bactérienne de $1 \text{ à } 3.10^8$ bactéries par ml. Ceci correspond à la suspension mère de bactéries.

Contrôle de dénombrements

Nous diluons la suspension mère de bactéries avec de l'eau distillée stérile.

0,1 ml de chaque dilution bactérienne est étalé en rateau à la surface d'une gélose de Mueller-Hinton en boîte de Pétri.

Après 18h d'incubation à 37°C, le dénombrement des colonies est effectué en ne prenant en compte que les boîtes contenant entre 30 et 300 colonies. Les résultats sont exprimés en unité formant colonies (UFC).

Pour chaque suspension mère, nous avons d'abord réalisé trois dénombrements distincts de manière à obtenir une bonne reproductibilité de la manipulation.

La densité bactérienne exprimée en nombre d'UFC par ml s'obtient en multipliant les résultats par le facteur de dilution utilisé. Les dilutions des solutions mères sont ajustées de manière à obtenir une solution d'une concentration de 10^6 bactéries par ml et donc un inoculum de 10^4 bactéries dans dix microlitres.

2.4.4 Les solutions de céfotaxime

Le céfotaxime est déconditionné de son flacon stérile sous hotte à flux d'air laminaire, puis pesé précisément et dissout dans du tampon de Sorrensen à pH 6. La composition du tampon Sorrensen est la suivante :

7,96 g de K_2HPO_4

1,461g de NaH_2PO_4

qsp 1l d'eau distillée

La solution est stérilisée à l'autoclave 20 minutes à 120°C puis conservée à 5° C.

256 mg de céfotaxime sont dissout dans 50 ml de tampon Sorrensen sous une hotte à flux d'air laminaire de manière à obtenir une solution mère à 5120 mg/l, puis cette solution mère d'antibiotique est diluée dans de l'eau distillée stérile, selon le tableau 16.

Solution initiale (mg/l)	solution mère (ml)	Volume d'eau distillée (ml)	Concentration obtenue (mg/l)	Concentration finale dans le milieu (mg/l)
5120	1	15	320	320
320	4	4	160	16
320	3	6	106,67	10,67
320	2	6	80	8
320	1	7	40	4
320	1	15	20	2
20	4	4	10	1
20	2	6	5	0,5
20	1	7	2,5	0,25
20	1	15	1,25	0,125
1,25	5	5	0,625	0,0625

Tableau 16 - Dilution des solutions de céfotaxime

*** Autre matériel utilisé :**

Nous utilisons également un bec Bünsen, une balance électronique Sartorius, un agitateur à vortex, une étuve thermostatée Jouan et des pipettes jaugées de mesure, stériles.

2.4.5 Protocole de détermination de la CMI

*** Préparation de la gamme de céfotaxime en boîte de Pétri**

Nous disposons stérilement 2 ml de chaque dilution de la gamme d'antibiotique dans une série de boîtes de Pétri. 18 ml de milieu gélosé de Mueller-Hinton, liquéfié extemporanément sont coulés dans chaque boîte. Les boîtes sont séchées 30mn à 37°C. Des boîtes témoins sans céfotaxime sont également préparées.

*** Ensemencement**

Le jour de la manipulation, chaque inoculum est préparé extemporanément selon le protocole décrit page 75 sous hotte à flux d'air laminaire et à température ambiante. 10 microlitres de chaque inoculum bactérien, soit 10^4 bactéries sont déposés à la surface des géloses suivant la figure 24 suivante.

Les boîtes de Pétri sont incubées 18 heures à 37° C.

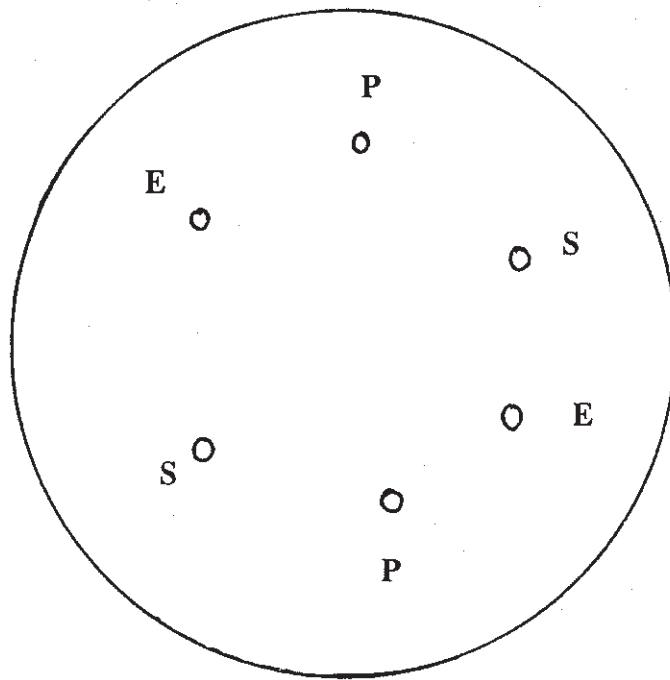
Un contrôle témoin de dénombrement est réalisé simultanément, pour chaque inoculum.

*** Lecture de la CMI**

Les cultures sont examinées, en ne tenant compte que des colonies nettes et denses. La présence de 1 à 3 colonies n'est pas prise en considération quel que soit leur aspect ou taille, il en est de même pour une croissance très fine à l'emplacement du dépôt.

Un faible nombre de colonies visibles pour plusieurs dilutions successives doit conduire à une investigation complémentaire.

Les dénombrements sont effectués en ne prenant en compte que des boîtes contenant de 30 à 300 colonies.



P : *Pseudomonas aeruginosa*

E : *Escherichia coli*

S : *Staphylococcus aureus*

Figure 24 - Représentation de l'ensemencement de la gélose

TROISIEME PARTIE
RESULTATS EXPERIMENTAUX

3.1 Dosimétrie du céfotaxime irradié par les rayons gamma

Après avoir effectué les irradiations à différentes doses du céfotaxime pulvérulent, des formes radicalaires sont apparues : nous les avons mises en évidence par RPE.

Nous mesurons alors l'intensité des pics obtenus (figure 25) , pour les comparer en fonction de la dose d'irradiation.

Le tableau 17 en présente les résultats.

Dose d'irradiation (kGy)	0,5	1	2	4	10	20	25	30
Hauteur pic à pic (unité arbitraire)	NS	432	1074	2271	2784	3442	4481	4765

NS : non significatif

Tableau 17- Résultats dosimétriques du céfotaxime

Nous traçons alors le graphe de la hauteur pic à pic des spectres RPE en fonction de la dose d'irradiation (figure 26) . Il présente une allure linéaire suivant l'équation suivante :

$$\text{DOSE (kGy)} = 6,9 \cdot 10^{-3} \cdot \text{INTENSITÉ (U A)} - 5,9$$

avec $r^2 = 0,912$ et U A unité arbitraire

La quantité de radicaux libres produits est donc proportionnelle à la dose d'irradiation gamma.

