



HAL
open science

**Essai de stérilité des préparations produites en lot :
neutralisation du pouvoir inhibiteur de la croissance
bactérienne de certains cytotoxiques par des agents de
complexation**

Maïté Sangnier

► **To cite this version:**

Maïté Sangnier. Essai de stérilité des préparations produites en lot : neutralisation du pouvoir inhibiteur de la croissance bactérienne de certains cytotoxiques par des agents de complexation. Sciences du Vivant [q-bio]. 2020. dumas-03019731

HAL Id: dumas-03019731

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03019731v1>

Submitted on 23 Nov 2020

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

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

U.F.R. DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 2020

Thèse n° 61

THESE POUR L'OBTENTION DU
DIPLOME D'ETAT de DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement

Par SANGNIER Maïté
Née le 29/07/1991 à Amiens (80)

Le 26/06/2020

**Essai de stérilité des préparations
produites en lot : Neutralisation du
pouvoir inhibiteur de la croissance
bactérienne de certains cytotoxiques
par des agents de complexation**

Sous la direction de Madame le Docteur Aude BERRONEAU, Praticien Hospitalier

Membres du jury :

Madame le Professeur Sylvie CRAUSTE-MANCIET
Madame le Docteur Aude BERRONEAU
Monsieur le Professeur Antoine DUPUIS
Madame le Professeur Véronique DUBOIS
Monsieur le Docteur Vincent SERVANT

Présidente
Directrice
Jury
Jury
Jury

REMERCIEMENTS

Aux membres du jury,

A madame la présidente du jury, le Professeur Sylvie Crauste-Manciet,

Je tiens à vous remercier de m'avoir donné goût à la pharmacotechnie dès le début de mon internat, mais également de m'avoir confié ce projet et accompagné tout au long de sa réalisation. Soyez assurée de mes remerciements sincères et de ma profonde considération.

A monsieur le Professeur Antoine Dupuis,

Ce fût un honneur de pouvoir travailler dans votre unité. Soyez assuré de mes remerciements les plus sincères pour le jugement de cette thèse.

A madame la Professeur Véronique Dubois,

Je vous remercie de votre implication dans ce projet ainsi que d'avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse. Soyez assurée de ma profonde gratitude.

A madame la directrice de thèse, le Docteur Aude Berroneau,

Merci beaucoup pour votre disponibilité et vos conseils pendant l'encadrement de cette thèse mais également pendant les semestres à vos côtés. J'ai beaucoup appris de votre professionnalisme et de votre gentillesse et je vous suis très reconnaissante d'avoir accepté de diriger ce travail.

A monsieur le Docteur Vincent Servant,

Un grand merci à vous pour votre gentillesse et pour vous être rendu disponible dans de brefs délais pour me faire l'honneur de juger ce travail. Soyez assuré de ma reconnaissance.

A toutes les personnes qui ont rendu ce travail possible,

A monsieur le Docteur Guillaume Bouguéon,

Un énorme merci pour ton encadrement, ton implication et ta disponibilité sans faille. C'était un plaisir de travailler avec toi. Je te souhaite beaucoup de bonheur pour la suite.

A Jean-Marc,

Merci franchement pour ton aide et ta disponibilité, ton travail rigoureux agrémenté de ta touche d'humour était plus qu'utile dans ce projet.

A l'équipe de technie d'Haut-Lévêque,

Aux assistants pour votre encadrement et votre formation.

Aux préparateurs pour la qualité de votre travail et votre humour en ZAC.

A mes co-internes, merci à Pierre, Aasfa et Pauline, de m'avoir supporté, soutenu, aidé, arrangé, ... merci pour nos potins et nos business à venir.

Au service de bactériologie,

Pour l'aide précieuse apportée pour les manipulations.

A toutes les équipes avec qui j'ai eu la chance de travailler,

A l'équipe de Pellegrin,

Tout a commencé là. Merci à Audrey et Bénédicte, votre encadrement m'a donné le goût à la technie, que je n'ai plus quitté. Merci aux préparateurs géniaux avec qui j'ai travaillé, vous me manquez beaucoup.

A l'équipe d'Haut-Lévêque,

Merci aux pharmaciens, aux internes, mais aussi aux cadres (merci Maxime pour ta présence), aux magasiniers toujours souriants, à nos secrétaires toujours disponibles et agréables, à Vincent... Merci à tous pour votre accompagnement pendant ces semestres.

A l'équipe de la stérilisation,

Merci à Monsieur Marque pour votre transmission de savoir, travailler avec vous était un plaisir. Marie, tu es devenue une amie, j'ai beaucoup de chance de t'avoir rencontré. Merci pour ton soutien et pour ce semestre passé avec toi. Et merci à « l'équipe de la sté », vous êtes extraordinaires.

A l'équipe de la matériovigilance et de Saint-André,

Merci pour ces semestres d'internat, j'ai appris beaucoup à vos côtés. Merci aux pharmaciens, aux co-internes et aux préparateurs.

