

Faculté de Pharmacie

Année 2018

Thèse N°

Thèse pour le diplôme d'État de docteur en Pharmacie

Présentée et soutenue publiquement

Le 23 octobre 2018

Par Julien Ami

Né(e) le 21 janvier 1989 à Limoges

Stérilité des préparations injectables hospitalières de 5-Fluorouracile : recherche d'une méthode alternative à l'essai de stérilité de la Pharmacopée Européenne

Thèse dirigée par le docteur Guillaume BOUGUEON

Examineurs :

Madame Marylène VIANA, Professeur des Universités

Madame Sylvie CRAUSTE-MANCIET, Professeur des Universités – Praticien
Hospitalier

Madame Aude BERRONEAU, Praticien Hospitalier

Monsieur Guillaume BOUGUEON, Assistant Hospitalo-Universitaire



Liste des enseignants

Le 1^{er} septembre 2017

PROFESSEURS :

BATTU Serge	CHIMIE ANALYTIQUE
CARDOT Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
DESMOULIERE Alexis	PHYSIOLOGIE
DUROUX Jean-Luc	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
FAGNERE Catherine	CHIMIE THERAPEUTIQUE - CHIMIE ORGANIQUE
LIAGRE Bertrand	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
MAMBU Lengo	PHARMACOGNOSIE
ROUSSEAU Annick	BIOSTATISTIQUE
TROUILLAS Patrick	CHIMIE PHYSIQUE - PHYSIQUE
VIANA Marylène	PHARMACOTECHNIE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES :

PICARD Nicolas	PHARMACOLOGIE
ROGEZ Sylvie	BACTERIOLOGIE ET VIROLOGIE
SAINT-MARCOUX Franck	TOXICOLOGIE

ASSISTANT HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES :

CHAUZEIX Jasmine	HEMATOLOGIE (Renouvelé jusqu'au 1 ^{er} novembre 2018)
JOST Jérémy	PHARMACIE CLINIQUE (1 ^{er} novembre 2016 pour 2 ans)

MAITRES DE CONFERENCES :

BASLY Jean-Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
BEAUBRUN-GIRY Karine	PHARMACOTECHNIE



BILLET Fabrice	PHYSIOLOGIE
CALLISTE Claude	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
CHEMIN Guillaume	BIOCHIMIE FONDAMENTALE
CLEDAT Dominique	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
COMBY Francis	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
COURTIOUX Bertrand	PHARMACOLOGIE, PARASITOLOGIE
DELEBASSEE Sylvie	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE-IMMUNOLOGIE
DEMIOT Claire-Elise	PHARMACOLOGIE
FROISSARD Didier	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGAMIE
GRIMAUD Gaëlle	CHIMIE ANALYTIQUE ET CONTROLE DU MEDICAMENT
JAMBUT Anne-Catherine	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
LABROUSSE Pascal	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGAMIE
LEGER David	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
MARION-THORE Sandrine	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
MARRE-FOURNIER Françoise	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
MERCIER Aurélien	PARASITOLOGIE
MILLOT Marion	PHARMACOGNOSIE
MOREAU Jeanne	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE-IMMUNOLOGIE
MUSUAMBA TSHINANU Flora	PHARMACOLOGIE
PASCAUD Patricia	PHARMACIE GALENIQUE – BIOMATERIAUX CERAMIQUES
POUGET Christelle	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
VIGNOLES Philippe	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE

ATTACHE TEMPORAIRE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE :

BONNET Julien PHARMACOLOGIE
(01.10.2016 au 31.08.2018)

LAVERDET Betty (1.09.2016 au 31.08.2017)
PHARMACIE GALENIQUE

PROFESSEURS EMERITES :

BUXERAUD Jacques (jusqu'au 30/09/2019)

DREYFUSS Gilles (jusqu'au 30/09/2019)

MOESCH Christian (1^{er} janvier 2017 - 1^{er} janvier 2019)

Remerciements

A Madame la présidente du jury

Le Professeur Marylène VIANA

Vous m'avez fait l'honneur d'avoir accepté de présider cette thèse malgré mon éloignement de Limoges

Soyez assurée de ma profonde gratitude

A Monsieur le directeur de thèse

Au Docteur Guillaume BOUGUEON

Je te remercie énormément pour ton travail et ton implication dans mon encadrement

Je te suis énormément reconnaissant

Aux membres du jury

Au Professeur Sylvie CRAUSTE-MANCIET

Je vous remercie énormément pour avoir accepté que je puisse réaliser une thèse avec vous.

Soyez assuré de mon sincère respect et de ma reconnaissance

Au Docteur Aude BERRONEAU

Un grand merci pour cette année de travail où votre sourire et votre bonne humeur conféraient à cette unité un cadre vraiment plaisant où travailler. Je vous remercie franchement pour avoir pris le temps de répondre à mes nombreuses questions ce qui m'a permis de me projeter vers mes responsabilités futures.

Aux personnes qui m'ont aidé dans ce travail

Au Professeur Véronique DUBOIS

Je vous remercie franchement pour votre aide apportée dans cette thèse. La conception et la réalisation de ces manipulations vous doivent beaucoup. Vous trouverez dans ces lignes l'expression de ma profonde gratitude.

A Jean-Marc

Merci beaucoup pour tes conseils, ta bonne humeur et ton humour.

Au service de stérilisation

Pour l'aide apportée dans la réalisation de mes manipulations

Aux membres de l'URC

Aux Assistants

Pour leurs encadrements et la transmission de leurs savoirs

Aux préparateurs

Pour l'excellente ambiance de travail et l'accueil fait aux internes

A mes co-internes

Pour tout

A mes amis

Ceux de Boyne

Pour une merveilleuse enfance

A la fine équipe de Limoges : Félicie, Jérémie, Jean-Charles et Simon

Pour ces années sur Limoges. Grâce à vous le départ de Limoges a été fait à regret.

A ma famille

Mon père, ma mère, mes frères et Evelyne et sa famille

A mes grands parents

A mes cousins, mes oncles et tantes

Merci

A ma Chérie

Pour ces merveilleuses années ensemble, que notre histoire continue et que le nouveau chapitre en Oise soit plein de joie et de bonheur.

Droits d'auteurs

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »

disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>

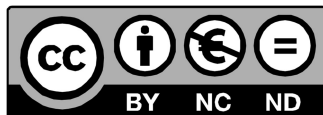


Table des matières

Table des annexes	15
Introduction	16
I. La stérilité des préparations parentérales	18
I.1. Historique.....	18
I.1.1. Histoire des préparations parentérales	18
I.1.2. Brève histoire des médicaments anticancéreux.....	21
I.2. La stérilité des médicaments injectables	21
I.2.1. Définitions	21
I.2.2. Méthodes de stérilisation	23
I.2.2.1. La stérilisation par la chaleur humide	23
I.2.2.2. La stérilisation par irradiation	24
I.2.2.3. La filtration sur membrane.....	25
I.2.2.4. La stérilisation à l'aide de gaz	26
I.3. La fabrication en conditions aseptiques	27
I.4. Essai de stérilité selon la Pharmacopée Européenne	29
I.5. Essai de fertilité.....	31
I.6. Méthodes de microbiologie rapides reconnues par la Pharmacopée Européenne	32
I.7. Le BacT/ALERT®	36
I.8. Micro-organismes environnementaux et préparation de médicaments.....	38
I.8.1. Généralités	38
I.8.2. Les micro-organismes viables mais non cultivables.....	40
II. Effets des anticancéreux sur les micro-organismes.....	46
II.1. Recherche d'effets antimicrobiens des anticancéreux.....	46
II.2. Etudes de viabilité des micro-organismes en contact avec des anticancéreux.....	47
II.3. Le 5-Fluorouracile	51
III. Travaux personnels	55
III.1. Méthodologie	55
III.1.1. Méthodologie générale	55
III.1.2. Méthodologie de mes travaux personnels	57
III.2. Matériel et méthode	58
III.2.1. Essai de solubilité de l'uracile.....	58
III.2.1.1. Essai de solubilité de l'uracile dans le 5-Fluorouracile.....	59
III.2.1.2. Essai de solubilité de l'uracile dans l'hydroxyde de sodium.....	59
III.2.2. Mesure du pH.....	59
III.2.3. Recherche des concentrations minimales inhibitrices du 5-fluorouracile.....	60
III.2.3.1. Etude préliminaire	61
III.2.3.2. Etudes de concentration minimales inhibitrices par séries de dilutions au dixième	61
III.2.3.3. Etudes comparatives de concentration minimale inhibitrice entre le 5-fluorouracile et les mélanges de 5-fluorouracile et d'uracile	62
III.2.3.4. Etudes de concentration minimales inhibitrices du 5-fluorouracile en présence d'uracile en excès	62
III.2.4. Extrapolation au BacT/ALERT®	63
III.3. Résultats et discussions.....	64

III.3.1. Essai de solubilité de l'uracile	64
III.3.1.1. Essai de solubilité de l'Uracile dans le 5-Fluorouracile	64
III.3.1.2. Essai de solubilité de l'uracile dans l'hydroxyde de sodium	64
III.3.2. Mesures du pH	67
III.3.3. Etude de concentrations minimales inhibitrices du 5-Fluorouracile	67
III.3.3.1. Etude préliminaire	67
III.3.3.2. Etudes de concentration minimales inhibitrices du 5-fluorouracile par séries de dilutions aux dixièmes	68
III.3.3.3. Etudes comparatives de concentration minimales inhibitrices entre le 5-fluorouracile et les mélanges de 5-fluorouracile et d'uracile en concentrations équimolaires	70
III.3.3.4. Etudes de concentrations minimales inhibitrices de 5-Fluorouracile avec excès d'Uracile	74
III.4. Discussion générale.....	75
Conclusion	79
Références bibliographiques	80
Serment De Galien.....	98

Table des illustrations

Figure 1 : Schéma de l'expérience du col de cygne de Louis Pasteur	19
Figure 2 : Ampoules médicamenteuses à sérum	20
Figure 3 : Autoclave de Chamberland.....	23
Figure 4 : Stérilisateur de chaleur sèche – Tau Steril 200	24
Figure 5 : Stérilisateur par rayonnement gamma alimenté par du Co ⁶⁰	25
Figure 6 : Cartouches de filtration hydrophiles – express SIGMA-MERCK®.....	25
Figure 7 : Stérilisateur médical à l'oxyde d'éthylène	26
Figure 8 : Pompe STERITEST EQUINOX®.....	30
Figure 9 : Rampe de filtration	30
Figure 10 : Composition du milieu liquide au thioglycolate.....	31
Figure 11 : Composition du milieu liquide à l'hydrolysate de caséine et de soja.....	31
Figure 12 : Automate BacT/ALERT® 3D	36
Figure 13 : Principe de détection du BacT/ALERT® 3D.....	37
Figure 14 : Morphologie des principaux micro-organismes	39
Figure 15 : Graphique comparant le nombre de cellules viables au nombre de cellules cultivables de <i>Vibrio vulnificus</i> lors d'une incubation à 5°C.....	42
Figure 16 : Comparaison d'une culture de <i>Campylobacter jejuni</i> croissante (A) avec une culture de <i>Campylobacter jejuni</i> déclinante (C).....	43
Figure 17 : Bactéries pathogènes connues pour entrer en état viable mais non cultivable.....	44
Figure 18 : Viabilité de micro-organismes dans le 5FU à la concentration de 50 mg/ml	48
Figure 19 : Evolution de la viabilité des micro-organismes dans une poche de NaCl 0,9% au cours du temps	49
Figure 20 : Formule semi-développée du 5-fluorouracile.....	51
Figure 21 : Mécanisme d'action du 5 fluorouracile	52
Figure 22 : Inhibition de la croissance de <i>E. coli</i> par le 5FU. Récupération de cette croissance en présence d'uracile et/ou de thymine	53
Figure 23 : Schéma de dilution en cascade.....	62
Figure 24 : Graphique de la solubilité de l'uracile en mg/ml en fonction de la normalité du NaOH.....	65
Figure 25 : Résultats de la série 3 de NaOH 0,25N chez <i>Staphylococcus aureus</i>	70
Figure 26 : Résultats de la série 3 de NaOH 0,25 N chez <i>Bacillus subtilis</i>	71
Figure 27 : Résultats de la série 3 de NaOH 1N chez <i>Aspergillus brasiliensis</i>	72

Figure 28 : Graphique regroupant les données des études de CMI.....73

Liste des Abréviations

5FU : 5 – Fluorouracile

ADN : Acide désoxyribonucléique

AMM : Autorisation de mise sur le marché

ARNm : Acide ribonucléique messenger

ATC : Anatomique, thérapeutique et chimique

CMI : Concentration minimale inhibitrice

CO₂ : Dioxyde de carbone

DCI : Dénomination commune internationale

EPPI : Eau pour préparation injectable

FDA : Food and Drug Administration

IUPAC = UICPA : Union internationale de chimie pure et appliquée

NaOH : Hydroxyde de sodium

O₂ : Dioxygène

OCDE : Organisation de coopération et développement économiques

OMS : Organisation mondiale de la santé

PCR = APC : Amplification en chaine par polymérase

POCT : *Point-of-care test*

PUI : Pharmacie à usage intérieur

UFC : Unité formant colonie

USP : United States' pharmacopeia

VMNC : Viables mais non cultivable

ZAC : Zones à atmosphère contrôlée

Table des tableaux

Tableau I : Caractéristiques particulières des différentes Zones à Atmosphère Contrôlées	28
Tableau II : Recommandations pour la surveillance microbiologique des Zones à Atmosphère Contrôlée en activité	28
Tableau III : Quantité minimale à utiliser pour chaque milieu retenus pour réaliser l'essai de stérilité	29
Tableau IV : Souches des micro-organismes appropriées pour les essais de fertilité et d'applicabilité de la méthode de la Pharmacopée Européenne	32
Tableau V : Récapitulatif des caractéristiques des germes de référence de la Pharmacopée Européenne	40
Tableau VI : Récapitulatif de l'existence d'effets antimicrobiens de molécules anticancéreuses	50
Tableau VII : Récapitulatif des effets du 5-Fluorouracile sur les germes de la Pharmacopée Européenne	54
Tableau VIII : Conception des solutions de mélange de 5FU et d'uracile en excès.	63
Tableau IX : Résultats de l'essai de solubilité de l'uracile dans le 5FU	64
Tableau X : Résultats des essais de solubilité de l'uracile dans le NaOH 1N	64
Tableau XI : Résultats des essais de solubilité de l'uracile dans le NaOH 0,5N	65
Tableau XII : Essais de solubilisation de l'uracile dans le NaOH0,25N	65
Tableau XIII : Récapitulatif des solubilités de l'uracile dans le NaOH	65
Tableau XIV : Conception des solutions pour les mesures du pH et études de CMI	66
Tableau XV : Résultats des essais de mesures de pH	67
Tableau XVI : Résultat de l'étude préliminaire de la CMI du 5FU sur <i>Staphylococcus aureus</i>	67
Tableau XVII : Résultat de l'étude préliminaire de la CMI du 5FU sur <i>Aspergillus brasiliensis</i>	67
Tableau XVIII : Résultats de l'étude préliminaire de la CMI du 5FU sur <i>Bacillus subtilis</i>	68
Tableau XIX : Résultats de l'étude de CMI du 5FU par dilution aux dixièmes sur le <i>Staphylococcus aureus</i>	68
Tableau XX : Résultats de l'étude de CMI du 5FU par dilution aux dixièmes sur le <i>Bacillus subtilis</i>	69
Tableau XXI : Résultats de l'étude de CMI du 5FU par dilution aux dixièmes sur <i>Aspergillus brasiliensis</i>	69
Tableau XXII : Résultat de l'étude comparative de CMI sur <i>Staphylococcus aureus</i>	70
Tableau XXIII : Résultats de l'étude comparative de CMI chez <i>Bacillus subtilis</i>	71

Tableau XXIV : Résultats de l'étude comparative de CMI chez <i>Aspergillus brasiliensis</i>	72
Tableau XXV : Résultats de l'étude de CMI d'un mélange 5FU et Uracile avec Uracile en excès chez <i>Staphylococcus aureus</i>	74
Tableau XXVI : Résultats de l'étude de CMI d'un mélange 5FU et Uracile avec Uracile en excès chez <i>Bacillus subtilis</i>	74
Tableau XXVII : Résultats de l'étude de CMI d'un mélange 5FU et Uracile avec Uracile en excès chez <i>Aspergillus brasiliensis</i>	75

Table des annexes

Annexe 1. Délais de détection des micro-organismes de la Pharmacopée Européenne au moyen du dispositif BacT/ALERT®.....	90
Annexe 2. Tableau récapitulatif des effets documentés des anticancéreux sur les micro-organismes	92

Introduction

Les pharmacies à usage intérieur (PUI), sont chargées de la gestion, l'approvisionnement, la détention et la dispensation des médicaments (1) pour le ou les établissements de santé auxquels elles sont rattachées. Parmi ces médicaments se trouvent les préparations magistrales et hospitalières. Leur fabrication peut être sous-traitée (2). Les PUI n'ont pas le droit de fabriquer des médicaments pour lesquels il existe une équivalence dans l'industrie pharmaceutique (3).

Depuis les années 2000, les médicaments anticancéreux sont reconstitués et préparés dans des unités de reconstitution centralisées (URC) sous la responsabilité d'un pharmacien. Cette centralisation des fabrications permet une optimisation des conditions de production d'un point de vue qualité, sécurité et économique. Ces médicaments pour injection parentérale doivent être stériles (4) car tout micro-organisme présent dans ces médicaments est potentiellement source d'infections. La stérilité des préparations est garantie par la préparation en conditions aseptiques (5).

Au Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Bordeaux, l'activité de l'URC de l'hôpital du Haut-Lévêque augmente progressivement : entre l'année 2015 (47559 préparations) et l'année 2017 (54446 préparations) il y a eu une augmentation de 14,5% d'activité. Cette augmentation de l'activité est notamment due à un développement des activités de sous-traitance pour la clinique du Tondu et un développement de l'hospitalisation à domicile. Devant cette augmentation de production, des préparations standard de chimiothérapie ont été mises en place pour les services de gastro-entérologie, pour les molécules suivantes : 5-fluorouracile, gemcitabine, irinotécan et oxaliplatine. Une concertation avec les prescripteurs et une analyse de l'historique des prescriptions a conduit à la prescription selon la méthode de « Dose-Banding. » (6).

Le fonctionnement actuel, dans les services de gastro-entérologie, repose sur la prescription et la validation anticipée des cures de chimiothérapies. La fabrication des produits est réalisée de façon anticipée, pour les produits stables, la veille de la venue du patient. Pour le 5-fluorouracile, la gemcitabine, l'irinotécan et l'oxaliplatine, des doses standard sont produites en série grâce au « Module standard » du logiciel CHIMIO®. Ces doses standards sont ensuite attribuées aux patients. Afin d'optimiser cette pratique, nous souhaitons réaliser ces préparations en lots.

Lorsque la taille du lot ne permet pas de suivre les demandes de la Pharmacopée Européenne au niveau de la réalisation d'essais, le risque associé à la stérilité est évalué par le pharmacien (5). Mais ce n'est pas le cas des lots de préparations magistrales de médicaments injectables que nous souhaitons réalisés (nombre d'unités galéniques par lot < 300). Ces préparations réalisées en lots doivent satisfaire à un essai de stérilité tel que défini au chapitre 2.6.1 de la Pharmacopée Européenne (7). Pour que l'essai de stérilité soit valide, il faut, qu'après 14 jours d'incubation, aucune croissance microbienne ne soit observable visuellement dans les milieux utilisés.

Cette période de quarantaine de 14 jours est trop importante pour notre objectif de préparation en lots car la péremption sera de l'ordre du mois (8). Il nous faut donc trouver une méthode permettant de prouver la stérilité de façon plus rapide afin de gagner du temps. Il existe des méthodes de microbiologie rapides qui sont reconnues par la Pharmacopée Européenne comme étant des alternatives possibles à l'essai de stérilité (9). Parmi ces

méthodes, le BacT/ALERT® est déjà utilisé en routine pour le suivi de la stérilité des préparations de nutrition parentérale et d'aciclovir (10,11).

L'objet de cette thèse est de rechercher une méthode alternative à la méthode de la Pharmacopée Européenne qui permettra de démontrer, dans un délai court, la stérilité des préparations que l'on fabriquera en lots. Parmi les molécules que nous utilisons pour faire des séries, le 5-fluorouracile est celle qui possède l'activité antibactérienne la plus marquée sur les micro-organismes utilisés dans l'essai de stérilité de la Pharmacopée Européenne (12). C'est donc sur cette molécule que je vais travailler.

Cette thèse présentera dans un premier temps les moyens utilisés pour garantir la stérilité des préparations médicamenteuses. Les effets des anticancéreux sur les micro-organismes seront abordés dans une seconde partie. Enfin, je présenterai mes travaux personnels.

I. La stérilité des préparations parentérales

Au sein de l'URC les anticancéreux préparés sont sous forme parentérale. « *Les préparations parentérales sont des préparations stériles destinées à être injectées, perfusées ou implantées dans le corps humain ou animal* »(4).

J'aborderai dans cette partie la stérilité de ces formes pharmaceutiques.

I.1. Historique

Je vais d'abord parler dans une première partie de l'histoire des préparations parentérales et ensuite faire une brève histoire des anticancéreux.

I.1.1. Histoire des préparations parentérales

Le terme parentéral vient du grec « para » qui signifie « à côté de » et du terme « enteros » qui signifie tube digestif. Le terme « forme parentérale » désigne étymologiquement toutes les formes non administrées par le tube digestif. Dans le langage courant, les formes parentérales regroupent toutes les formes injectées à travers la peau : intraveineuses, intra-artérielles, intrarachidiennes,(13) ...

Les injections parentérales sont apparues vers le XVIIIème siècle. L'apparition de cette forme pharmaceutique fait suite à la compréhension du système circulatoire, décrit de façon complète pour la première fois par William Harvey dans son ouvrage « *Exercitatio Anatomica de Motu Cordis et Sanguinis in Animalibus* » de 1628(14).

L'intérêt pour l'injection dans le sang a suivi : « *Mêler promptement avec le sang et porter au cœur le remède, sans diminution de ses forces, pour le distribuer de là dans toute la machinerie du corps et rendre son effet plus prompt et plus puissant.* » Michel Etmüller (15).

Les premières injections ont été faites chez l'animal, puis progressivement chez l'homme. Les premières substances injectées ont été des liqueurs d'opiacées, notamment par Robert Boyle (1657-1664). Du vin, de la bière, du lait et parfois du miel ont aussi été injectés. Le lait reviendra plusieurs fois au cours des siècles car il est associé à l'idée de jeunesse, mais il fut rapidement abandonné (16). Les premiers essais de transfusion ont été réalisés par Jean Baptiste Denis en 1667 mais avec des réussites aléatoires, notamment dues à l'ignorance des incompatibilités entre groupes sanguins (16).

Du fait de la méconnaissance de la stérilité, des notions d'isotonicité, de pH et de dérivés, avec des tests de nombreuses substances toxiques (notamment des sels de mercure), la pratique de l'injection dans le système circulatoire est abandonnée après la fin du XVIIème siècle car jugée trop dangereuse. Elle ne sera alors pratiquée que par les physiologistes et les anatomistes. Elle ne reparaît que vers le milieu du XIXème siècle. En 1831, le Dr Latta pratiquait des injections d'eau salée à l'aide de la seringue de Read pour traiter des malades du choléra, en s'appuyant sur les travaux de W. B. O'Shaughnessy (17). L'utilisation de « sérum artificiel » se propage en 1884 dans un contexte d'épidémies de choléra en Europe. A la même époque cette méthode est utilisée dans les anémies aiguës post-hémorragiques, notamment du post-partum(13).

Les premières injections sous-cutanées à but thérapeutique furent réalisées par le Dr Alexander Wood. Il s'agissait de sulfate d'atropine injecté avec une seringue de Pravaz. Cette méthode « *hypodermique* » n'était utilisée que lorsque le patient ne pouvait pas

prendre de traitement par voie orale. Ceci jusqu'aux années 1875-1880 car les solutions injectables n'étaient pas stérilisées et la désinfection des seringues était le plus souvent sommaire, entraînant de graves infections systémiques. Les principaux produits injectés à cette époque étaient la morphine, les sels d'atropine et les sels de quinine (13).

Les injections parentérales se développent avec l'entrée dans « l'ère Pasteurienne ». La stérilisation des préparations injectables et l'amélioration des pratiques d'injection ont réduit considérablement les effets indésirables des injections telles que « la maladie de la seringue » qui étaient liés à la contamination des solutions injectables et à l'amélioration des règles d'asepsies lors de l'injections (13). La tolérance des injections fut accrue également du fait de l'amélioration des connaissances physiologiques sur l'osmolarité et le pH sanguin.

La stérilisation des solutions pour injection fut notamment marquée par l'expérience des « ballons à col de cygne » de Louis Pasteur (**Figure 1**). Elle a permis de réfuter la théorie de la génération spontanée. Ainsi, cette expérience démontra que la vie ne se génère pas spontanément. Cela signifie qu'un milieu ne se contamine pas si les germes ne peuvent l'atteindre. Cette notion est primordiale dans le maintien de la stérilité : un milieu que l'on a stérilisé reste stérile tant que les barrières qui l'isolent sont intactes.

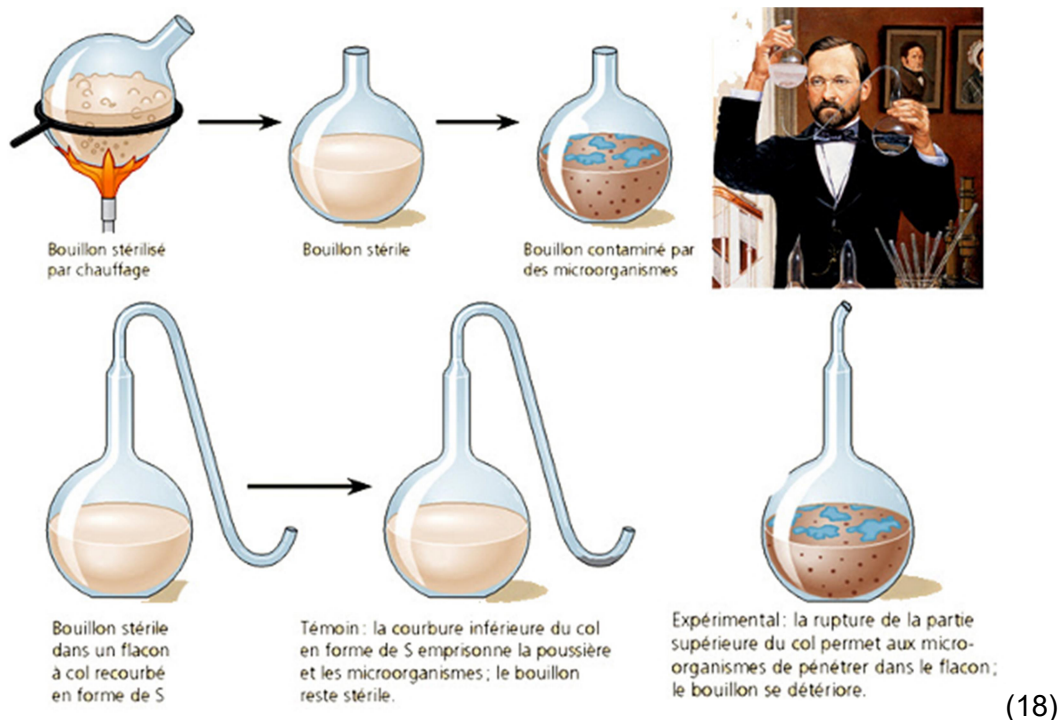


Figure 1 : Schéma de l'expérience du col de cygne de Louis Pasteur

Dès les années 1890, le Dr Schimmelbusch mettait l'accent sur la nécessité de stériliser toutes les solutions injectables devant l'impossibilité de se fier à la nature plus ou moins bactéricide des substances en solution(13).

La méthode parentérale progresse grâce à l'invention des ampoules médicamenteuses par le pharmacien Stanislas Limousin en 1886 qui étaient stérilisées au début au bain marie puis ensuite à l'autoclave sous pression à 110°-120°C. Le volume de ces ampoules variaient de 60 à 1000 cm³. Cette nouvelle forme permis le passage à un conditionnement unitaire alors qu'auparavant le conditionnement multidose était la norme pour les solutions pour injection (17).

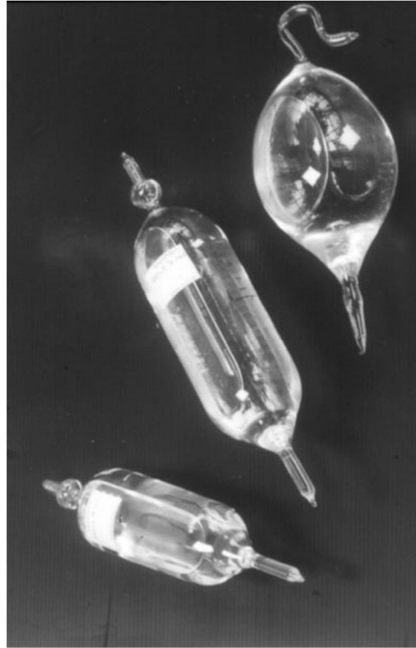


Figure 2 : Ampoules médicamenteuses à sérum

La fabrication d'ampoules médicamenteuses pour injection hypodermique pouvait être réalisée au début des années 1900 dans les officines, en préparation magistrale ou officinale. Les méthodes de stérilisation utilisées étaient l'autoclavage, la tyndallisation, le bain marie ou la filtration (13). La tyndallisation est une « *méthode de stérilisation d'un milieu fragile, consistant en un chauffage discontinu à une température de 60 à 70°C suivi de refroidissements successifs, qui sert à détruire les micro-organismes (les spores non détruites par un premier chauffage se développent et les microbes engendrés sont détruits par les chauffages suivants)* » (19).