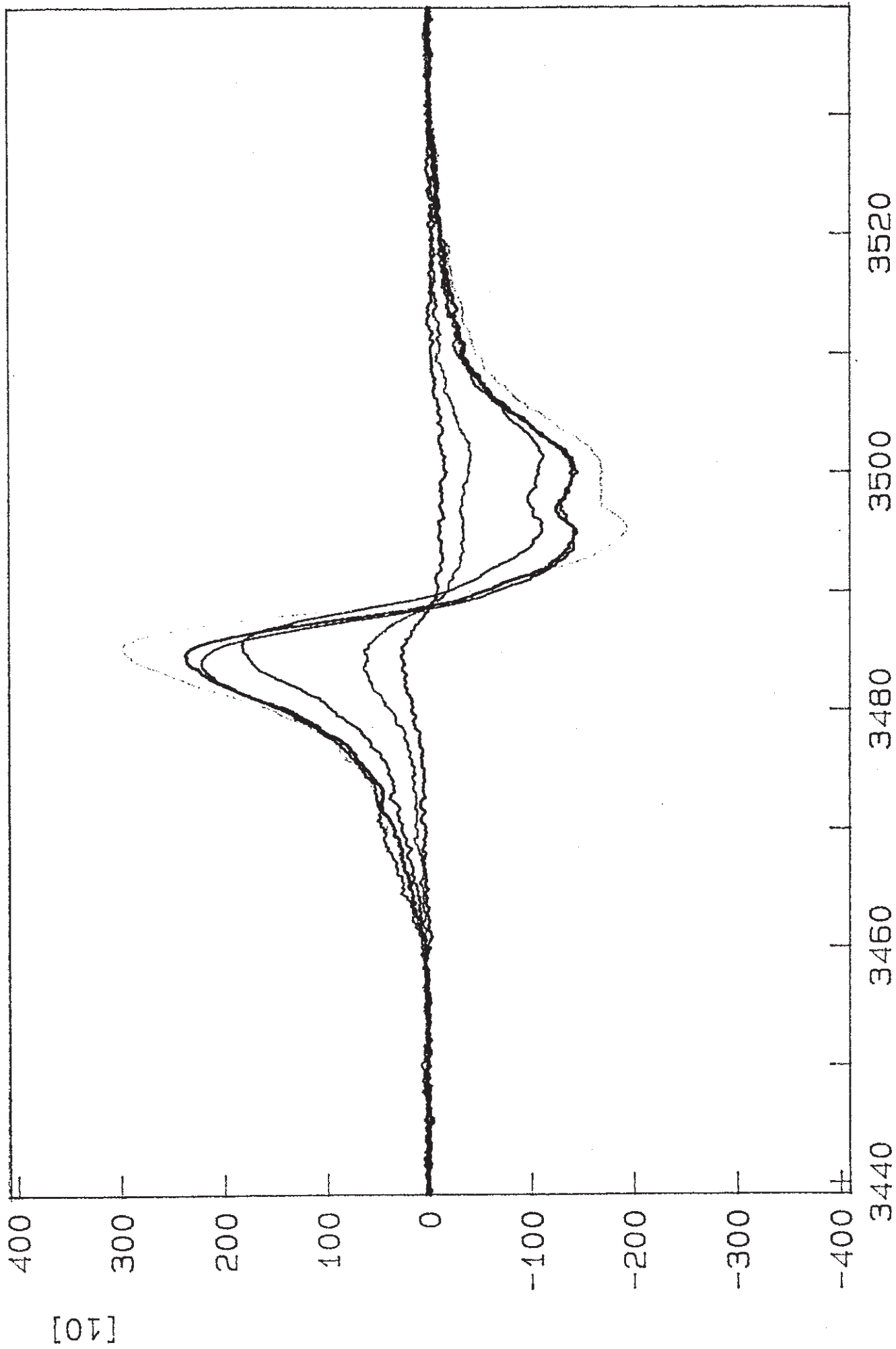


Figure 25 - Spectres obtenus en RPE après irradiation du céfotaxime à différentes doses [G]

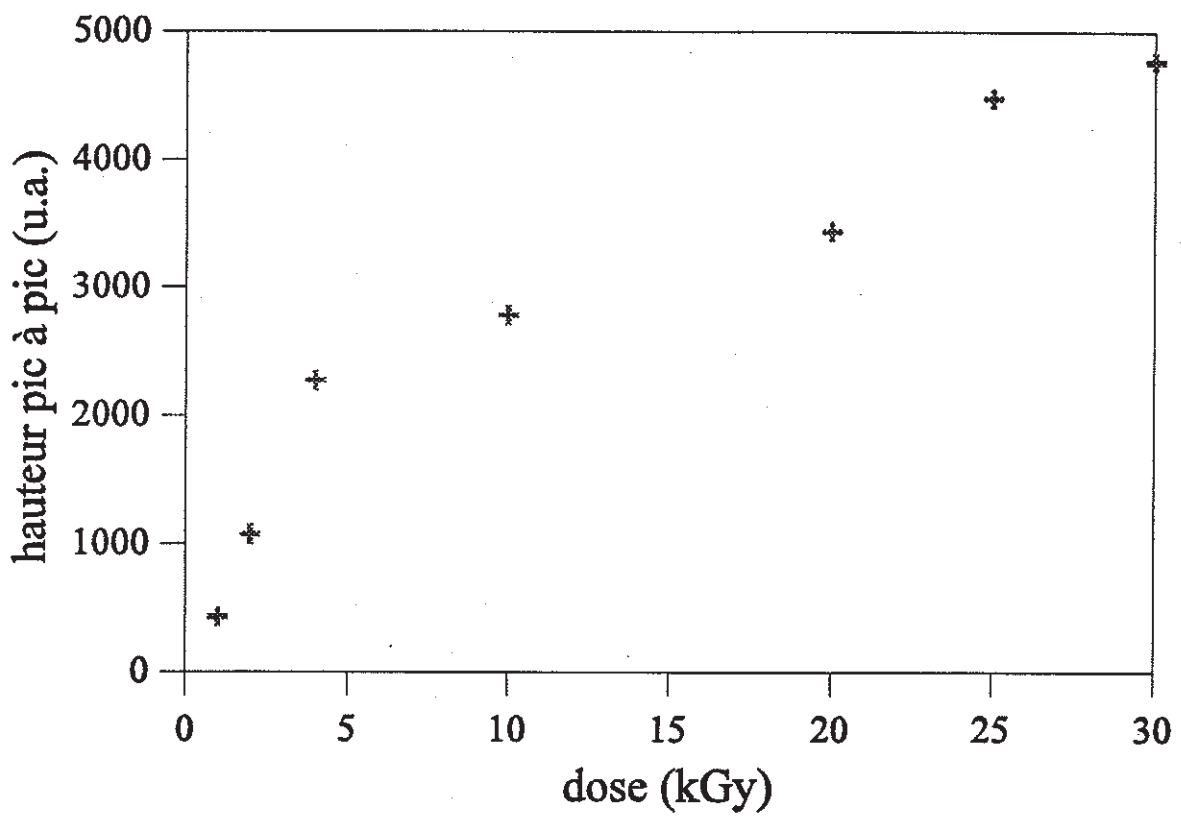


Figure 26 - Graphe de l'intensité des réponses en RPE en fonction de la dose d'irradiation

3.2 Pouvoir scavenger du céfotaxime

On mesure tout d'abord l'intensité témoin en RPE correspondant aux radicaux libres secondaires de DMPO. Ces radicaux libres sont créés par capture des radicaux libres primaires produits par réaction du rayonnement UV sur l'eau, ceci en l'absence de céfotaxime. On réalise alors les spectres avec différentes doses de céfotaxime (figure 27). Cette molécule, par son pouvoir "scavenger", va capter les radicaux libres primaires (oxygénés) et diminuer ainsi la quantité de radicaux libres secondaires (DMPO).

La concentration de céfotaxime, inhibitrice de 50 % de la production de radicaux libres de DMPO est alors calculée (figure 28). Elle est de 10^{-2} M.

Nous n'avons pas observé de différences significatives des pourcentage d'inhibition entre les doses d'irradiation : le test d'homogénéité donne un t calculé de 0,59 (au risque 5% et pour un degré de liberté de 15) inférieur au t de student théorique de 2,131. Le céfotaxime possède donc un pouvoir "scavenger" net. Les résultats obtenus sont représentés dans les tableaux 18 à 21.

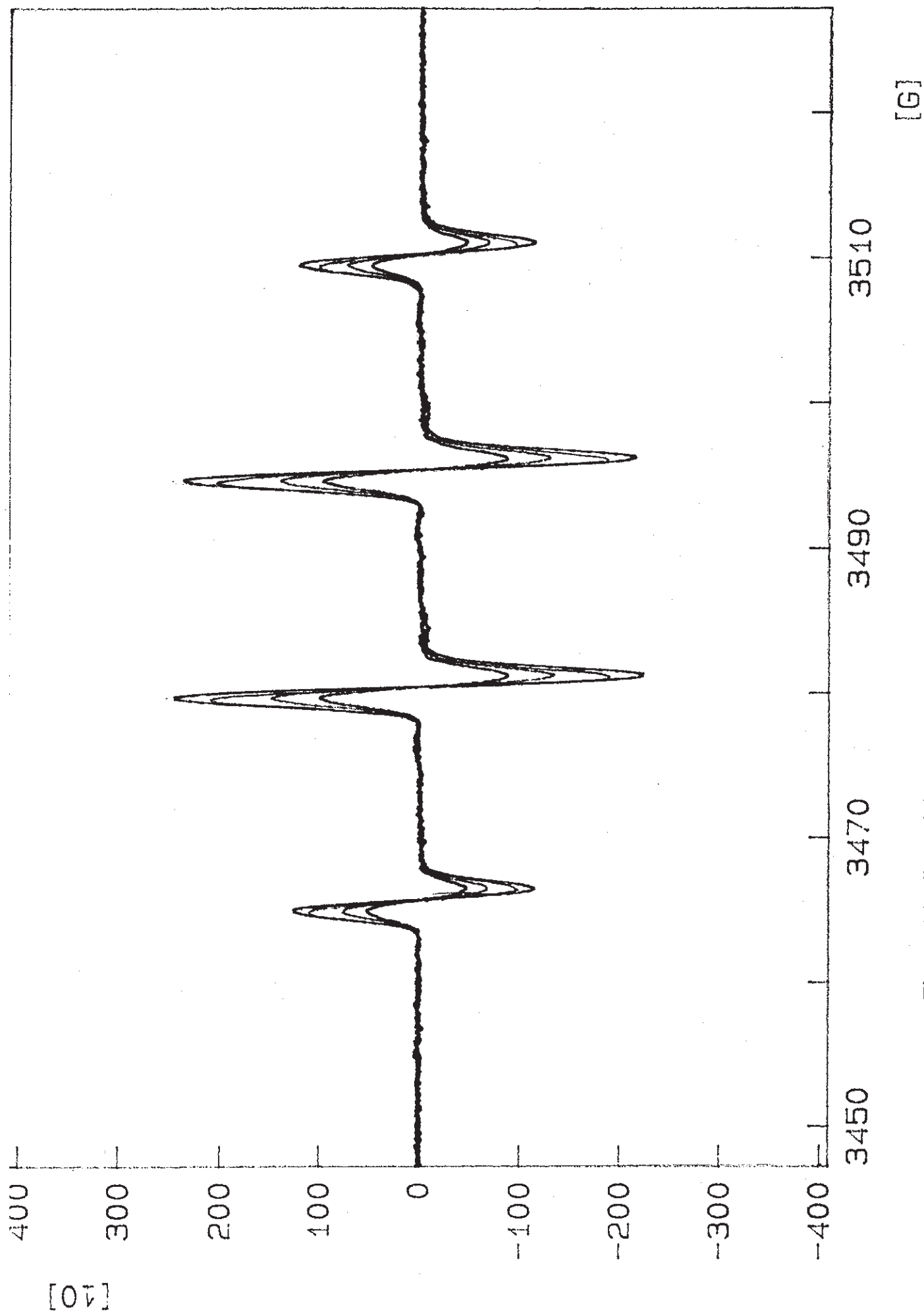


Figure 27 - Intensité des réponses en RPE de la DMPO en fonction de la concentration en céfotaxime