A toute la pharmacie du CHU de Poitiers,

Merci de m'avoir accueilli si gentiment et de m'avoir tant appris.

A mes amis et mes co-internes,

A Céline,

Merci pour ces années passées avec toi sur les bancs de la fac. Nos fous rires et nos sorties m'ont fait tenir. Merci pour ta présence sans faille tout au long de ces 11 années, dans les bons comme dans les mauvais moments. Ton amitié m'est très précieuse.

A Lucile et Charlotte,

Princesse Lulu et Coach, mon internat n'aurait pas été pareil sans vous. Vous êtes des piliers, sachez que votre soutien quotidien a permis ce travail.

A mes amiénois préférés,

A Claire et Népher, Baptiste et Victoria, Manon et Romain, Améline et Alexis, Océane et Damien,

Je n'ai pas de mots. Vous êtes des amitiés très précieuses, solides et toujours présentes même avec la distance et les années. Vos messages ont été d'un grand réconfort pendant tout ce travail (y compris les photos d'Iléana, Roxane, Milan et Oscar). Je resterai toujours disponible pour vous.

A Mickaël,

Mon premier co-interne (le meilleur, c'est sûr), ce semestre avec Laure et toi a permis un départ parfait pour mon internat et ta présence pendant ces 4 années était salvatrice. Notre discussion sur le charbon est le commencement de ce travail. J'espère partager encore beaucoup de moment avec toi.

Aux amis de Bordeaux,

A Hélène et Kevin, Jeannette, Maxime, D'Houdi, Solène, Thibault, Marine J., Marine S., Jérémy, et à tous les « petits » co-internes devenus grands,

Merci pour les instants de décompression à Bordeaux, ces vacances, ces week-end, ces soirées, tellement de superbes moments passés avec vous.

Aux co-internes de Poitiers,

A Gogo, Bébé Maumu, Tchorly, Léa, Ugo, Phiphi, Pépé, Alice, Francisco, Nathan, Alban, Clém, Margaux V, ... et j'en passe,

C'était juste un inter-CHU, juste 6 mois, je devais faire un aller-retour, mais je me suis tellement attachée à vous. Nos sorties, votre bonne humeur, nos rires, ... vous me manquez beaucoup. C'est vous qui étiez présents pendant la rédaction de ce travail, merci pour tout. Un merci tout particulier à Margaux et Manon. Poitiers c'est le feu.

A ma famille,

A mes grands-parents, A mes oncles et tantes, cousins et cousines,

Vous êtes si nombreux, vous m'avez toujours soutenue et encouragée depuis mon plus jeune âge. Merci énormément pour tout ce que vous avez pu faire pour moi pendant toutes ces années.

A ma belle-famille,

Merci à toute ma belle-famille pour les bons moments partagés. Un merci tout particulier à Isabelle et Julie pour votre soutien et tout ce que nous avons vécu ensemble. Merci Hugo de m'avoir rejoint dans l'équipe du reste du monde.

A ma petite sœur, Emma,

Merci de m'avoir toujours soutenue. Je suis fière de la femme que tu deviens.

A vous Papa et Maman,

Un grand merci de m'avoir guidé dans la vie, de m'avoir toujours soutenu et d'être présents quelques soient mes choix. Je suis fière de ce que vous m'avez appris. Merci Papa de m'avoir toujours poussé plus haut. Merci Maman pour toutes les petites phrases d'éducation qui résonnent toujours. Si j'ai le goût de travailler si dur c'est grâce à votre exemple.

A Thomas,

C'est très compliqué d'écrire tes remerciements en alliant pudeur et gratitude. Tu m'as apporté l'humour (toujours), le soutien et le réconfort (beaucoup), l'encouragement et les conseils (souvent), ... tout est possible quand on est ensemble. A tous nos jolis projets en cours et à venir.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES TABLES	8
LISTE DES FIGURES	8
ABBREVIATIONS.....	9
INTRODUCTION.....	10
PARTIE I – GENERALITES.....	13
1) <i>Standardisation des doses et production en lot</i>	<i>13</i>
a) Standardisation des doses.....	13
b) Production en lot et en série	15
2) <i>La stérilité des préparations parentérales.....</i>	<i>17</i>
a) Méthode de référence de la Pharmacopée Européenne	17
b) Le système BacT/ALERT®.....	18
3) <i>Les anticancéreux choisis dans notre étude</i>	<i>20</i>
a) Définitions et mécanismes d'action	20
b) Justification du choix des anticancéreux	25
PARTIE II – ETUDE DE L’EFFET INHIBITEUR DE LA CROISSANCE MICROBIOLOGIQUE ET NEUTRALISATION	28
1) <i>Les effets inhibiteurs de la croissance microbologique des cytotoxiques.....</i>	<i>28</i>
2) <i>Evaluation de l’effet inhibiteur de la croissance microbologique du 5-fluorouracile, de l’oxaliplatine et de l’irinotecan</i>	<i>30</i>
a) Méthodologie	31
b) Résultats et discussion	32
3) <i>Méthodes de neutralisation de l’activité des inhibiteurs de la croissance microbologique</i>	<i>34</i>
a) La méthode de référence de la Pharmacopée Européenne.....	34
b) La méthode de dilution de la Pharmacopée Européenne	35
c) L’inhibition.....	35
d) La dégradation de la molécule	35
e) La complexation de la molécule	36
PARTIE III – ETUDE DE L’ACTION DES DIFFERENTS AGENTS DE COMPLEXATION SUR LE 5FU	38
1) <i>Méthodologie pour l’étude de l’efficacité de la complexation</i>	<i>38</i>
a) Résumé de la méthodologie générale.....	38
b) Étude de la répétabilité de la méthode de filtration sous vide	40
c) Statistiques	41