Les préparations injectables connaissent dans ces années un essor considérable, notamment avec la découverte du sérum antidiphtérique, seul remède alors disponible à la « terreur des mères ». Pendant la Première Guerre mondiale on peut noter l'utilisation importante des sérums anti-gangréneux, sérum antitétanique, la vaccination anti-typho- et para-typhoïdique, ... Ces médicaments ont joué un rôle capital dans le déroulement de la première guerre mondiale. Le sérum antitétanique était injecté systématiquement chez les soldats blessés rapatriés parfois après avoir passé plus de 3 jours blessés sur le champ de bataille. Le vaccin anti-typho-paratyphoïdique a permis de mettre fin à l'épidémie de typhoïde et de paratyphoïde ayant sévi entre 1914 et 1918 et ayant coûté la vie à 11406 personnes (13).

Même si les notions de stérilité des préparations injectables sont connues depuis Pasteur, il faudra attendre 1937 pour que la Pharmacopée Française précise que « les solutions injectables doivent être stériles, si possible iso-osmotique aux liquides de l'organisme », et la mise en place d'un premier essai de stérilité inscrit à la Pharmacopée (17). Ce n'est qu'en 1949 qu'est mise en place la recherche d'endotoxines bactériennes par le lysat d'amœbocytes de limule : sang d'un animal marin qui a la propriétés de gélifier au contact d'endotoxines bactérienne (17).

I.1.2. Brève histoire des médicaments anticancéreux

Les débuts de la chimiothérapie anticancéreuse datent des années 1940. Les pharmacologistes Louis Goodman et Alfred Gilman observent lors d'autopsies de soldats exposés au gaz moutarde soufrés (sulfure de 2,2'-dichlorodiéthyl), une importante hypoplasie lymphoïde associée à une myélo-suppression. Ils formulent l'hypothèse que l'on pouvait utiliser des principes actifs semblables aux gaz de combat pour traiter les malades atteints de cancers hématologiques. Cette hypothèse fut vérifiée lors de l'utilisation de la caryolysine, un agent alkylant, pour traiter un patient atteint de lymphome non hodgkinien, le premier cytotoxique injectable(20).

Vers la même époque fut découvert le premier agent anti-métabolique : le méthotrexate. Utilisé pour traiter les leucémies aiguës lymphoïdes, elle est la molécule ayant permis la première rémission complète d'un enfant atteint(13).

Depuis ces années le nombre de médicaments anticancéreux augmente régulièrement. Au CHU de Lausanne, entre 1989 et 2014, le nombre de préparations d'anticancéreux réalisées est passé de 1230/an à 12000/an (21). Ceci lié à la découverte de nouvelles molécules anticancéreuses et à l'amélioration de la compréhension des mécanismes impliqués dans l'apparition et la prolifération cancéreuse.

Récemment, les anticancéreux oraux se développent avec 77 médicaments disponibles en avril 2016. Ils sont surtout représentés par des thérapies ciblées (30%), par des chimiothérapies conventionnelles (29%) et par de l'hormonothérapie (14%). Entre 2010 et 2015 il y a eu plus d'Autorisations de Mise sur le Marché (AMM) pour des anticancéreux oraux (28) que d'AMM pour les anticancéreux injectables (21). Mais sur l'année 2015, il y a eu plus d'AMM pour des anticancéreux injectables (6), dues au développement de l'immunothérapie (22).

Pour la classe ATC L : antinéoplasique les anticancéreux injectables représentent environ 52% des DCI (75 molécules injectables contre 68 administrable *per os*). A l'heure actuelle, les anticancéreux représentent une grande famille de molécules très diverses comprenant, entre autres, les agents alkylants, les antimétabolites, les alcaloïdes végétaux, ...Leurs interactions avec les micro-organismes ne sont pas généralisables pour tous les membres de la même classe thérapeutique.

I.2. La stérilité des médicaments injectables

I.2.1. Définitions

La stérilité, du latin « *sterilitas* », signifie stérile dans le sens infécondité ou impuissance, et non productivité. Pour l'agriculture, et d'un point de vue étymologique, on dit d'un endroit qu'il est stérile si la vie ne peut y croître. Cette racine associée à l'idée de « non productivité » est la base de l'essai de stérilité tel que décrit dans la Pharmacopée Européenne car il est basé sur la croissance bactérienne(7).

« *La stérilité est l'absence de micro-organismes viables, définie par un niveau d'assurance de stérilité de valeur inférieure ou égale à 10^{-6} .* »(23)

La stérilité se définit comme « l'absence de micro-organismes viables ». Il s'agit d'une notion dichotomique : un environnement est soit stérile, soit non stérile. Il n'y a pas d'intermédiaire. L'état stérile est obtenu par un procédé physique ou chimique appelé la stérilisation.

Le niveau d'assurance de stérilité représente la probabilité de retrouver un micro-organisme viable : c'est-à-dire la probabilité que le produit soit non stérile à l'issue du procédé de stérilisation. Un niveau d'assurance de la stérilité de valeur égale à 10^{-6} signifie qu'il existe une chance sur un million pour que l'environnement ne soit pas stérile. « *La stérilité de tous les articles contenus dans une population ayant fait l'objet d'un traitement de stérilisation ne peut être ni garantie ni démontrée dans l'absolu* » (23).

Le niveau d'assurance de la stérilité est démontré lors de la validation du procédé de stérilisation en utilisant des inocula d'endospores de bactéries (indicateurs biologiques). L'hypothèse faite est que : la preuve de l'inactivation de ces micro-organismes très résistants permet de prouver la destruction des autres micro-organismes moins résistants par ce procédé de stérilisation (24).

L'état stérile est maintenu par la présence de barrières qui l'isole de l'environnement. « *Le récipient et le système de fermeture doivent assurer le maintien de la stérilité du produit pendant toute sa durée de conservation* » (23).

Cette définition de la stérilité est une définition probabiliste. Le contrôle de tous les éléments d'un même lot entraînerait des coûts de productions intenable (24). De fait, le moyen de pouvoir certifier qu'un environnement soit stérile est de le rendre potentiellement non stérile car les tests de stérilités induisent tous une rupture de la barrière isolant le milieu que l'on veut tester de l'environnement pour en prélever une partie. Si le test est négatif, cela indique qu'avant le prélèvement le milieu était stérile. Mais lors du prélèvement le milieu peut avoir été contaminé.

La stérilité est assurée par le contrôle de l'ensemble des moyens mis en place pour atteindre l'état stérile ainsi que les barrières mises en place pour le conserver. La stérilisation ne doit pas être confondue avec la désinfection qui a pour but la réduction de la flore bactérienne par destruction ou inactivation.

Avant l'étape de stérilisation, plusieurs étapes sont mises en place pour limiter la contamination:

- Fabrication en Zone à Atmosphère Contrôlée (ZAC)
- Nettoyage des surfaces, tenues du personnel adaptées (gants, charlotte, surchaussures, ...)

Pour atteindre l'état stérile, il existe différentes méthodes de stérilisation réparties en deux catégories :

- Utilisation de moyens physiques (autoclavage, filtration, etc.),
- Utilisation d'agents chimiques (oxyde d'éthylène, acide peracétique, etc.).

L'évaluation de la stérilité peut se faire par mesure de paramètres adaptés à la méthode de stérilisation choisie (mesure physique, indicateur biologique, etc.). Cette libération paramétrique est valide si lors de la conception du procédé de stérilisation il a été prouvé que l'agent stérilisant (vapeur d'eau, oxyde d'éthylène, ...) arrive à atteindre toutes les parties devant être stérilisées.

L'appréciation de la stérilité peut aussi se faire sur le contrôle d'un certain nombre d'éléments d'un même lot de fabrication par méthode destructrice.

Dans l'industrie pharmaceutique, les médicaments stériles peuvent être fabriqués :

- Grâce à une stérilisation dans leurs conditionnements finaux. Il s'agit de la méthode privilégiée
- Grâce à une préparation en conditions aseptiques, lorsqu'aucune méthode de stérilisation dans le conditionnement final n'est possible ou que les méthodes de stérilisation altèrent le médicament ou le conditionnement

Pour les solutions pour injections parentérales stérilisés dans leurs conditionnements finaux, le remplissage et le scellement des récipients doit se faire en zone à atmosphère contrôlée de classe ISO 8 minimum (équivalent de classe C) (24).

I.2.2. Méthodes de stérilisation

Dans cette partie je vais aborder les différentes méthodes utilisées actuellement pour obtenir l'état stérile et les moyens utilisés pour les contrôler.

I.2.2.1. La stérilisation par la chaleur humide

La stérilisation par la chaleur humide est la méthode de choix lorsqu'elle est envisageable (25). Cette méthode est également appelée autoclavage. Elle est réalisée dans un autoclave. C'est une enceinte hermétique thermostatée où est introduite de la vapeur d'eau osmosée sous pression. L'utilisation de la pression permet d'atteindre une vapeur d'eau dont la température est comprise entre 121 et 134°C(26).

Le premier stérilisateur à vapeur sous pression (autoclave) a été mis au point par Charles Chamberland (**Figure 3**), élève et collaborateur de Louis Pasteur en 1880.

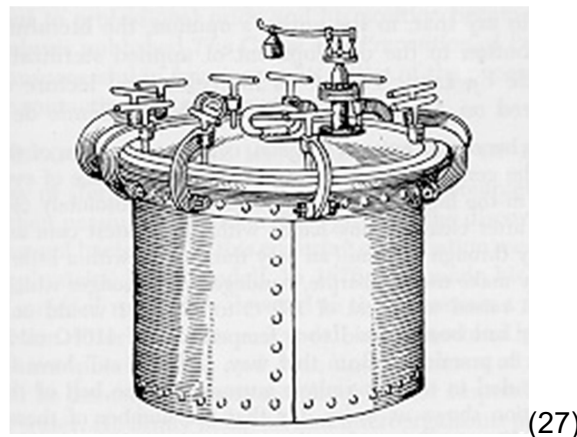


Figure 3 : Autoclave de Chamberland

La validation d'un cycle de stérilisation passe par la mesure de la température et de la pression, ainsi que du maintien du plateau température/pression stérilisant le temps nécessaire (exemple : 18 min). Dans les unités de stérilisation pour les dispositifs médicaux, un test d'étanchéité est pratiqué toutes les semaines et un test d'uniformité de répartition de la vapeur est réalisé au moyen d'un test de Bowie Dick tous les jours. Des tests chimiques ou biologiques peuvent être utilisés en complément mais ne remplacent pas l'évaluation de la courbe température/pression pour évaluer la stérilité d'un cycle d'autoclave.

I.2.2.2. La stérilisation par la chaleur sèche

La stérilisation par la chaleur sèche est une méthode de stérilisation terminale reposant sur le transfert de chaleur aux articles à stériliser, qui peut s'opérer par convection, rayonnement ou transfert direct. La stérilisation par la chaleur sèche est réalisée dans un four à ventilation forcée ou un autre dispositif conçu à cet effet, par exemple un tunnel.

La validation d'un cycle de stérilisation par la chaleur sèche passe par la mesure de la température en fonction du temps. Les conditions de référence pour cette méthode de stérilisation sont de 160°C minimum pendant au moins 2 heures.



Figure 4 : Stérilisateur de chaleur sèche – Tau Steril 200

I.2.2.3. La stérilisation par irradiation

La stérilisation par irradiation ou stérilisation par rayonnement ionisant est effectuée soit par :

- Irradiation par rayonnement gamma en utilisant l'isotope 60 du Cobalt (**Figure 5**)
- Un faisceau d'électrons énergisés au moyen d'un accélérateur d'électrons
- Des rayons X produits par bombardement d'une cible avec des électrons énergisés

Elle s'utilise essentiellement pour la stérilisation d'éléments sensibles à la chaleur. Cette méthode ne peut être utilisée que pour les médicaments et les conditionnements pour lesquels une absence de détérioration par les radiations a été prouvée expérimentalement. La validation d'un cycle de stérilisation se fait par contrôle des relevés effectués par un dosimètre (24). La dose de référence pour cette méthode de stérilisation est de 25 kGy (23).



Figure 5 : Stérilisateur par rayonnement gamma alimenté par du Co^{60}

La stérilisation par rayonnement ultraviolet n'est plus recommandée en industrie pharmaceutique à cause de son risque d'inefficacité. « Le rayonnement ultraviolet ne constitue pas normalement une méthode acceptable de stérilisation » (25).

I.2.2.4. La filtration sur membrane

« La filtration sur membrane est utilisée pour réduire la contamination des gaz et autres fluides par des particules viables ou non viables ne se prêtant pas à la stérilisation par la chaleur ou l'irradiation » (23).

La filtration sur membrane (**Figure 6**) se fait par le passage à travers un filtre stérile de porosité de $0,22 \mu\text{m}$. Le diamètre de ses pores est trop petit pour permettre le passage de micro-organismes.



Figure 6 : Cartouches de filtration hydrophiles – express SIGMA-MERCK®

La filtration comporte plus de risque que les autres méthodes de stérilisation à cause des risques de recontamination. Il est conseillé d'effectuer une seconde filtration stérilisante juste avant la répartition dans le conditionnement final. Les caractéristiques du filtre doivent être telles que le relargage de fibres soit minimal.

Les données permettant de valider la stérilisation par la filtration sont :

- Le contrôle de l'intégrité du filtre avant et immédiatement après usage via des tests tel que le point de bulle, de diffusion ou le test du maintien de pression
- Le contrôle du débit et pression avant et après le filtre

Le filtre ne doit pas altérer le produit, ni en absorbant ses constituants, ni en relarguant d'autres substances (24).

I.2.2.5. La stérilisation à l'aide de gaz

Les principaux gaz stérilisants utilisés dans le domaine pharmaceutique sont l'oxyde d'éthylène (agent alkylant), l'acide peracétique et le peroxyde d'hydrogène (agents oxydants) (24). L'oxyde d'éthylène est principalement utilisé dans l'industrie pharmaceutique pour stériliser les dispositifs médicaux. Le peroxyde d'hydrogène le principal agent stérilisant utilisé pour la stérilisation basse température des dispositifs médicaux thermosensibles (28). L'acide peracétique est l'agent stérilisant utilisé dans les stérilisateur nominatifs des isolateurs que nous utilisons dans l'URC (29).



Figure 7 : Stérilisateur médical à l'oxyde d'éthylène

L'utilisation d'un gaz stérilisant ne peut être employée que lorsqu'aucune autre méthode n'est utilisable. Pour être efficace les gaz stérilisants doivent être en contact direct avec les micro-organismes. Cette méthode n'est adaptée que pour la stérilisation des surfaces. Un cycle de stérilisation gazeuse se compose de trois phases :

- Humidification et chauffage : avant l'exposition au gaz stérilisant, les produits doivent atteindre le degré d'humidité et la température requis par la méthode
- Stérilisation : introduction et maintien du gaz stérilisant à une certaine concentration pendant un temps défini par la méthode, puis évacuation du gaz stérilisant
- Aération : pour accélérer le dégazage et permettre que les taux résiduels de gaz stérilisant soient conformes aux normes (24)

La validation des cycles de stérilisation par gaz stérilisant se fait via des enregistrements qui doivent comporter la durée du cycle, la pression, l'humidité et la concentration en gaz stérilisant (23).

Aucune de ces méthodes de fabrication de produits stériles n'est actuellement utilisable à l'URC de l'hôpital du Haut-Lévêque. La préparation des produits stériles se fait en condition aseptique car la stérilisation dans le conditionnement final n'est pas possible :

- Les conditionnements que nous utilisons ne sont pas autoclavables
 - o poches pour perfusion FreeFlex plus®, Viaflo®
 - o seringues en polypropylène
- La stérilisation par le rayonnement n'est pas disponible
- La stérilisation à l'aide de gaz n'est pas adaptée pour stériliser les liquides

La filtration sur membrane n'est pas adaptée à la cadence de production hospitalière du fait de l'intensité de l'activité.

I.3. La fabrication en conditions aseptiques

La fabrication en conditions aseptiques est une méthode de préparation de médicaments stériles pour lesquels une stérilisation dans le conditionnement final n'est pas possible (23).

La garantie de stérilité dans ces conditions repose sur un ensemble d'éléments :

« La garantie de la stérilité est assurée par le respect d'un ensemble de conditions et de paramètres couvrant en particulier la qualification des installations et des équipements, la qualité des matières premières et des articles de conditionnement, la validation et la maîtrise des procédés de préparation et de stérilisation, les contrôles microbiologiques et particuliers de l'environnement et la formation initiale et continue du personnel. L'essai de stérilité appliqué à la préparation terminée est considéré comme le dernier d'une série de contrôles permettant de garantir la stérilité » (5).

Certains sont sous la responsabilité des entreprises pharmaceutiques :

- Les matières premières
- Les solvants de reconstitution
- Les dispositifs médicaux qui sont utilisés comme conditionnement finaux

Les autres éléments garantissant la stérilité sont sous la responsabilité du pharmacien de l'URC :

- La formation du personnel
- La qualification des installations (présence de sas, traitement et taux de renouvellement de l'air, maintien de la surpression, etc.)
- La qualification des équipements (isolateurs, hottes à flux d'air laminaire, etc.)

- Les contrôles périodiques d'environnement (microbiologiques et particulaires) répondant aux normes des ZAC. La fabrication des préparations doit être réalisée en classe A(ISO 5). L'environnement immédiat doit relever de la classe D si la fabrication est réalisée sous isolateur (ISO 8) ou de la classe C ou B si la fabrication est réalisée sous hotte à flux d'air laminaire (ISO 7 ou 6). Les deux tableaux ci-dessous détaillent les différentes classes d'exigence microbiologiques et particulaires.

Tableau I : Caractéristiques particulières des différentes Zones à Atmosphère Contrôlées

	<i>Au repos</i>		<i>En activité</i>	
<i>Classe</i>	<i>Nombre maximal autorisé de particules par m³ de taille égale ou supérieure aux tailles précisées.</i>			
	<i>0.5 µm (d)</i>	<i>5 µm</i>	<i>0.5 µm (d)</i>	<i>5 µm</i>
<i>A</i>	3520	20	3520	20
<i>B</i>	3520	29	352000	2900
<i>C</i>	352000	2900	3520000	29000
<i>D</i>	3520000	29000	<i>Non défini</i>	<i>Non défini</i>

(25)

Tableau II : Recommandations pour la surveillance microbiologique des Zones à Atmosphère Contrôlée en activité

Limites recommandées de contamination microbiologique (a)				
<i>Classe</i>	<i>Echantillon d'air ufc/m³</i>	<i>Boîtes de Pétri (diam.: 90 mm), ufc/4heures (b)</i>	<i>Géloses de contact (diam. : 55 mm), ufc/plaque</i>	<i>Empreintes de gant (5 doigts) ufc/gant</i>
<i>A</i>	<1	<1	<1	<1
<i>B</i>	10	5	5	5
<i>C</i>	100	50	25	-
<i>D</i>	200	100	50	-

(25)

Un contrôle final de la stérilité doit être réalisé pour les préparations réalisées en conditions aseptiques lorsqu'il est possible de le réaliser. Il est effectué au moyen de l'essai de stérilité tel que défini par la Pharmacopée Européenne (Chapitre I.4). Dans le cas des préparations magistrales, la libération des préparations est sous la responsabilité du pharmacien. Ce dernier évalue le risque associé à la stérilité (5).

Les préparations parentérales d'anticancéreux sont dans la très grande majorité des cas des préparations magistrales. Mais les préparations d'anticancéreux que nous fabriquons en série doivent satisfaire à l'essai de stérilité de la Pharmacopée Européenne que nous allons détailler ci-dessous.

I.4. Essai de stérilité selon la Pharmacopée Européenne

L'essai de stérilité de la Pharmacopée Européenne est le même en tous points que celui décrit par l'OMS (30) et la Pharmacopée des Américaine(UPS) (31).

L'essai de stérilité, tel que défini au chapitre 2.6.1 de la Pharmacopée Européenne, est une méthode d'analyse qualitative de présence ou absence de micro-organismes dans une préparation donnée (7). Il doit être réalisé sur un nombre significatif d'éléments d'un lot (10% des récipients avec un minimum de 4 échantillons). Il s'applique pour toutes les préparations répondant aux critères de stérilité, ce qui est le cas pour les préparations que l'on souhaite réaliser en lots plus importants.

L'essai de stérilité est réalisé dans des conditions aseptiques. Les précautions prises pour l'asepsie ne doivent pas affecter les micro-organismes recherchés.

Pour les préparations liquides la technique de référence est la filtration sur membrane qui « est utilisée dès que la nature du produit le permet ». Cette technique consiste à filtrer sur une membrane (de porosité inférieure ou égale à 0,45 µm) un volume minimal (**Tableau III**) de la préparation que l'on souhaite contrôler.

Tableau III : Quantité minimale à utiliser pour chaque milieu retenus pour réaliser l'essai de stérilité

Quantité par récipient	Quantité minimale de préparation à utiliser pour chaque milieu, sauf exception justifiée et autorisée
<i>Liquides</i>	
- < 1 mL	Contenu total de chaque récipient
- 1-40 mL	La moitié du contenu de chaque récipient, mais pas moins de 1 mL
- > 40 mL mais ≤ 100 mL	20 mL
- >100 mL	10 pour cent du contenu du récipient, mais pas moins de 20 mL
<i>Liquides antibiotiques</i>	1 mL

(7)

Cette filtration peut être faite soit sur une membrane qui sera alors partagée en deux, soit réalisée dans un appareil permettant de faire une filtration de la même préparation sur deux membranes, par exemple avec le système STERITEST® (**Figure 8**) ou l'utilisation d'une rampe de filtration (**Figure 9**).



Figure 8 : Pompe STERITEST EQUINOX®



Figure 9 : Rampe de filtration

Les membranes utilisées sont ensuite déposées dans deux milieux différents. L'un est un milieu liquide au thioglycolate (**Figure 10**). Il « *est principalement destiné à la recherche de bactéries anaérobies, mais il permet également la détection des bactéries aérobies* ». Il doit être incubé à une température de 30-35°C.

Milieu liquide au thioglycolate	
L-Cystine	0,5 g
Gélose	0,75 g
Chlorure de sodium	2,5 g
Glucose monohydraté/Glucose	5,5 g/5,0 g
Extrait de levure (hydrosoluble)	5,0 g
Hydrolysât pancréatique de caséine	15,0 g
Thioglycolate de sodium ou	0,5 g
Acide thioglycolique	0,3 mL
Solution de résazurine sodique à 1 g/L, récemment préparée	1,0 mL
<i>Eau R</i>	1000 mL
pH après stérilisation : 7,1 ± 0,2	(7)

Figure 10 : Composition du milieu liquide au thioglycolate

L'autre milieu est un milieu à l'hydrolysât de caséine et de soja (**Figure 11**). Il est principalement dédié à la recherche de bactéries aérobies mais aussi de levures et de champignons filamenteux. Il doit être incubé à une température de 20-25°C.

Milieu à l'hydrolysât de caséine et de soja	
Hydrolysât pancréatique de caséine	17,0 g
Hydrolysât papaique de farine de soja	3,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Phosphate dipotassique	2,5 g
Glucose monohydraté/Glucose	2,5 g/2,3 g
<i>Eau R</i>	1000 mL
pH après stérilisation : 7,3 ± 0,2	(7)

Figure 11 : Composition du milieu liquide à l'hydrolysât de caséine et de soja

D'autres milieux peuvent être utilisés à condition qu'ils satisfassent à l'essai de fertilité.

Afin de valider l'utilisation de la méthode de la Pharmacopée Européenne. Un essai d'applicabilité de la méthode de la Pharmacopée Européenne doit être réalisé. Il consiste en un essai de fertilité réalisé en présence de la substance que l'on souhaite contrôler. Cette substance devant être exempte d'activité antimicrobienne.

I.5. Essai de fertilité

L'essai de fertilité est une étape préliminaire à la mise en place de l'essai de stérilité. Il permet d'évaluer les conditions dans lesquelles on souhaite réaliser l'essai de stérilité (milieux utilisés, matériel, etc...). Il doit aussi être réalisé sur tout nouveau lot de milieu destiné à être utilisé pour un essai de stérilité.

Pour effectuer l'essai de fertilité, il faut ensemer les milieux choisis avec des micro-organismes de référence que l'on retrouve au **Tableau IV**.

Tableau IV : Souches des micro-organismes appropriées pour les essais de fertilité et d'applicabilité de la méthode de la Pharmacopée Européenne

Bactéries aérobies	
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538, CIP 4.83, NCTC 10788, NCIMB 9518, NBRC 13276
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633, CIP 52.62, NCIMB 8054, NBRC 3134
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027, NCIMB 8626, CIP 82.118, NBRC 13275
Bactérie anaérobie	
<i>Clostridium sporogenes</i>	ATCC 19404, CIP 79.3, NCTC 532, ATCC 11437, NBRC 14293
Moisissures et levures	
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231, IP 48.72, NCPF 3179, NBRC 1594
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	ATCC 16404, IP 1431.83, IMI 149007, NBRC 9455

(7)

Il faut ensemercer des fractions séparées du milieu liquide au thioglycolate avec un petit nombre de ces micro-organismes (maximum 100 UFC) : *Clostridium sporogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*. Ces fractions du milieu sont ensuite incubées à 30-35°C.

Il faut ensemercer des fractions du milieu à l'hydrolysate de caséine et de soja avec un petit nombre de micro-organismes (maximum 100 UFC) : *Aspergillus brasiliensis*, *Bacillus subtilis* et *Candida albicans*. Ces fractions du milieu sont ensuite incubées à 20-25°C.

Pour que l'essai de fertilité soit valide, il faut qu'une croissance soit visuellement observable après 3 jours maximum pour les bactéries et 5 jours maximum pour les levures et champignons filamenteux.

Afin de valider l'utilisation de la méthode de la Pharmacopée Européenne. Un essai d'applicabilité de la méthode de la Pharmacopée Européenne doit être réalisé. Il consiste en un essai de fertilité réalisé en présence de la substance que l'on souhaite contrôler. Cette substance devant être exempte d'activité antimicrobienne.

I.6. Méthodes de microbiologie rapides reconnues par la Pharmacopée Européenne

L'essai de stérilité contraint à une mise en quarantaine des préparations pour 14 jours le temps que la stérilité des préparations soit prouvée. Il existe des méthodes de microbiologie rapides ayant des systèmes de détections plus sensibles que le contrôle visuel et donc des délais de détection des micro-organismes plus courts que ceux de l'essai de stérilité.

Le chapitre 5.1.6 de la Pharmacopée Européenne (9) « *Méthodes alternatives pour le contrôle de la qualité microbiologique* » a pour objectif de faciliter la mise en œuvre et l'utilisation de méthodes microbiologiques alternatives.