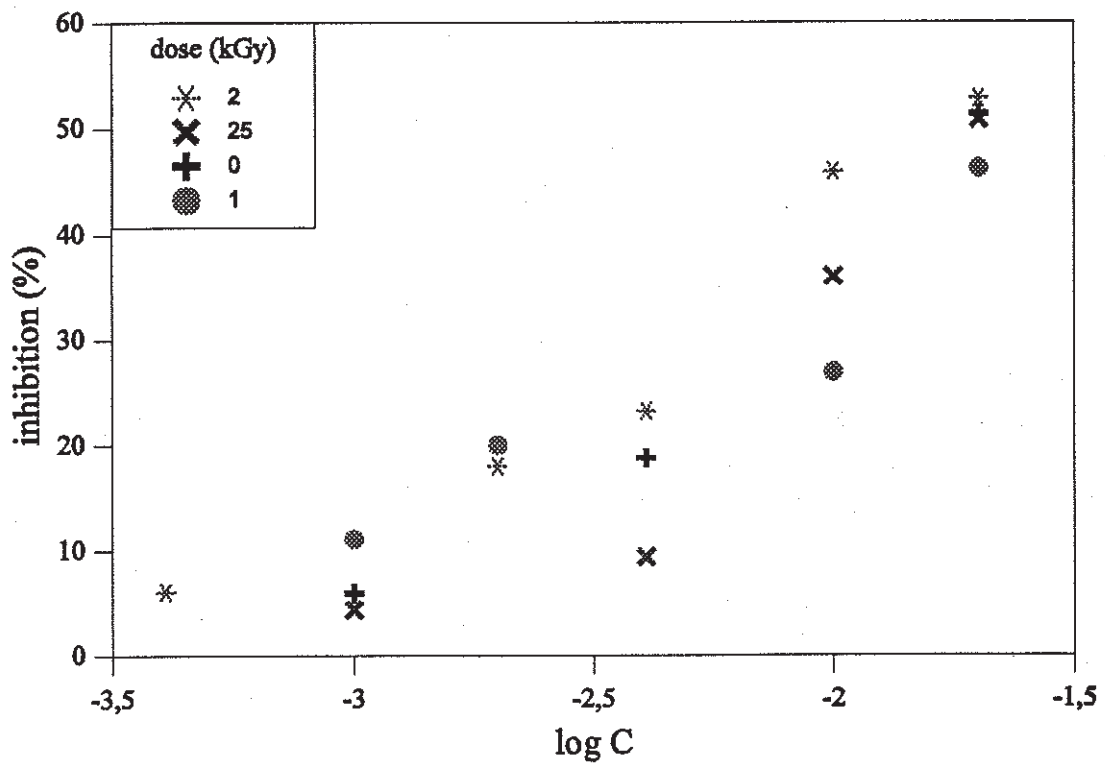


Figure 28 - Pourcentage d'inhibition des réponses en RPE de la DMPO en fonction du logarithme de la concentration de céfotaxime

Concentration en céfotaxime (M)	10^{-3}	$4 \cdot 10^{-3}$	$2 \cdot 10^{-2}$
Pourcentage d'inhibition	6,045	18,80	51,315
Logarithme de la concentration en céfotaxime	-3	-2,39	-1,7

Tableau 18 - Inhibition de la réponse RPE en fonction de la concentration en céfotaxime non irradié

Concentration en céfotaxime (M)	10^{-3}	$2 \cdot 10^{-3}$	10^{-2}	$2 \cdot 10^{-2}$
Pourcentage d'inhibition	11,11	19,96	26,91	46,25
Logarithme de la concentration en céfotaxime	-3	-2,7	-2	-1,7

Tableau 19 - Inhibition de la réponse RPE en fonction de la concentration en céfotaxime à la dose d'irradiation de 1kGy

Concentration en céfotaxime (M)	$4 \cdot 10^{-4}$	$2 \cdot 10^{-3}$	$4 \cdot 10^{-3}$	10^{-2}	$2 \cdot 10^{-2}$
Pourcentage d'inhibition	6,10	17,96	23,22	45,85	52,79
Logarithme de la concentration en céfotaxime	-3,39	-2,7	-2,39	-2	-1,7

Tableau 20 - Inhibition de la réponse RPE en fonction de la concentration en céfotaxime irradié à 2kGy

Concentration en céfotaxime (M)	10^{-3}	$4 \cdot 10^{-3}$	10^{-2}	$2 \cdot 10^{-2}$
Pourcentage d'inhibition	4,36	9,45	36,02	50,84
Logarithme de la concentration	-3	-2,39	-2	-1,7

Tableau 21 - Inhibition de la réponse RPE en fonction de la concentration en céfotaxime irradiée à 25 kGy

3.3 Résultats des mesures de CMI

3.3.1 Résultats des dénombrements

Pour les dénombrements de l'inoculum nous avons choisi une culture en phase stationnaire et utilisé un spectrophotomètre. Un premier essai de dénombrement est réalisé tout d'abord pour vérifier la quantité de l'inoculum bactérien de chaque souche de référence. Elle doit être de $1 \text{ à } 3 \cdot 10^8$ bactéries/ml (tableau 22).

	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>
Dilutions de la suspension bactérienne mère	Nombre de colonies dans 0,1 ml	Nombre de colonies dans 0,1 ml	Nombre de colonies dans 0,1 ml
10^{-5}	110	52	
10^{-4}			89
Nombre de bactéries par ml de la suspension mère	$1,1 \cdot 10^8$	$0,52 \cdot 10^8$	$0,13 \cdot 10^8$

Tableau 22 - Résultat du premier dénombrement des inoculums bactériens

Cinq autres dénombrements ont été réalisés. Les valeurs en sont reprises dans le tableau 23.

Différents dénombrements	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>
Deuxième dénombrement	1,5.10 ⁸	0,64.10 ⁸	0,11.10 ⁸
Troisième dénombrement	0,79.10 ⁸	0,51.10 ⁸	0,23.10 ⁸
Quatrième dénombrement	1.10 ⁸	0,5.10 ⁸	0,6.10 ⁸
Cinquième dénombrement	1,27.10 ⁸	0,39.10 ⁸	0,45.10 ⁸
Sixième dénombrement	1,37.10 ⁸	0,28.10 ⁸	1,05.10 ⁸

Tableau 23 - Dénombrements des inoculums bactériens effectués exprimés en nombre de bactéries/ml

Les valeurs de ces dénombrements sont reproductibles pour *P. aeruginosa*. Les dénombrements de *S. aureus* sont inférieurs à 10⁸. Seul le sixième dénombrement de *E. coli* est conforme.

3.3.2 Résultats des mesures de CMI du céfotaxime

Sur les trois souches bactériennes, nous avons mesuré la CMI du céfotaxime non irradié, du céfotaxime irradié à 4 kGy et à 25 kGy, puis nous avons comparé les résultats.

La stabilité du céfotaxime en milieu gélosé a également été recherché. Pour cela nous avons préparé les boîtes contenant l'antibiotique soit le jour même (J₀), soit un jour avant (J-1), soit 5 jours avant la recherche de la CMI (J-5).

Souche bactérienne	Inoculum .10 ⁴ bactéries/ml	CMI à 0kGy	CMI à 4kGy	CMI à 25kGy
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1,37	10	16	16
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,57	1	2	4
<i>Escherichia coli</i>	2,1	<0,06	<0,06	0,125

Tableau 24 - Mesures de CMI à J₀

Les valeurs de CMI sont exprimées en mg/l.

Une différence de deux dilutions de CMI est nécessaire pour démontrer une diminution de l'activité de l'antibiotique. L'irradiation augmente les valeurs de CMI du céfotaxime obtenues avec les trois souches bactériennes de référence. La diminution d'activité de l'antibiotique est surtout intéressante vis à vis de *S. aureus* où une différence de deux dilutions est observée entre le céfotaxime non irradié et irradié à 25kGy (tableau 24) .

Souche bactérienne	Inoculum .10 ⁴ bactéries/ml	CMI à 0kGy	CMI à 4kGy	CMI à 25kGy
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1,27	8	8	10
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,78	2	2	4
<i>Escherichia coli</i>	0,75	≤0,125	≤0,125	≤0,125

Tableau 25 - Mesures de CMI à J-1

Les valeurs de CMI sont exprimées en mg/l.

A J-1 l'irradiation du céfotaxime à 25kGy entraîne une augmentation de la CMI d'une dilution chez deux souches bactériennes : *P. aeruginosa* et *S. aureus* (tableau 25).

Souche bactérienne	Inoculum .10 ⁴ bactéries/ml	CMI à 0kGy	CMI à 4kGy	CMI à 25kGy
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1,37	10	10	10
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,57	1	1	4
<i>Eschérichia coli</i>	2,1	≤0,06	≤0,06	0,125

Tableau 26 - Mesures de CMI à J-5

Les valeurs de CMI sont exprimées en mg/l.