2) <i>Les résines échangeuses d'ions</i>	41
a) Définition et mécanisme d'action	41
b) Caractéristiques des résines choisies	43
c) Évaluation de la complexation du 5FU.....	44
a. Méthodologie	44
b. Résultats et discussion	45
3) <i>Le charbon actif</i>	48
a) Définition et mécanisme d'action	48
b) Évaluation de la complexation du 5FU.....	48
a. Méthodologie	48
b. Résultats et discussion	49
4) <i>Croissance microbiologique après traitement par agent de complexation</i>	51
a) Méthodologie.....	51
b) Résultats et discussion	52
5) <i>Test de mise en place en routine</i>	53
a) Choix des microorganismes étudiés.....	53
b) Méthodologie.....	54
c) Résultats et discussion	55
CONCLUSION	57
BIBLIOGRAPHIE :	61

LISTE DES TABLES

Tableau 1 - Données de la littérature concernant l'activité antimicrobienne de cytotoxiques	30
Tableau 2 - Détection bactérienne par le système BA d'échantillons de 5FU contaminés <i>par S. aureus</i> ..	34
Tableau 3 - Caractéristiques de la méthode HPLC utilisée	39
Tableau 4 - Répétabilité de la méthode de traitement par filtration sous vide	40
Tableau 5 - Caractéristiques des REI étudiées	44
Tableau 6 - Complexation du 5FU par R1 à l'intérieur des flacons de BA	45
Tableau 7 - Efficacité de la complexation de 5FU par les REI	46
Tableau 8 - Efficacité de la complexation du 5FU par le CA	50
Tableau 9 - Détection de la croissance bactérienne par le système BA après traitement par CA	52
Tableau 10 - Résultats du test de mise en place en routine	55

LISTE DES FIGURES

Figure 1 - Schéma de production en série et en lot (exemple de poches)	15
Figure 2 - Schéma de l'essai de stérilité de référence de la Pharmacopée Européenne	18
Figure 3 - Schématisation du principe de détection par le système BacT/ALERT®	19
Figure 4 - Formule du 5-fluorouracile	21
Figure 5 - Formule de l'oxaliplatine	23
Figure 6 - Formule de l'irinotécan	24
Figure 7 - Schématisation de la méthode de microdilution liquide	31
Figure 8 - Méthodologie de l'étude de l'efficacité des agents de complexation	39
Figure 9 - Schématisation du mécanisme d'action des REI	43
Figure 10 - Souches de microorganismes recommandés par la Pharmacopée Européenne	53
Figure 11 - Schématisation du test de mise en place en routine	54

ABBREVIATIONS

5FU : 5-fluorouracile

ADN : Acide DesoxyriboNucléique

ARN : Acide RiboNucléique

BA : BacT/ALERT®

BPP : Bonnes Pratiques de Préparation

CA : Charbon Actif

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CO₂ : Dioxyde de Carbone

DACH : DiAminoCycloHexane

DDS : Drug Delivery System : Système de délivrance de médicament

DPD : Dihydropyrimidine Déshydrogénase

GHT : Groupement Hospitalier de Territoire

HPLC : Chromatographie Liquide Haute Performance

INCa : Institut National du Cancer

LED : Diode électroluminescente

MCO : Médecine - Chirurgie – Obstétrique

NaCl : Chlorure de Sodium

NaOH : Hydroxyde de Sodium

Ph. Eur. : Pharmacopée Européenne

REI : Résine Échangeuse d'Ions

RPM : Rotation Par Minute

UFC : Unité Formant Colonie

INTRODUCTION

Selon l'Institut National du Cancer (INCa) (1), en 2017, 1,2 million de personnes atteintes du cancer ont été hospitalisées dans les établissements MCO (Médecine, Chirurgie, Obstétrique), soit une augmentation de 10% par rapport à 2012. Cette hausse du taux d'hospitalisation s'accompagne d'une augmentation de la demande de chimiothérapies pour les unités de production à l'hôpital. Par ailleurs, la création des Groupements Hospitaliers de Territoire (GHT) engendre une convergence de certaines activités, telle que la production de chimiothérapies, vers les centres supports (ici, le CHU de Bordeaux). Afin de pallier cette augmentation, à moyens toujours constants, chaque pharmacie doit améliorer sa productivité pour satisfaire aux demandes des services, tout en préservant la qualité et la sécurité des soins pour le patient. Dans cet objectif, ces établissements cherchent à mettre en place des solutions comme la standardisation des doses (appelée également « dose-banding ») ainsi que la production en lot. Ces solutions, qui augmentent la productivité et lissent l'activité, permettent également d'augmenter la qualité et la sécurité de la prise en charge médicamenteuse (2).