I.6.1. Listes des différentes méthodes alternatives de microbiologie rapides

Le chapitre 5.1.6 de la Pharmacopée Européenne fournit une liste non-exhaustive de méthodes alternatives qu'il classe en trois grandes catégories :

- « *Méthodes fondées sur la croissance, avec, généralement, obtention d'un signal détectable au terme d'une période de culture* »
- *Mesure directe, avec différenciation et/ou visualisation de cellules individuelles*
- *Analyse de composants cellulaires, avec mesure indirecte d'une présence microbienne et identification de micro-organismes via l'expression de composants cellulaires spécifiques* »

« Les méthodes fondées sur la croissance sont tributaires de l'existence d'une croissance microbienne pour pouvoir apporter une indication sur la présence et/ou le nombre de micro-organismes ». La Pharmacopée Européenne (9) cite :

- Les méthodes électrochimiques : la croissance de micro-organismes entraîne la production de métabolites ioniques fortement chargés à partir de nutriments organiques faiblement chargés. Cela entraîne une modification d'impédance qui est mesurée par des électrodes présentes dans le milieu.
- La mesure de la consommation ou production d'un gaz : dans un système clos la production de dioxyde de carbone (CO₂) ou la consommation de dioxygène (O₂) sont mesurées. La détection est effectuée au moyen d'un indicateur colorimétrique introduit dans le milieu.
- La bioluminescence : provocation de la libération d'adénosine triphosphate (ATP) par les micro-organismes et dosage au moyen d'un système enzymatique luciférine/luciférase émettant une intensité lumineuse proportionnelle à la quantité d'ATP présente.
- La turbidimétrie : la croissance des micro-organismes entraîne une opacification mesurable du milieu. La mesure se fait par exemple dans un milieu liquide où l'opacité est mesurée par la transmittance d'un faisceau lumineux
- La détection de croissance sur milieu sélectifs et/ou indicatifs : ces milieux permettent la détection de la présence d'enzymes spécifiques au moyen de substrats chromogènes appropriés

Les méthodes de mesures directes sont indépendantes de la croissance bactérienne. Ces méthodes permettent notamment la détection de micro-organismes non cultivables et la détection de spores. La Pharmacopée Européenne(9) cite :

- La cytométrie en phase solide : les micro-organismes sont mis en contact avec un fluorophore conjugué, initialement non fluorogène. Dans les cellules viables (métaboliquement actives et avec une membrane intacte), le fluorophore conjugué est clivé par action enzymatique, ce qui entraîne l'accumulation intracellulaire d'un dérivé fluorescent. Un examen en microscopie par épifluorescence permet la détection.
- La cytométrie en flux : les micro-organismes en suspension, marqués par un fluorophore, sont détectés lors de leurs passages dans un cytomètre en flux. Le marquage permet de différencier les cellules viables. Moins sensible que la cytométrie en phase solide, elle peut nécessiter un enrichissement. L'agglomération des micro-organismes peut poser problèmes (exemple : *Staphylococcus aureus*).
- La filtration et l'épifluorescence directe : les micro-organismes sont concentrés par filtration et colorés avec un réactif fluorescent. La détection se fait par microscopie en épifluorescence.
- L'autofluorescence : détection de molécules autofluorescentes endogènes des micro-organismes (exemple : NADPH, flavoprotéines)

Les méthodes basées sur l'analyse de composants cellulaires permettent la détection indirecte des micro-organismes et leurs caractérisations comme la recherche de composants donnant des indications sur la virulence de ces micro-organismes. Ces méthodes sont surtout utilisées pour l'identification d'un micro-organisme et ne sont pas adaptées pour la recherche de micro-organismes. La Pharmacopée Européenne cite :

- Les techniques phénotypiques : ces techniques vont rechercher la présence de composants spécifiques caractéristiques des familles de micro-organismes. Elles comprennent :
 - Les méthodes immunologiques. Elles sont basées sur la réaction antigène-anticorps. La mise en évidence de cette réaction peut faire intervenir l'agglutination, la colorimétrie ou la fluorimétrie,
 - Les méthodes permettant d'obtenir des profils caractéristiques des familles de micro-organismes en acides gras, protéines, glucides, ... Ces méthodes nécessitent de travailler à partir d'isolats et d'avoir un haut niveau de standardisation. Parmi ces méthodes on retrouve :
 - Les méthodes par évaluation du profil de composition en acides gras,
 - La méthode par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier,
 - La méthode par spectrométrie de masse : MALDI-TOF
 - Les méthodes par dosage biochimique de réactions physiologiques : se sont les méthodes utilisant les kits d'identification biochimiques sur un isolat de micro-organismes (par exemple la galerie d'identification API).
- Les techniques génotypiques : elles se basent sur l'analyse du génome des micro-organismes. Elles permettent la détection directe de séquences de nucléotides spécifiques d'une espèce ou d'un groupe de micro-organismes. Ces techniques fondées sur la détection d'ADN ou d'ARN peuvent être divisées en trois grandes catégories : hybridation directe, amplification génique et empreinte génétique.
 - Hybridation directe : utilisation de sondes d'ADN marquées. Le marquage est fait au moyen de molécules radioactives, fluorescentes ou chromogènes. Cette technique nécessite de disposer d'une grande quantité d'ADN cible.
 - Technique d'amplification génique : repose sur l'utilisation de l'amplification en chaîne par polymérase(PCR) qui conduit à une augmentation exponentielle de la teneur d'un fragment spécifique d'acide nucléique.
 - Empreinte génétique : identification d'une souche sur la base de son profil ADN. Cette technique permet de discriminer les souches à

l'intérieur d'une même espèce. La souche analysée doit être sous forme de culture pure. Cette technique constitue un outil d'investigation permettant d'identifier l'origine et les voies de contamination microbiologiques.

En pratique clinique, pour l'identification de micro-organismes deux méthodes sont couramment employées : la PCR sous ses différentes formes (PCR, RT-PCR, PCR type POCT, ...) et la spectrométrie de masse (MALDI-TOF)(32). La PCR est le « Gold standard » à l'heure actuelle car ses méthodes permettent la détection de la présence de bactérie avec des amorces pour rechercher l'ARN 16S qui est spécifique des bactéries. Elle permet aussi l'identification du germe et la recherche de résistance au traitement. Mais le MALDI-TOF fournit des résultats en 10 à 15 min (33).

Pour la détection de micro-organismes, la méthode qui semble la plus rapide (3 heures) avec une grande sensibilité (1 bactérie détectée dans 1000 ml) est la cytométrie en phase solide. Cette méthode présente l'avantage de détecter les bactéries VMNC et de pouvoir être couplée à une filtration sur membrane (33), comme dans l'automate SCANRDI® de Biomérieux®. L'automate SCANRDI® est plus rapide que la méthode de la Pharmacopée Européenne pour effectuer l'essai de stérilité et statistiquement non inférieur (34,35). Il est déjà utilisé pour effectuer l'essai de stérilité dans les industries suivantes GKS®, ALCON®, Pisa®, Fresenius kabi®, Pfizer®, Novartis®, Baxter®, Halexistar®. Il a déjà été testée sur plus de 1400 produits (34)

I.6.2. Méthodologie de validation de ces méthodes alternatives

Parmi ces méthodes, un bon nombre peuvent être utilisées en tant que méthode alternative à l'essai de stérilité. Les industries pharmaceutiques se heurtent à des difficultés pour valider l'emploi de ces méthodes auprès des autorités : « *les dossiers de validation des méthodes alternatives peuvent coûter plusieurs centaines de milliers d'euros et durer 1 à 2 ans* » (33). Ce chapitre 5.1.6 de la Pharmacopée Européenne (9) a été créé pour « *faciliter la mise en œuvre et l'utilisation des méthodes de microbiologie alternatives* ». Ainsi, il donne la trame de validation conseillée pour mettre en œuvre ces méthodes alternatives à la place des essais de référence.

Cette validation passe par deux étapes : une validation primaire, qui est assurée la plupart du temps par le fabricant de l'automate que l'on souhaite utiliser, et une validation pour l'usage prévu, qu'utilisateur doit réaliser.

La validation primaire détaille, dans notre cas, les éléments suivants :

- Type de réponse
- Spécificité
- Limite de détection
- Exactitude et fidélité
- Robustesse

La validation pour l'usage prévu doit permettre de démontrer que la méthode envisagée est une alternative valable à la méthode de la Pharmacopée Européenne. Dans notre cas, on souhaite prouver que l'utilisation du BacT/ALERT® peut être une alternative à l'essai de stérilité pour les préparations que l'on souhaite réaliser en série.

La validation pour l'usage prévu comprend les éléments suivants :

- Etablissement du cahier des charges utilisateur : décrit les fonctions que la méthode doit être capable de remplir (type d'analyse à effectuer, limite de détection, spécificité, nombre et type d'échantillon, temps de détection)
- Qualification de la conception : apporte la preuve documentée que la conception des équipements est compatible avec l'usage que l'on souhaite en faire. Par exemple qu'un équipement que l'on souhaite utiliser pour faire un essai de stérilité puisse détecter la présence de micro-organismes dans le milieu que l'on souhaite contrôler
- Qualification de l'installation : apporte la preuve que l'équipement a été installé conformément aux spécifications
- Qualification opérationnelle : apporte la preuve que l'équipement opère dans les limites préétablies lorsqu'il est utilisé conformément aux procédures
- Qualification des performances : apporte la preuve que l'équipement donne des résultats conformes de façon constante

Parmi les étapes décrites dans ce document, seul l'établissement du cahier des charges et la qualification de la conception relève de notre responsabilité. En effet, l'équipement BacT/ALERT® est installé dans le laboratoire de bactériologie auquel nous allons soustraire l'analyse de nos échantillons. Ainsi la qualification de l'installation, la qualification opérationnelle et la qualification des performances ont déjà été réalisées par le laboratoire de bactériologie car l'automate BacT/ALERT® est utilisé en routine pour les hémocultures.

L'établissement du cahier des charges sera détaillé dans la partie « matériels et méthodes ». La qualification de conception sera donnée dans la partie suivante : le chapitre BacT/ALERT®.

I.7. Le BacT/ALERT®

Le dispositif BacT/ALERT® fait partie des méthodes de microbiologie rapides fondées sur la croissance des micro-organismes. Les échantillons testés au moyen du BacT/ALERT® doivent être introduits dans des flacons spécifiques qui sont ensuite placés dans l'automate de mesure (**Figure 12**). L'automate de mesure assure l'incubation des échantillons dans une enceinte thermostatée à 35°C et une lecture automatisée du signal toutes les 10 minutes.



Figure 12 : Automate BacT/ALERT® 3D

Il fonctionne par détection de la production de CO₂ au moyen d'une pastille présente au fond des flacons BacT/ALERT®. Cette pastille contient un indicateur colorimétrique qui change en fonction du pH de l'échantillon. Ce changement de couleur est mesuré à l'aide d'un photodétecteur et d'une diode électroluminescente (**Figure 13**). Le signal obtenu est traité informatiquement par un algorithme pour éviter les faux positifs. Selon le laboratoire Biomérieux®, si aucune croissance microbologique n'a été détectée au bout de 5 jours, l'échantillon peut être considéré comme stérile (36). Alors que dans la méthode de la Pharmacopée Européenne un échantillon est considéré comme stérile si aucune croissance microbologique n'est observable visuellement après 14 jours.

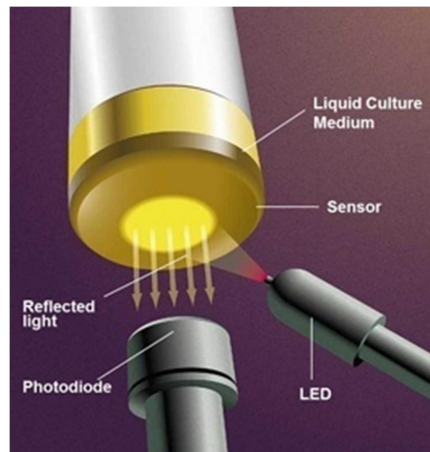


Figure 13 : Principe de détection du BacT/ALERT® 3D

Le dispositif BACTEC® (du laboratoire Becton Dickinson®) est similaire au BacT/ALERT®. Il fait partie des méthodes de microbiologie rapides basées sur la croissance. L'automate BACTEC mesure indirectement la production de CO₂ par fluorimétrie. Alors que le BacT/ALERT® mesure la production de CO₂ par réflectométrie.

Le BacT/ALERT® semble le plus rapide pour la détection de micro-organismes. Mais sur certaines espèces le BACTEC® est plus rapide, notamment sur *Bacillus vulgatus*, *Clostridium sporogenes*, *Micrococcus luteus*, *Bacteriodes fragilis*, *Haemophilus influenzae*, *Nesseria meningitidis* et *Stenophomonas maltophilia* (37,38).

L'utilisation du BacT/ALERT® a été approuvée par la Food and Drug Administration (FDA) pour le suivi de la stérilité de cultures cellulaires de Chondrocytes CARTICEL® du laboratoire Genzyme® en 2005. La mise en place d'une méthode de microbiologie rapide était nécessaire car la méthode de la Pharmacopée Américaine ne donnait des résultats positifs qu'entre 6 et 14 jours dans 67% des cas et le CARTICEL® a une durée de conservation de 3 jours. Cette autorisation a été donnée après que les laboratoires aient prouvé que le BacT/ALERT® était une méthode alternative, pour l'essai de stérilité, à la méthode de la Pharmacopée Américaine en le comparant au STERITEST®. Cette étude a montré que le BacT/ALERT® possédait une sensibilité, spécificité et reproductibilité similaire avec un délai de détection plus rapide (39). La limite de détection retrouvée dans cette étude était de 1-10 UFC introduits par flacon.

Dans un second temps, le dispositif BacT/ALERT® a été validé pour le suivi de la stérilité de concentrés plaquettaires (38,40-42). L'utilisation du BacT/ALERT® dans cette indication a été approuvée après plusieurs études. Elles ont prouvé que le BacT/ALERT®, en présence de concentrés plaquettaires, permettait la détection de 10 germes responsable de 85% des décès liés aux infections transmises par transfusions. Cette détection était réalisée en

moins de 24 heures sauf pour *Streptococcus viridans*(40). Le BacT/ALERT® permet de détecter 15 souches de micro-organismes contaminant fréquemment les pools de concentrés plaquettaires dans les 24 heures sauf pour *Propionibacterium acnes* (entre 9 et 48h)(41,42).

Une étude a comparé différentes méthodes de microbiologie rapides (Rapidmilliflex Detection system, BacT/ALERT® et BACTEC®) à la méthode de la Pharmacopée américaine (filtration sur membrane et inoculation directe). Cette étude a retrouvé que la méthode Pharmacopée était significativement plus sensible que le BacT/ALERT® pour la détection des micro-organismes à faible concentration (1 UFC/10 ml) : 49 tests positifs sur les 97 pour le BacT/ALERT® (soit 50,52%) contre 101 tests positifs sur les 138 pour la méthode de la Pharmacopée Américaine (soit 73,19%). La méthode la plus sensible, selon cette étude, est la « Rapidmilliflex ® Detection system » (66 tests positifs sur les 77 à la même concentration, soit 85,71%). Le BacT/ALERT® détecte tous les germes de la Pharmacopée Européenne à la concentration de 10UFC dans 10 ml et avec un temps de détection significativement inférieur à celui de la méthode Pharmacopée (38).

Récemment l'utilisation du BacT/ALERT® a été validée, en France, pour le contrôle de la stérilité de préparations pour nutrition parentérale selon deux travaux : une thèse et une communication orale. Dans les deux cas le BacT/ALERT® a été comparé au STERITEST® utilisé selon la méthode de l'essai de stérilité de la Pharmacopée Européenne.(10,11) Dans les deux travaux le BacT/ALERT® a permis une détection plus rapide des micro-organismes : inférieur à 24 h pour les bactéries et inférieur à 48 heures pour les champignons contre 3 jours et 5 jours exigés par la Pharmacopée Européenne. Ces travaux ont conclu que le BacT/ALERT® était valide pour l'essai de stérilité (Cf Annexe 1). Le BacT/ALERT® est ainsi utilisé en routine pour le suivi de la stérilité des préparations de nutrition parentérale réalisées au CHU de Bordeaux.

Ces travaux, ainsi qu'une étude de Brugno (43), indiquent que les germes de référence de la Pharmacopée Européenne peuvent croître et être détectés par le dispositif BacT/ALERT®. Ainsi dans le milieu aérobie du dispositif BacT/ALERT®, les micro-organismes suivants peuvent pousser : *S. aureus*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *C. albicans* et *A. brasiliensis*. Dans le milieu anaérobie les germes suivants peuvent pousser : *S. aureus*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa* et *C. sporogenes*. Il est à noter que plusieurs travaux s'accordent sur le fait que *P. aeruginosa* pousse mieux dans le milieu aérobie que dans le milieu anaérobie (10,11,36). La limite de détection des flacons BacT/ALERT® semble être située entre 1 et 10 UFC introduits dans les flacons (38,44).

I.8. Micro-organismes environnementaux et préparation de médicaments

I.8.1. Généralités

Parmi les disciplines étudiant le vivant, la microbiologie est l'une des plus récentes. Les micro-organismes sont des organismes ne pouvant être observés qu'au moyen d'un équipement permettant d'observer des éléments de l'ordre du micromètre comme par exemple le microscope optique. Les micro-organismes sont ubiquitaires : on en retrouve dans quasiment tous les types de milieux : l'eau, l'air, le sol, la surface de la peau, le tractus digestif ...

Les micro-organismes regroupent les bactéries (procaryotes), les virus, les champignons (levures et champignons filamenteux : eucaryotes) et les protozoaires (eucaryotes). Les

bactéries et archaéa forme le plus vaste et abondant groupement d'organismes sur Terre(45). Ces micro-organismes sont souvent très proches par leurs aspects extérieurs de tel sorte qu'une observation directe ne permet souvent pas d'identifier de façon certaine une espèce de micro-organisme.

Les micro-organismes peuvent être une source d'infections, notamment systémiques, s'ils sont introduits dans l'organisme. En temps normal, des barrières comme l'épiderme ou la paroi des muqueuses isolent les compartiments stériles de l'organisme du milieu extérieur.

Les préparations parentérales doivent être stériles (c'est-à-dire exemptes de micro-organismes viables) car elles sont injectées directement dans l'organisme et favorise ainsi le risque de contamination. Ce risque de contamination est notamment bien connu chez les utilisateurs de drogues injectées par voie intraveineuse, d'où l'existence de guides pour préparer le plus aseptiquement possible les injections (46). En 1964, 8 cas d'infections de l'œil par *Pseudomonas aeruginosa* ont été causés par la contamination d'une pommade ophtalmique utilisée après un acte chirurgical (47). Entre 1990 et 1993, aux États-Unis, plusieurs cas d'infections ont été rapportés après injection de propofol. La préparation des seringues pour les injections était réalisée avec des erreurs d'asepsie (48). La contamination de préparations pour nutrition parentérale par une entérobactérie rare est à l'origine de la mort de 4 nourrissons à Chambéry en 2013 (affaire Murette).

Les micro-organismes ainsi introduits dans l'organisme ont un fort potentiel infectieux. Cependant, l'impact clinique est difficile à prédire et va dépendre du type de micro-organisme, de la taille de l'inoculum, de l'état physiologique du patient, etc.

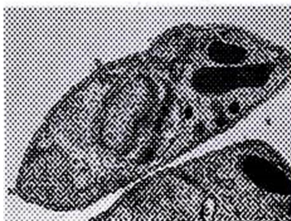
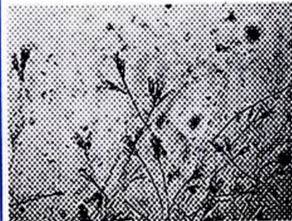
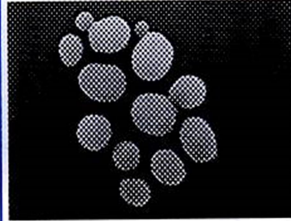

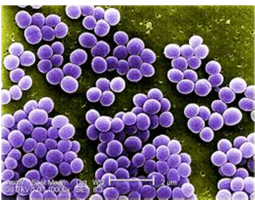

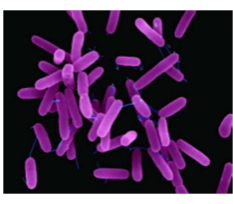
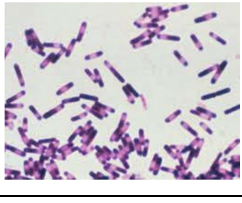
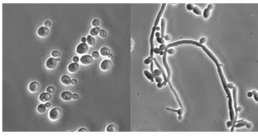
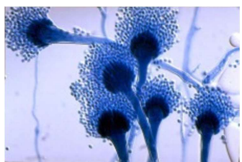
Protozoaire	Champignons		Bactérie
	Moisissure	Levure	
 <p><i>Plasmodium falciparum</i>, hématozoaire du paludisme (Gr x 75 000)</p>	 <p><i>Penicillium notatum</i></p>	 <p>Levure de bière</p>	 <p>Coupe de <i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>, bacille Gram (maladie des frigidaires)</p>

Figure 14 : Morphologie des principaux micro-organismes

Les micro-organismes de l'essai de stérilité de la Pharmacopée Européenne (7) (**Tableau IV**) sont des micro-organismes environnementaux. Ils peuvent tous être à l'origine d'infections chez l'être humain. Même *Bacillus subtilis* (49) qui est rarement impliqué dans des infections humaines.

Tableau V : Récapitulatif des caractéristiques des germes de référence de la Pharmacopée Européenne

règne	espèce	aspect	Atmosphère	réservoir	illustration
Bacteria	<i>Staphylococcus aureus</i> (50,51)	Cocci Gram positif en amas	Aéro -anaérobie facultatif pH _{op} = 7 -7,5	Peau, muqueuse	
	<i>Bacillus subtilis</i> (52,53)	Bacille Gram positif mobile	Aérobie strict pH _{op} = 8	Ubiquitaire	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (54,55)	Bacille Gram négatif flagellé	Aérobie pH _{op} = 7	Hydrique	
	<i>Clostridium difficile</i> (56,57)	Bacille Gram positif mobile	Anaérobie strict pH _{op} = 6,5-7 ,5	Tractus digestif, sols	
Fungi	<i>Candida albicans</i> (58,59)	Levure ou pseudo-hyphes	Aéro–anaérobie pH _{op} = 5,5	Muqueuse	
	<i>Aspergillus brasiliensis</i> (60,61)	Mycélium, tête aspergillaire	Aéro–anaérobie pH _{op} : 6,5	ubiquitaire	

pH_{op} : pH optimal pour la croissance

Les micro-organismes de la Pharmacopée Européenne ont des pH optimaux de croissance situés autour de la neutralité (pH = 7). Des milieux avec des pH éloignés de ces valeurs ne sont pas propices à la croissance de ces micro-organismes.

1.8.2. Les micro-organismes viables mais non cultivables

Jusqu'à récemment, l'identification d'un micro-organisme se faisait via une isolation de la souche que l'on souhaite analyser, une mise en culture et une identification par l'étude de caractères physiologiques et biochimiques. Désormais ces études d'identifications sont effectuées via des spectromètres de masse et des techniques de PCR (Chapitre 1.5).

La notion de micro-organisme viable est sujette à controverse. D'autres états intermédiaires que « viable » et « non viable » ont été décrits chez certains micro-organismes : « mourant », « dormant », « latent », des espèces « cryptobiotiques »... La notion de micro-organisme viable est reliée, dans la Pharmacopée Européenne, à sa capacité à se multiplier, les essais de stérilité étant tous basés sur l'observation visuelle de la formation de colonies. Mais dans les états décrits précédemment, cette capacité est difficilement détectable. Seuls 1 à 5% des micro-organismes sont cultivables en utilisant les méthodes habituelles(62) : moyens de collecte, géloses et températures d'incubation. Il a été rapporté plusieurs fois de grandes différences entre le nombre de cellules comptées par examen direct et le nombre d'unités formant des colonies (UFC). La majorité de ses cellules observées sont viables mais l'absence de croissance observable peut-être due à deux cas de figure :

- Espèces connues pour lesquelles les conditions de cultures ne sont pas favorables à leur croissance ou pour lesquelles les cellules sont entrées dans un état « non-cultivable »
- Espèces inconnues n'ayant jamais été mises en culture à cause de méthodes non adaptées

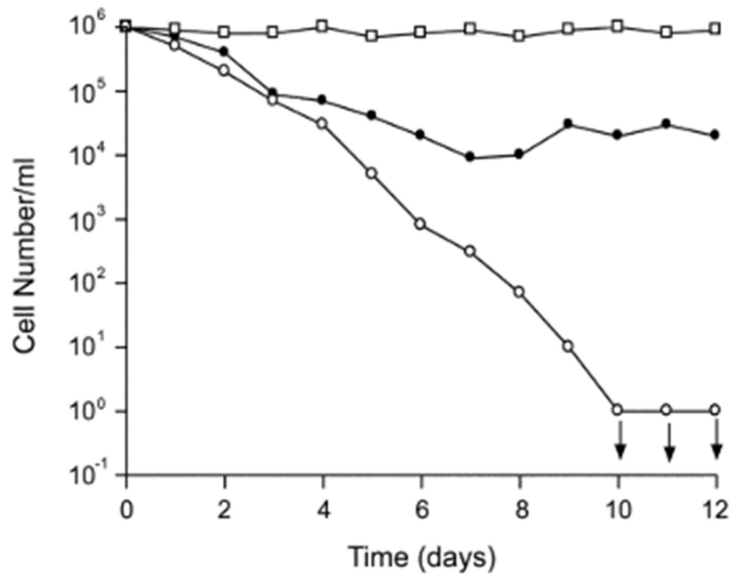
Le terme « bactéries viables mais non cultivables » (en anglais VBNC : Viable But Non Cultivable) désigne les bactéries vivantes ne pouvant pas être cultivées et former des colonies sur un milieu sur lequel ces bactéries se développent normalement, aux conditions habituelles de température, humidité, etc.

L'entrée dans cet état semble être dû à divers stress environnementaux qui dépendent de l'espèce bactérienne. Cet état semble donc être relié à une stratégie de survie(63). Parmi les éléments de stress pouvant induire un état viable mais non cultivable il a été retrouvé :

- Un manque de nutriments (64)
- Une incubation à des températures en dehors des températures habituelles de croissance exemple **Figure 15** page 42 (63–67)
- Des pressions osmotiques élevées ou basses (68,69)
- Des concentrations en O₂ élevées ou basses (70)
- Une présence de conservateurs alimentaires communs
- Une présence de métaux lourds
- Une exposition à la lumière blanche

La détection de ses bactéries viables mais non cultivables (VMNC) peut se faire via :

- L'utilisation de réactifs permettant de voir au microscope la présence de membranes cytoplasmiques intactes comme par exemple l'essai LIVE/DEAD BacLight®. Sur un échantillon, le nombre de bactéries VMNC est obtenu par soustraction du nombre de bactéries viables observées au nombre de bactéries cultivables (66).
- La RT-PCR, qui permet la détection de la production d'ARNm bactérien (agent de l'expression des gènes). Cela permet d'objectiver la survie des bactéries VMNC car l'ARNm possède une demi-vie de 3 à 5 min (65).
- La cytométrie de flux (71) : elle permet de vérifier l'intégrité de la membrane des bactéries mais aussi de mesurer l'activité métabolique.



(66)

Figure 15 : Graphique comparant le nombre de cellules viables au nombre de cellules cultivables de *Vibrio vulnificus* lors d'une incubation à 5°C

- : nombre totale de cellules
- : nombre de cellules cultivables
- : nombre de cellules viables

Les bactéries dans un état viable mais non cultivable (VMNC) présentent des changements physiologiques et morphologiques :

- Une réduction de la taille de la plupart des bactéries avec parfois un changement de forme. L'entrée dans cet état VMNC semble accompagné chez *Campylobacter jejuni* d'une modification morphologique : normalement de forme spiralée, il devient de forme coccoïde et il y a sécrétion de matrice extracellulaire entraînant une augmentation de la viscosité (**Figure 16**)
- Des modifications dans la composition de la paroi bactérienne au niveau des peptidoglycanes et de la composition en acides gras. Ces changements peuvent avoir des conséquences cliniques, par exemple chez *Enterococcus faecalis* (bacille Gram positif) l'action de la vancomycine (même à 100 fois la CMI) n'empêche pas la ressuscitation de l'état viable mais non cultivable car dans cet état il synthétise peu le peptide D-Ala-D-Ala qui est la cible de la vancomycine(72)
- Une réduction de la synthèse de macromolécules
- Une diminution de la fréquence des échanges gazeux

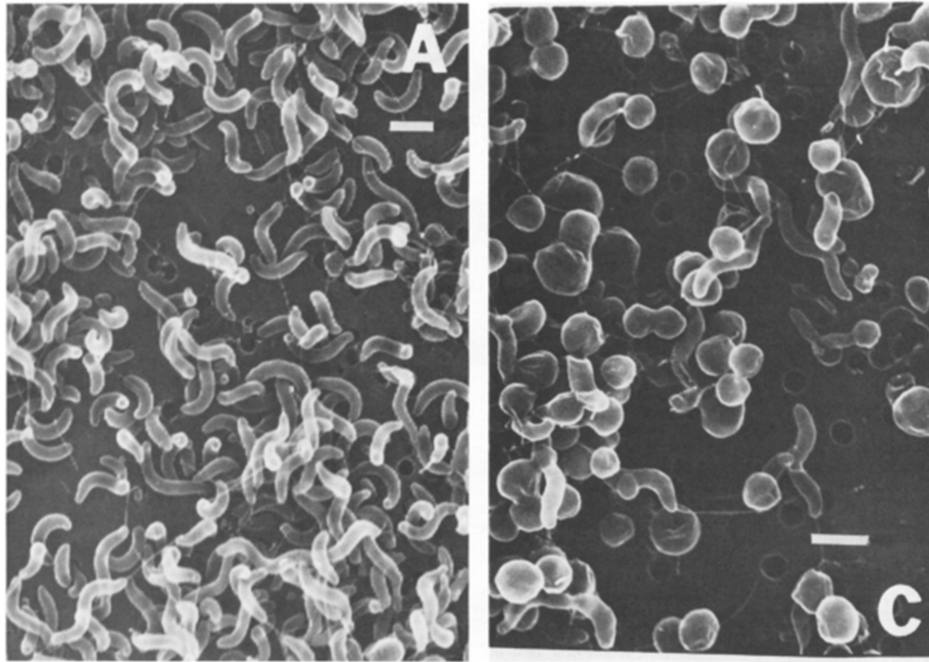


Figure 16 : Comparaison d'une culture de *Campylobacter jejuni* croissante (A) avec une culture de *Campylobacter jejuni* déclinante (C)

Les bactéries entrées dans cet état peuvent « ressusciter » retrouvant ainsi leurs capacités à causer des infections et à être cultivables(73,74).

Cette ressuscitation peut être due à :

- Un retour à une température normale de croissance. Cela a été décrit chez *Vibrio vulnificus*
- Un contact avec un autre organisme : *Legionella pneumophila* en état VMNC, induit par chloration à 0.5 ppm et 1ppm pendant 24h, peut ressusciter après un contact de 5 jours avec le protozoaire *Acanthamoeba polyphaga*(75)
- Une production de protéine *Rpf* (*Resuscitation - promoting factor*) chez *Mycobacterium tuberculosis*, responsable de la virulence(70,76)

L'entrée de bactéries à l'état VMNC a été décrit pour plus de 60 genres de bactéries et plus de 100 espèces(63). Plusieurs de ces bactéries sont pathogènes pour l'homme (**Figure 17**), par exemple *Escherichia coli* et *Vibrio cholerae* restent viables dans l'eau salée mais perdent rapidement leurs capacités à coloniser un milieu, mais aussi *Salmonella enteritidis*, *Campylobacter jejuni* (74,77,78), *Legionella pneumophila* (79), *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*(68) et *Shigella dysenteriae* (80).