Les mesures de CMI du céfotaxime sont augmentées d'une dilution à la dose de 25kGy avec *S. aureus* (tableau 26).

Comparaison entre les doses d'irradiation

Bactérie	CMI (mg/l) <i>(inoculum en 10⁵)</i>	J ₀	J ₋₁	J ₅
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		10 (1,37)	8 (1,27)	10 (1,37)
<i>Staphylococcus aureus</i>		1 (0,57)	2 (0,78)	4 (0,57)
<i>Eschérichia coli</i>		<0,06 (2,1)	<0,125 (0,75)	0,125 (2,1)

Tableau 27 - Valeurs des CMI du céfotaxime non irradié

Bactérie	CMI (mg/l) <i>(inoculum en 10⁵)</i>	J ₀	J ₋₁	J ₅
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		16 (1,37)	8 (1,27)	10 (1,37)
<i>Staphylococcus aureus</i>		2 (0,57)	2 (0,78)	1 (0,57)
<i>Eschérichia coli</i>		<0,06 (2,1)	<0,125 (0,75)	<0,06 (2,1)

Tableau 28 - Valeurs des CMI du céfotaxime irradié à 4kGy

Bactérie	CMI (mg/l) <i>(inoculum en 10⁵)</i>	J ₀	J ₋₁	J ₅
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		16 (1,37)	10 (1,27)	10 (1,37)
<i>Staphylococcus aureus</i>		4 (0,57)	4 (0,78)	4 (0,57)
<i>Eschérichia coli</i>		0,125 (2,1)	<0,125 (0,75)	0,125 (2,1)

Tableau 29 - Valeurs des CMI du céfotaxime irradié à 25kGy

Les CMI du céfotaxime irradié ou non varient peu dans le milieu gélosé au cours du temps. Avec le même inoculum, c'est à dire celui utilisé à J₀ et J₋₅, on remarque que si les CMI sont parfaitement identiques pour l'antibiotique non irradié, elles fluctuent légèrement pour l'antibiotique irradié (tableaux 27 à 29) .

3.4. Autres caractères étudiés

3.4.1 Résonance Magnétique Nucléaire

Nous avons effectué les spectres de Résonance Magnétique Nucléaire dans de l'eau deutérée, à l'aide d'un spectromètre Brüker de puissance 200 MHz, du céfotaxime non irradié, irradié à 4 kGy et à 25 kGy. Un exemple de spectre est représenté à la figure 29.

Analyse du spectre du céfotaxime non irradié

- *à **2,4 ppm** (partie pour million) nous retrouvons le singulet représentant 3 H du groupement terminal du groupement acétyle

- *à **3,5 ppm et 4 ppm**, nous retrouvons les deux doublets du CH₂ en alpha du soufre du cycle béta-lactame

- * à **4,3 ppm**, un singulet pour les trois hydrogènes du groupement méthyle

- * à **5 ppm**, deux doublets du groupement CH₂O

- * à **4,8 ppm**, un pic élargi représentant les hydrogènes mobiles dans l'eau deutérée

- * à **5,3 et 6,1ppm**, deux doublets représentant les deux hydrogènes du cycle béta-lactame, avec dans l'ordre celui en alpha du soufre et celui en alpha de l'azote

* à 7,3 ppm, un singlet pour le H en alpha du soufre du cycle aminothiazole

Nous n'avons observé aucune différence entre les trois spectres. Les dérivés secondaires dus à l'irradiation sont à très faibles concentrations, inférieures à la limite de résolution de la RMN.

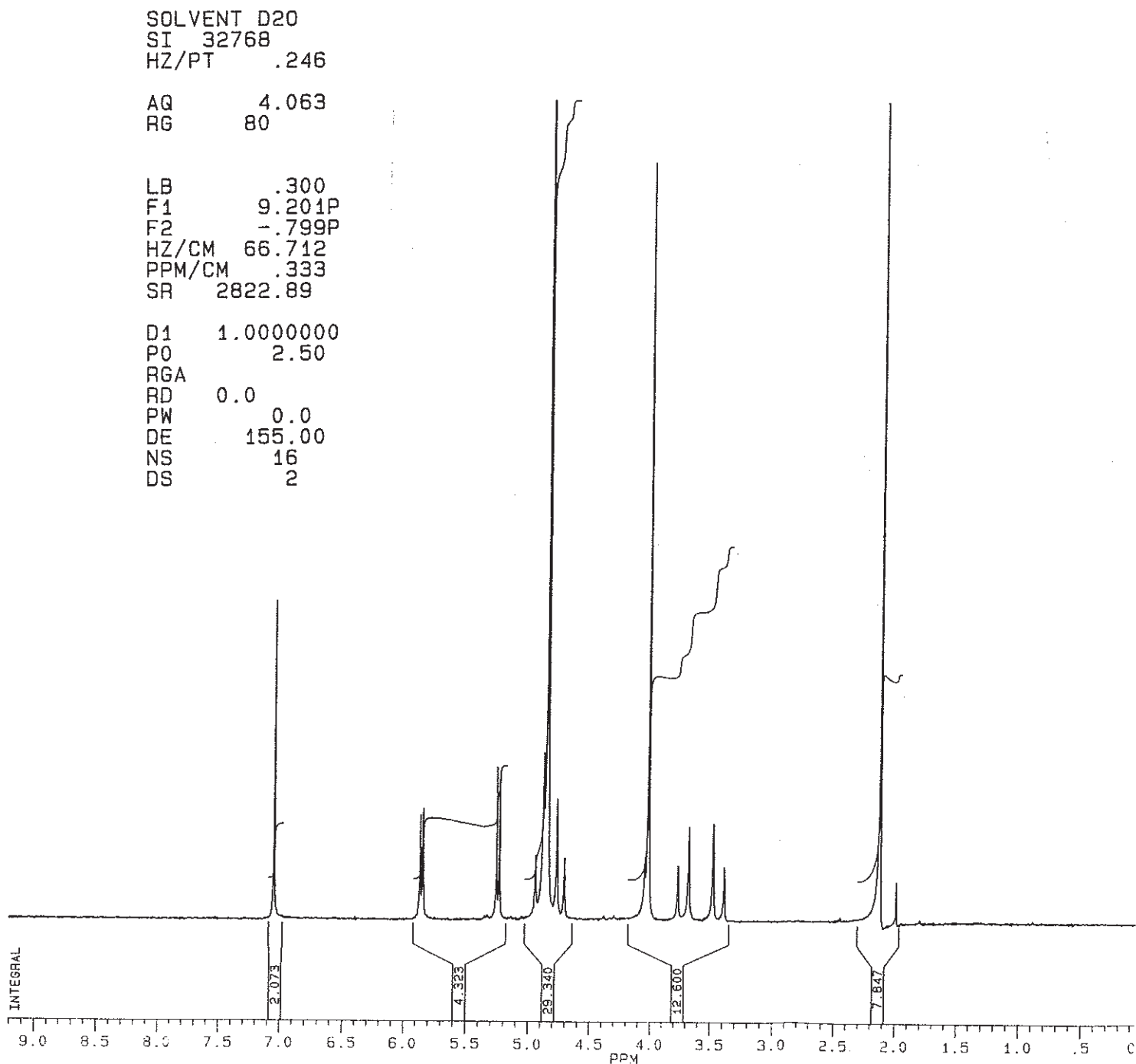


Figure 29 - Spectre RMN du céfotaxime

3.4.2 Irradiation du céfuroxime

Nous avons également effectué les spectres de RPE du céfuroxime irradié par des rayons gamma.

Cette molécule diffère du céfotaxime par le remplacement d'un noyau aminothiazole par un noyau furane et d'un méthyle par une amine.

Le spectre obtenu est représenté à la figure 30.

L'intensité des pics est quasiment nulle et n'augmente pas avec l'irradiation (mesures à 4, 15 et 20 kGy).