Cependant, afin de pouvoir mettre en place une production en lot, il faut satisfaire aux exigences de référentiels, notamment les Bonnes Pratiques de Préparation (BPP) (3) et la Pharmacopée Européenne (Ph. Eur.) (4). Pour satisfaire à l'application de ces référentiels, il convient, entre autres choses, de pouvoir étudier la stabilité de ces préparations. En dehors de la stabilité physicochimique, la stabilité microbiologique reste un enjeu primordial pour ce type d'activité sensible. L'essai de stérilité de référence de la Ph. Eur. est basé sur une filtration et nécessite 15 jours de mise en incubation. Cependant, les stabilités physicochimiques des agents cytotoxiques peuvent être limitées dans le temps, il est donc raisonnable de se tourner vers des méthodes alternatives rapides également proposées par la Ph. Eur. (4). La réalisation de ces essais de stérilité alternatifs peut néanmoins être

problématique. En effet, certaines molécules cytotoxiques présentent un effet inhibiteur de la croissance microbiologique et ces méthodes alternatives ne permettent pas de visualiser une contamination lorsqu'elle a lieu.

Le Groupement Hospitalier Sud du CHU de Bordeaux doit faire face depuis plusieurs années à un surcroît important d'activité avec notamment la construction d'un nouveau centre médical et des projets de centralisation d'activités et de sous-traitances. En 2019, une augmentation de 8,2% par rapport à 2017, a été observée sur la production des anticancéreux et des thérapies ciblées. Des modifications organisationnelles comme la standardisation des doses, la production anticipée et la préparation en séries de certains cytotoxiques ont d'ores et déjà été mises en place. L'instauration d'une production en lot est envisagée pour améliorer la productivité et la qualité des préparations. C'est dans ce contexte que la réalisation d'un contrôle microbiologique alternatif rapide concernant les molécules cytotoxiques est explorée.

Dans une première partie, nous réaliserons un état des lieux des différentes notions abordées dans le cadre de ce projet : les concepts de standardisation des doses et de production en lot, de stérilité des préparations parentérales et la présentation des molécules cytotoxiques utilisés dans notre étude. Une seconde partie sera consacrée à l'évaluation des effets inhibiteurs de la croissance microbiologique de certains cytotoxiques sélectionnés ainsi que des méthodes possibles pour neutraliser cet effet. Enfin, nous aborderons dans une dernière partie, l'étude de l'action neutralisante de différents agents de complexation (différentes résines échangeuses d'ions et le charbon actif) dans le cas particulier de la molécule de 5-fluorouracile (5FU).

PARTIE I

GENERALITES

PARTIE I – GENERALITES

1) Standardisation des doses et production en lot

a) Standardisation des doses

La standardisation des doses (ou « dose-banding ») est un concept anglo-saxon initié à la fin du 20^{ème} siècle et développé au début du 21^{ème} siècle. Il consiste à définir des intervalles de doses permettant de proposer une dose standardisée (qui se trouve au milieu de cet intervalle) lorsque la dose prescrite est comprise dans cet intervalle. Ce concept repose sur la volonté de ne pas produire des doses individualisées de chimiothérapies afin d'être plus efficient.

Dans le cas de prescriptions de doses individuelles, le résultat final est incertain pour différentes raisons :

- Le choix de la formule de calcul ou les méthodes de mesure du poids et de la taille du patient sont des variables qui rendent difficile un calcul exact de la surface corporelle ;
- Les variabilités interindividuelles liées à la physiopathologie du patient sont toujours présentes avec une dose calculée selon la surface corporelle ;
- La préparation d'une dose précise n'est pas toujours faisable sur le plan pratique ;

La prescription précise et individuelle n'est donc pas scientifiquement justifiée dans tous les cas de figure.

Le dose-banding est un mode de production qui permet l'anticipation des fabrications. Cette possibilité de produire de façon anticipée apparaît comme un levier intéressant pour améliorer le circuit de production des cytotoxiques mais également pour le sécuriser. En effet, une diminution des erreurs de manipulation et une augmentation de la précision lors

de la fabrication permet de sécuriser le circuit (5). Les intérêts de la standardisation portent également sur un aspect économique. Elle apporte la possibilité de pouvoir réattribuer des poches non administrées (surtout pour les produits coûteux), de pouvoir préparer à l'avance des poches non nominatives et de fluidifier ainsi la production de l'unité.

Le choix des molécules à standardiser est justifié par différents critères dont :

- ✓ **La fréquence de production de ces préparations.** Les intérêts de la standardisation des doses, cités ci-dessus, se retrouvent limités si le nombre et la fréquence de prescriptions sont insuffisants. La préparation à l'avance et la réattribution des poches n'est alors plus possible. Ce critère d'éligibilité varie d'un centre de production à l'autre en fonction du type et de l'importance de son activité.