<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>A. salmonicida</i>	<i>Klebsiella aerogenes</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>S. flexneri</i>
<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>K. planticola</i>	<i>S. sonnei</i>
<i>B. pseudomallei</i>	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Streptococcus faecalis</i>
<i>Campylobacter coli</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Vibrio alginolyticus</i>
<i>C. jejuni</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>V. anguillarum</i>
<i>C. lari</i>	<i>M. smegmatis</i>	<i>V. campbellii</i>
<i>Cytophaga allerginae</i>	<i>Pasteurella piscicida</i>	<i>V. cholerae</i>
<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>V. harveyi</i>
<i>E. cloacae</i>	<i>P. syringae</i>	<i>V. mimicus</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Ralstonia solanacearum</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>
<i>E. hirae</i>	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	<i>V. shiloi</i>
<i>E. faecium</i>	<i>R. meliloti</i>	<i>V. vulnificus (types 1 & 2)</i>
<i>Erwinia amylovora</i>	<i>Salmonella enterica</i>	<i>Xanthomonas campestris</i>
<i>Escherichia coli</i> (including EHEC)	<i>S. typhi</i>	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i>
<i>Francisella tularensis</i>	<i>S. typhimurium</i>	

Figure 17 : Bactéries pathogènes connues pour entrer en état viable mais non cultivable

Le rôle de cet état viable mais non cultivable est très important dans les infections humaines. Il semble expliquer certains phénomènes de réinfection. L'état dormant de *Mycobacterium tuberculosis* dans les granulomes pulmonaires semble être un état VMNC de la bactérie, ce qui permet à la maladie de se réactiver des années après la primo-infection(76).

Il joue un rôle important dans les récurrences d'infections urinaires :

- La présence de bactéries VMNC dans les urines humaines saines. La concentration en bactéries VMNC dans les urines augmente chez les patients ayant une infection urinaire active(81)
- Après une infection urinaire aiguë les souches uropathogènes de *Escherichia coli* peuvent former un réservoir dans la vessie à l'état quiescent pendant plus de 6 semaines(82). Cet état leur permet de résister au système immunitaire et aux antibiotiques. Ce réservoir semble être la source des rechutes des infections urinaires souvent observées
- Chez *Escherichia coli* KL16, l'exposition à la ciprofloxacine à une concentration égale à 100 fois la CMI induit un état similaire à VMNC (changement de composition de la membrane, réduction de la fréquence respiratoire, conservation du potentiel de membrane, etc.)(83)

Cet état VMNC semble expliquer la survie des bactéries dans l'environnement. Cela a une grande importance dans le milieu hospitalier où les patients infectés contaminent leur environnement proche avec des bactéries pathogènes, d'où la nécessité d'un respect strict des précautions standard d'hygiène hospitalière afin d'éviter tout risque de transmission croisée et de potentielle situation épidémique. La bactérie *Legionella pneumophila* peut entrer dans un état VMNC et ressusciter dans un circuit hydrique traité par monochloramine. La monochloramine est un nouveau désinfectant utilisable pour l'élimination de *Legionella pneumophila*. Dans une étude sur la monochloramine, il a été retrouvé 87% de réussite de désinfection par les méthodes de croissance contre 34% retrouvé par la PCR (84).

Cet état « dormant » semble favoriser la résistance aux antibiotiques. Dans cet état les bactéries (souvent sous forme de biofilm) ont une croissance plus lente. Or, un grand nombre d'antibiotiques sont actifs sur la croissance (72).

L'existence de cet état VMNC est l'une des limites de l'étude des prélèvements environnementaux. En outre, l'aspect cultivable des bactéries (prélèvements sur gélose) est utilisé actuellement pour contrôler les ZAC où sont réalisées les préparations en conditions aseptiques (**Tableau I****Tableau**). Il existe donc un risque de prélèvements faussement négatifs et une potentielle contamination des préparations réalisées au sein des URC avec des bactéries dans un état VMNC.

D'autre part, les essais de stérilité tel que définis dans la Pharmacopée Européenne(7) sont basés sur la croissance visible de micro-organismes sur milieux gélosés ou liquides. Ils ne permettent pas de détecter les bactéries dans un état VMNC qui peuvent contaminer les préparations médicamenteuses. Pour les préparations parentérales, la méthode de détection par cytométrie en phase solide semble la plus adaptée pour détecter les Bactéries VMNC. Cette méthode peut être couplée à une filtration sur membrane. La détection des Bactéries VMNC est permise car le fluorophore est activé par le métabolisme des Bactéries.

II. Effets des anticancéreux sur les micro-organismes

Anticancéreux (ou agent antinéoplasique) est un « terme générique pour désigner toute substance utilisée dans le but de détruire les cellules cancéreuses ou d'en empêcher la prolifération » (85).

On attribue souvent aux anticancéreux des propriétés antimicrobiennes et que d'une certaine façon le suivi de la stérilité des préparations anticancéreuses n'est pas nécessaire. Il est à noter que lors de la dernière conférence de consensus européenne sur les études de stabilité, il a été spécifié qu'une évaluation de la stérilité du produit final n'est, dans ce cas précis, pas généralement nécessaire. Mais que pour les préparations dont un stockage prolongé est prévu (ou pour les produits connus pour permettre la croissance microbienne comme le glucose ou les protéines), une étude de préservation de la stérilité devrait être faite en prenant en compte les caractéristiques du produit final (86).

Dans la partie qui suit, les études de viabilité des micro-organismes en présence d'anticancéreux et la recherche d'effets antibactériens des anticancéreux seront traités séparément. La construction de ses deux types d'études est différente :

- La recherche d'effets bactéricides mesure la sensibilité des micro-organismes à différentes concentrations souvent sur milieu gélosés
- les études de viabilités essayent de simuler les conditions d'une préparation « clinique » d'anticancéreux (même concentration, même contenant, conditions de conservations, ...)

L'annexe 2 (page 92) et le **Tableau VI** reprennent les données des études mentionnées.

II.1. Recherche d'effets antimicrobiens des anticancéreux.

Des études ont été menées afin de voir si certains anticancéreux pouvaient être utilisés dans la lutte contre les infections bactériennes. Malgré les effets toxiques des anticancéreux, l'utilisation d'un certain nombre d'entre eux est envisageable chez des germes multi-résistants (par exemple : *Staphylococcus aureus* ou *Escherichia coli*). Selon l'équipe de Valérie Soo l'utilisation des anticancéreux comme agent antibactérien pourrait permettre d'éviter de rentrer dans une « ère post-antibiotique » où les micro-organismes seraient résistants aux traitements antibiotiques (87,88).

L'étude de Hamilton (89) a testé 21 anticancéreux sur 28 souches de micro-organismes choisies pour être représentatives des quatre grands groupes pathogènes (bactéries Gram positif aérobies, bactéries Gram négatif aérobies, bactéries anaérobies et levures). Il a retrouvé que sur les anticancéreux testés seuls trois ressortent : la mitomycine C (un antibiotique), le 5-fluorouracile et le methotrexate (deux antimétaboliques). Ces trois anticancéreux montrent une activité importante sur les bactéries Gram positif aérobies. La mitomycine C est active aussi sur les bactéries anaérobies et les bactéries Gram négatif aérobie. Les deux antimétaboliques sont peu actifs sur les bactéries Gram négatifs et les anaérobies. Tous les autres anticancéreux testés présentaient une activité antimicrobienne faible (CMI > 10 mg/L).

Une revue récente de la littérature réalisée en 2017 a recherché sur plus de 200 agents anticancéreux utilisés couramment (liste issue de la National Cancer Institute –USA) toute mention d'activité antibactérienne. Il en a résulté qu'une activité antimicrobienne n'a été retrouvée que pour seulement 35 agents anticancéreux. Parmi ceux-ci on retrouve 9 agents alkylants (busulfan, carmustine, lomustine, ...), 6 agents antimétaboliques (5FU, gemcitabine, ...), 3 hormonorégulateurs, 2 composants radiomimétiques (bléomycine et streptonigrin), 4 inhibiteurs de la transduction du signal (geftinib, ibrutinib, ...), 5 inhibiteurs de la topoisomérase (doxorubicine, etoposide, ...) et 5 classés « autres »(88).

Cette revue de la littérature conclue sur l'utilisation possible de trois agents anticancéreux dans la lutte contre les infections bactériennes : le 5FU, le Gallium et la mitomycine C. Le 5FU possède une action antibactérienne, antibiofilm et anti facteur de virulence. Ses propriétés seront détaillées dans le chapitre suivant.

Le gallium sous forme ionique est proche des propriétés des ions ferriques mais ne peut effectuer de réactions d'oxydoréductions. Il agit en perturbant les enzymes utilisant des atomes de Fer (90). Le Gallium est efficace sur différent type de cancer : hépatocarcinomes, cancer de la vessie, cancer ovarien, lymphomes et myélome multiple (maladie de Kahler). Le gallium possède des propriétés antibactérienne notamment sur *Pseudomonas aeruginosa* (91), *Staphylococcus aureus* méthicillino-résistant (92), *Mycobacterium avium* (93) et sur *Candida albicans* (94).

La mitomycine C est un agent alkylant de l'ADN qui diffuse facilement à travers les membranes cellulaires (95). La mitomycine C a besoin d'être réduite pour être active. Le microenvironnement tumoral souvent hypoxique et ayant un pH bas permet cette réduction et contribue à la sélectivité de la mitomycine C (96). De ce fait, la mitomycine C est plus active sur les cellules tumorales que sur les cellules saines. Le cytoplasme bactérien est lui aussi un environnement réducteur donc permettant d'obtenir la forme active de la mitomycine C. D'où l'action de la mitomycine C sur un grand nombre de micro-organismes. La mitomycine C présente l'avantage d'être très active sur les cellules VMNC. Car la mitomycine C n'a pas besoin d'être activée par le métabolisme des micro-organismes. Sa diffusion dans le cytoplasme des cellules est un phénomène passif. L'Activation se fait par les propriétés réductrices du cytoplasme. La mitomycine C est active sur *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Borrelia burgdorferi*.

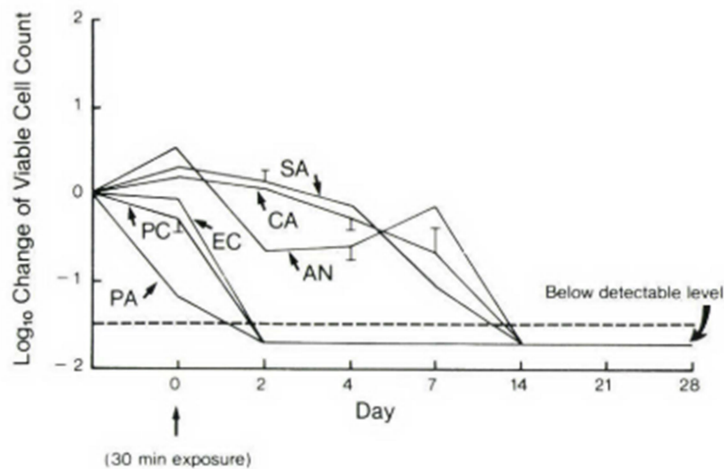
Le **Tableau VI** page 50 et l'annexe 2 page 92 regroupent les informations retrouvées sur les effets des anticancéreux sur les micro-organismes.

II.2. Etudes de viabilité des micro-organismes en contact avec des anticancéreux

Différents groupes ont travaillé sur la viabilité des micro-organismes au contact d'anticancéreux. Différentes approches ont été réalisées. Certains ont évalué des solutions non diluées d'anticancéreux (Holmes (97) et Patel (98)), d'autres comme l'équipe de Krämer (99–101) ont utilisé des concentrations inférieures à celles utilisées en « pratique clinique » afin de se placer dans les conditions les plus défavorables pour les patients et les plus favorable pour la croissance des micro-organismes. Et enfin d'autres ont utilisé des concentrations « cliniques » (102,103) pour étudier la viabilité des micro-organismes.

L'étude de Holmes(97) a retrouvé qu'en présence de 5-fluorouracile à 50 mg/ml (ou de cisplatine à 1 mg/ml) les micro-organismes suivants perdent leurs viabilités (**Figure 18**) :

Staphylococcus aureus, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas cepacia*, *Candida albicans* et *Aspergillus brasiliensis* (ancien *Aspergillus niger*).



(97)

Figure 18 : Viabilité de micro-organismes dans le 5FU à la concentration de 50 mg/ml

SA = *Staphylococcus aureus* ; EC = *Escherichia coli* ; PA = *Pseudomonas aeruginosa* ; PC = *Pseudomonas cepacia* ; CA = *Candida albicans* ; AN = *Aspergillus niger*

L'étude de Patel (98) a retrouvé qu'en présence d'irinotécan à 1 mg/ml les micro-organismes suivants : *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* perdent leur viabilité au bout de 16h, 24h et 28 jours respectivement mais *Candida albicans* et *Aspergillus brasiliensis* restent viables après les 28 jours (dernier prélèvement prévu par l'étude).

Ces études à des concentrations pures montrent que même en présence de ces molécules à des concentrations non diluées, des micro-organismes survivent (surtout les champignons *C. albicans* et *A. brasiliensis*).

Sur les Travaux de Kramër, une première étude sur 12 agents anticancéreux a montré que seuls 2 des agents testés possèdent une activité antibactérienne significative : le Tresulfan (un agent alkylant) et l'oxaliplatine (sels de platine) sur le germe *Pseudomonas aeruginosa*(101). Parmi les anticancéreux testés on retrouve des antimétaboliques (fludarabine, gemcitabine), des taxanes (docétaxel et paclitaxel), un vinca-alcaloïdes (vinorelbine), des inhibiteurs de la topoisomérase (Topotécan et idarubicine)(101).

Dans une seconde étude, les propriétés antibactériennes de 14 anticancéreux « récents » ont été testés. Parmi les anticancéreux testés on retrouve 3 anticorps monoclonaux (panitumumab Vectibix®, ofatumumab Arzerra®, brentuximab-vedotin Adcetris® et ipilimumab), des stabilisateurs du fuseau mitotique (Eribuline mesilate Halaven®, cabazitaxel Jevtana® et nab-paclitaxel Abraxane®), un anti VEGFR (aflibercept Zaltrap®), l'arsenic trioxyde Trisenox®, des agents antimétaboliques (clofarabine Evoltra®, nélarabine Atriance®), des agents alkylants (fotémustine Muphoran®, trabectidine Yondelis®) et un inhibiteur de protéine kinase (temsirolimus Torisel®).

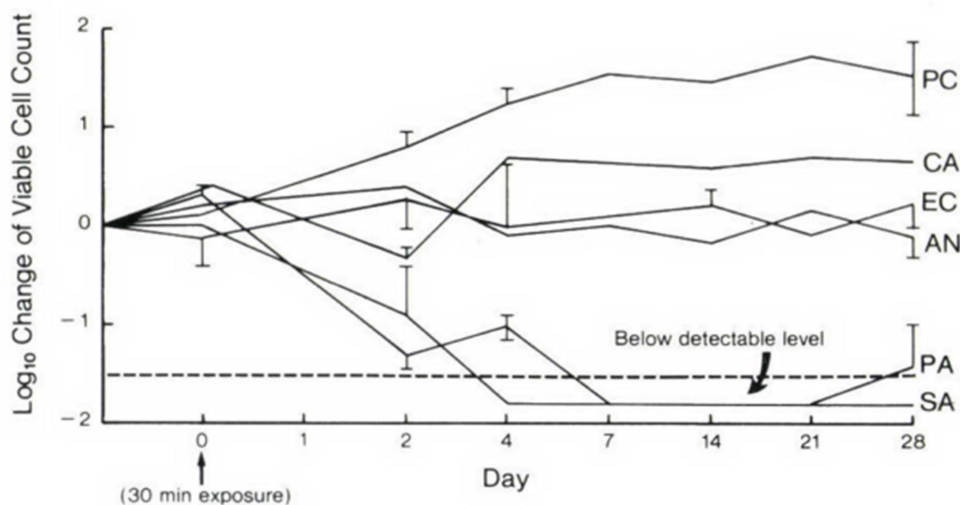
Seule la Trabectidine a démontré une activité antibactérienne. Elle a été active sur *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterococcus faecium*. Aucun des anticancéreux testés n'a montré d'activité contre *Candida albicans*. Le nab-paclitaxel a montré qu'il permettait la prolifération des quatre micro-organismes testés (100).

Les travaux de Paris, qui ont testé la viabilité de deux micro-organismes (*Bacillus subtilis* et *Candida albicans*) en présence d'étoposide, de cisplatine, de 5FU, d'ifosfamide et de cytarabine. Il a été retrouvé que l'étoposide est bactéricide sur *Bacillus subtilis* que la solution soit pure ou diluée et que le 5FU est fongicide sur *Candida albicans* et Bactéricide sur *Bacillus subtilis* que la solution soit pure ou diluée(102).

Les Travaux de Favier (103), ont testé la viabilité de 5 micro-organismes introduits dans des poches de préparations d'anticancéreux (4 agents anticancéreux testés). Le but de son étude était de vérifier que la présence d'anticancéreux ne favorisait pas la prolifération des Bactéries. En effet, aucun prolifération Bactérienne ou fongique n'a été observée quelques soit le micro-organisme ou les conditions de conservation (température ambiante ou 4-8°C).

Ces études de viabilités ont démontré que les anticancéreux possèdent rarement des propriétés antibactérienne et plus rarement encore des propriétés fongicides. La plupart du temps les micro-organismes survivent en présence d'anticancéreux et, dans le cas du nab-paclitaxel, prolifèrent(100). De cette viabilité fréquente des micro-organismes au contact des anticancéreux découle l'obligation d'un respect strict de l'asepsie des conditions de préparations.

Certaines de ses études peuvent être biaisées car certain micro-organismes (dont *Staphylococcus aureus*) perdent leurs viabilités dans des poches de NaCl 0,9% (Figure 19). Le mécanisme en cause semble être le défaut de nutriment disponible.



(97)

Figure 19 : Evolution de la viabilité des micro-organismes dans une poche de NaCl 0,9% au cours du temps

SA = *Staphylococcus aureus* ; EC = *Escherichia coli* ; PA = *Pseudomonas aeruginosa* ;

PC = *Pseudomonas cepacia* ; CA = *Candida albicans* ; AN = *Aspergillus niger*

Les valeurs sous la ligne en pointillé représentent une perte de viabilité supérieure à 1,5 log₁₀.

Le **Tableau VI** page 50 et l'annexe 2 page 92 regroupent les informations retrouvées sur les effets des anticancéreux sur les micro-organismes.

Tableau VI : Récapitulatif de l'existence d'effets antimicrobiens de molécules anticancéreuses

Classe ATC	anticancéreux	effet documenté	Classe ATC	anticancéreux	effet documenté	
L01A	A	Bendamustine	L01C	A	Docetaxel	absence
		Cyclophosphamide			Nab-paclitaxel	favorise
		Ifosfamide			Paclitaxel	absence
		Melphalan		B	Trabectédine	bactéricide
	B	Busulfan		D	Daunorubicine	bactéricide
	D	Carmustine			Doxorubicine	bactéricide
		Fotémustine			Epirubicine	bactéricide
X	Dacarbazine	Idarubicine	bactéricide			
L01B	A	Methotrexate	L01D	B	Mitomycine C	bactéricide
					bactéricide	Cisplatine
	fongicide	Oxaliplatine			absence	
	B	Clofarabine	L01X	C	Brentuximab-vedotin	absence
		Fludarabine			Ipilimumab	absence
		Nelarabine			absence	
	C	Azacitidine	L01X	A	Ofatumumab	absence
		Cytarabine			Panitumumab	absence
		5-Fluorouracil			Temsirolimus	absence
		fongicide		C	Aflibercept	absence
Gemcitabine	bactéricide					
L01C	A	Vinblastine	L01X	C	Eribuline	absence
		Vincristine			Topotécan	bactéricide
		Vinorelbine			bactéricide	
	B	Etoposide		absence		
	D	Cabazitaxel		absence		

Absence d'effet sur la croissance de micro-organisme

Effet néfaste sur la croissance de micro-organisme

Effet bénéfique sur la croissance de micro-organisme

L01A : Agents Alkylants ; L01B : Antimétabolites ;

L01C : Alcaloïdes végétaux et autres médicaments d'origines naturelle ;

L01D : Antibiotiques cytotoxiques et apparentés ; L01X : Autres antinéoplasiques

Ce tableau est une version simplifié du tableau disponible à l'Annexe 2.

II.3. Le 5-Fluorouracile

Le 5-fluorouracile (Figure 20) est l'une des molécules avec laquelle nous fabriquons des préparations en série de doses standard. Dans une étude préalable il a été rapporté que les micro-organismes de la Pharmacopée Européenne ne se développaient pas en présence de 5FU dans le dispositif BacT/ALERT®(12). De ce fait nous avons fait une recherche approfondie des propriétés du 5FU vis-à-vis des micro-organismes.

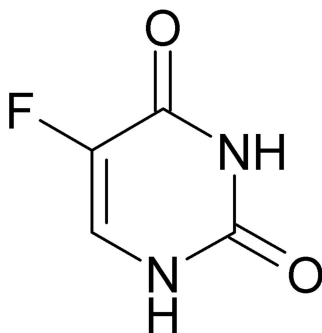


Figure 20 : Formule semi-développée du 5-fluorouracile

Formule brute = $C_4H_3FN_2O_2$

Nom IUPAC = 5 – Fluoro - 1H – pyrimidine - 2,4 - dione

Masse molaire = 130,078 g/mol

pka = 8,02

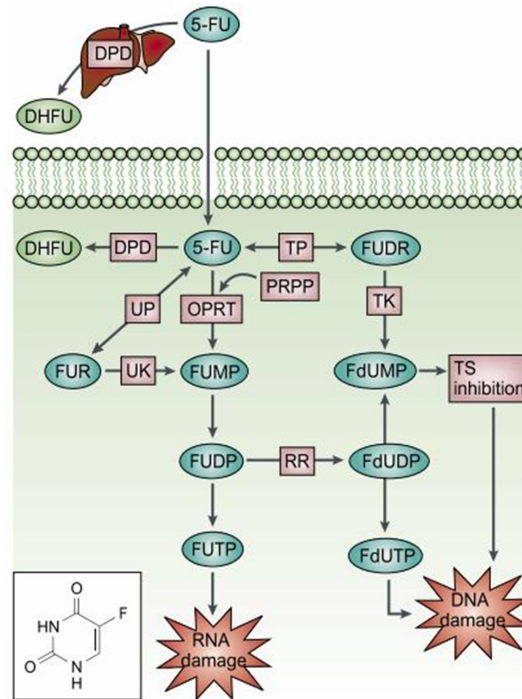
Température de décomposition = 282-283°C

Solubilité dans l'eau à 22°C = 11100 mg/L

Le 5FU est un antinéoplasique cytostatique de la famille des antimétabolites (antipyrimidine). Il est un analogue de l'uracile avec remplacement d'un atome d'hydrogène par un atome de fluor en C-5. Il est actif sur les tissus à croissance rapide car il possède trois effets antimétaboliques (Figure 21) :

- Inhibition de la synthèse d'ADN : ses métabolites (FdUMP, FdUTP) inhibent la synthèse et la réparation de l'ADN en inhibant la thymidilate-synthétase enzyme responsable de la formation *de novo* de thymidine. Cette inhibition de la formation de thymidine entraîne, par des phénomènes de rétrocontrôles, l'inhibition de la formation de toutes les désoxynucléotides.
- Lésions de l'ADN : l'accumulation de dUTP et de FdUTP dans la cellule conduit à des lésions de l'ADN et l'absence de thymidine empêche la réparation conduisant l'apoptose.
- Altération de la synthèse de protéines : ses métabolites s'incorporent à la place de l'uracile dans l'ARN provoquant la synthèse de protéines anormales

Il est inactivé en dihydrofluorouracile (DHFU) par la dihydropyrimidine phosphorylase (DPD) une enzyme présente abondamment au niveau hépatique (104).



(104)

Figure 21 : Mécanisme d'action du 5 fluorouracile

DPD = dihydropyrimidine deshydrogenase	;	DHFU = Dihydrofluorouracile
FdUMP = Fluorodesoxyuridine monophosphate	;	FdUDP = Fluorodesoxyuridine diphosphate
FdUTP = Fluorodesoxyuridine triphosphate	;	FUDR = Fluorodesoxyuridine
FUR = Fluorouridine	;	FUMP = Fluorouridine monophosphate
FUDP = Fluorouridine diphosphate	;	FUTP = Fluorouridine triphosphate
OPRT = Orotatephosphoribosyl transferase	;	PRPP = Phosphoribosyl pyrophosphate
RR = Ribonucleotide reductase	;	TK = Thymidine kinase
TP = Thymidine phosphorylase	;	UP = Uridinephosphorylase
UK = Uridine Kinase		

Le 5FU a obtenu l'AMM dans de nombreuses indications, dont les principales sont le traitement des adénocarcinomes digestifs métastatiques, des cancers colorectaux après résection, des adénocarcinomes mammaires, des adénocarcinomes ovariens, et les carcinomes épidermoïdes des voies aérodigestives supérieures et œsophagiennes (105,106).

Les posologies du 5FU varient selon les situations et/ou les indications.

Dans l'AMM :

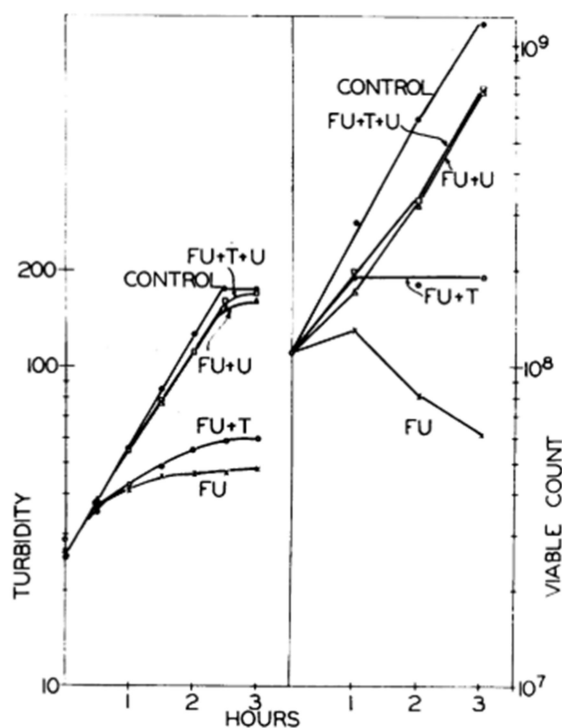
- Monothérapie : posologie moyenne de 400 à 600 mg/m²/j, 3 à 6 jours par mois ou 48 heures tous les 14 jours
- En association 300 à 600 mg/m², 2 à 5 jours toutes les 3 à 4 semaines. Il est utilisé en perfusion continue de 700 à 1000 mg/m² pendant 3 à 5 jours consécutifs.

Par voie intra-artérielle hépatique, la posologie est de 600 mg/m², toutes les semaines.

Hors AMM : Dans de nombreux protocoles (par exemple FOLFOX 4 simplifié), le 5FU est utilisé à des posologies jusqu'à 1500 mg/m²/j (106).

Les concentrations de 5FU dans les préparations réalisées à l'URC du Haut-Lévêque varient en moyenne entre 10 et 15 mg/ml (bolus de 5FU) et entre 25 et 50 mg/ml (infuseurs).

En outre, le 5FU possède une activité antibactérienne de type bactéricide et bactériostatique. Une première étude évaluant les effets des dérivés du 5-fluorouracile sur *E. Coli*, montre que le 5FU, à la concentration de 0,089 mmol/L (soit 0,001158 mg/ml), possède un effet bactériostatique par inhibition de la synthèse d'ADN et un effet moindre inhibiteur sur la synthèse d'ARN(107). Les auteurs montrent que cette inhibition disparaît presque totalement, lors de l'ajout concomitant d'uracile à la même concentration (**Figure 22**) que le 5FU(107). L'étude de Vanlancker a retrouvé que la présence de l'uracile conférait une résistance au 5FU pour les germes *Pseudomonas aeruginosa* et *Streptococcus salivarius* (108). Je n'ai pas retrouvé d'autres travaux observant l'action de l'uracile sur le 5FU. Un autre argument pour l'utilisation de l'uracile comme agent neutralisant de l'activité antimicrobienne du 5FU est que le triacétate d'uridine est utilisé comme antidote aux intoxications par le 5FU. Car l'uridine est une molécule d'uracile liée à un groupement ribose (109).



(107)

Figure 22 : Inhibition de la croissance de *E. coli* par le 5FU. Récupération de cette croissance en présence d'uracile et/ou de thymine

FU = 5-Fluorouracile ; T = thymine ; U = Uracile.

La concentration de ces différentes molécules est de 0,089 µmol/ml.

Dans d'autres études, lors de l'évaluation de l'activité bactéricide d'agents cytotoxiques, le 5FU a montré une concentration minimale inhibitrice (CMI) inférieure ou égale à 50 mg/L (le pic plasmatique après administration IV espéré étant de 60 mg/L) pour 29 bactéries sur les 41 testées avec une action sur les germes anaérobies (*Clostridium*, *Bacteriodes*, ...) et aérobies (*Streptococcus spp*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Salmonella enteritidis*,

Shigella sp, ...)(110). Le 5FU est également actif sur les mycobactéries (*Mycobacterium tuberculosis*, *M. intracellulare*, ...)(111,112) et est fongistatique sur *Candida albicans* (103).