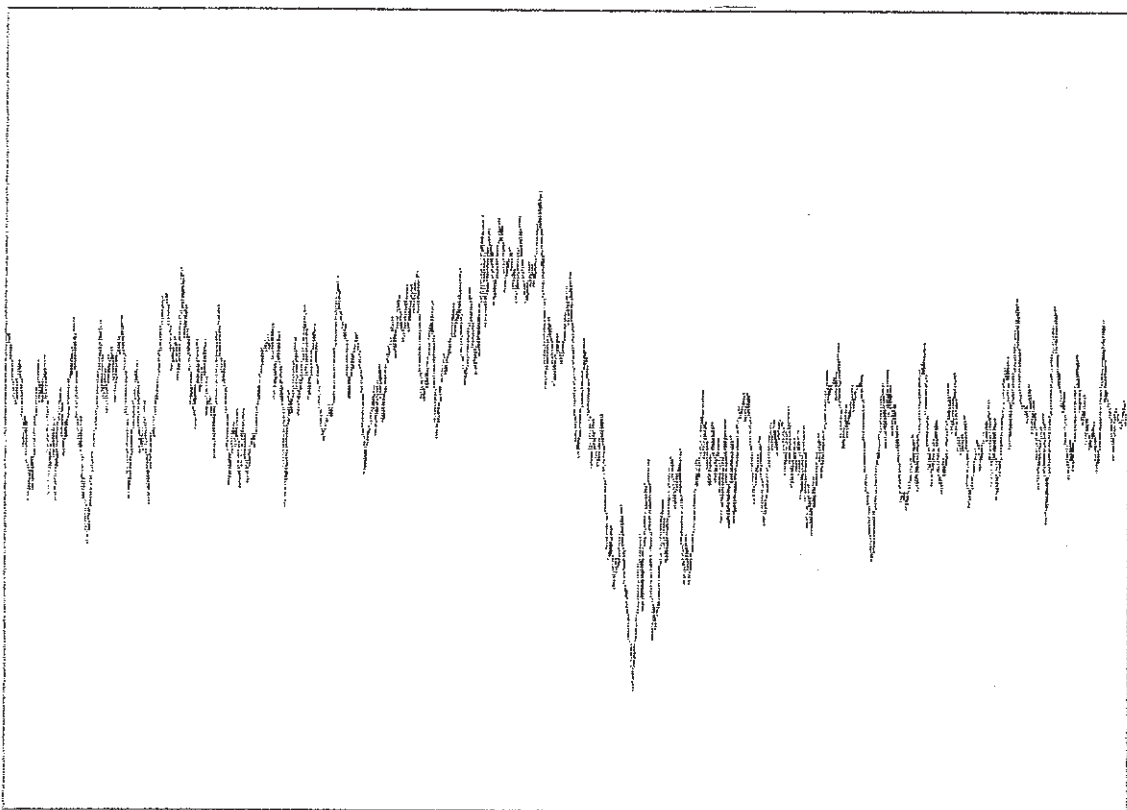


Figure 30 - Spectre RPE du céfuroxime irradié à 4 kGy

3.4.3 Caractères divers

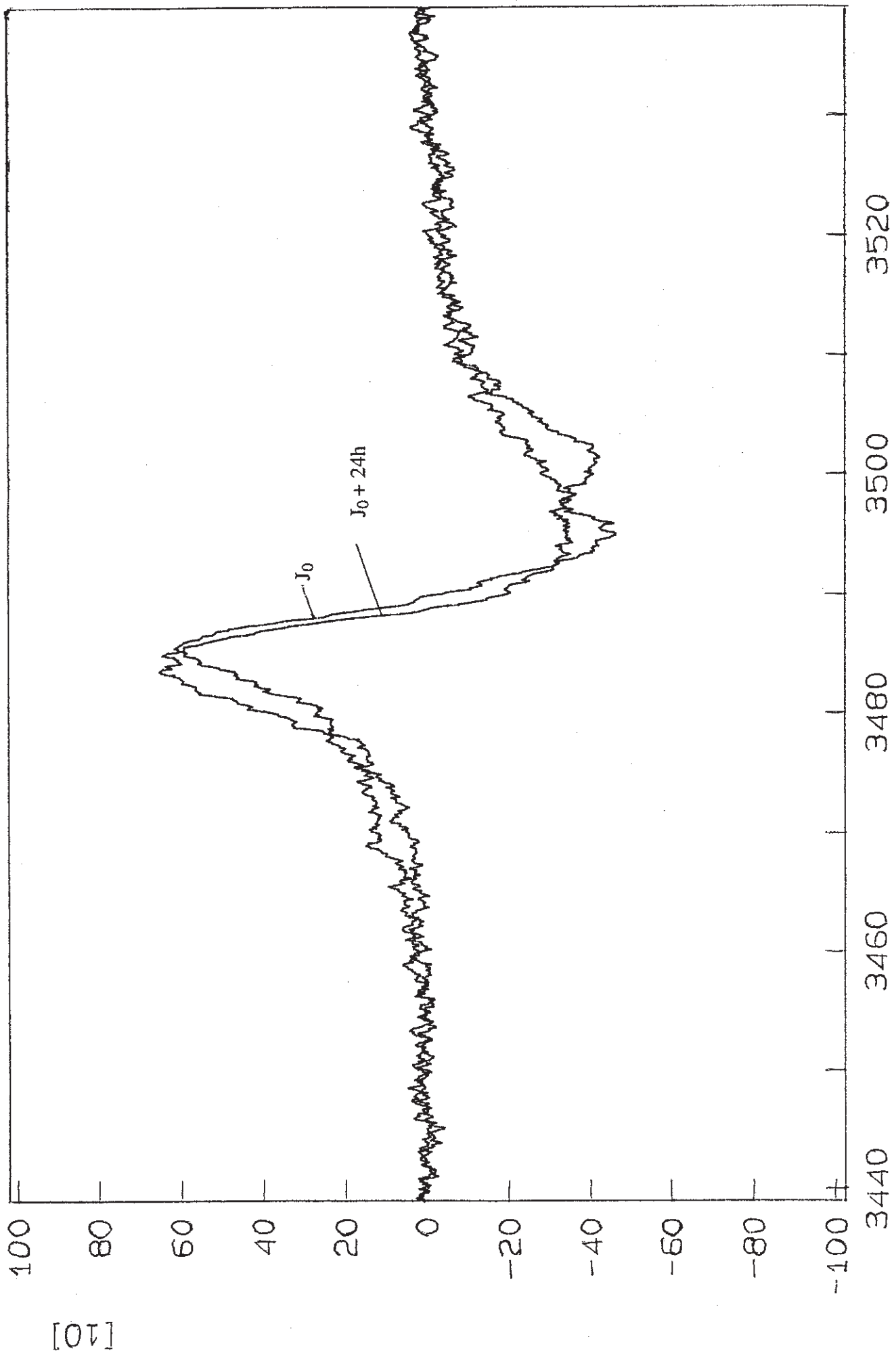
Nous avons également étudié la **stabilité des radicaux libres du céfotaxime dans le temps.**

Le spectre obtenu après 24 heures est représenté à la figure 31 en comparaison avec le spectre réalisé une heure après l'irradiation.

L'intensité est constante, mais le pic est plus étroit et l'épaule disparaît.

Des modifications organoleptiques sont constatées.

La forme pulvérulente du céfotaxime présente un léger jaunissement à la dose de 25 kGy.



[G]

Figure 31 - Comparaison des spectres de RPE du céfotaxime irradié dans le

temps

QUATRIEME PARTIE
DISCUSSION

*** Dosimétrie de la dose d'irradiation du céfotaxime**

Les radicaux libres étudiés ont été formés par l'irradiation gamma à température ambiante de la forme pulvérulente du céfotaxime. Ces radicaux libres possèdent une durée de vie longue. Les raies obtenues en RPE sont larges. Elles ne permettent pas d'identifier les différentes espèces radicalaires présentes. Elles prouvent par leur présence que les radicaux libres du céfotaxime sous forme solide sont stables.

Un épaulement est nettement identifiable sur les spectres obtenus. Il peut signifier la présence d'au moins deux radicaux libres différents. La littérature rapporte que l'irradiation des céphalosporines génère de nombreuses espèces de radicaux libres (38, 39, 40, 41). A la température utilisée lors de ces expérimentations (20-25° C), des réactions de réarrangement peuvent avoir lieu entre les radicaux libres, ce qui tend à modifier le spectre détecté.

Les spectres obtenus (figure 26) à faible température (quelques dizaines de degrés Kelvin) donnent une bonne résolution entre les différents pics. Une interprétation de ces spectres permettrait alors d'identifier la structure chimique des radicaux libres, en comparant les spectres obtenus avec des spectres théoriques (43, 44, 45). Nous n'avons pu effectuer nos mesures dans ces conditions, mais il serait intéressant de les réaliser.

La dosimétrie du céfotaxime a montré la linéarité de la réponse observée en RPE selon l'équation : $DOSE = 6,9 \cdot 10^{-3} \cdot INTENSITE \text{ PIC RPE} - 5,9$

Ceci est conforme à la littérature (21, 46). La quantité de radicaux libres est donc proportionnelle à la dose d'irradiation. Cependant, cette méthode présente une imprécision, car l'intensité du spectre est proportionnelle à la quantité de radicaux libres présents dans la masse d'échantillon comprise dans le faisceau de la RPE. Cette masse peut varier en fonction du tassement de la poudre, et sa valeur précise nous est inconnue.

Il pourrait ainsi être intéressant de stabiliser les radicaux libres en les piégeant à basse température par "spin-trapping", de les séparer par HPLC et de les détecter alors par RPE (4.4).

*** Pouvoir scavenger du céfotaxime**

Le céfotaxime possède des propriétés de capture de radicaux libres. La CI 50 obtenue est de 10^{-2} M. Aucune différence n'a été trouvée entre les différentes doses d'irradiation.

Nous avons pensé qu'il serait intéressant de mesurer cet effet : les radicaux libres du céfotaxime sont stables pendant plusieurs jours car ils sont stabilisés par sa structure moléculaire. Cette structure moléculaire permet donc la capture d'autres radicaux libres. Cette manipulation est reproductible car les concentrations de céfotaxime sont définies.

*** Mesures de CMI du céfotaxime**

Le but des mesures de CMI du céfotaxime vis à vis des souches bactériennes de référence est de rechercher si l'activité antibiotique du produit est modifiée par l'irradiation gamma.