- ✓ **La stabilité physicochimique du principe actif dilué** doit également être prise en compte afin de permettre un stockage prolongé et une facilitation de la réattribution. Même si la prescription est nominative, l'intérêt d'avoir fabriqué cette poche à dose standardisée est également de pouvoir la réattribuer à un autre patient dont la prescription est à la même dose. La standardisation permet alors de pouvoir limiter les pertes de coûts et de temps engendrées par une modification ou une annulation de prescription.

- ✓ **La complexité ou la durée de la fabrication** peuvent pareillement être envisagées. Leur standardisation peut permettre de fabriquer en avance ces produits et d'ainsi fluidifier la production.

b) Production en lot et en série

La standardisation des doses permet également de mettre en place un autre système : la production en série. Celui-ci donne lieu à une rationalisation de la production. Il s'agit de la production d'une quantité déterminée de préparations à l'identique pour plusieurs patients. Afin d'optimiser encore le circuit, il existe la production en lot, qui consiste en la répartition d'un contenant mère en plusieurs contenants filles pour de multiples patients. Ces deux processus sont schématisés dans la **Figure 1** ci-dessous.

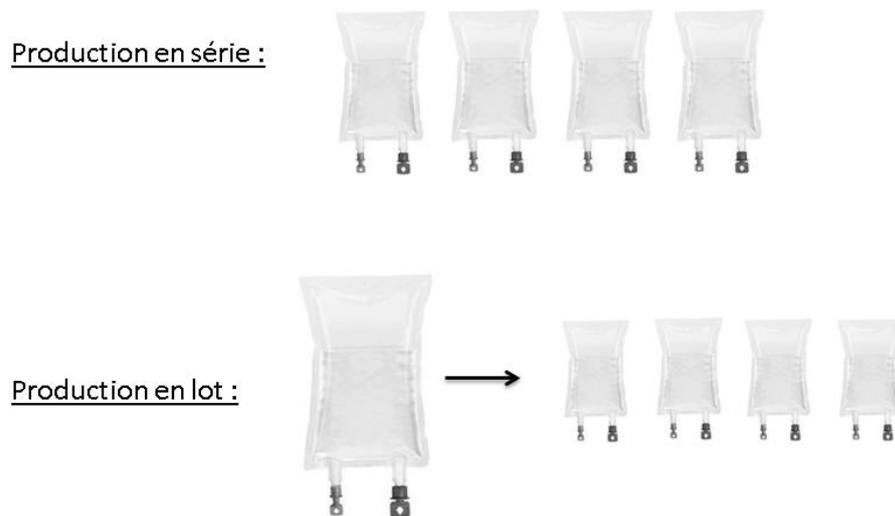


Figure 1 - Schéma de production en série et en lot (exemple de poches)

La production en lot apporte des avantages supplémentaires par rapport à une production en série :

- ✓ **Limiter les erreurs de manipulation** : la production d'une poche mère suivie d'une répartition aseptique est une méthode de production à moindre risque car elle limite le nombre de manipulations et le risque d'erreurs lors de ces manipulations.

- ✓ **Permettre un stockage prolongé** : moins de manipulations à risque sont présentes dans ce processus de fabrication, le risque de contamination microbiologique est donc diminué et le stockage de ces poches peut être prolongé. C'est pour cette raison que ce type de production doit répondre à des exigences supplémentaires, notamment de contrôle microbiologique afin de permettre un stockage prolongé. En effet, on peut lire dans la nouvelle version des BPP (6), actuellement en enquête publique depuis Juillet 2019, que le contrôle de la stabilité physicochimique et microbiologique de la préparation terminée doit être effectué lorsque la préparation est réalisée à l'avance et destinée à être conservée sur des périodes prolongées. Les méthodes analytiques utilisées doivent être validées et permettre de quantifier la substance active et ses produits de dégradation tandis que les méthodes microbiologiques doivent démontrer le maintien de la qualité microbiologique au cours du temps en accord avec la Ph. Eur.

- ✓ **Lisser la production** : le fait de produire en lot et de stocker les poches ainsi produites pour une durée plus importante, permet de réaliser des campagnes de production d'une même molécule à des moments où la production est plus calme. L'activité de l'unité est ainsi fluidifiée.

Au CHU de Bordeaux, au sein du Groupement Hospitalier Sud, certaines préparations de cytotoxiques sont fabriquées en séries, à doses standardisées : le 5FU en bolus, l'irinotécan et l'oxaliplatine. Ces trois préparations représentent une production annuelle de 2348, 1786 et 1610 poches respectivement au cours de l'année 2018. Afin d'optimiser encore ce circuit, une production en lot est souhaitée, elle permettrait un stockage prolongé mais aussi une sécurisation des étapes de la production et un lissage de

l'activité. Cependant, afin de mettre en place cette production en lot, et selon les BPP citées précédemment, il convient de réaliser un contrôle microbiologique des préparations terminées.