On note que le 5FU est bactéricide sur *Staphylococcus aureus*(CMI<5mg/L) (103,110) , bactéricide sur *Bacillus subtilis* (102), bactéricide sur *Pseudomonas aeruginosa* (103,108,110,113) et fongistatique sur *Candida albicans* à la concentration de 5 mg/ml que l'on retrouve dans les préparations de chimiothérapie (102,103). Ces trois germes sont des germes de référence de l'essai de stérilité de la Pharmacopée.

Tableau VII : Récapitulatif des effets du 5-Fluorouracile sur les germes de la Pharmacopée Européenne

micro-organisme	effet	concentration de 5FU	source
<i>Staphylococcus aureus</i>	bactéricide	0,5-5 µg/ml	(110)
	bactéricide	52,03 mg/ml *	(114)
	bactéricide	5mg/ml	(103)
<i>Bacillus subtilis</i>	Bactéricide	NP (« pure et dilué »)	(102)
<i>Clostridium sporogenes</i>	Pas de données retrouvées dans la littérature		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	bactéricide	10,8 µg/ml	(113)
	bactéricide	10-50 µg/ml	(113)
	bactériostatique	12,5 µmol/L	(108)
	bactéricide	5mg/ml	(103)
<i>Candida albicans</i>	fongistatique	5mg/ml	(103)
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	Pas de données retrouvées dans la littérature		

(*): dose calculée

NP : non précisé

En outre le 5FU inhibe la formation de biofilms chez *Escherichia Coli* K-12(115). Chez *Pseudomonas aeruginosa*, il inhibe aussi la formation de biofilms, il abolie la détection du quorum (expression des gènes en fonction de la densité bactérienne) et réduit la virulence (91,116,117). Les cathéters ayant un traitement de surface par du 5FU ne sont pas moins efficaces que les cathéters ayant un traitement de surface par chlorhexidine/argent sulfadiazine pour prévenir les colonisations (118).

Cette activité antibactérienne semble être due une conversion intracellulaire en Fluorodesoxyuridylate. Ce métabolite est responsable d'une inhibition de la thymidilate-synthetase provoquant une inhibition de la synthèse d'ADN(112,114). Cette activité antibactérienne est aussi due à une accumulation d'ester de N-acetylhexosamine. Cette accumulation provoque un déséquilibre osmotique et une inhibition de la synthèse d'éléments de la paroi bactérienne (112,114,119).

En conclusion, l'activité antibactérienne du 5FU a bien été mise en lumière sur un bon nombre d'études. Le spectre antibactérien du 5FU touche un grand nombre de micro-organismes différents. Les CMI du 5FU retrouvées sur les micro-organismes de la pharmacopée sont regroupées dans le **Tableau VII**. Nos concentrations usuelles sont entre 10 et 50 mg/ml. Le 5FU possède donc une activité antibactérienne marquée aux concentrations présentes dans nos préparations. Cette activité devra être inhibée pour mettre en place un essai de stérilité basé sur la croissance de micro-organismes tel que le BacT/ALERT®.

III. Travaux personnels

Mes travaux auront pour but de trouver une méthode de traitement pré analytique pour que le BacT/ALERT® puisse être une alternative à l'essai de stérilité pour le 5FU.

III.1. Méthodologie

III.1.1. Méthodologie générale

La validation d'une méthode alternative à l'essai de stérilité la Pharmacopée Européenne repose sur plusieurs étapes :

- **Description de l'essai de référence**

Cette étape va permettre d'identifier les caractéristiques de la méthode de référence. Cela va permettre de choisir une méthode alternative adaptée et de trouver les points sur lesquels la comparaison de méthode doit se baser. De façon succincte, l'essai de stérilité de la Pharmacopée Européenne pour les préparations parentérales se caractérise par :

- L'information recherchée : **le type de réponse** est qualitatif. Cet essai détermine la présence/absence de micro-organismes viables.
- **Principe de la méthode** : filtration sur membrane d'un volume de préparation représentatif du lot (cf **Tableau III**), ensemencement sur un milieu liquide au thioglycolate (incubation à 30-35°C) et sur un milieu à l'hydrolysate de caséine et de soja (incubation à 20-25°C).
- **Méthode de détection** : lecture visuelle. La présence de micro-organismes entraîne la formation d'un trouble dans les milieux de cultures.
- **Délais nécessaire avant de pouvoir valider la stérilité** : 14 jours
- **Points critiques** :
 - Les milieux utilisés permettent la détection des micro-organismes suivants : *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridium difficile*, *Candida albicans* et *Aspergillus brasiliensis*
 - cette méthode de référence permet de détecter un inoculum de 100 UFC maximum en 3 jours pour des bactéries et en 5 jours pour des champignons
 - la plus grande valeur acceptable de la limite de détection de cette méthode est de 100 UFC

Ces points critiques sont des exigences qui doivent être satisfaites pour que cette méthode soit valide.

Une description plus détaillée de l'essai de stérilité de la Pharmacopée Européenne est faite au chapitre I.4.

- **Choix et description de la méthode alternative**

Le choix de la méthode alternative est validé en fonction de la description de la méthode alternative. En étudiant les caractéristiques de la méthode alternative sélectionnée, on vérifie sa capacité à pouvoir répondre aux exigences de la méthode de référence. Dans notre cas une méthode de microbiologie rapide a été sélectionnée : le BacT/ALERT®. Ses caractéristiques sont :

- **Type de réponse** : qualitatif. Il permet la recherche de présence/absence de micro-organismes
- **Principe de la méthode** : ensemencement direct dans des flacons hermétiques. Incubation dans une enceinte thermostatée à 37°C d'un automate de mesure. Il existe deux grands types de flacons : l'un adapté à la recherche de micro-organismes aérobies et l'autre adapté à la recherche de microorganismes anaérobies
- **Méthode de détection** : détection de la baisse de pH due à l'émission de CO₂ grâce à un indicateur coloré présent dans le fond des flacons de milieux de cultures. Le changement de couleur est lu au moyen d'une Diode Electro Luminescente et d'un photodétecteur. Les résultats sont rendus après traitement informatique
- **Délais nécessaire avant de pouvoir valider la stérilité** : 5 jours
- **Points critiques** :
 - le BacT/ALERT® permet la détection des micro-organismes de la Pharmacopée Européenne
 - Le BacT/ALERT® permet la détection des micro-organismes en environ 48 h (Cf Annexe 1)

La description du BacT/ALERT® est compatible avec son utilisation comme alternative à l'essai de stérilité.

- **Recherches bibliographiques sur l'usage de la méthode alternative dans ce domaine**

Cette étape va rechercher si la méthode sélectionnée a déjà été appliquée pour l'usage prévu. Les données recueillies vont aider à l'élaboration de la méthode et pour l'interprétation des résultats. Dans notre cas le BacT/ALERT® est déjà utilisé pour les essais de stérilités des préparations de nutriments parentéraux et des préparations parentérales d'aciclovir. Les données sur les délais de détections en fonction des micro-organismes et des milieux ont été compilées (Cf Annexe 1).

- **Comparaison de la méthode de référence avec la méthode alternative**

Cette étape se déroule en deux parties : un essai de fertilité et un essai d'applicabilité de la méthode.

- **Essai de fertilité**

Lors de cet essai est évaluée la capacité des deux méthodes (celle de référence et la méthode alternative) à répondre aux exigences de la Pharmacopée Européenne dans un milieu neutre. Les deux méthodes doivent satisfaire aux **points critiques** de la méthode de

référence : croissance des microorganismes, limites de détections, ... Cette étape permet la validation des conditions de réalisation des essais : locaux, matériels utilisés, milieux de culture, ... elle va permettre également de fournir une base de comparaison pour interpréter les résultats de l'étape suivante.

- **Essai d'applicabilité de la méthode**

Le but de cette étape est d'évaluer la capacité des deux méthodes à être utilisable dans l'usage prévu. Dans notre cas, lors de cette étape on va évaluer la capacité des deux méthodes à pouvoir être utilisées pour réaliser l'essai de stérilité en présence de 5-fluorouracile aux concentrations usuelles de nos préparations (c'est-à-dire entre 10 et 50 mg/ml).

- **Caractérisation de la méthode alternative**

Etape de finalisation du dossier de validation de la méthode alternative où seront décrit ses caractéristiques pour l'usage prévu par l'évaluation de :

- La limite de détection : plus petite quantité de micro-organisme détectable par la méthode.
- Spécificité, justesse : capacité de la méthode a rendre des résultats positifs pour des échantillons positifs et à rendre des résultats négatifs lorsque les échantillons sont négatifs.
- Répétabilité, reproductibilité : évalue la capacité de la méthode a rendre des résultats similaires dans les mêmes conditions.
- Robustesse : mesure la capacité d'une procédure d'analyse à ne pas être affectée par des variations faibles des paramètres de la méthode.

Avec ces différentes étapes réalisées, le dossier de validation de la méthode alternative sera complété (120,121).

III.1.2. Méthodologie de mes travaux personnels

Mes travaux personnels débutent à l'étape d'applicabilité de la méthode car la littérature ainsi que les travaux réalisés précédemment dans notre centre ont démontré que le BacT/ALERT® satisfaisait à l'essai de fertilité (6,10,11). Il permet en effet la détection des micro-organismes de références de l'essai de stérilité dans les limites du temps impartis (cf Annexe 1).

Comme nous l'avons vu au chapitre II.3, le 5FU possède une activité antibactérienne marquée qui ne permet pas au BacT/ALERT® de détecter les micro-organismes de la Pharmacopée Européenne(12). L'objectif est donc de mettre en place une méthode permettant d'inhiber cette activité antibactérienne. A ce titre, les travaux de Cohen démontrant que l'activité antimicrobienne du 5FU pouvait être inhibée en présence d'uracile à concentration équimolaire semblent intéressants (107).

Comme étape préliminaire à l'utilisation du BacT/ALERT® une recherche de concentration minimal inhibitrice (CMI) sur les micro-organismes de la Pharmacopée Européenne sera réalisée en présence de 5FU et en présence de mélanges équimolaires 5FU et d'uracile. Ces recherches de CMI vont être réalisées en effectuant des dilutions en cascade des solutions. Pour chaque dilution, on va rajouter un volume de milieu de culture inoculé avec le micro-organisme dont on veut évaluer la CMI. Le résultat sera évalué par l'observation

visuelle de la présence d'un trouble signifiant la croissance du micro-organisme. L'intérêt de cette étape est d'objectiver l'activité antimicrobienne du 5FU et d'observer l'effet de la présence de l'uracile sur la CMI du 5FU.

En cas de résultats significatifs, le mélange uracile et 5FU sera évalué dans le BacT/ALERT®.

Nous avons décidé de ne travailler qu'avec trois des six souches de micro-organismes que la Pharmacopée Européenne recommande car certaines souches ne sont pas représentatives des contaminants que l'on rencontre dans nos Zones à Atmosphères Contrôlées. Les souches sélectionnées sont:

- *Staphylococcus aureus* CIP 4.83,
- *Bacillus subtilis* CCM 1999 (= ATCC 6633),
- *Aspergillus brasiliensis* ATCC16 404.

L'un des points critiques est que l'on ne connaît pas la solubilité maximale de l'uracile. Celle retrouvée dans l'eau ppi est trop faible (3,6 mg/ml) (122) pour pouvoir être utilisée. Pour que l'uracile et le 5FU soient en concentration équimolaire le volume ajouté d'uracile dilué dans l'eau ppi entraînerait une dilution trop grande de l'échantillon de 5FU. Il va donc falloir mesurer la solubilité dans différents solvants. L'uracile semble soluble dans le NaOH 1N mais le pH élevé de ce solvant a de fortes chances de réduire la viabilité des micro-organismes.

Le pH des différentes solutions que l'on va utiliser pour mesurer les CMI sera mesuré pour vérifier une éventuelle influence du pH des solutions testées.

III.2. Matériel et méthode

III.2.1. Essai de solubilité de l'uracile

L'uracile, que nous allons utiliser, est sous forme de poudre à 99% commercialisé par Sigma Aldrich (référence U0750). Les informations fournies par le laboratoire indiquent que l'uracile peut se solubiliser dans l'hydroxyde de sodium normal (NaOH 1N) à la concentration de 50 mg/ml. Le laboratoire, que nous avons contacté, n'a pas de données de solubilité maximale et n'a pas testé d'autres solvants. L'uracile est aussi soluble dans l'eau distillée à la concentration de 3,6 mg/ml(122).

La solubilité de l'uracile va être évaluée dans plusieurs solvants :

- Le 5FU à 50 mg/ml : afin d'avoir la dilution minimale de 5FU possible. Ces deux molécules sont proches au niveau structural et au niveau de leurs propriétés physico-chimiques. Ainsi leurs pka est proche : 8,03 pour le 5FU et 9,45 pour l'uracile.
- L'hydroxyde de sodium à différentes normalités : le pH de la solution finale de 5FU et d'uracile risque de ne pas permettre la croissance de micro-organismes.

L'utilisation d'un témoin positif pour les essais de solubilités a dû être mis en place car on a observé la présence de petites particules insolubles qui peuvent être des impuretés de la matière première ou alors des particules rejetées par le verre. Les essais de solubilisation ont été comparés visuellement au témoin positif. Le témoin positif retenu est la solution

décrite par le laboratoire produisant l'uracile : 100 mg d'uracile dissous dans 2 ml de NaOH 1N. Ne sont pris en compte pour l'essai de solubilité que la présence de granules denses sédimentant rapidement qui ne sont pas présents dans le témoin positif.

Matériel :

- Balance Sartorius® QUINTIX 224-1CFR Type SQP-A (max 220g ; min 10 mg ; e = 1 mg ; d = 0,1 mg ; reconnue conforme jusqu'au 10/2018)
- Uracile poudre à 99% Sigma Aldrich pot de 25g. lot # SLBT4848
- 5-Fluorouracile 1000 mg/20 ml TEVA flacon de 1g prêt à l'emploi lot 16J23KA péremption 10/2018

Méthode :

Selon les lignes directrices de l'OCDE n°105 l'essai préliminaire de solubilité se déroule en ajoutant des volumes d'eau croissant à environ 0,1 g d'échantillon. Les solides doivent être pulvérisés, à température ambiante dans un flacon gradué fermé. Après chaque ajout d'eau le mélange doit être agité pendant 10 minutes(123). L'expérience est répliquée en triplicat.

Note : au cours de la réalisation des essais de solubilisation de l'uracile des améliorations du protocole ont été réalisés : dans un premier temps les essais de solubilisation étaient réalisés par agitations entre chaque ajout de volume et sans comparaison avec un témoin positif. Mais dans un second temps l'utilisation du VORTEX à plusieurs reprises jusqu'à absence de dissolution entre chaque ajout de volume a permis de retrouver une valeur de solubilité maximale bien plus importante.

III.2.1.1. Essai de solubilité de l'uracile dans le 5-Fluorouracile

Dans l'idéal l'uracile serait soluble dans la spécialité de 5FU que l'on utilise dans l'unité de reconstitution des chimiothérapies à une concentration équimolaire au 5FU. La solution la plus concentrée de nos préparations de 5FU est de 50 mg/ml.

III.2.1.2. Essai de solubilité de l'uracile dans l'hydroxyde de sodium

Vérification des données fournies par le laboratoire sur la solubilité de l'uracile et exploration de la solubilité maximale de l'uracile dans des solutions de normalité différentes.

La solubilité de l'uracile va être évaluée dans différentes dilutions d'NaOH pour limiter l'impact potentiel du pH sur la viabilité des micro-organismes. Les dilutions que l'on va évaluer sont : le NaOH 1N, le NaOH 0,5N et le NaOH 0,25N.

Le NaOH 1N est disponible dans le laboratoire de la PUI les autres concentrations sont obtenue par dilution avec de l'EPPI.

III.2.2. Mesure du pH

Le pH des solutions finales que nous allons utiliser dans nos essais de recherche de CMI est un paramètre qui va potentiellement influencer nos résultats. Le pH des différentes solutions que nous allons utiliser pour faire nos tests de CMI sera mesuré.

Les solutions que l'on va tester doivent respecter les conditions suivantes qui vont mimer les types d'échantillons que l'on souhaite analyser avec le BacT/ALERT® :

- Volume final de 10 mL
- Pour les solutions 5FU + Uracile concentration au moins équimolaire entre l'uracile et le 5FU.
- Pour les solutions 5FU + Uracile : concentration maximale en uracile (*i.e.* volume de 5FU maximal)

Le pH des solutions suivantes va être mesuré :

- 5FU
- 5FU + Uracile équimolaire dans NaOH 1N
- 5FU + uracile équimolaire dans NaOH 0,25N

La solution de NaOH 0,5N ne sera évaluée que si les études de CMI du NaOH 1N et du NaOH 0,25N montrent qu'il faudrait un intermédiaire entre les deux.

Matériel :

- pH mètre (Ph meter 220)

Méthode :

Etalonnage du pH mètre avec une solution tampon à 10,01 +/- 0,02. Les différentes solutions dont on souhaite mesurer le pH sont fabriquées extemporanément pour éviter tout biais de conservation. Leurs volumes et leurs contenants permettent l'immersion adéquate de la sonde du pH mètre. La sonde est rincée à l'eau distillée entre chaque mesure.

III.2.3. Recherche des concentrations minimales inhibitrices du 5-fluorouracile

L'activité antibactérienne du 5FU à la concentration de 50 mg/ml va être évaluée par une méthode de mesure de la CMI par méthode macroscopique : à il va être effectué à partir de cette solution une dilution en cascade et, à chaque dilution, ajout de bouillon de Mueller Hinton inoculé avec le micro-organisme dont on veut regarder la sensibilité. La lecture se fera par observation visuelle de la formation de trouble (signe de la croissance microbienne). Ces déterminations de CMI vont se faire par une phase préliminaire qui va permettre de situer la CMI de façon approximative. Dans un seconds temps, nous allons élaborer un protocole permettant la comparaison simultanée de CMI d'un même micro-organisme en contact avec des dilutions en cascades de différentes solutions.

III.2.3.1. Etude préliminaire

Cette étude préliminaire a pour but de situer approximativement les CMI du 5FU sur les microorganismes que l'on évalue pour dans un second temps créer un protocole de dilution qui va permettre d'atteindre cette concentration et un ou deux dilution plus faible. La gamme de concentration sélectionnée permettra d'objectiver l'effet de la présence de l'uracile sur la CMI que ce soit en l'augmentant ou en la diminuant.

Matériel :

- *Staphylococcus aureus* CIP 4.83,
- *Bacillus subtilis* CCM 1999 (= ATCC 6633),
- *Aspergillus brasilliensis* ATCC16 404.
- Bouillon de Mueller Hinton en poudre

Méthode :

Etapes préliminaire : Réalisation d'un bouillon de Muller Hinton à l'aide d'une poudre déshydratée et d'eau distillée. Ce bouillon est réparti dans des tubes avec un volume final de 10 ml. Stérilisation à l'autoclave à 134°C pendant 18 min, dans le service de stérilisation du CHU du Haut-Lévêque. Stérilisation du matériel pour réaliser les CMI : tubes à hémolyses, micropipettes et cônes.

Réalisation d'une gamme de dilution au demi avec un témoin positif entre 50 mg/ml et 0,19 µg/ml. Il correspond un tube contenant de l'eau ppi. Dans chaque tube est ajoutée la même quantité de bouillon de Mueller Hinton inoculé avec une pastille de micro-organisme. Les tubes sont refermés et mis à l'étuve à 37°C.

III.2.3.2. Recherche de concentration minimales inhibitrices par séries de dilutions au dixième

Staphylococcus aureus possède une grande sensibilité vis à vis du 5FU, selon la bibliographie (**Tableau VII**). Afin de permettre l'observation de cette CMI supposée vers 0,5 µg/ml, une étude de CMI par série de dilution au dixième va être faite. Elle va permettre d'observer la CMI mais aussi les effets de la présence de l'uracile en concentration équimolaire que ce soit en diminuant la CMI ou en augmentant la CMI (et donc en diminuant l'effet bactéricide du 5FU).

La dilution au dixième est réalisée selon le schéma suivant :

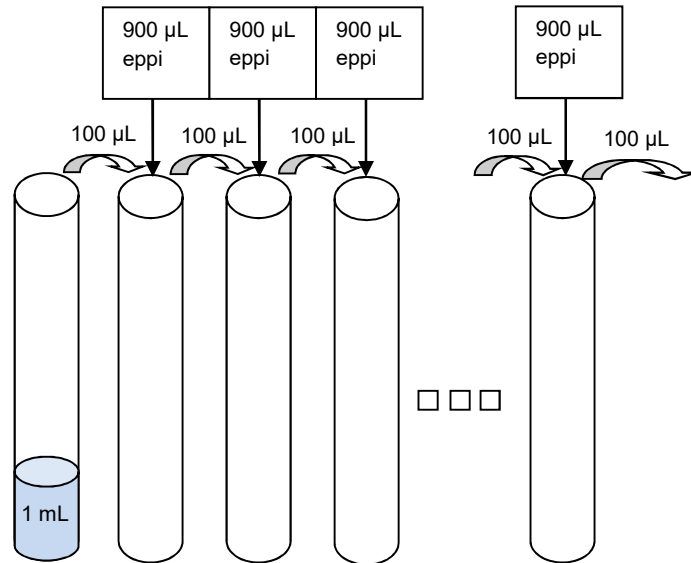


Figure 23 : Schéma de dilution en cascade

III.2.3.3. Etudes comparatives de concentration minimale inhibitrice entre le 5-fluorouracile et les mélanges de 5-fluorouracile et d'uracile

Dans cette partie nous allons tester des solutions similaires à celle que l'on souhaite injecter dans le BacT/ALERT®.

Pour rappel ces solutions doivent satisfaire aux exigences suivantes :

- Volume final de 10 mL
- Pour les solutions 5FU + Uracile concentration au moins équimolaire entre l'uracile et le 5FU.
- Pour les solutions 5FU + Uracile : concentration maximale en uracile (*i.e.* volume de 5FU maximale)

Les solutions testées sont identiques à celles dont nous avons mesuré le pH.

III.2.3.4. Etudes de concentration minimales inhibitrices du 5-fluorouracile en présence d'uracile en excès

Nous allons tester les CMI de deux mélanges de 5FU + Uracile (25% 5FU et 75% uracile en nombre de moles) :

- uracile dissous dans le NaOH 1N
- uracile dissous dans le NaOH 0,25N

le schéma utilisé sera une dilution en cascade au cinquième.

Tableau VIII : Conception des solutions de mélange de 5FU et d'uracile en excès.

solution	[5FU] mg/ml	V _{5FU} ml	[5FU] mol/l	m _{uracile} mg	[Uracile] Mol/l	V _{NaOH 1N} ml	V _{eppi} ml
5FU + NaOH 1N	50	4,2	0,16	626,4	0,56	5,8	0
5FU + NaOH 0,25 N	50	1,6	0,062	235,2	0,21	2,1	6,3

III.2.4. Extrapolation au BacT/ALERT®

En fonction des résultats des expériences précédentes, le ou les mélanges fournissant les résultats les plus probants seront testés dans le dispositif BacT/ALERT®. Les milieux présents dans les flacons peuvent interférer avec l'effet antimicrobien de l'uracile.

Si les résultats sont positifs, la limite de détection de la méthode sera évaluée. Comme nous avons vu au chapitre I.7 la limite de détection retrouvée pour le BacT/ALERT® est située entre 1 et 10 UFC introduits par flacon.

III.3. Résultats et discussions

III.3.1. Essai de solubilité de l'uracile

III.3.1.1. Essai de solubilité de l'Uracile dans le 5-Fluorouracile

Devant une solubilité bien plus faible que celle espérée, des modifications du protocole ont dû avoir lieu comprenant le changement de contenant pour augmenter le volume où les essais de solubilités ont été pratiqués.

Les résultats sont détaillés dans le tableau suivant :

Tableau IX : Résultats de l'essai de solubilité de l'uracile dans le 5FU

Solvant	Masse d'uracile (mg)	Volume solvant (ml)	Solubilisation	Solubilité
5 FU 50 mg/ml	107,5	4	Non	< 30 mg/ml
5 FU 50 mg/ml	105,4	11	Non	< 10 mg/ml
5 FU 50 mg/ml	53,6	21	Oui	2,55 mg/ml

Discussions :

L'uracile n'est pas assez soluble dans le 5FU à 50 mg/ml pour atteindre une concentration équimolaire. Nous allons donc devoir utiliser un autre solvant pour dissoudre l'uracile ce qui va entraîner la dilution du 5FU.

III.3.1.2. Essai de solubilité de l'uracile dans l'hydroxyde de sodium

Les résultats sont détaillés dans les tableaux suivant :

Tableau X : Résultats des essais de solubilité de l'uracile dans le NaOH 1N

Solvant	Masse uracile (mg)	Volume (ml)	Solubilisation	Solubilité (mg/ml)
NaOH 1N	100,6	1	oui	100,6
NaOH 1N	100,3	0,970	oui	103,4
NaOH 1N	107,5	0,970	oui	110,82
NaOH 1N	100,3	0,920	oui	109,02

Tableau XI : Résultats des essais de solubilité de l'uracile dans le NaOH 0,5N

Solvant	Masse uracile (mg)	Volume (ml)	Solubilisation	Solubilité (mg/ml)
NaOH 0,5N	99,8	1,76	oui	56,70
NaOH 0,5N	100,6	1,7	oui	59,18
NaOH 0,5N	104,0	1,72	oui	60,47

Tableau XII : Essais de solubilisation de l'uracile dans le NaOH0,25N

Solvant	Masse uracile (mg)	Volume (ml)	Solubilisation	Solubilité (mg/ml)
NaOH 0,25N	101,5	3,3	oui	30,72
NaOH 0,25N	99,6	3,35	oui	29,73
NaOH 0,25N	108,1	4,2	oui	25,74

Tableau XIII : Récapitulatif des solubilités de l'uracile dans le NaOH

Normalité NaOH (N)	1	0,5	0,25	0
Solubilité retenue (mg/ml)	105	55	28	3,6(122)

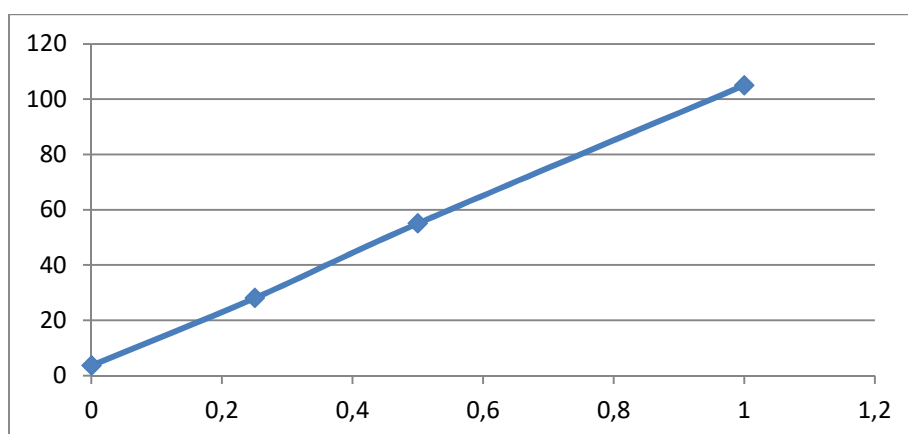


Figure 24 : Graphique de la solubilité de l'uracile en mg/ml en fonction de la normalité du NaOH

Discussions :

Conformément aux informations fournies par le laboratoire qui nous a fourni l'uracile : l'uracile est soluble dans le NaOH 1N. Le laboratoire nous avait indiqué ne pas avoir fait d'essai de solubilité maximale. En effet, nous avons retrouvé une solubilité maximale bien supérieure à celle indiquée : le laboratoire nous indiquait une solubilité de 50 mg/ml dans le NaOH 1N et nous avons retrouvé expérimentalement une solubilité d'environ 105 mg/ml dans le même solvant. La solubilité de l'uracile diminue proportionnellement à la normalité du NaOH.

Cette solubilité est suffisante pour que les volumes de 5FU soient significatifs dans les mélanges équimolaire de 5FU et d'uracile.

Avec ces données de solubilité de l'uracile on peut concevoir les solutions qui seront utilisées pour réaliser les CMI. Elles doivent satisfaire aux exigences suivantes :

- Volume final de 10 mL
- Pour les solutions 5FU + Uracile concentration au moins équimolaire entre l'uracile et le 5FU.
- Pour les solutions 5FU + Uracile : concentration maximale en uracile (*i.e.* volume de 5FU maximale)

D'après ces données les solutions qui vont être utilisées pour réaliser les études de CMI seront

Tableau XIV : Conception des solutions pour les mesures du pH et études de CMI

solutions	[5FU] mg/ml	V _{5FU} ml	[5FU] mol/l	m _{uracile} mg	[Uracile] Mol/l	V _{NaOH 1N} ml	V _{eppi} ml	V _{Total} ml
5FU	50	10	0	0	0	0	0	10
5FU + NaOH 1N	50	7	2,69	301,6	2,69	3	0	10
5FU + NaOH 0,25 N	50	4	1,54	172,3	1,54	1,5	4,5	10

III.3.2. Mesures du pH

Tableau XV : Résultats des essais de mesures de pH

Série de mesures	1	2	3
5-Fluorouracile	8,92	8,93	8,94
5FU + U dans NaOH 1N	10,80	10,78	10,76
5FU + U dans NaOH 0,25N	10,00	10,01	10,01

U : uracile

Ces pH sont plus basiques que les pH optimaux de croissances des micro-organismes de la Pharmacopée Européenne (**Tableau V**). Les pH sont donc défavorables à la croissance de ces micro-organismes.