Nous avons réalisé plusieurs essais de dénombrements de chaque souche pour contrôler la reproductibilité des manipulations. Les valeurs des concentrations des suspensions bactériennes mères obtenues sont assez reproductibles. Les écarts observés peuvent être attribués à la différence entre la DO théorique mesurée au spectrophotomètre, qui correspond au nombre total de bactéries (viables et non viables) et le dénombrement sur gélose qui correspond aux seules bactéries viables. Ainsi nous avons obtenu des inoculums à 10^4 variant entre 0,57 et 2,1.

Les valeurs de CMI obtenues pour les trois souches bactériennes avant l'irradiation du céfotaxime sont légèrement différentes de celles publiées par le Comité de l'Antibiogramme de la SFM, à savoir 0,06 à 0,25mg/l pour *E. coli*, 2 à 8mg/l pour *P. aeruginosa* et aux valeurs de la littérature pour *S. aureus*.

Nous avons voulu étudier la stabilité du céfotaxime au sein du milieu de culture gélosé dans le temps. De manière générale l'activité du céfotaxime irradié ou non varie peu dans le milieu gélosé au cours du temps. Avec un inoculum identique utilisé à J_0 et J_{-5} , le céfotaxime non irradié est stable. Par contre, il semblerait que l'antibiotique irradié soit plus instable.

Une différence de deux dilutions est nécessaire pour démontrer une diminution, de l'activité d'un antibiotique. Au niveau des trois souches de bactéries utilisées, il apparaît que *E. coli* est très sensible au céfotaxime, même après irradiation à 4 ou 25 kGy (CMI inférieure ou égale à 0,125 mg/ml) . Des différences de CMI d'une dilution sont apparues après irradiation du céfotaxime pour *Pseudomonas aeruginosa*.

Seules les mesures portant sur *Staphylococcus aureus* nous ont permis de montrer une différence de CMI d'au moins deux dilutions entre le céfotaxime non irradié et l'antibiotique stérilisé à 25 kGy (la CMI passe de 1 à 4mg/l) . Par contre la différence n'est plus que d'une dilution entre le céfotaxime non irradié et la molécule stérilisée à 4 kGy.

Nous avons choisi la mesure de CMI pour apprécier l'activité de l'antibiotique. D'autres méthodes de mesure sont plus précises comme l'HPLC. Cette technique bactériologique ne nécessite pas la connaissance de la structure des dérivés secondaires du céfotaxime, créés par l'irradiation gamma contrairement à l'HPLC.

Ce dosage de CMI a permis de montrer une diminution d'activité entre la cefotaxime non irradiée et le céfotaxime irradiée à une dose de 25kGy, dose d'irradiation importante pour une souche bactérienne. Par contre aucune différence significative n'a été trouvée entre le céfotaxime non irradié et le céfotaxime irradiée à une dose plus faible de 4kGy, dose stérilisante d'après certains auteurs.

*** Autres paramètres étudiés**

L'étude de la stabilité des radicaux de céfotaxime dans le temps a montré que si l'intensité globale des spectres de RPE était stable sur plusieurs jours, leur forme se modifiait. En effet, le pic devient plus fin et l'épaulement disparaît.

Une hypothèse est proposée, deux espèces radicalaires seraient prépondérantes, dont l'une serait moins stable que l'autre.

Des études récentes (46) utilisent un couplage des techniques d'HPLC et de RPE. Elles montrent une augmentation des impuretés préexistantes à l'irradiation ainsi que l'apparition de composés nouveaux à partir de la forme pulvérulente de céfotaxime, provoquée par l'irradiation gamma (figure 36, tableau 30). Certains de ces composés ont été identifiés : ce sont les mêmes que ceux rencontrés par d'autres auteurs : formes lactone, dimérisée, N-formylée, desacetoxylée et desacétylée (47) . Le pourcentage de la forme anti-céfotaxime augmente avec l'irradiation. Ces impuretés constituent 3% du céfotaxime à la dose d'irradiation de 50kGy. Les spectres RPE semblent indiquer la présence de deux radicaux libres différents , ce qui confirme nos expériences, donnant un singulet et un triplet qui se superposeraient.

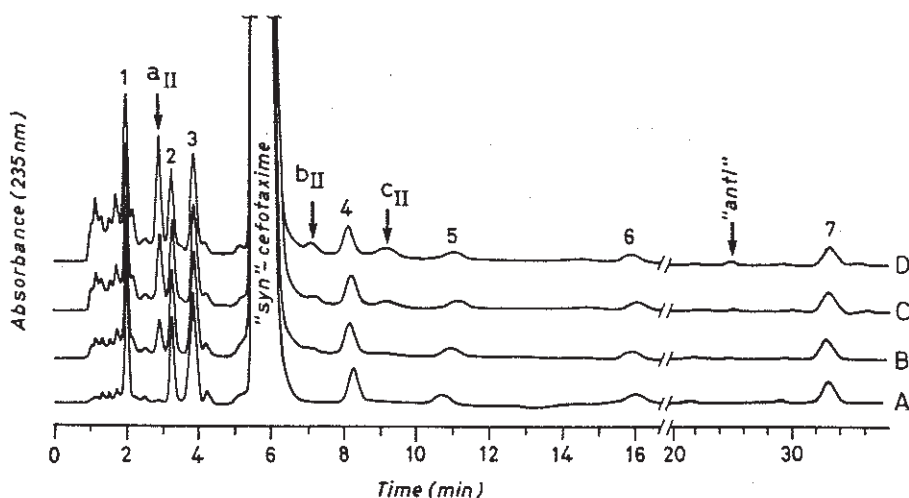


Figure 36 - Dégradation du céfotaxime après irradiation gamma (46)

HPLC à 235nm -A : non irradié, B, C, D : irradié à 10, 25, 50kGy, a₂, b₂, c₂, 4, 5 : impuretés, 1 : desacétyl-céfotaxime, 2 : desacetoxy-céfotaxime, 3 lactone-céfotaxime, 6 : N-formyl-céfotaxime, 7 : dimère de céfotaxime

Sample	% Content ⁽¹⁾ (C.V.) (Sodium salt)										
	Cefuroxime ⁽²⁾						Cefotaxime ⁽²⁾				
	Syn	anti	a _I	b _I	c _I	d _I	Syn	anti	a _{II}	b _{II}	c _{II}
Unirradiated	98.71 (0.75)	0.19 (1.35)	-	-	-	-	96.95 (0.59)	-	-	-	-
G ₁₀	98.02 (1.01)	0.24 (1.68)	0.02 (2.01)	0.22 (1.32)	0.07 (1.91)	0.16 (1.34)	96.61 (0.88)	-	0.18 (1.71)	traces	traces
G ₂₅	96.67 (0.89)	0.29 (1.42)	0.05 (1.81)	0.44 (1.15)	0.15 (1.68)	0.30 (1.52)	95.85 (0.71)	traces	0.35 (1.62)	0.05 (2.02)	0.10 (1.85)
G ₅₀	95.36 (0.93)	0.36 (1.39)	0.09 (1.75)	0.70 (1.45)	0.21 (1.71)	0.47 (1.61)	94.09 (0.81)	0.09 (1.98)	0.62 (1.35)	0.12 (1.41)	0.29 (1.33)

⁽¹⁾ mean of five replications

⁽²⁾ U.S.P. and Eur. Ph. limits: 90-105% (12) and 96-101% (13), respectively

Tableau 30 - Composition du céfotaxime et du syn-céfotaxime après différentes doses d'irradiation en kGy - HPLC : 274 nm

Ces radicaux libres seraient basés sur un centre azoté et un centre carboné. La différence d'intensité des spectres RPE entre le triplet et le singulet peut être attribuée à la différence énergétique entre NO-CH₃ et CO-CH₃. La concentration en radicaux libres est trop faible pour pouvoir être détectée en HPLC, de plus, ils ne sont pas stables en solution aqueuse. La dose d'irradiation ne modifie pas la forme mais l'intensité du signal.

Nous pouvons en déduire les ruptures chimiques provoquées par les rayons gamma (figure 37) permettant la formation des dérivés secondaires mentionnés ci-dessus. La capacité à donner des radicaux libres stables ainsi que le pouvoir "scavenger" peuvent être attribués au pouvoir électrodonneur du céfotaxime, en particulier à celui des atomes d'azote et de soufre. L'analyse des spectres RMN du céfotaxime montre que la molécule de départ est seule identifiable dans le produit irradié.

La littérature (47) rapporte que de nombreuses impuretés existent dans la poudre de céfotaxime avant irradiation, notamment l'isomère anti du céfotaxime par rapport à la fonction aminothiazole, l'acide thiazoximique, l'acide amino-7 céphalosporanique, le dimère du céfotaxime, le N-formyl céfotaxime, la lactone céfotaxime et les dérivés desacetylés et desacetoxylés du céfotaxime. Un certain nombre d'impuretés créées lors de l'ionisation gamma existaient donc auparavant.

Nous avons également effectué les spectres de RPE du céfuroxime irradié par des rayons gamma. Il n'y a pas de pic nettement visualisable pour cette molécule. Les radicaux libres produits pendant l'irradiation ne sont donc pas stables ou sont en quantité insuffisante dans cette forme pulvérulente.