2) La stérilité des préparations parentérales

a) Méthode de référence de la Pharmacopée Européenne

La stérilité se définit comme l'absence de microorganisme viable. Les préparations pour usage parentéral doivent être stériles. La Ph. Eur. (4) recommande donc un essai de stérilité pour toutes ces préparations devant être stériles. Cet essai est semblable à celui recommandé par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (7) mais également par la Pharmacopée Américaine (USP) (8). Pour les préparations liquides, la technique de référence décrite est la filtration sur membrane, cette technique consiste à filtrer (avec une membrane présentant des pores inférieurs à $0,45\mu\text{m}$), un volume minimal de la préparation à contrôler. Les membranes sont ensuite déposées dans deux milieux de culture puis elles sont mises à incuber. Cet essai de référence contraint à une mise en incubation de 14 jours et donc à une séquestration des préparations terminées pendant cette période. La **Figure 2** ci-dessous représente schématiquement cet essai.

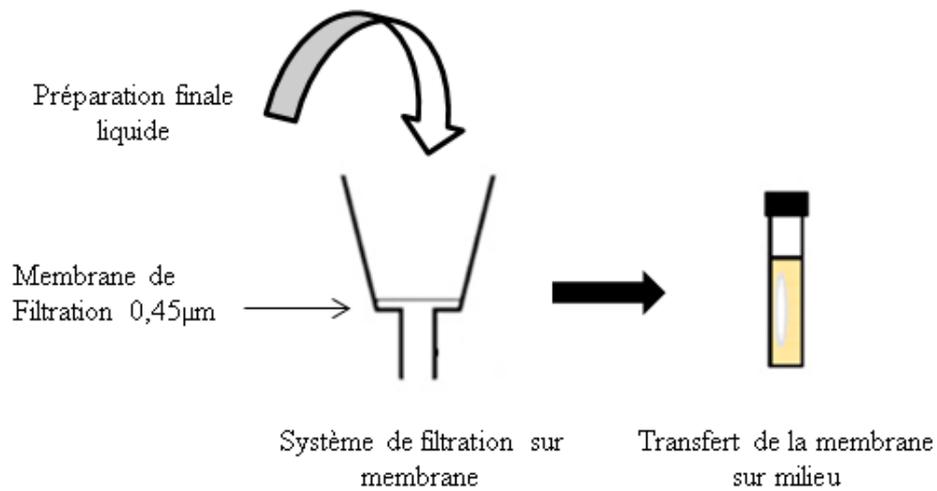


Figure 2 - Schéma de l'essai de stérilité de référence de la Pharmacopée Européenne

Ce test de référence engendre une perte de 14 jours de stabilité des préparations, il n'est donc pas adapté. Afin d'utiliser un temps de détection plus court, des méthodes alternatives sont proposées par la Ph. Eur. (Chapitre 5.1.6). Au CHU de Bordeaux, la méthode couramment utilisée est la méthode par le système BacT/ALERT® décrite ci-dessous.

b) Le système BacT/ALERT®

La méthode BacT/ALERT® (BA) du laboratoire Biomérieux (France) fait partie des méthodes de microbiologie rapides alternatives proposées par la Ph. Eur. Elle est fondée sur la croissance des micro-organismes et est communément utilisée pour leur détection dans les hémocultures. En effet, les micro-organismes présents dans le milieu produisent du CO₂ pendant leur croissance, ce qui induit une diminution du pH du milieu de culture. Un sensor est disposé au fond de chaque flacon de BA sur lequel un faisceau lumineux est envoyé par une LED. Le changement de pH induit par la production de CO₂, provoque un virage colorimétrique de ce sensor (**Figure 3**). Une photodiode collecte l'intensité réfléchie par le

sensor. Les flacons de BA sont disposés dans le système de détection BA, ils sont lus toutes les 10 minutes à l'aide de trois algorithmes. La limite de détection de cette méthode est comprise entre 1 et 10 Unités Formant Colonies (UFC) (9) et les résultats négatifs définitifs sont donnés après 5 jours d'incubation.