III.3.3. Etude de concentrations minimales inhibitrices du 5-Fluorouracile

III.3.3.1. Etude préliminaire

L'inoculum de *Staphylococcus aureus* était d'environ 4200 UFC/ml : dilution d'une pastille de 42 000 UFC dans 10 ml de bouillon de Mueller Hinton. Cet inoculum a permis la positivations du témoin après 24h alors qu'il n'a pas été observé de croissance chez aucune dilution même après une semaine d'incubation à 37°C.

Tableau XVI : Résultat de l'étude préliminaire de la CMI du 5FU sur *Staphylococcus aureus*

Concentration en 5FU µg/ml	0	25000	12500	6250	3125	1562,5	781,25	390,63	195,31	97,66
Croissance	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Concentration en 5FU µg/ml	48,83	24,41	12,21	6,1	3,05	1,53	0,76	0,38	0,19	
Croissance	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

+ : observation d'un trouble

- : absence de trouble

L'inoculum d'*Aspergillus brasiliensis* était d'environ 1000 UFC dans 1ml. Cet inoculum a permis la positivations du témoin après 24h alors qu'aucune dilution ne s'est positivé même après une semaine d'incubation à 37°C.

Tableau XVII : Résultat de l'étude préliminaire de la CMI du 5FU sur *Aspergillus brasiliensis*

Concentration en 5FU µg/ml	0	25000	12500	6250	3125	1562,5	781,25
croissance	+	-	-	-	-	-	-

+ : observation d'un trouble

- : absence de trouble

L'absence de croissance du *Bacillus subtilis* même avec le témoin positif suggère un inoculum trop faible ou une non viabilité des pastilles reçues.

Tableau XVIII : Résultats de l'étude préliminaire de la CMI du 5FU sur *Bacillus subtilis*

Concentration en 5FU µg/ml	0	25000	12500	6250	3125	1562,5	781,25
croissance	-	-	-	-	-	-	-

+ : observation d'un trouble

- : absence de trouble

Discussion :

L'absence de croissance de *Staphylococcus aureus* dans toute la gamme de dilution alors qu'il y a 18 niveau de dilution. Le schéma de dilution au demi n'est donc pas adapté. En comparant les premiers résultats retrouvés avec ceux de la littérature, (cf **Tableau VII**) on observe que l'activité antibactérienne du 5FU sur *Staphylococcus aureus* est plus importante que celle mentionnée : on retrouve une absence de croissance à la concentration de 0,19 µg/ml alors que dans la littérature on retrouve 0,5 µg/ml. Je n'ai pas retrouvé de données chiffrées pour les autres micro-organismes.

III.3.3.2. Etudes de concentration minimales inhibitrices du 5-fluorouracile par séries de dilutions aux dixièmes

Tableau XIX : Résultats de l'étude de CMI du 5FU par dilution aux dixièmes sur le *Staphylococcus aureus*

Concentration en 5FU (µg/ml)	0	0,25	0,025	0,0025	0,00025	0,000025
Croissance série 1	+	-	+	+	+	+
Croissance série 2	+	-	-	+	+	+

+ : observation d'un trouble

- : absence de trouble

Tableau XX : Résultats de l'étude de CMI du 5FU par dilution aux dixièmes sur le *Bacillus subtilis*

Concentration en 5FU (µg/ml)	0	0,25	0,025	0,0025	0,00025	0,000025
Croissance série 1	+	-	+	+	+	+
Croissance série 2	+	-	+	+	+	+

+ : observation d'un trouble

- : absence de trouble

Tableau XXI : Résultats de l'étude de CMI du 5FU par dilution aux dixièmes sur *Aspergillus brasiliensis*

Concentration en 5FU (µg/ml)	0	0,25	0,025	0,0025	0,00025	0,000025
Croissance série 1	+	+	+	+	+	+
Croissance série 2	+	+	+	+	+	+

+ : observation d'un trouble

- : absence de trouble

Discussion :

Chez les trois micro-organismes le schéma de dilution au dixième permet l'observer une croissance sur au moins deux dilutions tout en partant de la solution mère : le 5FU à la concentration de 50 mg/ml. Un autre avantage de ce schéma de dilution est que la gamme de dilution ne comporte que 10 éléments. D'après ces résultats le schéma de cascade de dilutions au dixième est adapté : il va permettre d'observer la CMI du 5FU et l'effet de la présence de l'uracile sur la CMI jusqu'à la solution mère.

III.3.3.3. Etudes comparatives de concentrations minimales inhibitrices entre le 5-fluorouracile et les mélanges de 5-fluorouracile et d'uracile en concentrations équimolaires

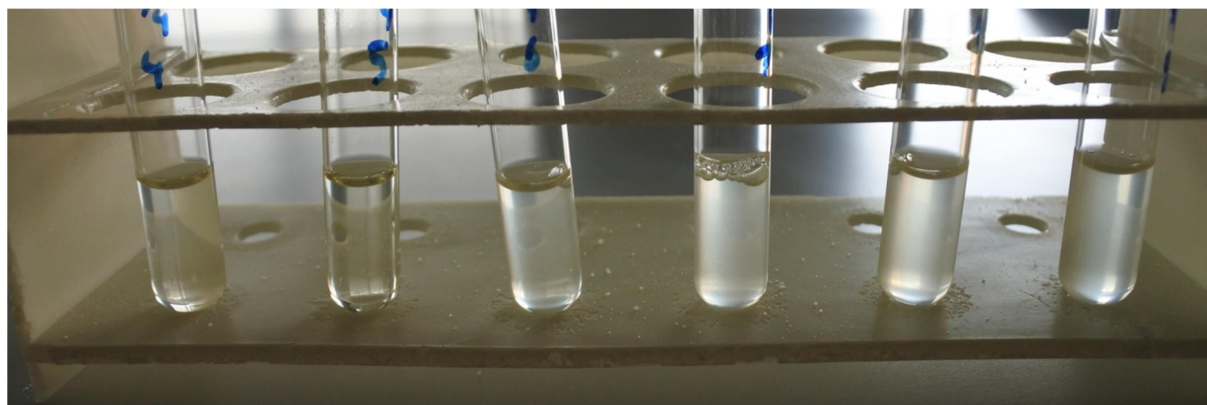


Figure 25 : Résultats de la série 3 de NaOH 0,25N chez *Staphylococcus aureus*

De Gauche à droite : concentration 10 µg/ml, 1µg/ml, 0,1µg/ml, 0,01 µg/ml, 0,001 µg/ml et 0,0001 µg/ml. Les tubes à 10µg/ml et 1 µg/ml sont négatifs. Dans les autres on observe un trouble. Le bouillon de Mueller Hinton inoculé est jaune clair. Dans chaque tube un volume égal de bouillon et de mélange à tester a été mis. Le mélange final donne une coloration jaune très peu prononcée.

Tableau XXII : Résultat de l'étude comparative de CMI sur *Staphylococcus aureus*

5FU pure (µg/ml)	25000	2500	250	25	2,5	0,25	0,025	0,0025	0,00025	0,000025
Série 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Série 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Série 3	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
5FU (µg/ml) + U _{NaOH 1N}	17500	1750	175	17,5	1,75	0,175	0,0175	0,00175	0,000175	0,0000175
Série 1	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
Série 2	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Série 3	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
5FU (µg/ml) + U _{NaOH 0,25N}	10000	1000	100	10	1	0,1	0,01	0,001	0,0001	0,000017
Série 1	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Série 2	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Série 3	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+

+ : observation d'un trouble

- : absence de trouble

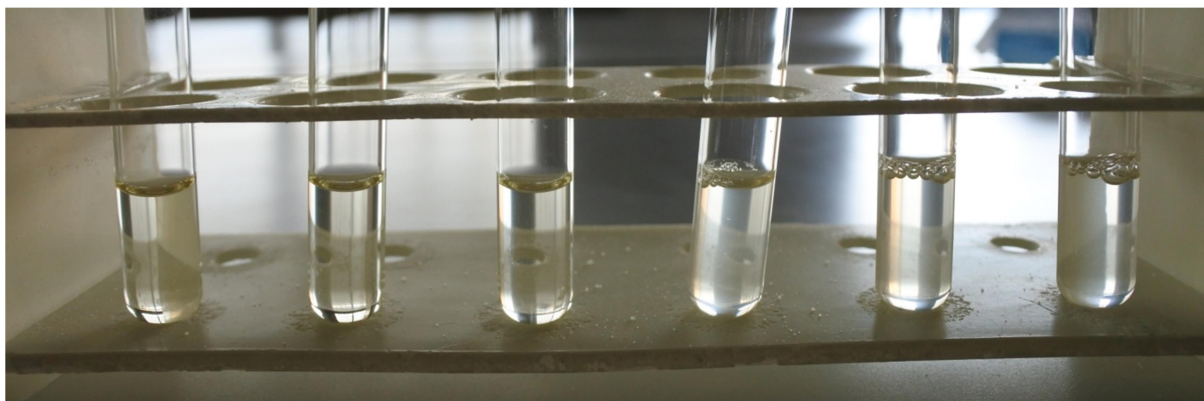


Figure 26 : Résultats de la série 3 de NaOH 0,25 N chez *Bacillus subtilis*

De gauche à droite concentration en 5FU : 1000 µg/ml, 100 µg/ml, 10 µg/ml, 1 µg/ml, 0,1 µg/ml et 0,01 µg/ml. Les trois premiers tubes sont négatifs et les autres sont positifs.

Tableau XXIII : Résultats de l'étude comparative de CMI chez *Bacillus subtilis*

5FU pure (µg/ml)	25000	2500	250	25	2,5	0,25	0,025	0,0025	0,00025	0,000025
Série 1	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Série 2	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Série 3	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
5FU (µg/ml) + U _{NaOH 1N}	17500	1750	175	17,5	1,75	0,175	0,0175	0,00175	0,000175	0,0000175
Série 1	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
Série 2	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
Série 3	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
5FU (µg/ml) + U _{NaOH 0,25N}	10000	1000	100	10	1	0,1	0,01	0,001	0,0001	0,00001
Série 1	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Série 2	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
Série 3	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+

+ : observation d'un trouble

- : absence de trouble

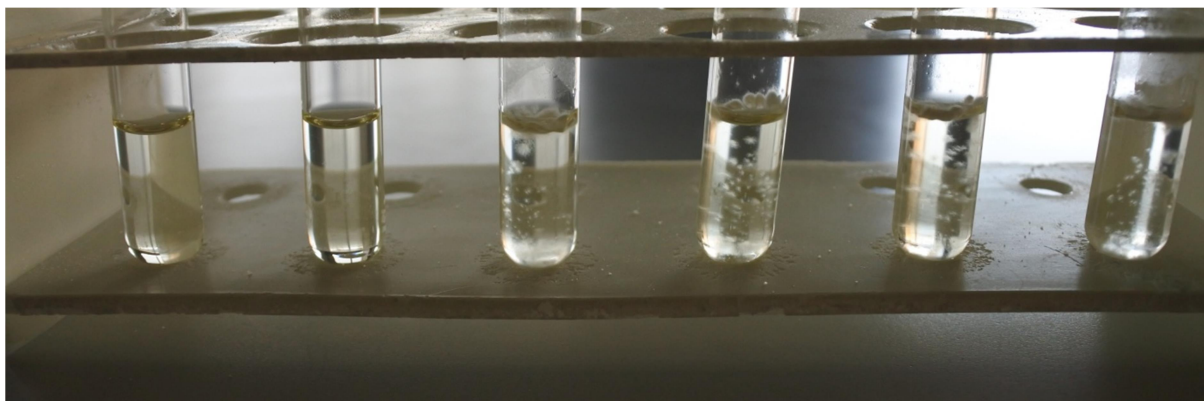


Figure 27 : Résultats de la série 3 de NaOH 1N chez *Aspergillus brasiliensis*

De gauche à droite concentration en 5FU : 1750 µg/ml, 175 µg/ml, 17,5 µg/ml, 1,75 µg/ml, 0,175 µg/ml et 0,0175 µg/ml. Les deux premiers tubes sont négatifs et les autres sont positifs.

Tableau XXIV : Résultats de l'étude comparative de CMI chez *Aspergillus brasiliensis*

5FU pure (µg/ml)	25000	2500	250	25	2,5	0,25	0,025	0,0025	0,00025	0,000025
Série 1	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Série 2	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Série 3	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
5FU (µg/ml) + U _{NaOH 1N}	17500	1750	175	17,5	1,75	0,175	0,0175	0,00175	0,000175	0,0000175
Série 1	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Série 2	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Série 3	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
5FU (µg/ml) + U _{NaOH 0,25N}	10000	1000	100	10	1	0,1	0,01	0,001	0,0001	0,00001
Série 1	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Série 2	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Série 3	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ : observation d'un trouble

- : absence de trouble

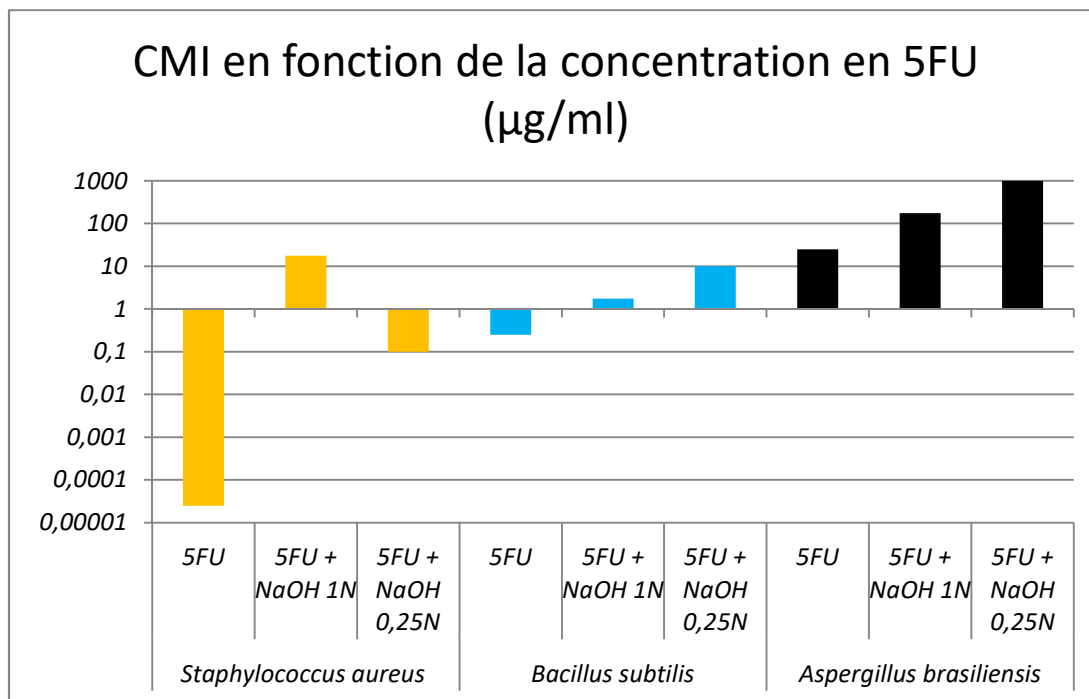


Figure 28 : Graphique regroupant les données des études de CMI

5FU : solution de 5-Fluorouracile

5FU + NaOH 1N : solution de 5-Fluorouracile et d'uracile en concentration équimolaire où l'uracile est dissout dans le NaOH 1N

5FU + NaOH 0,25N : solution de 5-Fluorouracile et d'uracile en concentration équimolaire où l'uracile est dissout dans le NaOH 0,25N

Discussions :

La CMI du 5FU chez les micro-organismes testés est trop basse pour envisager une dilution des préparations pour contrer l'activité antimicrobienne du 5FU. Une dilution de 10^{-10} serait nécessaire pour que *Staphylococcus aureus* soit viable. Le volume de la dilution testée ne serait pas représentatif de l'échantillon et donc de la préparation.

Chez les trois micro-organismes testés, la présence de l'uracile en concentration équimolaire entraîne une augmentation de la CMI du 5FU. La présence de l'uracile permet donc d'inhiber en parti l'activité antimicrobienne du 5FU. Cependant l'inhibition de l'effet antimicrobien n'est pas complète : chez aucun micro-organisme la présence d'uracile n'inhibe complètement l'activité antimicrobienne du 5FU. La CMI la plus élevée retrouvée est de 1 mg/ml chez *Aspergillus brasiliensis* ce qui est loin de la concentration cible 50 mg/ml que l'on souhaite atteindre.

Dans l'étude de Cohen qui utilise aussi l'uracile pour inhiber l'activité du 5FU, les concentrations de 5FU et d'uracile sont de 0,089 μ mole/ml soit 11,57 μ g/ml de 5FU (107). De la même façon que dans cette étude nous observons à cette concentration l'activité antimicrobienne du 5FU sur *Staphylococcus aureus* et sur *Bacillus subtilis*. Sur ces micro-organismes l'activité antimicrobienne du 5FU est inhibée en présence d'uracile lorsque l'uracile est dissout dans le NaOH 1N pour *Staphylococcus aureus* et lorsque l'uracile est dissout dans le NaOH 0,25 N pour *Bacillus subtilis*. Les résultats sont donc similaires à ceux de l'étude de Cohen. La bactérie dans son étude est *Escherichia coli* l'absence d'information sur les paramètres de cette étude rends la comparaison difficile : n'est pas mentionner le solvant utilisé pour dissoudre l'uracile ni le milieu de culture utilisé.

III.3.3.4. Etudes de concentrations minimales inhibitrices de 5-Fluorouracile avec excès d'Uracile

Tableau XXV : Résultats de l'étude de CMI d'un mélange 5FU et Uracile avec Uracile en excès chez *Staphylococcus aureus*

5FU ($\mu\text{g/ml}$) + $\text{U}_{\text{NaOH } 1\text{N}}$	10500	2100	420	84	16,8
Série 1	-	-	+	+	+
Série 2	-	-	+	+	+
5FU ($\mu\text{g/ml}$) + $\text{U}_{\text{NaOH } 0,25\text{N}}$	4000	800	160	32	6,4
Série 1	-	-	+	+	+
Série 2	-	-	+	+	+

+ : observation d'un trouble

- : absence de trouble

Tableau XXVI : Résultats de l'étude de CMI d'un mélange 5FU et Uracile avec Uracile en excès chez *Bacillus subtilis*

5FU ($\mu\text{g/ml}$) + $\text{U}_{\text{NaOH } 1\text{N}}$	10500	2100	420	84	16,8
Série 1	-	-	-	-	+
Série 2	-	-	-	+	+
5FU ($\mu\text{g/ml}$) + $\text{U}_{\text{NaOH } 0,25\text{N}}$	4000	800	160	32	6,4
Série 1	-	-	-	+	+
Série 2	-	-	+	+	+

+ : observation d'un trouble

- : absence de trouble

Tableau XXVII : Résultats de l'étude de CMI d'un mélange 5FU et Uracile avec Uracile en excès chez *Aspergillus brasiliensis*

5FU (µg/ml) + U _{NaOH} 1N	10500	2100	420	84	16,8
Série 1	-	+	+	+	+
Série 2	-	+	+	+	+
5FU (µg/ml) + U _{NaOH} 0,25N	4000	800	160	32	6,4
Série 1	-	-	+	+	+
Série 2	-	-	+	+	+

+ : observation d'un trouble

- : absence de trouble

Discussion :

Même en présence d'uracile en concentration bien plus importante que le 5FU (plus de trois fois supérieure) l'activité antimicrobienne du 5FU n'est pas entièrement inhibée. Une autre méthode pour suivre la stérilité du 5FU devrait être envisagée.

III.4. Discussion générale

Les études d'effets antimicrobiens des anticancéreux ont retrouvé qu'une proportion non négligeable des anticancéreux de l'arsenal thérapeutique actuel ne possède pas d'activités antimicrobiennes (88,89,97,124, ...). De la même façon les études de viabilité des micro-organismes ont retrouvé que fréquemment, les micro-organismes survivaient au contact d'agents anticancéreux (99–102,125). Or les études sur la viabilité et sur les activités antimicrobiennes des micro-organismes au contact des anticancéreux se basaient sur la capacité des micro-organismes à pouvoir se multiplier : l'évaluation était réalisée sur le nombre d'UFC ou sur l'inhibition de la croissance. Ces études ne prenaient pas en compte la possibilité que les bactéries et les champignons puissent rentrer en état viables mais non cultivable (VMNC). Donc, ces études peuvent avoir surévalué les activités antimicrobiennes des anticancéreux et sous-évalué la capacité de survie des micro-organismes au contact des anticancéreux. Ces informations confirment la nécessité de mettre en place une méthode d'évaluation de la stérilité des préparations d'anticancéreux à partir du moment où cela est réalisable.

L'essai de stérilité tel que défini par la Pharmacopée Européenne est un test standardisé utilisé au niveau international. C'est un test ancien dont les premières mentions datent de 1932 dans la pharmacopée Belge. Même s'il a eu des modifications, le principe est resté le même. Il possède de nombreuses limites :

- Ses conditions de cultures (milieux, températures, ...) ne permettent pas de détecter un grand nombre de micro-organismes (126)

- Son mode de détection est basée sur une observation visuelle qui est donc subjective
- Il ne permet pas la quantification des micro-organismes dans le volume d'échantillon
- Il ne permet pas la détection des micro-organismes viables mais non cultivables. Or ces micro-organismes VMNC sont inclus dans la définition de la stérilité : « absence de micro-organismes viables ».

Les tests de microbiologies rapides actuellement disponibles sont plus sensibles, plus rapides pour rendre les résultats. Certaines de ces méthodes permettent la détection des micro-organismes viables mais non cultivables (cytométrie en phase solide, cytométrie en phase liquide, PCR, RT-PCR) mais elles possèdent des inconvénients :

- la PCR et la RT-PCR sont des méthodes coûteuses.
- La cytométrie en flux a besoin d'un inoculum important (il est recommandé d'avoir un inoculum de 10^5 cellules/ml) or les contaminations accidentelles des préparations parentérales sont faites avec de petits inocula.
- La méthode qui semble la plus applicable au CHU de Bordeaux semble être la cytométrie en phase solide que je décris plus bas.

La détection de ces micro-organismes VMNC va peut-être mettre en lumière la contamination de nos préparations par des micro-organismes inhabituels. Car ces micro-organismes ne sont pas détectés par les méthodes usuelles de contrôles : gélose de contact, méthodes de sédimentations.

L'utilisation du BacT/ALERT® se justifie dans une démarche d'harmonisation des pratiques car il est déjà utilisé pour le suivi de la stérilité des préparations d'aciclovir et des mélanges tertiaires de nutriments parentéraux pédiatriques. L'une des critiques que l'on peut faire vis-à-vis de son utilisation est que le mode de détection du BacT/ALERT® est basé sur la croissance. Il ne permet donc pas la détection des micro-organismes VMNC. Il n'a pas satisfait à l'essai d'applicabilité de la méthode de la Pharmacopée Européenne pour les anticancéreux suivant : le 5-fluorouracile et la gemcitabine (12). Il faut donc une étape pré-analytique de traitement de l'échantillon pour réaliser l'essai de stérilité pour les préparations que l'on souhaite réaliser en lots importants.

Les études de CMI réalisées avaient pour but d'évaluer l'activité antimicrobienne du 5FU et de voir si l'utilisation de l'uracile permettait de l'inhiber. Ces études ont retrouvé que le 5FU possède une activité antimicrobienne très marquée. Cette activité est plus importante sur les bactéries testées (*Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis*) que sur le champignon testé (*Aspergillus brasiliensis*). Cette activité antimicrobienne est trop importante pour utiliser la dilution comme étape pré analytique avant l'introduction dans le BacT/ALERT® car il faudrait réaliser une dilution à 10^{-10} pour contrer l'activité bactéricide du 5FU. La proportion infinitésimale de l'échantillon initial analysé ne serait pas représentatif des préparations.

L'utilisation de l'uracile en concentration équimolaire au 5FU montre une augmentation de la CMI du 5FU mais ne permet pas une inhibition complète de l'activité antimicrobienne. Le solvant utilisé pour dissoudre l'uracile a une influence sur les résultats. Pour *Staphylococcus aureus* l'utilisation du solvant NaOH 1N a permis une plus grande augmentation de la CMI que le solvant NaOH 0,25N. Pour les deux autres micro-organismes c'est l'effet inverse. On

ne peut donc pas conclure que l'utilisation du solvant NaOH 0,25N est à privilégier par rapport au solvant NaOH 1N.

Même l'utilisation de l'uracile en concentration supérieure à la concentration en 5FU ne permet pas d'inhiber totalement l'activité antimicrobienne du 5FU. L'activité antimicrobienne du 5FU n'étant pas inhibée aux concentrations que l'on souhaite évaluer par l'uracile, l'évaluation de cette méthode dans BacT/ALERT® n'a pas été réalisée.

L'activité du 5FU est liée à deux phénomènes le Fluorouracile triphosphate qui s'incorpore à la place de l'uracile dans l'ARN et le fluorodésoxyuridine monophosphate qui inhibe la thymidilate-synthétase. L'absence d'une réversion complète de l'activité antimicrobienne du 5FU par l'uracile pourrait s'expliquer par le fait que l'uracile ne parvient probablement pas à - déloger le FdUMP de sa liaison avec la thymidilate-synthétase (104).

Dans la méthode utilisée pour réaliser les études de CMI il n'a pas été évalué l'association 5FU et NaOH 1N. Cette évaluation aurait permis de mettre plus en lumière l'effet du pH sur la croissance des micro-organismes en présence de 5FU. De la même façon, il aurait été intéressant d'évaluer la CMI du 5FU à un pH ajusté à 7 au moyen d'un tampon. Car les pH optimaux des micro-organismes de la Pharmacopée Européenne sont tous proches de 7.

Un autre produit inhibe potentiellement l'activité antimicrobienne du 5FU : le tracétate d'uridine Vistogard®. Il s'agit d'un médicament en ATU qui est utilisé dans le traitement des intoxications au 5FU. Après métabolisation le triacétate d'uridine entre en compétition avec l'un des métabolites toxiques du 5FU le Fluorouracile triphosphate (FUTP) pour son incorporation dans l'ARN (127). Son évaluation est intéressante d'un point de vue théorique mais le prix de cette spécialité est trop important pour l'envisager (16 766 \$ les 40 g).

L'activité antimicrobienne du 5FU est tellement marquée que, selon moi, il faudrait utiliser une méthode ayant recourt à une filtration sur membrane. Cette filtration associée à des rinçages permettrait que les micro-organismes ne soient quasiment plus en contact avec l'anticancéreux. La filtration sur membrane permet en outre de concentrer les échantillons : sur une même membrane plusieurs unités d'un même lots peuvent être filtrées ; cela permet d'augmenter la sensibilité de l'essai et de réduire le nombre d'analyses pour le même nombre d'échantillons analysés. La remise en solution de ces germes pour ensuite les injecter dans le BacT/ALERT® me semble compliqué et potentiellement source de faux positifs du fait de l'asepsie rigoureuse nécessaire.

Une alternative prometteuse serait d'utiliser le Système SCANRDI® de Biomérieux. Ce système utilise une méthode de microbiologie rapide qui ne nécessite pas de croissance des micro-organismes : la cytométrie en phase solide. Cette méthode consiste en une filtration sur membrane. Après la filtration sur membrane et le rinçage, un colorant est utilisé. Ce colorant, une fois métabolisé, est fluorescent. La membrane est ensuite transférée dans l'automate de lecture SCANRDI® qui par balayage laser va rendre les résultats. Selon le site du constructeur, cette méthode permet de détecter une bactérie viable dans un litre d'échantillon testé. Le délai de rendu des résultats est de 3 heures. En comparaison avec l'essai de stérilité (14 jours) cela représente une réduction du temps de rendu des résultats très importante et également avec l'utilisation du BacT/ALERT® (5 jours).

En outre, d'un point de vue validation de méthode, cette méthode semble plus facile à valider. En effet, en effectuant la méthode d'applicabilité de la Pharmacopée Européenne les micro-organismes sont filtrés sur la membrane avec le liquide de rinçage. Ce qui signifie que

lorsque les micro-organismes arrivent au contact de la membrane l'anticancéreux se retrouve en concentration infinitésimale.

Pour la mesure de la stérilité de lot de 5FU, une autre approche serait la fabrication en poche composé en M312 de Sealed air®, vendu en France par la société Sippex®. Ce matériau permet la stérilisation à l'autoclave de ces poches à plus de 121°C. Le 5FU ne se décompose que vers 282-283°C(128), il résiste à la température atteinte par l'autoclave (134°C). En stérilisant la préparation dans son conditionnement final la préparation, d'un point de vue microbiologique, aurait la même péremption que celle appliquée aux produits stérilisés dans le service de stérilisation : une péremption de 6 mois.