Les différences chimiques entre le céfotaxime et le céfuroxime peuvent expliquer ce résultat, au niveau des radicaux produits ou au niveau de leur stabilisation dans la forme pulvérulente. Cette molécule diffère du céfotaxime par le remplacement d'un noyau aminothiazole par un noyau furane et d'un méthyle par une amine (figure 38). De récents travaux indiquent que l'intensité du message RPE du céfuroxime est inférieure d'un facteur 20 à celle du céfotaxime. Ils attribuent cette différence à la conjugaison inférieure du céfuroxime. Ces radicaux libres sont également moins stables que ceux du céfuroxime (19, 46).

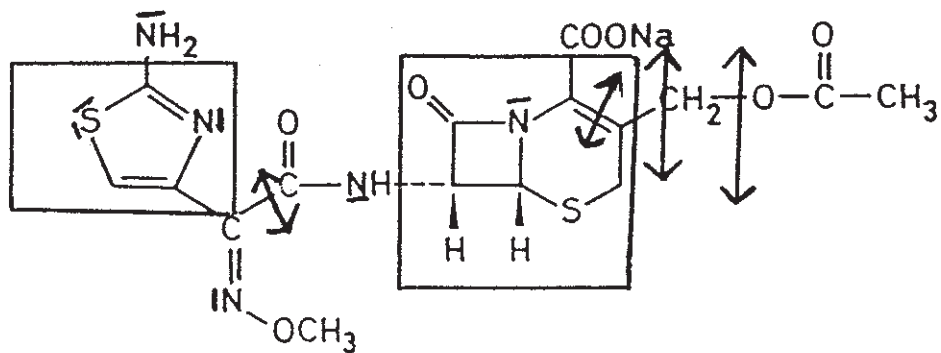


Figure 37 - Formule chimique du céfotaxime (1)

Les cycles participant à la mésomérie, stabilisant les radicaux libres, sont encadrés. Les ruptures chimiques provoquées par les rayons gamma sont indiquées par des flèches.

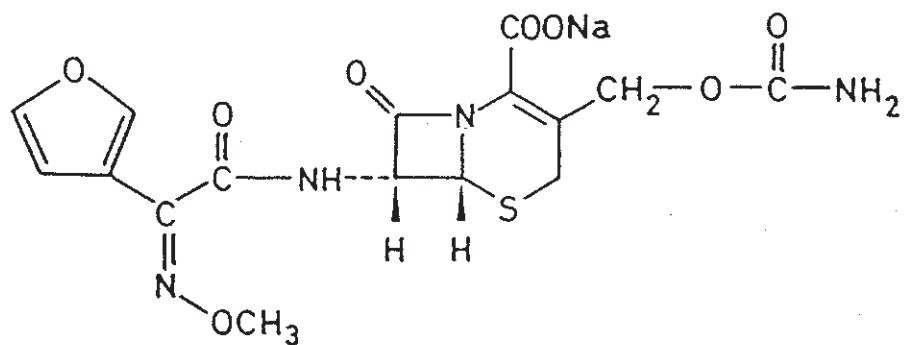


Figure 38 - Formule chimique du céfuroxime (8)

CONCLUSION

Nous avons étudié dans cette thèse la radiostérilisation gamma du céfotaxime, un principe actif pulvérulent et coûteux. Après irradiation à différentes doses, nous avons effectué une étude par Résonance Paramagnétique Electronique à température ambiante des radicaux libres produits. Ces radicaux libres sont stables sous forme solide. Il existe une relation linéaire entre la dose d'irradiation et l'intensité du spectre de RPE. Une dosimétrie par cette méthode sensible et spécifique est donc réalisable. Les radicaux libres produits sont stables pendant plusieurs jours. Le pouvoir "scavenger" de cette molécule a également été démontré par compétition avec la DMPO. Enfin, l'activité antibiotique de cette molécule a été mesurée par détermination de la CMI sur trois souches bactériennes. Il n'a pas été trouvé de différence significative entre le produit non irradié et le céfotaxime irradié à 4 kGy, dose jugée stérilisante par certains auteurs si la contamination microbienne de départ est faible. Par contre une différence significative a été notée pour la souche de *Staphylococcus aureus*, montrant une diminution d'activité du céfotaxime irradié à 25kGy, dose conseillée par la Pharmacopée française, par rapport au céfotaxime non irradié. Cependant les radicaux libres formés n'ont pu être individualisés et leurs structures moléculaires comme celles des dérivés secondaires de la radiolyse demeurent inconnues. La littérature (46) rapporte des études sur la nature des impuretés créées par l'irradiation gamma mais n'identifie pas les radicaux libres détectables en RPE. Une étude plus poussée, en particulier en irradiant et en effectuant les spectres RPE à très basses températures ainsi qu'en stabilisant les radicaux libres par des méthodes de "spin-trapping" et en les séparant par HPLC pour les détecter par RPE serait souhaitable. Une fois leur structure connue, des études pharmacotoxicologiques devraient être effectuées pour que la radiostérilisation gamma du céfotaxime apparaisse envisageable.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - Claforan* - céfotaxime. Informations comparatives à l'attention des pharmaciens des hopitaux- Laboratoires Roussel.
- 2 - PERRONET J.- Le céfotaxime, céphalosporine d'hémisynthèse de la nouvelle génération.- La nouvelle presse médicale, 1981, 10, (8).
- 3 - Vidal , OVP édition du Vidal , Paris 1995.
- 4 - VAN LANDUYT H. W., PUYCKAVET M.- In vitro activity of cefotaxime against cephalotin resistant clinical isolates. Antimicrob. Agent. Chemo., 1979, 16 (1) , p. 109-111.
- 5 - SOSNA J., MURREY P., MEDOFF G. - Comparison of the in vitro activities of the HH 756 with other cephalosporin. Antimicrob. Agent. Chemo., 1978, 14 (16) , p. 876-879.
- 6 - Les points forts du 15ème ICC; Istanbul, Juillet 1987 - Adis, Manchester 1987.
- 7 - MICOUD M. ABCD du Claforan* - La lettre de l'infectiologue, 1993, Hors-série , p 3- 39.
- 8 - Informations à l'attention des pharmaciens hospitaliers sur le céfuroxime. Laboratoire Glaxo.
- 9 - LE HIR A.- Pharmacie galénique - Paris, Masson, 1992, 385 p.
- 10 - Pharmacopée française, 9ème et 10 ème éditions, Adrapharm, Maisonneuve, Paris.

- 11 - GALTIER F.- Hygiène Hospitalière Pratique - Paris, Technique et documentation, 1988.
- 12 - HENON Y and PELLET M.- Sterilization by irradiation of pharmaceuticals in INTERNATIONAL STERILIZATION CONFERENCE, 1994, Rome.
- 13 - British Pharmacopeia - Her Majesty' s stationery office, 1988, London.
- 14 - United State Pharmacopeia. The national formulary convention. Rond Mac Naly, 1995. Taunto.
- 15 - ZEEGERS F., CRUCQ AS., GIBELLA M. et TILQUIN B.- Radiolyse et radiostérilisation des médicaments.- Journal de chimie physique, 1993 , 90, p. 1029- 1040.
- 16 - TILQUIN B. - Radiostérilisation de médicaments.- Pharm. Belg.; 1991, 46 (6) , p. 396-398.
- 17 - TILQUIN B., ZEEGERS F.- Radiolyse de médicaments : cas du chloramphénicol.- J. Chim. Phys. , 1991, 88, p. 1137- 1145.
- 18 - HENON Y.-Décontamination microbienne des plantes médicinales par rayonnement gamma - Gammaster Provence s. a., Marseille.
- 19 - DAM A. M., GAZSO L. G., KAEWPILA S. and MASCHEK I. - Radiation sterilization dose calculation for heparin and apronitin based ISO Method 1. Int. J. Pharm., 1995, 121, p.245-248.
- 20 - JACOBS G. P.- A review : radiation sterilization of pharmaceuticals.- Radiat; Phys. Chem., 1985 , 26 (2), p. 133- 142.

- 21 - MIYAZAKI T., ARAI J. , KANEKO T., YAMAMOTO K., GIBELLA M. and TILQUIN B. Estimation of irradiation dose of radiosterilized antibiotics by electron spin resonance : Ampicillin. J. Pharm. Sci., 1994, 83 (11), 1643-1644.
- 22 - JAUFFRIT J. - A. Encapsulation de *Salmonella Typhimurium* et infection de bovins. Rapport de DESS de Pharmacotechnie vétérinaire, Limoges, 1993-1994 , p. 25.
- 23 - GOPAL N. G. S.- Radiation sterilization of pharmaceuticals and polymers.- Radiat. Phys. Chem. , 1978 , 12, p. 35- 50.
- 24 - SEBERT P., BOURNY B. and ROLLET M.- Gamma irradiation of carboxymethylcellulose : technological and pharmaceuticals aspects.- Int. J. Pha , 1994, 106, p. 103 - 108.
- 25 - EL-BAGORY I., REID B. D. and MITCHELL A. G.- The effect of gamma radiation on the tableting properties of some pharmaceuticals excipients.- Int. J. Pha , 1994, 105, p. 255 - 258.
- 26 - CRIPPA P. R. and TEDESCHI R.- The secondary effects of sterilization of the rifampicin by gamma irradiation.- Farmaco Ed. Prat. , 1973, 28, n° 4, p. 226-232.
- 27 - CHABOT J.- Mise en évidence d'une corrélation entre l'activité anti-inflammatoire et le pouvoir électrodonneur de phénothiazines. Recherche d'une activité antiradicalaire., Thèse de doctorat en pharmacie, Limoges, 1995.
- 28 - HALLS N - The microbiology of irradiation sterilization.- Medical device technology. , 1992.
- 29 - DUCLOUX G.- Les radicaux libres.- Lille médical. , 1989, 29, n° 7, p. 295- 303.