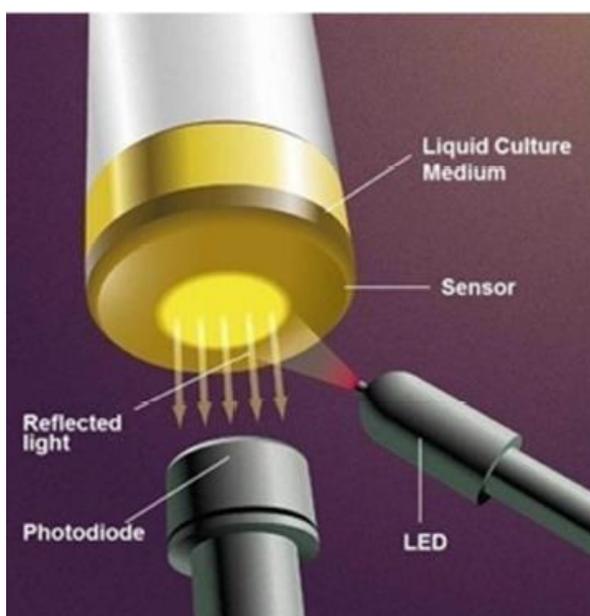


Figure 3 - Schématisation du principe de détection par le système BacT/ALERT®

Cette méthode de contrôle microbiologique rapide alternative a déjà été validée et transposée dans notre unité pour le contrôle microbiologique des nutriments parentéraux et des poches d'Aciclovir produites en lot (2), c'est pourquoi nous explorons cette méthode pour contrôler les préparations de cytotoxiques. Malgré la disponibilité de cette méthode dans notre centre, elle n'est pas applicable en l'état pour les contrôles de stabilité microbiologique de tous les cytotoxiques. Effectivement, certains cytotoxiques sont reconnus pour être des inhibiteurs de la croissance microbiologique (voir partie II), ce qui pourrait empêcher la lecture d'un résultat positif malgré une contamination de l'échantillon.

Les flacons d'hémocultures du système BacT/ALERT®, appelés flacons FAN® plus, sont composés de billes polymériques absorbantes permettant une neutralisation des antibiotiques présents dans le sang des patients. La composition de ces billes n'est pas communiquée par le fabricant. On peut voir dans les travaux de *Mitteregger et al* (10) que l'action des antimicrobiens administrés aux patients avant le prélèvement sanguin est neutralisée par les résines présentes dans les flacons de BA, ceci est démontré par l'évaluation du temps de détection de la croissance microbiologique. Les concentrations d'antimicrobiens présents dans le sang des patients sont bien inférieures aux concentrations utilisées dans nos préparations de cytotoxiques. De plus, les concentrations restantes d'agents antimicrobiens, après action de la résine, ne sont pas évaluées. Il est donc difficile de prédire l'efficacité de ces résines dans notre situation. Il conviendra d'étudier la détection par le système BacT/ALERT® de la croissance microbiologique d'échantillons de cytotoxiques contaminés volontairement.

3) Les anticancéreux choisis dans notre étude

a) Définitions et mécanismes d'action

Le **5FU** est un agent anticancéreux antinéoplasique de la classe des antimétabolites (antipyrimidine plus précisément) (11). Il a été synthétisé en partant du postulat que les cellules tumorales utilisaient plus d'uracile que les tissus sains. Des pyrimidines modifiées ont donc été développées afin de bloquer la voie des pyrimidines. Le 5FU, dérivé de l'uracile a été synthétisé en 1957 par Heidelberger et Duschinsky (12). Il est utilisé, entre autres, pour le traitement des adénocarcinomes digestifs évolués et pour des cancers colorectaux. L'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) a également été obtenue dans le cadre des adénocarcinomes mammaires, des adénomes ovariens et des carcinomes

épidermoïdes des voies aérodigestives supérieures et œsophagiennes. Cette molécule est utilisée en France depuis plus de soixante ans et c'est encore une des chimiothérapies les plus prescrites.

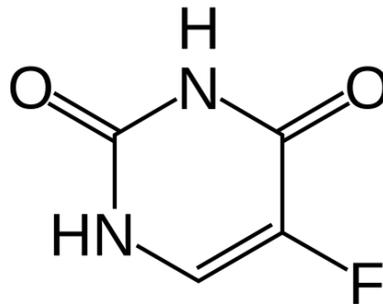


Figure 4 - Formule du 5-fluorouracile

Le 5FU est actif via trois mécanismes d'action :

- ✓ Le FdUMP et le FdUTP (fluorodesoxyuracile monophosphate et triphosphate) sont des métabolites du 5FU qui inhibent la synthèse de l'ADN et sa réparation par inhibition de la thymidilate-synthétase
- ✓ L'accumulation des métabolites du 5FU entraîne des lésions de l'ADN qui ne peuvent être réparées à cause de l'inhibition de la thymidilate-synthétase
- ✓ Les métabolites du 5FU s'incorporent à la place de l'uracile dans l'ARN provoquant la synthèse de protéines anormales

La toxicité du 5FU est dose-dépendante et variable en fonction du schéma d'administration. Elle concerne essentiellement la sphère digestive et hématologique. Les principaux effets indésirables se présentent sous forme de diarrhées, stomatites et myélosuppression modérée. Le nadir est d'environ 10 jours après l'injection. De façon plus rare, on a pu relever une cardiotoxicité en cas de perfusion longue (13) ainsi qu'une neurotoxicité rare (14). Enfin, certains patients peuvent développer des toxicités hématologiques sévères provoquant une atteinte neurologique importante en raison d'un déficit congénital en enzyme DPD (dihydropyrimidine déshydrogénase) (15). Cette toxicité est due aux métabolites actifs du 5FU. La fréquence de cette anomalie est estimée à environ 1 à 3% dans la population générale (16) et doit être systématiquement recherchée avant toute administration de 5FU.