Conclusion

La présence d'anticancéreux ne permet pas d'assurer l'absence de micro-organismes viables car peu d'anticancéreux possèdent des propriétés antimicrobiennes très marquées et que la présence d'anticancéreux n'altère pas fréquemment la survie des micro-organismes. Le suivi de la stérilité des anticancéreux doit donc être réalisé dès que la taille d'un lot de préparations le permet pour la sécurité des patients. Réaliser le suivi de la stérilité au moyen de l'essai de stérilité de la Pharmacopée Européenne ne convient pas car il s'agit d'un test imparfait. Il ne permet pas la détection de tous les micro-organismes, il ne prend pas en compte les micro-organismes à l'état viable mais non cultivable (VMNC) et son délai de rendu de résultats (14 jours) n'est pas adapté avec nos pratiques. Il existe des méthodes de microbiologies rapides qui peuvent être utilisées à la place de cet essai de stérilité comme l'utilisation de l'automate BacT/ALERT®. Le BacT/ALERT® est déjà utilisé pour l'essai de stérilité des préparations de nutriments parentéraux pédiatriques et pour l'essai de stérilité des préparations d'aciclovir. J'ai donc voulu chercher une méthode permettant la croissance des micro-organismes en présence des anticancéreux que nous voulons fabriquer en lots importants.

Parmi ces anticancéreux je me suis concentré sur le 5-Fluorouracile. Mes études de concentration minimales inhibitrices (CMI) ont retrouvé qu'il possède une activité antimicrobienne très marquée. Ses CMI sont trop basses pour pouvoir utiliser la dilution comme méthode pour inhiber cette activité. La présence de l'uracile permet une réduction de cette activité antimicrobienne mais pas suffisamment pour retrouver les concentrations que nous utilisons dans nos préparations.

En conclusion pour que le BacT/ALERT® puisse être utilisé pour l'essai de stérilité du 5-Fluorouracile, il faudrait trouver une autre méthode pour inhiber cette activité antimicrobienne.

Une autre méthode de microbiologie rapide que le BacT/ALERT® pourrait être envisageable la cytométrie en phase solide qui est utilisée dans l'automate SCANRDI®. Une autre approche serait la préparation du 5FU dans des poches en M312 qui permettrait une stérilisation des préparations à l'autoclave.

Références bibliographiques

1. Code de la santé publique. Article L5126-1. In: Legifrance [Internet]. 2018. p. I-1°. Disponible sur:
<https://www.legifrance.gouv.fr/affichCodeArticle.do?cidTexte=LEGITEXT000006072665&idArticle=LEGIARTI000006690064&dateTexte=&categorieLien=cid>
2. Code de la santé publique. Article L5126-5. In: Legifrance [Internet]. 2018. p. 2°. Disponible sur:
https://www.legifrance.gouv.fr/affichCodeArticle.do;jsessionid=055221F3D87858EED875F3EC52CC26D7.tplgfr34s_3?idArticle=LEGIARTI000036511544&cidTexte=LEGITEXT000006072665&dateTexte=20180730
3. Code de la santé publique. Article L5121-1. In: Legifrance [Internet]. 2018. p. 1°-2°. Disponible sur:
<https://www.legifrance.gouv.fr/affichCode.do?idArticle=LEGIARTI000033621108&idSectionTA=LEGISCTA000006171366&cidTexte=LEGITEXT000006072665&dateTexte=20180730>
4. Pharmacopée Européenne V9.6. Préparations parentérales. 2018. 944-946 p.
5. AFSSAPS. Bonnes pratiques de préparation, Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé (Afssaps) [Internet]. Vol. 2007/7 bis, Bulletin officiel. 2007. Disponible sur:
http://ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/a5d6ae4b3d5fdee013ca463462b7b296.pdf
6. Sauvaget L. Standardisation des doses (ou " Dose-Banding ") des médicaments injectables : application à deux principes actifs l'aciclovir et l'infliximab. Université de Bordeaux; 2016.
7. Pharmacopée Européenne V9.5. 2.6.1. stérilité (1). 2011;(1):197–200.
8. Rochard E, Barthès D, Courtois P. Stability of fluorouracil, cytarabine, or doxorubicin hydrochloride in ethylene vinylacetate portable infusion-pump reservoirs. *Am J Hosp Pharm* [Internet]. 1992;49(3):619–23.
Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1598939>
9. Pharmacopée Européenne V9.5. 5.1.6. méthodes alternatives pour le controle de la qualite microbiologique. 2018. p. 4588–98.
10. Le Roy C, Bermudez E, (Hôpitaux Universitaires Paris CCBH-D. Validation de la méthode BacT-Alert® pour le contrôle microbiologique des poches de nutrition parentérale pédiatrique (NPP). GERPAC [Internet]. 2015;
Disponible sur: <https://www.gerpac.eu/validation-de-la-methode-bact-alert-r-pour-le-controle-microbiologique-des-poches-de-nutrition-parenterale-pediatrique-npp>
11. Quatremare E. Thèse : Nutrition parentérale et maîtrise du risque microbiologique : validation d ' une méthode alternative pour l ' essai de stérilité des mélanges nutritifs « à la carte ». Rouen; 2014.
12. Matheron A, Vazquez R, Guerrault-Moro M, Brossard D, Crauste-Manciet S. TCH-044 Sterility Testing Using a Rapid Microbiological Method For Batch Production of Cytotoxic Drugs in a Hospital Pharmacy: Abstract TCH-044 Table 1. *Eur J Hosp Pharm* [Internet]. 2013;20(Suppl 1):A84.1-A84.
Disponible sur: <http://ejhp.bmj.com/lookup/doi/10.1136/ejpharm-2013-000276.235>

13. Pariente L. Naissance et évolution de quinze formes pharmaceutiques. Louis Pari. 1996. 207-256 p. ISBN : 2-84059-007-7
14. Harvey W. Exercitatio Anatomica de Motu Cordis et Sanguinis in Animalibus. 1628.
15. Ettmüller M. Nouvelle chirurgie médicale et raisonnée. In 1691. p. 1–580.
16. Charonnat R, Charonnat PR. Les origines de l'injection parentérale. Rev Hist Pharm (Paris). 1952;(132):320–3.
17. Dauphin A, Cazalaa J, Pradeau D, Chaouky H, Saince-Viard D. Les solutés de perfusion : histoire d'une forme pharmaceutique majeure née à l'hôpital. Rev Hist Pharm (Paris) [Internet]. 2003;91(338):219–38.
Disponible sur: http://www.persee.fr/web/revues/home/prescript/article/pharm_0035-2349_2003_num_91_338_5515
18. Dronchon S. Marchons dans les pas de Louis Pasteur [Internet]. solidarité et progrès. 2016.
Disponible sur: <https://www.solidariteetprogres.org/marchons-sur-pas-de-pasteur.html>
19. CNRLT. Définition thyndallisation [Internet]. 2018. Disponible sur: <http://www.cnrtl.fr/definition/tyndallisation>
20. L'histoire de la chimiothérapie [Internet]. agoravox. 2011. Disponible sur: <https://www.agoravox.fr/actualites/sante/article/l-histoire-de-la-chimiotherapie-88177>
21. Grouzmann M, Podilsky G, Sadeghipour F. Évolution De La Préparation Des Anticancéreux Depuis 25Ans Dans Une Pharmacie Centrale D'Un Hôpital Universitaire. Le Pharm Hosp Clin [Internet]. 2015;50(3):340.
Disponible sur: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211104215001605>
22. Institut National du CAncer. Développement des anticancéreux oraux : Projections à court, moyen et long termes [Internet]. 2016. Disponible sur: <http://www.e-cancer.fr/Expertises-et-publications/Catalogue-des-publications/Developpement-des-anticancereux-oraux-Projections-a-court-moyen-et-long-termes>
23. Pharmacopée Européenne V9.6. 5.1.1. méthodes de préparation des produits stériles. 2018;(1):4581–4.
24. Sandle T. Sterility, Sterilisation And Sterility Assurance For Pharmaceuticals : Technology, Validation And Current Regulations. Woodhead; 2013. 370 p. ISBN : 978-1-908818-63-8
25. ANSM. Guide Des Bonnes Pratiques de fabrication [Internet]. 2016. Disponible sur: <https://ansm.sante.fr/content/download/108495/1374645/.../Guide-BPF-Aout2017.pdf>
26. CCLIN Sud-Est. stérilisation à la vapeur d'eau (Autoclave) [Internet]. 2010. Disponible sur: <http://www.cclin-arlin.fr/nosopdf/doc10/0013703.pdf>
27. Skellie B. Une brève histoire de la stérilisation [Internet]. 2010. Disponible sur: <https://brnskill.com/fr/shares/a-brief-history-of-sterilization/>
28. AFFSAPS. Note information stérilisateur STERRAD [Internet]. 2007. Disponible sur: https://www.ansm.sante.fr/content/download/26501/.../Information_STERRAD.pdf
29. Rohrbach P, Talla M. Technologie des isolateurs a l'hopital [Internet]. GERPAC. 2012. p. 1–6. Disponible sur: https://www.gerpac.eu/IMG/pdf/2000_01.pdf
30. World Health Organization. 3.2 TEST FOR STERILITY [Internet]. 2012. Disponible sur: http://www.who.int/medicines/publications/pharmacopoeia/TestForSterility-RevGenMethod_QAS11-413FINALMarch2012.pdf
31. U. S. PHARMACOPEIA. STERILITY TESTS [Internet]. USP29. 2018. p. 1–13.

Disponible sur: http://www.pharmacopeia.cn/v29240/usp29nf24s0_c71.html

32. Greub G, Schrenzel J. Le nouveau visage de la microbiologie. *Rev Med Suisse* [Internet]. 2014;10:2123–4. Disponible sur: <https://www.revmed.ch/RMS/2014/RMS-N-450/Le-nouveau-Visage-de-la-microbiologie-diagnostique>
33. Dureuil A. Enquête Contrôle microbiologique : Les méthodes rapides et traditionnelles s'équilibrent. *IndustriPharma* [Internet]. 2016;1–12. Disponible sur: <https://www.industripharma.fr/les-methodes-rapides-et-traditionnelles-s-equilibrent,75746>
34. Gadal P. Métodos Microbiológicos Rápidos. In: Associação Brasileira dos Produtores de Soluções Parenterais : ABRASP. 2016.
35. Smith R, Von Tress M, Tubb C, Vanhaecke E. Evaluation of the ScanRDI(R) as a Rapid Alternative to the Pharmacopoeial Sterility Test Method: Comparison of the Limits of Detection. *PDA J Pharm Sci Technol* [Internet]. 2010;64(4):356–63. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21502036>
36. Vedy S. Microbiology method validation: illustration with Bact'Alert 3D. *Ann Biol Clin* [Internet]. 2013;71(3):353–61. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23747676>
37. Somily AM, Babay HAH, Torchyan AA, Sayyed SB, Absar M, Al-Aqeel R, et al. Time-to-detection of bacteria and yeast with the BACTEC FX versus BacT/Alert Virtuo blood culture systems. *Ann Saudi Med* [Internet]. 2018;38(3):194–9. Disponible sur: <http://www.annsaudimed.net/index.php/vol38/vol38iss3/4859.html>
38. Parveen S, Kaur S, David SAW, Kenney JL, McCormick WM, Gupta RK. Evaluation of growth based rapid microbiological methods for sterility testing of vaccines and other biological products. *Vaccine* [Internet]. 2011;29(45):8012–23. Disponible sur: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.08.055>
39. Kielpinski G, Prinzi S, Duguid J, du Moulin G. Roadmap to approval: Use of an automated sterility test method as a lot release test for Carticel??, autologous cultured chondrocytes. *Cytotherapy* [Internet]. 2005;7(6):531–41. Disponible sur: <http://dx.doi.org/10.1080/14653240500361079>
40. Brecher ME, Hay SN, Rose AD, Rothenberg SJ. Evaluation of BacT/ALERT plastic culture bottles for use in testing pooled whole blood-derived leukoreduced platelet-rich plasma platelets with a single contaminated unit. *Transfusion*. 2005;45(9):1512–7.
41. Brecher ME, Means N, Jere CS, Heath D, Rothenberg S, Stutzman LC. Evaluation of an automated culture system for detecting bacterial contamination of platelets: an analysis with 15 contaminating organisms. *Transfusion* [Internet]. 2001;41(April):477–82. Disponible sur: <https://onlinelibrary-wiley-com.docelec.u-bordeaux.fr/doi/epdf/10.1046/j.1537-2995.2001.41040477.x>
42. Mcdonald CP, Rogers A, Cox M, Smith R, Roy A, Robbins S, et al. Evaluation of the 3D BacT / ALERT automated culture system for the detection of microbial contamination of platelet concentrates. *Blood*. 2002;(March 1998).
43. Bugno A, Lira RS, Oliveira WA, Almodovar AAB, Saes DPS, De Jesus Andreoli Pinto T. Application of the BacT/ALERT^R 3D system for sterility testing of injectable products. *Brazilian J Microbiol*. 2015;46(3):743–7.
44. BIOMERIEUX. Notice BacT/ALERT® BPA REF 279018 site FDA [Internet]. 2018. Disponible sur: <https://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/BloodBloodProducts/Approve>

dProducts/SubstantiallyEquivalent510kDeviceInformation/UCM596342.pdf

45. Whitman WB, Coleman DC, Wiebe WJ. Perspective Prokaryotes: The unseen majority. 1998;95(June):6578–83.
46. CRIPS Ile-de-france. Les risques infectieux liés à l'usage de drogues par voie intraveineuse [Internet]. collection VIH/SIDA. 2001. Disponible sur: http://doc.hubsante.org/doc_num.php?explnum_id=15777
47. Flaum I. Contamination of pharmaceutical products. Br Med J. 1967;5545:125–6.
48. Bennett SN, McNeil MM, Bland L a, Arduino MJ, Villarino ME, Perrotta DM, et al. Postoperative infections traced to contamination of an intravenous anesthetic, propofol. N Engl J Med. 1995;333(3):147–54.
49. La Jeon Y, Yang JJ, Kim MJ, Lim G, Cho SY, Park TS, et al. Combined Bacillus licheniformis and Bacillus subtilis infection in a patient with oesophageal perforation. J Med Microbiol. 2012;61(PART12):1766–9.
50. Fiche Technique Santé-Sécurité: Agents Pathogènes – Staphylococcus aureus [Internet]. Agence de la santé publique du Canada. 2010. p. 1–11. Disponible sur: <https://www.canada.ca/fr/sante-publique/services/biosecurite-biosurete-laboratoire/fiches-techniques-sante-securite-agents-pathogenes-evaluation-risques/staphylococcus-aureus.html>
51. Bose JL, Bayles KW. Staphylococcus aureus. Brenner's Encycl Genet [Internet]. 2013;(May):553–5. Disponible sur: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012374984001473X>
52. IGEM Toulouse. Study of the optimum growth conditions of Bacillus subtilis (strain WT 168), and Pseudomonas fluorescens (strain SBW25) [Internet]. 2016. Disponible sur: http://2016.igem.org/wiki/images/e/e0/T--Imperial_College--ToulouseGrowthStudy.pdf
53. Loison P. Etude de la spore de Bacillus subtilis: caractérisation des structures impliquées dans sa résistance [Internet]. Université de Bourgogne - Ecole doctorale environnement-santé. 2013. Disponible sur: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01124213>
54. Fiche Technique Santé-Sécurité: Agents Pathogènes – Pseudomonas spp. [Internet]. Agence de la santé publique du Canada. 2010. p. 1. Disponible sur: <https://www.canada.ca/fr/sante-publique/services/biosecurite-biosurete-laboratoire/fiches-techniques-sante-securite-agents-pathogenes-evaluation-risques/pseudomonas.html>
55. Ezenobi NO, Okpokwasili GC. COMBINED EFFECT OF TEMPERATURE AND pH ON PSEUDOMONAS AERUGINOSA ISOLATED FROM A COSMETIC PRODUCT. Int J Curr Res. 2016;8(08):37124–30.
56. Fiche Technique Santé-Sécurité: Agents Pathogènes – Clostridium difficile [Internet]. Agence de la santé publique du Canada. 2011. p. 1–8. Disponible sur: <https://www.canada.ca/fr/sante-publique/services/biosecurite-biosurete-laboratoire/fiches-techniques-sante-securite-agents-pathogenes-evaluation-risques/clostridium-difficile-fiche-technique-sante-securite-agents-pathogenes.html>
57. Wheeldon LJ, Worthington T, Hilton AC, Elliott TSJ, Lambert PA. Physical and chemical factors influencing the germination of Clostridium difficile spores. J Appl Microbiol. 2008;105(6):2223–30.
58. Fiche Technique Santé-Sécurité: Agents Pathogènes – Candida albicans [Internet]. Agence de la santé publique du Canada. 2011. p. 1–9. Disponible sur: <https://www.canada.ca/fr/sante-publique/services/biosecurite-biosurete-laboratoire/fiches-techniques-sante-securite-agents-pathogenes-evaluation-risques/candida-albicans-fiche-technique-sante-securite-agents-pathogenes.html>

risques/candida-albicans-fiches-technique-sante-securite-agents-pathogenes.html

59. Vasconcellos AA de, Gonçalves LM, Del Bel Cury AA, Da Silva WJ. Environmental pH influences *Candida albicans* biofilms regarding its structure, virulence and susceptibility to fluconazole. *Microb Pathog*. 2014;69–70(1):39–44.
60. Fiche Technique Santé-Sécurité : Agents Pathogènes – *Aspergillus* spp. [Internet]. Agence de la santé publique du Canada. 2010. p. 1–11. Disponible sur: <https://www.canada.ca/fr/sante-publique/services/biosecurite-biosurete-laboratoire/fiches-techniques-sante-securite-agents-pathogenes-evaluation-risques/aspergillus.html>
61. Jamila Said Hood HLH. Optimisation of Medium Formulation and Growth Conditions for Xylanase Production by *Aspergillus brasiliensis* in Submerged Fermentation (SmF). *J Biodiversity, Bioprospecting Dev* [Internet]. 2014;01(01):1–13. Disponible sur: <http://omicsgroup.org/journals/optimisation-of-medium-formulation-and-growth-conditions-for-xylanase-production-by-aspergillus-brasiliensis-in-submerged-fermentation-smf-2376-0214.1000102.php?aid=26479>
62. Amann RI, Ludwig W, Schleifer K. Phylogenetic Identification and In Situ Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation. *Microbiol Rev*. 1995;59(1):143–69.
63. Oliver JD. The Viable but Nonculturable State for Bacteria: Status Update. *Microbe Mag* [Internet]. 2016;11(4):159–64. Disponible sur: <http://www.asmscience.org/content/journal/microbe/10.1128/microbe.11.159.1>
64. Cook KL, Bolster CH. Survival of *Campylobacter jejuni* and *Escherichia coli* in groundwater during prolonged starvation at low temperatures. *J Appl Microbiol*. 2007;103(3):573–83.
65. Oliver JD. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Rev*. 2010;34(4):415–25.
66. Oliver JD. The Viable but Nonculturable State in Bacteria. *J Microbiol*. 2005;43(February):93–100.
67. Maalej S, Denis M, Dukan S. Temperature and growth-phase effects on *Aeromonas hydrophila* survival in natural seawater microcosms: Role of protein synthesis and nucleic acid content on viable but temporarily nonculturable response. *Microbiology*. 2004;150(1):181–7.
68. BESNARD V, FEDERIGHI M, DECLERQ E, FJUGIAU F, CAPPELIER J-M. Environmental and physico-chemical factors induce VBNC state in *Listeria monocytogenes*. *VetRes* 33 [Internet]. 2002;33:359–70. Disponible sur: <https://pdfs.semanticscholar.org/261a/d02fb3ddade5b82e41b97e4566b84b556537.pdf>
69. WONG H-C, LIU S-H. Characterization of the Low-Salinity Stress in *Vibrio vulnificus*. *J Food Prot* [Internet]. 2008;71(2):416–9. Disponible sur: <http://jfoodprotection.org/doi/abs/10.4315/0362-028X-71.2.416>
70. Kana BD, Gordhan BG, Downing KJ, Sung N, Vostroktunova G, Machowski EE, et al. The resuscitation-promoting factors of *Mycobacterium tuberculosis* are required for virulence and resuscitation from dormancy but are collectively dispensable for growth in vitro. *Mol Microbiol*. 2008;67(3):672–84.
71. Porter J, Edwards C, Pickup RW. Rapid assessment of physiological status in *Escherichia coli* using fluorescent probes. *J Appl Bacteriol*. 1995;79(4):399–408.
72. Del Mar Lleò M, Benedetti D, Tafi MC, Signoretto C, Canepari P. Inhibition of the resuscitation from the viable but non-culturable state in *Enterococcus faecalis*. *Environ Microbiol*. 2007;9(9):2313–20.

73. Ben Said M, Masahiro O, Hassen A. Detection of viable but non cultivable *Escherichia coli* after UV irradiation using a lytic Q β phage. *Ann Microbiol.* 2010;60(1):121–7.
74. Stern NJ, Jones DM, Wesley I V, Rollins DM. Colonization of chicks by non-cultureable *Campylobacter* spp. *Lett Appl Microbiol.* 1994;18:333–6.
75. Dusserre E, Ginevra C, Hallier-Soulier S, Vandenesch F, Festoc G, Etienne J, et al. A PCR-based method for monitoring *Legionella pneumophila* in water samples detects viable but noncultivable legionellae that can recover their cultivability. *Appl Environ Microbiol.* 2008;74(15):4817–24.
76. Gengenbacher M, Kaufmann SHE. *Mycobacterium tuberculosis*: Success through dormancy. *FEMS Microbiol* [Internet]. 2013;36(3):514–32. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3319523/pdf/nihms358630.pdf>
77. Jones DM, Sutcliffe EM, Curry A. Recovery of viable but non-culturable *Campylobacter jejuni*. *J Gen Microbiol* [Internet]. 1991;137(10):2477–82. Disponible sur: <http://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/00221287-137-10-2477>
78. Rollins DM, Colwell RR. Viable but nonculturable stage of *Campylobacter jejuni* and its role in survival in the natural aquatic environment. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 1986;52(3):531–8. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC344478/>
79. Hussong D, Colwell RR, O'Brien M, Weiss E, Pearson AD, Weiner RM, et al. Viable *Legionella pneumophila* not detectable by culture on agar media. *BIOTECHNOLOGY.* 1987;5:947–50.
80. Islam MS, Hasan MK, Miah MA, Sur GC, Felsenstein A, Venkatesan M, et al. Use of the polymerase chain reaction and fluorescent-antibody methods for detecting viable but nonculturable *Shigella dysenteriae* type 1 in laboratory microcosms. *Appl Env Microbiol* [Internet]. 1993;59(2):536–40. Disponible sur: <http://aem.asm.org/content/59/2/536.abstract%5Cnhttp://aem.asm.org/content/59/2/536.full.pdf>
81. Anderson M, Bollinger D, Hagler A, Hartwell H, Rivers B, Ward K, et al. Viable but Nonculturable Bacteria Are Present in Mouse and Human Urine Specimens †. *J Clin Microbiol.* 2004;42(2):753–8.
82. Mulvey MA, Schilling JD, Hultgren SJ. Establishment of a persistent *Escherichia coli* reservoir during the acute phase of a bladder infection. *Infect Immun.* 2001;69(7):4572–9.
83. Mason DJ, Power EG, Talsania H, Phillips I, Gant V a. Antibacterial action of ciprofloxacin . These include : Antibacterial Action of Ciprofloxacin. 1995;39(12):2752–8.
84. Casini B, Baggiani A, Totaro M, Mansi A, Costa AL, Aquino F, et al. Detection of viable but non-culturable legionella in hospital water network following monochloramine disinfection. *J Hosp Infect* [Internet]. 2018;98(1):46–52. Disponible sur: <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2017.09.006>
85. Médecine A de. Dictionnaire médical de l'académie de médecine [Internet]. 2018. Disponible sur: <http://dictionnaire.academie-medecine.fr/index.php?q=anticancéreux>
86. Bardin C, Astier A, Vulto A, Sewell G, Vigneron J, Trittler R, et al. Guidelines for the practical stability studies of anticancer drugs: A european consensus conference. *Eur J Hosp Pharm.* 2012;19(3):278–85.
87. Fukuda K. Le monde risque de sombrer dans une ère post-antibiotiques : le moment

- est venu de prendre des mesures énergiques [Internet]. Organisation mondiale de la Santé. 2015. Disponible sur: <http://www.who.int/mediacentre/commentaries/antibiotic-resistance/fr/>
88. Soo VWC, Kwan BW, Quezada H, Castillo-juárez I, Pérez-eretza B, García-Contreras SJ, et al. Repurposing of Anticancer Drugs for the Treatment of Bacterial Infections. *Curr Top Med Chem*. 2017;17(10):1157–76.
 89. Hamilton-Miller JMT. Antimicrobial activity of 21 anti-neoplastic agents. *Br J Cancer*. 1984;49(3):367–9.
 90. Bernstein LR. Mechanisms of Therapeutic Activity for Gallium. *Pharmacol Rev* [Internet]. 1998;50(4):665–82. Disponible sur: <http://pharmrev.aspetjournals.org/content/50/4/665.long#title4>
 91. Rangel-Vega A, Bernstein LR, Mandujano-Tinoco EA, García-Contreras SJ, García-Contreras R. Drug repurposing as an alternative for the treatment of recalcitrant bacterial infections. *Front Microbiol*. 2015;6(APR):1–8.
 92. Antunes LCS, Imperi F, Minandri F, Visca P. In Vitro and In Vivo antimicrobial activities of gallium nitrate against multidrug-resistant acinetobacter baumannii. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(11):5961–70.
 93. Fecteau ME, Aceto HW, Bernstein LR, Sweeney RW. Comparison of the antimicrobial activities of gallium nitrate and gallium maltolate against *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in vitro. *Vet J* [Internet]. 2014;202(1):195–7. Disponible sur: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.06.023>
 94. Lessa JA, Soares MA, Dos Santos RG, Mendes IC, Salum LB, Daghestani HN, et al. Gallium(III) complexes with 2-acetylpyridine-derived thiosemicarbazones: Antimicrobial and cytotoxic effects and investigation on the interactions with tubulin. *BioMetals*. 2013;26(1):151–65.
 95. BYFIELD john E, CALABRO-JONES PM. Carrier-dependant and carrier-independant transport of anti-cancer alkulating agents. *Nature* [Internet]. 1981;294:281–3. Disponible sur: <http://www.nature.com/doi/10.1038/294281a0>.pdf
 96. Kennedy KA, McGurl JD, Leondaridis L, Alabaster O. pH Dependence of Mitomycin C-induced Cross-Linking Activity in EMT6 Tumor Cells. *Cancer Res*. 1985;45(8):3541–7.
 97. Holmes CJ, Kubey WY, Love DI. Viability of microorganisms in fluorouracil and cisplatin small-volume injections. *Am J Hosp Pharm*. 1988;45(5):1089–91.
 98. Patel K, Craig S, McBride M, Palepu N. Microbial inhibitory properties and stability of topotecan hydrochloride injection. *Am J Heal Pharm* [Internet]. 1998;55(15):1584–7. Disponible sur: <http://www.ajhp.org/content/55/15/1584?sso-checked=true>
 99. Sarakbi I, Heeb R, Thiesen J, Krämer I. Viability of Selected Microorganisms in Non-Cytotoxic Aseptic Preparations. *Pharm Technol Hosp Pharm* [Internet]. 2016;1(1):9–20. Disponible sur: <http://www.degruyter.com/view/j/pthp.2016.1.issue-1/pthp-2015-0007/pthp-2015-0007.xml>
 100. Sarakbi I, Federici M, Krämer I. Viability of microorganisms in novel chemical and biopharmaceutical anticancer drug solutions. *Eur J Parenter Pharm Sci*. 2015;20(1):5–12.
 101. Krämer I. Viability of microorganisms in novel antineoplastic and antiviral drug solutions. *J Oncol Pharm Pract*. 1998;4(1):32–7.
 102. Paris I, Paci A, Rey JB, Bourget P. Microbial growth tests in anti-neoplastic injectable solutions. *J Oncol Pharm Pract*. 2005;11(1):7–12.
 103. Favier B, Latour JF, Fuhrmann C. Viability of microorganisms in bags of cytotoxic

- drugs. *J Oncol Pharm Pract*. 2001;6(4):167–71.
104. Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-Fluorouracil: Mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2003;3(5):330–8. Disponible sur: <https://www.nature.com/articles/nrc1074>
 105. Base de données publique du médicament. RCP 5 FLUOROURACIL 50 mg/ml ACCORD [Internet]. Base de Données publique du médicament. 2017. Disponible sur: <http://base-donnees-publique.medicaments.gouv.fr/affichageDoc.php?specid=65502207&typedoc=R>
 106. Centre National Hospitalier d'information sur le Médicament. Anticancéreux : utilisation pratique. 2015. 320-323 p.
 107. Cohen S, Loeb MR, Lichtenstein J. The Mode of Action of 5-Fluorouracil and Its Derivatives. *Biochemistry* [Internet]. 1958;44:1004–12. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC528686/>
 108. Vanlancker E, Vanhoecke B, Smet R, Props R, Van de Wiele T. 5-Fluorouracil Sensitivity Varies Among Oral Microorganisms. *J Med Microbiol*. 2016;65(8):775–83.
 109. Garcia RAG, Saydoff JA, Bamat MK, von Borstel RW. Prompt treatment with uridine triacetate improves survival and reduces toxicity due to fluorouracil and capecitabine overdose or dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2018;353(June):67–73.
 110. Bodet CA, Jorgensen JH, Drutz DJ. Antibacterial Activities of Antineoplastic Agents. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 1985;28(3):3–6. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC180269/>
 111. TSUKAMURA M. In Vitro Susceptibility of Mycobacteria, Especially Mycobacterium intracellulare, to 5-Fluorouracil and Pattern of Development of Resistance of Mycobacterium tuberculosis to the Drug. *Microbiol Immunol* [Internet]. 1979;23(6):427–9. Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1348-0421.1979.tb00481.x>
 112. Singh V, Brecik M, Mukherjee R, Evans JC, Svetlíková Z, Blaško J, et al. The complex mechanism of antimycobacterial action of 5-fluorouracil. *Chem Biol*. 2015;22(1):63–75.
 113. Ueda Y, Saito A, Fukuoka Y, Yamashiro Y, Ikeda Y, Taki H, et al. Interactions of beta-lactam antibiotics and antineoplastic agents. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 1983;23(3):374–8. Disponible sur: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=184655&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 114. Perkins HR, Rogers H J. 5-Fluorouracil and Mucopolysaccharide. *Biochemistry*. 1960;77:448–59.
 115. Attila C, Ueda A, Wood TK. 5-Fluorouracil reduces biofilm formation in *Escherichia coli* K-12 through global regulator AriR as an antivirulence compound. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2009;82(3):525–33.
 116. Ueda A, Attila C, Whiteley M, Wood TK. Uracil influences quorum sensing and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* and fluorouracil is an antagonist. *Microb Biotechnol*. 2009;2(1):62–74.
 117. Imperia F, Massaib F, Facchinic M, Frangipanib E, Visaggioa D, Leonib L, et al. Repurposing the antimycotic drug flucytosine for suppression of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2013;110(12):4451–7. Disponible sur: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1222231110>
 118. Walz JM, Avelar RL, Longtine KJ, Carter KL, Mermel LA, Heard SO. Anti-infective