- 30 - Mesure des radicaux libres dans les milieux biologiques.- Club d'étude des radicaux libres en biologie. Compte rendu de conférences, Grenoble, 1991.
- 31 - CEROU S., Radicaux libres et pathologie humaine : actualisation et perspectives d'avenir, Thèse de doctorat en pharmacie, Limoges, 1994.
- 32 - ERCELIK A. , Synthèses et études en RPE de nouvelles nitrones dérivées de la DMPO comme agent de spin-trapping. Thèse de doctorat en pharmacie, Limoges 1995.
- 33 - BUNCE N. J. - Introduction to the interpretation of E. R. S.- J. Chem. Educ. , 1987, 64, (11) , p.907 - 914.
- 34 - LAFFOND S.- Actualité des radicaux libres.- Thèse de doctorat en pharmacie , Limoges, 1992.
- 35 - TRE S. E.- Les excipients des préparations injectables et leur stérilisation par rayonnement gamma.- Thèse de doctorat en pharmacie , Limoges, 1994.
- 36 - CHACHATY C.- Spectrométrie par R. M. N. et par R. P. E.- Tech. de l'ingénieur, 1984, p.2885 -1 - 8.
- 37 - Recommandations du comité de l'antibiogramme de la société française de Microbiologie.- Bull. Soc. Fr. Microbiol., 1993, 8 (3).
- 38 - MIAZAKI T. and TILQUIN B.- ESR study of radiosterilization of antibiotics : ceftazidine.- J. Pharm. Scien. , 1994 , 83, n° 1, p.68-71.
- 39 - YANG G. C. and ASZOLAS A.- ESR of antibiotics.- Drugs Pharm. S. 1986, 27, p. 183-196.

40 - CRUCQ A. S., GIBELLA M. et TILQUIN B.- Détection RPE de l'irradiation de médicaments.- Journal de chimie physique. ,1993 , 90, p. 1041- 1053.

41 - LABRO M. T.- Cefdinir, a new oral amino-2-thiazolyl cephalosporin inhibits human neutrophil myeloperoxidase in the extracellular medium but not the phagolysosome.- J. Immun. , 1993, 2 , p. 2447 - 2455.

42 - AMARTI H. , Modulation de l'activité antiradicalaire d'un inhibiteur de l'enzyme de conversion, le captopril, par alkylation d'un groupement thiol -Evaluation par RPE. Thèse de doctorat en pharmacie Limoges 1995.43 - RAFFI J., THIERY C., TRIOLET J.- Etude par résonance paramagnétique électronique de saccharides soumis à un rayonnement gamma.- Journal de chimie physique. ,1993 , 90, p. 1009- 1019.

44 - TRIOLET T. and AGNEL J. P.- ESR spin-trapping analysis of gamma induced radicals in sucroses.- 1990, 10 (2) , p. 57- 61.

45 - STRONCKS H., JANZEN E. and XEBER J.- ESR détection of PPN spin adduct. Anal. Let. 1994, 17, p. 321-328.

46 - SIGNORETTI E. C. , VALVO L., FATTIBENE P. , ONORI S. and PANTALONI M. Gamma irradiation induced effects on cefuroxime and cefotaxime investigation on degradation and syn-anti isomerization. Drug Dev. Ind. Pharm., 1994, 20 (16), 2493 - 2508.

47 - Documents mis à disposition personnelle, Roussel-Uclaf.

48 - MIYAZAKI T., KANEKO T. , YOSHIMURA T. , CRUCQ A. S. and TILQUIN B. ESR study of radiosterilization of antibiotics : ceftadizime. J. Pharm. Sci.,1994, 83 (1), 68 - 71.

49 - MOURAD T. - Etude du PMMA dopé au squaléne en vue de son utilisation comme "chronodosimètre" dans le domaine de l'ionisation des aliments et de la stérilisation du matériel médico-pharmaceutique par rayonnements ionisants. Thèse d'université, Pharmacie Limoges 1995.

Table des matières

PLAN	9
INTRODUCTION	11
PREMIERE PARTIE : PRESENTATION BIBLIOGRAPHIQUE	13
1.1 Présentation du céfotaxime et du céfuroxime.....	14
1.1.1 Le céfotaxime-Claforan*.....	14
1.1.2 Le céfuroxime- Zinnat*.....	19
1.2 Les différentes méthodes de stérilisation.....	25
1.2.1 Généralités.....	25
1.2.1.2 La stérilisation par la chaleur.....	26
1.2.1.3 La filtration stérilisante.....	27
1.2.1.4 La stérilisation par les gaz.....	28
1.2.2. La radiostérilisation.....	30
1.2.2.1 Deux types de rayonnements : béta et gamma.....	30
1.2.2.2 Applications.....	34
1.3 Les radicaux libres.....	48
1.3.1 Définition.....	48
1.3.2 Les radicaux libres oxygénés.....	49
1.3.3 La biologie des radicaux libres.....	53
1.4 Etude spectroscopique par Résonance Paramagnétique Electronique.....	58
1.4.1 Principe généraux.....	58
1.4.2 Appareillage.....	64
1.5 Méthodes de dosage microbiologique et détermination de l'activité d'un antibiotique par mesure de la CMI et de la CMB.....	65
1.5.1 Titrage d'un antibiotique selon la Pharmacopée Française.....	65
1.5.2 détermination de la CMI et de la CMB d'un antibiotique.....	66
DEUXIEME PARTIE : MATERIELS ET METHODES	67

2.1 La radiostérilisation.....	68
2.1.1 L'ionisateur IBL 460.....	68
2.1.2 L'ionisation.....	68
2.2 Dosimétrie par RPE.....	68
2.3 Mesure du pouvoir scavenger du céfotaxime.....	70
2.4 Mesures de la CMI.....	73
2.4.1 Souches utilisées.....	74
2.4.2 Milieux de cultures.....	74
2.4.3 Les inoculums.....	75
2.4.4 Les solutions de céfotaxime.....	76
2.4.5 Protocole de détermination de la CMI.....	78
TROISIEME PARTIE : RESULTATS EXPERIMENTAUX.....	80
3.1 Dosimétrie du céfotaxime irradié par les rayons gamma.....	81
3.2 Pouvoir scavenger du céfotaxime.....	84
3.3 Résultats des mesures de CMI.....	89
3.3.1 Résultat des dénombrements.....	89
3.3.2 Résultats des mesures de CMI.....	90
3.4 Autres caractères étudiés.....	94
3.4.1 Résonance Magnétique Nucléaire.....	94
3.4.2 Irradiation du céfuroxime.....	96
3.4.3 Caractères divers.....	97
QUATRIEME PARTIE : DISCUSSION.....	99
CONCLUSION	106
BIBLIOGRAPHIE.....	108

AUSSEUR (Thierry). — Traitement du céfotaxime par radiostérilisation gamma : Recherche des effets produits. Détection par résonance paramagnétique électronique des radicaux libres formés. Modification des valeurs de concentration minimale inhibitrice. — 127 f. ; ill. ; tabl. 30 cm. (Thèse : Pharm. ; Limoges ; 1995).

RESUME :

L'irradiation par les rayons gamma est actuellement largement utilisée pour stériliser le matériel médico-chirurgical et décontaminer les matières premières dans les industries pharmaceutique et agroalimentaire. Son développement apparaît aujourd'hui envisageable pour la stérilisation des médicaments.

Nous avons étudié l'application des rayons gamma à la stérilisation du céfotaxime, un principe actif pulvérulent. Différentes doses d'irradiation ont été appliquées ; la résonance paramagnétique électronique (RPE) nous a permis d'effectuer la dosimétrie des radicaux libres formés en identifiant la relation linéaire entre l'intensité du spectre RPE et la dose d'irradiation. Le pouvoir capteur de radicaux libres de cette molécule a été démontré. L'étude du spectre RPE du céfotaxime a montré qu'il se modifiait au cours du temps en gardant une intensité maximale sensiblement constante. Le céfuroxime a également été irradié et les spectres de RPE obtenus comparés avec ceux du céfotaxime. En fait la réponse est quasiment nulle avec cette molécule. La différence de structure chimique entre les deux céphalosporines influencerait donc sur la stabilité des radicaux libres produits par l'irradiation.

Des mesures de concentration minimale inhibitrice ont été effectuées sur trois souches de référence, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*. Elles semblent montrer une diminution d'activité du céfotaxime irradié à 25 kGy sur une seule souche, mais pas à 4 kGy, dose que certains auteurs jugent stérilisante.

Ces premiers résultats sont intéressants, mais une étude plus fondamentale serait nécessaire avant d'utiliser cette méthode de stérilisation dans l'industrie pharmaceutique.

MOTS-CLES :

- Céfotaxime.
- Céfuroxime.
- Radiostérilisation.
- Rayons gamma.
- RPE.
- Radicaux libres.
- DMPO.
- CMI.

JURY : Président : Madame le Professeur BOSGIRAUD.
Juges : Monsieur DUROUX, *Maître de Conférences*.
Monsieur LAGORCE, *Maître de Conférences*.
Monsieur AUXEMERY, *Pharmacien industriel*.