- external coating of central venous catheters: A randomized, noninferiority trial comparing 5-fluorouracil with chlorhexidine/silver sulfadiazine in preventing catheter colonization. *Crit Care Med*. 2010;38(11):2095–102.
119. Tomasz A, Borek E. The mechanism of bacterial fragility produced by 5-Fluorouracil : the accumulation of cell wall precursors. 1960;324–7.
 120. Cofrac. Guide technique d'accréditation de vérification (portée a) / validation (portée b) des méthodes en biologie médicale SH GTA04 Rev00 [Internet]. Guide de vérification/validation de méthodes en biologie humaine. 2011. p. 1–46. Disponible sur: <http://www.cofrac.fr/documentation/SH-GTA-04>
 121. Désenfant M, Priel M, Rivier C. De la validation des méthodes d'analyse à l'évaluation de l'incertitude des résultats de mesure. Actes du Congrès Int Métrologie, Toulon [Internet]. 2003; Disponible sur:
<http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:De+la+validation+de+s+methodes+d?analyse+a+l?evaluation+de+l?incertitude+des+resultats+de+mesure#3>
 122. National Center for Biotechnology Information. Uracil [Internet]. PubChem Compound Database. 2018. p. CID=1174. Disponible sur:
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1174>
 123. OCDE. Solubilité dans l'eau [Internet]. Vol. Essai n°10, lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, section 1. 2004. p. 1–10. Disponible sur: https://www.oecd-ilibrary.org/fr/environment/essai-n-105-solubilite-dans-l-eau_9789264069596-fr
 124. Andros CC, Dubay RA, Mitchell KD, Chen A, Holmes DE, Kennedy DR. A novel application of radiomimetic compounds as antibiotic drugs. *J Pharm Pharmacol*. 2015;67(10):1371–9.
 125. Karstens A, Krämer I. Viability of micro-organisms in novel anticancer drug solutions. *Eur J Hosp Pharm Sci*. 2007;13:27–32.
 126. Sutton S. Rapid Sterility Testing [Internet]. Jeanne Moldenhauer, editor. 2010. Disponible sur: http://www.microbiologynetwork.com/content/file/Sutton_The-Sterility-Tests.pdf
 127. institut Nation de santé publique du Québec, Centre Antipoison du Québec. LE triacétate d'uridine: un nouvel antidote pour le traitement de l'intoxication au 5-fluorouracile [Internet]. Bulletin d'information toxicologique. 2011. Disponible sur: <https://www.inspq.qc.ca/toxicologie-clinique/le-triacetate-d-uridine-un-nouvel-antidote-pour-le-traitement-de-l-intoxication-au-5-fluorouracil>
 128. National Center for Biotechnology Information. Fluorouracil [Internet]. PubChem Compound Database. 2018. p. CID=3385. Disponible sur: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5-Fluorouracil#section=Top>
 129. Peiris V, Oppenheim BA. *Influence Isolation*. 1993;(July):1124–5.
 130. Kruszewska H, Zareba T, Tyski S. Antimicrobial activity of selected non-antibiotics--activity of methotrexate against *Staphylococcus aureus* strains. *Acta Pol Pharm* [Internet]. 2000;57. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11293238>
 131. Yadava MK, Chae S-W, Song J-J. Effect of 5-azacytidine on in vitro biofilm formation of *Streptococcus pneumoniae*. *Microb Pathog* [Internet]. 2012;53(5–6). Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0882401012001556>
 132. Gajadeera C, Willby MJ, Green KD, Shaul P, Fridman M, Garneau-Tsodikova S, et al. Antimycobacterial activity of DNA intercalator inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis*

- primase DnaG. *J Antibiot (Tokyo)*. 2015;68(3):153–7.
133. Chopra S, Matsuyama K, Hutson C, Madrid P. Identification of antimicrobial activity among FDA-approved drugs for combating *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium chelonae*. *J Antimicrob Chemother*. 2011;66(7):1533–6.

Annexe 1. Délais de détection des micro-organismes de la Pharmacopée Européenne au moyen du dispositif BacT/ALERT®

Germes	UFC	flacons	milieu testé	délais de détection (h)	source
<i>Staphylococcus aureus</i>	76	FN	fertilité	16,6	Thèse E. QUATREMARE(11)
	10-30	FA		3,83	
	5	FA	Aciclovir 5mg/ml	15	Thèse L. SAUVAGET(6)
	2,5	FA		15,88	
	7-30	FA		16,38	
	5	FA	préparation binaire pédiatrique	14,4	LEROY(10)
	5	FN		19,2	
	40	FA	concentré plaquettaire	11,8	Brecher(41)
	400	FA		10,9	
	40	FA		13,2	
	40	FN		13,9	
	400	FA		11,9	
	400	FN		12,6	
	40	FA		11,9	McDONALD(42)
	400	FA		11,1	
	40	FN		14,8	
	400	FN		13,8	
	40	FAN ae		14,2	
	400	FAN ae		12,6	
	40	FAN anae		16,4	
400	FAN anae	15,4			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	67	FN	fertilité	négatif	Thèse E. QUATREMARE(11)
	88	FA		17,1	
	10-30	FA		4,25	Thèse L. SAUVAGET(6)
	7-30	FA	aciclovir 5mg/ml	17,28	
	5	FA	préparation binaire pédiatrique	16,8	LE ROY(10)
	5	FN		60	
	40	FA	concentré plaquettaire	16,2	McDONALD(42)
	400	FA		14,5	
	40	FN		négatif	
	400	FN		négatif	
	40	FAN ae		16,9	
	400	FAN ae		15	
40	FAN anae	négatif			
400	FAN anae	négatif			
<i>Bacillus subtilis</i>	31	FA	fertilité	11,4	Thèse E. QUATREMARE(11)
	10-30	FA		3,78	
	7-30	FA	aciclovir 5mg/ml	11,37	Thèse L. SAUVAGET(6)
	5	FA	préparation binaire	12	LE ROY(10)

<i>Bacillus subtilis</i>	5	FN	pédiatrique	24	BRECHER(41)	
	40	FAN ae	Concentré plaquettaire	11,6		
	400	FA		10,8		
	40	FA		13,6		
	400	FA		12,4	McDONALD(42)	
	40	FN		110,9		
	400	FN		48,6		
	40	FAN ae		13,7		
	400	FAN ae		12,8		
	40	FAN anae		négatif		
	400	FAN anae		négatif		
	<i>Clostridium sporogenes</i>	46		FN		fertilité
10-30		FN		aciclovir 5mg/ml	4,58	Thèse L. SAUVAGET(6)
5		FN	19,55			
2,5		FN	20,33			
7-30		FN	19,9			
5		FN	préparation binaire pédiatrique	19,2	C. LE ROY(10)	
<i>Candida albicans</i>	88	FN	fertilité	40,9	Thèse E. QUATREMARE(11)	
	10-30	FA	aciclovir 5mg/ml	26	Thèse L. SAUVAGET(6)	
	5	FA		85		
	7-30	FA		46		
	5	FA	préparation binaire pédiatrique	100,8	C. LE ROY(10)	
	40	FA	Concentré plaquettaire	17,9	BRECHER(41)	
	400	FA		15,9		
	40	FA		23	McDONALD(42)	
	400	FA		19,2		
	40	FN		Négatif		
	400	FN		19		
	40	FAN ae		34,2		
	400	FAN ae		27,3		
40	FAN anae	Négatif				
400	FAN anae	Négatif				
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	65	FA		fertilité	44,1	Thèse E. QUATREMARE(11)
	10-30	FA		aciclovir 5mg/ml	30	Thèse L. SAUVAGET(6)
	7-30	FA	48,33			
	5	FA	préparation binaire pédiatrique	55,2	C. LE ROY(10)	

Annexe 2. Tableau récapitulatif des effets documentés des anticancéreux sur les micro-organismes

classe ATC	anticancéreux	concentration	germe	effet	
L01A agent alkylants	A : moutardes à l'azote	Bendamustine	0,25 mg/ml	<i>S. aureus</i>	absence(101)
			<i>E. faecium</i>	absence(101)	
			<i>P. aeruginosa</i>	absence(101)	
			<i>C. albicans</i>	absence(101)	
		Cyclophosphamide	1-100 µg/ml	<i>S. aureus</i>	absence(129)
			1-100 µg/ml	<i>S. epidermidis</i>	absence(129)
			1-100 µg/ml	<i>E. coli</i>	absence(129)
			1-100 µg/ml	<i>P. aeruginosa</i>	absence(129)
			1-100 µg/ml	<i>S. sanguis</i>	absence(129)
			1-100 µg/ml	<i>C. albicans</i>	absence(129)
			1 mg/ml	Bactéries Gram +	absence(89)
				Bactéries Gram -	absence(89)
		Bactérie anaérobie		absence(89)	
		levures		absence(89)	
		Ifosfamide	pure	<i>B. subtilis</i>	absence(102)
				<i>C. albicans</i>	absence(102)
	Melphalan	1 mg/ml	Bactéries Gram +	absence(89)	
			Bactéries Gram -	absence(89)	
			Bactérie anaérobie	absence(89)	
			levures	absence(89)	
	B : Alkylsulfonates	Busulfan	0,5 mg/ml	<i>S. aureus</i>	bactéricide/bactériostatique(88)
				<i>E. faecium</i>	bactéricide/bactériostatique(88)
				<i>P. aeruginosa</i>	bactéricide/bactériostatique(88)
			1 mg/ml	Bactéries Gram +	absence(89)
				Bactéries Gram -	absence(89)
				Bactérie anaérobie	absence(89)
		levures		absence(89)	
		D : Nitrosouées	Carmustine	1 mg/ml	Bactéries Gram +
Bactéries Gram -					absence(89)
Bactérie anaérobie				absence(89)	
1 - 0,1 mg/ml	levures		foncigide(89)		
Fotémustine	0,2 mg/ml		<i>S. aureus</i>	absence(100)	
		<i>P. aeruginosa</i>	absence(100)		
		<i>E. faecium</i>	absence(100)		
		<i>C. albicans</i>	absence(100)		
X : autres agents alkylants	Dacarbazine	0,01 - 0,1 mg/ml	Bactéries Gram +	bactéricide(89)	
			Bactéries Gram -	bactéricide(89)	
		Bactérie anaérobie	bactéricide(89)		
1 mg/ml	levures	absence(89)			
A : analogues de l'acide folique	Methotrexate	9mg/ml	<i>S. aureus</i>	Bactériostatique (130)	
			<i>P. aeruginosa</i>	Bactériostatique (130)	
		10-1000 µg/ml	Bactéries Gram +	bactéricide(89)	
		1 mg/ml	Bactéries Gram -	absence(89)	

L01B antimetaboliq ues		Methotrexate		Bactérie anaérobie	absence(89)
			0,1- 1 mg/ml	levures	fongicide(89)
	B : analogues de la purine	Clofarabine	0,07 mg/ml	<i>S. aureus</i>	absence(99)
				<i>P. aeruginosa</i>	absence(99)
				<i>E. faecium</i>	absence(99)
				<i>C. albicans</i>	absence(99)
		Fludarabine	0,2 mg/ml	<i>S. aureus</i>	absence(101)
				<i>E. faecium</i>	absence(101)
				<i>P. aeruginosa</i>	absence(101)
		Nelarabine	800 mg/ml	<i>C. albicans</i>	absence(101)
				<i>S. aureus</i>	absence(99)
				<i>P. aeruginosa</i>	absence(99)
				<i>E. faecium</i>	absence(99)
		C : analogues de la pyrimidine	Azacitidine	0,5 mg/ml	<i>P. aeruginosa</i>
	Cytarabine		pure	<i>B. subtilis</i>	absence(102)
				<i>C. albicans</i>	absence(102)
			1 mg/ml	Bactéries Gram +	absence(89)
				Bactéries Gram -	absence(89)
				Bactérie anaérobie	absence(89)
	levures			absence(89)	
	5-Fluorouracil		8,65 µg/ml	<i>E. coli</i>	bactéricide(113)
			10 µM	<i>E. coli</i>	bactéricide(88)
			pure	<i>B. subtilis</i>	bactéricide(102)
				<i>B. subtilis</i>	bactéricide(102)
			0,1 mg/ml	<i>K. pneumoniae</i>	absence(113)
			1,24 µg/ml	<i>P. vulgaris</i>	bactéricide(113)
			10,8 µg/ml	<i>P. aeruginosa</i>	bactéricide(113)
			0,5 - 1 µg/ml	<i>S. aureus</i>	bactéricide(88)
				<i>S. epidermidis</i>	bactéricide(88)
				<i>P. aeruginosa</i>	Bactériostatique (88)
			50 mg/ml	<i>P. cepacia</i>	bactéricide(97)
				<i>C. albicans</i>	fongicide(97)
			pure	<i>C. albicans</i>	fongicide(102)
				<i>C. albicans</i>	fongicide(102)
			50 mg/ml	<i>A. niger</i>	fongicide(97)
	0,1 - 10 µg/ml		Bactéries Gram +	bactéricide(89)	
	0,1-1 mg/ml		Bactéries Gram -	bactéricide(89)	
10-100 µg/ml	Bactérie anaérobie		bactéricide(89)		
	levures		fongicide(89)		
Gemcitabine	0,001 - 1 µg/ml		<i>Listeria</i>	bactéricide(88)	
			<i>Bacillus</i>	bactéricide(88)	
			<i>Enterococcus</i>	bactéricide(88)	
			<i>Staphylococcus</i>	bactéricide(88)	
		<i>Streptococcus</i>	bactéricide(88)		
	2,4 mg/ml	<i>S. aureus</i>	bactéricide(101)		
		<i>E. faecium</i>	bactéricide(101)		
		<i>P. aeruginosa</i>	bactéricide(101)		
		<i>C. albicans</i>	bactéricide(101)		

L01C Alcaloïdes végétaux et autre médicaments d'origine naturelle	A : vincaalcaloïde s et analogues	vinblastine	0,1-1 mg/ml	Bactéries Gram +	absence(89)
			1 mg/ml	Bactéries Gram -	absence(89)
			0,1-1 mg/ml	levures	absence(89)
		Vincristine	1-100 µg/ml	<i>S. aureus</i>	absence(129)
				<i>S. epidermidis</i>	absence(129)
				<i>E. coli</i>	absence(129)
				<i>P. aeruginosa</i>	absence(129)
				<i>S. sanguis</i>	absence(129)
				<i>C. albicans</i>	absence(129)
			1 mg/ml	Bactéries Gram +	absence(89)
				Bactéries Gram -	absence(89)
		Bactérie anaérobie		absence(89)	
	levures	absence(89)			
	Vinorelbine	0,1 mg/ml	<i>S. aureus</i>	absence(101)	
			<i>E. faecium</i>	absence(101)	
			<i>P. aeruginosa</i>	absence(101)	
			<i>C. albicans</i>	absence(101)	
	B : analogue de la podophyllotox ines	Etoposide	6,2 mg/ml	<i>K. rhizophila</i>	bactéricide(88)
			50mg/ml	<i>S. faecalis</i>	bactéricide(88)
			50mg/ml	<i>B. subtilis</i>	bactéricide(88)
pure			<i>B. subtilis</i>	bactéricide(102)	
12,5-16 mg/ml			<i>S. aureus</i>	Bactériostatique (88)	
pure			<i>E. coli</i>	Absence(88)	
			<i>P. aeruginosa</i>	Absence(88)	
			<i>K. pneumoniae</i>	Absence(88)	
			<i>C. albicans</i>	absence(102)	
diluée			<i>C. albicans</i>	absence(102)	
0,01-0,1 mg/ml			Bactéries Gram +	bactéricide(89)	
1 mg/ml			Bactéries Gram -	absence(89)	
0,01-0,1 mg/ml	Bactérie anaérobie	bactéricide(89)			
1 mg/ml	levures	absence(89)			
L01C Alcaloïdes végétaux et autre médicaments d'origine naturelle	D : Taxanes	Cabazitaxel	0,17 mg/ml	<i>S. aureus</i>	absence(99)
				<i>P. aeruginosa</i>	absence(99)
				<i>E. faecium</i>	absence(99)
				<i>C. albicans</i>	absence(99)
		Docetaxel	0,8 mg/ml	<i>S. aureus</i>	absence(101)
				<i>E. faecium</i>	absence(101)
				<i>P. aeruginosa</i>	absence(101)
				<i>C. albicans</i>	absence(101)
		Nab-paclitaxel	5,0 mg/ml	<i>S. aureus</i>	favorise(99)
				<i>P. aeruginosa</i>	favorise(99)
				<i>E. faecium</i>	favorise(99)
				<i>C. albicans</i>	favorise(99)
		Paclitaxel	0,7 mg/ml	<i>S. aureus</i>	absence(101)
				<i>E. faecium</i>	absence(101)
				<i>P. aeruginosa</i>	absence(101)
				<i>C. albicans</i>	absence(101)
X : autres plantes alcaloïdes et	Trabectédine	0,005 mg/ml	<i>S. aureus</i>	bactéricide(99)	
			<i>P. aeruginosa</i>	bactéricide(99)	
			<i>E. faecium</i>	bactéricide(99)	

	produits naturels			<i>C. albicans</i>	absence(99)
L01D antibiotique cytotoxique et apparenté	B : anthracyclines et apparentés	Daunorubicine	0,5 µM	<i>M. smegmatis</i>	Bactéricide (88,132)
			1,25 µM	<i>M. tuberculosis</i>	Bactéricide (88,132)
			0,5 µM	<i>B. subtilis</i>	bactéricide(88)
			125 µg/ml	<i>E. coli</i>	bactéricide(88)
			125 µg/ml	<i>P. mirabilis</i>	bactéricide(88)
		Doxorubicine	0,1 ml/ml	<i>E. coli</i>	absence(113)
			0,1-10 µg/ml		absence(129)
			0,1 ml/ml	<i>K. pneumoniae</i>	absence(113)
				<i>P. vulgaris</i>	absence(113)
				<i>P. aeruginosa</i>	absence(113)
			1 µg/ml	<i>S aureus</i>	Bactériostatique (88,129)
				<i>S. epidermidis</i>	Bactériostatique (88,129)
			10 µg/ml	<i>S. sanguis</i>	Bactériostatique (88,129)
			0,1-10 µg/ml	<i>P. aeruginosa</i>	absence(129)
			8 µM	<i>M. smegmatis</i>	Bactéricide (88,132)
			5 µM	<i>M. tuberculosis</i>	Bactéricide (88,132)
			0,1 - 10 µg/ml	<i>C. albicans</i>	absence(129)
			1 mg/ml	Bactéries Gram +	absence(89)
				Bactéries Gram -	absence(89)
			0,01 - 0,1 mg/ml	Bactérie anaérobie	bactéricide(89)
		1 mg/ml	levures	absence(89)	
		Epirubicine	7,25 mg/ml	<i>M. chelonae</i>	Bactéricide (88,133)
				<i>M. abscessus</i>	Bactéricide (88,133)
		Idarubicine	0,6 µM	<i>M. chelonae</i>	Bactéricide (88,132)
			80 µM	<i>M. abscessus</i>	Bactéricide (88,132)
			0,07 mg/ml	<i>S. aureus</i>	absence(101)
				<i>E. faecium</i>	absence(101)
<i>P. aeruginosa</i>	absence(101)				
<i>C. albicans</i>	absence(101)				
Bléomycine	1,25 µg/ml	<i>E. coli</i>	bactéricide(113)		
	1,91 µg/ml	<i>K. pneumoniae</i>	bactéricide(113)		
	100 µg/ml	<i>P. vulgaris</i>	absence(113)		
		<i>P. aeruginosa</i>	absence(113)		
	0,566 µg/ml	<i>S. aureus</i>	bactéricide(124)		
	1 mM	<i>S. pneumoniae</i>	bactéricide(124)		
		<i>S. epidermidis</i>	bactéricide(124)		
		<i>E. faecalis</i>	absence(124)		
		<i>M. luteus</i>	bactéricide(124)		
		<i>B. subtilis</i>	bactéricide(124)		
		<i>S. marcescens</i>	bactéricide(124)		
		<i>P. vulgaris</i>	bactéricide(124)		
		<i>P. aeruginosa</i>	bactéricide(124)		
		<i>N. sicca</i>	bactéricide(124)		
<i>E. coli</i>	bactéricide(124)				
L01D antibiotique cytotoxique et apparenté	C : autres antibiotiques et apparentés				

		Mitomycine C	2,04 µg/ml	<i>E. coli</i>	bactéricide(113)
			2,5 µg/ml	<i>K. pneumoniae</i>	bactéricide(113)
			2,34 µg/ml	<i>P. vulgaris</i>	bactéricide(113)
			1,61 µg/ml	<i>P. aeruginosa</i>	bactéricide(113)
			0,2 - 15 µg/ml	<i>S. aureus</i>	bactéricide(88)
				<i>P.aeruginosa</i>	bactéricide(88)
			0,2 µg/ml	<i>B. burgdoferi</i>	bactéricide(88)
			0,01 - 0,1 µg/ml	Bactéries Gram +	bactéricide(89)
			1 - 10 µg/ml	Bactéries Gram -	bactéricide(89)
			0,01 - 0,1 µg/ml	Bactérie anaérobie	bactéricide(89)
1 mg/ml	levures	absence(89)			
	A : dérivés du platine	Cisplatine	pure	<i>B. subtilis</i>	absence(102)
			1 mg/ml	<i>S. aureus</i>	bactéricide(97)
				<i>E. coli</i>	bactéricide(97)
				<i>P. aeruginosa</i>	bactéricide(97)
				<i>P. cepacia</i>	bactéricide(97)
		pure	<i>C. albicans</i>	absence(102)	
		1 mg/ml	<i>C. albicans</i>	fongicide(97)	
			<i>A. niger</i>	fongicide(97)	
		Oxaliplatine	0,4 mg/ml	<i>S. aureus</i>	absence(101)
				<i>E. faecium</i>	absence(101)
<i>P. aeruginosa</i>	absence(101)				
<i>C. albicans</i>	absence(101)				
L01X autre anti-neoplasiques	C : anticorps monoclonaux	Brentuximab-vedotin	0,4 mg/ml	<i>S. aureus</i>	absence(99)
				<i>P. aeruginosa</i>	absence(99)
				<i>E. faecium</i>	absence(99)
				<i>C. albicans</i>	absence(99)
		Ipilimumab	1,5 mg/ml	<i>S. aureus</i>	absence(99)
				<i>P. aeruginosa</i>	absence(99)
				<i>E. faecium</i>	absence(99)
				<i>C. albicans</i>	absence(99)
	Ofatmumumab	3,0 mg/ml	<i>S. aureus</i>	absence(99)	
			<i>P. aeruginosa</i>	absence(99)	
			<i>E. faecium</i>	absence(99)	
			<i>C. albicans</i>	absence(99)	
	Panitumumab	3,07 mg/ml	<i>S. aureus</i>	absence(99)	
			<i>P. aeruginosa</i>	absence(99)	
			<i>E. faecium</i>	absence(99)	
			<i>C. albicans</i>	absence(99)	
E : inhibiteurs des protéines kinases	Temsirrolimus	0,1 mg/ml	<i>S. aureus</i>	absence(99)	
			<i>P. aeruginosa</i>	absence(99)	
			<i>E. faecium</i>	absence(99)	
			<i>C. albicans</i>	absence(99)	
X : autres antinéoplasiques	Aflibercept	1,2 mg/ml	<i>S. aureus</i>	absence(99)	
			<i>P. aeruginosa</i>	absence(99)	
			<i>E. faecium</i>	absence(99)	
			<i>C. albicans</i>	absence(99)	
	Eribuline	0,07 mg/ml	<i>S. aureus</i>	absence(99)	

			0,07 mg/ml	<i>P. aeruginosa</i>	absence(99)		
				<i>E. faecium</i>	absence(99)		
				<i>C. albicans</i>	absence(99)		
		Topotécan	1 mg/ml	<i>S. aureus</i>	bactéricide(98)		
				<i>P. aeruginosa</i>	bactéricide(98)		
				<i>E. coli</i>	bactéricide(98)		
				<i>C. albicans</i>	absence(98)		
			0,01 mg/ml	<i>A. niger</i>	absence(98)		
				<i>S. aureus</i>	absence(101)		
				<i>E. faecium</i>	absence(101)		
		Acide trioxide	0,04 mg/ml	<i>P. aeruginosa</i>	absence(101)		
				<i>C. albicans</i>	absence(101)		
				<i>S. aureus</i>	absence(99)		
				<i>P. aeruginosa</i>	absence(99)		
						<i>E. faecium</i>	absence(99)
						<i>C. albicans</i>	absence(99)

Serment De Galien

Je jure en présence de mes Maîtres de la Faculté et de mes condisciples :

- d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;
- d'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
- de ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères, si j'y manque.

Stérilité des préparations injectables hospitalières de 5-Fluorouracile : recherche d'une méthode alternative à l'essai de stérilité de la Pharmacopée Européenne

La fabrication en conditions aseptiques de lots de préparations injectables nécessite un contrôle de la stérilité. Pour certaines préparations, le BacT/ALERT® est déjà utilisé en routine. L'utilisation du BacT/ALERT® pour le suivi de la stérilité de préparations d'anticancéreux, notamment le 5-Fluorouracile (5FU), se heurte à une probable interférence due à des propriétés antimicrobiennes. Le but du présent travail est de trouver une alternative à l'essai de stérilité de la Pharmacopée Européenne dans ce cadre. L'hypothèse testée est que la présence de l'uracile permet d'inhiber cette activité. Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) du 5FU retrouvées ont été de $2,5 \times 10^{-8}$ mg/ml sur *Staphylococcus aureus*, $2,5 \times 10^{-4}$ mg/ml pour *Bacillus subtilis* et de $2,5 \times 10^{-2}$ mg/ml pour *Aspergillus brasiliensis*. L'activité antimicrobienne du 5FU est très marquée. En présence d'uracile ces CMI augmentent mais pas suffisamment pour atteindre les concentrations de nos préparations. Les difficultés rencontrées ont été d'évaluer l'influence du pH sur ces résultats ainsi que la solubilisation du l'uracile. En conclusion l'activité antimicrobienne du 5FU faiblement impactée par la dilution et la présence de l'uracile ne permet pas de l'inhiber complètement. Une autre méthode doit être recherchée tel que la cytométrie en phase solide. Le présent manuscrit de décline en trois parties : la stérilité des préparations injectables, les effets des anticancéreux sur les micro-organismes et les travaux personnels.

Mots-clés : Anticancéreux ; Essai de Stérilité ; BacT/ALERT® ; Méthodes de microbiologies rapides ; 5 Fluorouracile

Sterility of hospital injectable preparations of 5-Fluorouracil: search for an alternative method to the sterility test of the European pharmacopoeia

The aseptic manufacture of lots of injectable preparations requires sterility control. For some preparations, the BacT/ALERT® is actually used. The use of the BacT/ALERT® for monitoring of the sterility of antineoplastic preparations, especially 5-Fluorouracil (5FU), encounters a likely interference due to antimicrobial properties. The purpose of the present work is to find an alternative to the European Pharmacopoeia sterility test in this context. The hypothesis tested is that the presence of uracil makes it possible to inhibit this activity. The minimum inhibitory concentrations (MIC) of 5FU found were 2.5×10^{-8} mg/ml on *Staphylococcus aureus*, 2.5×10^{-4} mg/ml for *Bacillus subtilis* and 2.5×10^{-2} mg/ml for *Aspergillus brasiliensis*. The antimicrobial activity of 5FU is very marked. In the presence of uracil these MICs increase but not enough to reach the concentrations of our preparations. The difficulties encountered were to evaluate the influence of pH on these results as well as the solubilization of uracil. In conclusion, the antimicrobial activity of 5FU weakly impacted by the dilution and the presence of uracil does not allow to completely inhibit it. Another method must be sought such as solid phase cytometry. This manuscript is divided into three parts: the sterility of injectable preparations, the effects of anticancer drugs on microorganisms and personal work.

Keywords : antineoplastic ; Sterility assay ; BacT/ALERT® ; Rapid microbiology method, 5-Fluorouracil