L'**oxaliplatine** est un agent alkylant dérivé des platines. Son action consiste à ajouter un groupement alkyle sur les bases puriques et pyrimidiques de l'ADN (formation d'adduits platine sur les bases guanine-guanine ou guanine-adénine), induisant la mort cellulaire. Cette molécule appartient à la famille des sels de platine, représentante de la famille des DACH-platines : l'atome de platine est lié à un radical oxalate et à un radical diaminocyclohexane (DACH) qui lui confèrent ses propriétés pharmacologiques et thérapeutiques. En association avec le 5FU, elle est indiquée dans le traitement adjuvant du cancer du côlon au stade III et dans le traitement du cancer colorectal métastatique.

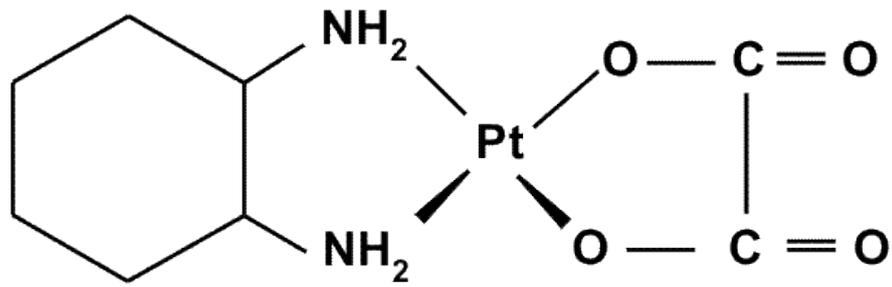


Figure 5 - Formule de l'oxaliplatine

Les effets indésirables notables de l'oxaliplatine sont principalement des neuropathies périphériques. Cet effet est un effet limitant relativement fréquent qui est caractérisé le plus souvent par des paresthésies. Par ailleurs, on notera que l'oxaliplatine présente moins de néphrotoxicité que le cisplatine et moins d'hématotoxicité que le carboplatine.

L'**irinotécan** est un dérivé de la camptothécine. C'est un agent antinéoplasique inhibiteur de la topo-isomérase qui provoque des fractures de l'ADN bloquant sa réplication. Il s'agit d'une prodrogue, métabolisée par la carboxylesterase avec une affinité pour les cellules tumorales. Le métabolite actif est le SN-38 qui est un inhibiteur de la topo-isomérase 1. Cette thérapeutique est utilisée dans le traitement du cancer colorectal avancé, seul (après échec du 5FU) ou en association et dans le traitement des cancers du côlon et du rectum métastatiques.

b) Justification du choix des anticancéreux

Dans le cadre de nos recherches, nous avons choisi de nous concentrer sur les molécules de 5FU, d'oxaliplatine et d'irinotécan présentées précédemment pour plusieurs raisons :

- ✓ Ces molécules sont parmi les plus utilisées : les traitements de chimiothérapies de nombreuses tumeurs et notamment de la plupart des cancers digestifs leur accordent une place importante. Le 5FU, bien qu'étant une drogue ancienne, est toujours très utilisé.

- ✓ Ces molécules sont privilégiées pour la production en lot : le 5FU étant très utilisé, il a fait partie des premières molécules standardisées dans de nombreux établissements (17). La standardisation des doses pour cette molécule s'est faite depuis plusieurs années dans plusieurs centres du pays. Par ailleurs les stabilités physicochimiques de ces molécules, associées à une étude de leur stabilité microbiologique, peut permettre un stockage prolongé. On peut relever dans la littérature des stabilités de 28 jours pour des concentrations de 5FU à 8, 10 et 50mg/ml (18–20), de 30 jours pour des concentrations d'oxaliplatine à 0.7mg/ml (21) et de 28 jours pour des concentrations d'irinotécan allant de 0.4 à 2.8mg/ml (22). Ces concentrations correspondent aux concentrations que nous utilisons en routine : de 5 à 50mg/ml pour le 5FU, de 0.4 à 0.7mg/ml pour l'oxaliplatine et de 0.9 à 1.5mg/ml pour l'irinotécan. Ces molécules, actuellement produites en séries font donc partie des premières molécules que l'on souhaite produire en lot dans notre établissement.

- ✓ Concernant le 5FU, il possède un effet inhibiteur de la croissance microbologique parmi les plus importants, comme nous le verrons dans la seconde partie. Il peut être considéré comme le « worst-case » (pire scénario possible dans une situation). Neutraliser cet effet pour le 5FU, pourrait éventuellement permettre de mettre en place un contrôle microbologique pour les autres agents inhibiteurs de la croissance microbologique.

PARTIE II

ETUDE DE L'EFFET INHIBITEUR DE LA CROISSANCE MICROBIOLOGIQUE ET NEUTRALISATION

PARTIE II – ETUDE DE L’EFFET INHIBITEUR DE LA CROISSANCE MICROBIOLOGIQUE ET NEUTRALISATION

1) Les effets inhibiteurs de la croissance microbologique des cytotoxiques

On entend régulièrement que les molécules cytotoxiques sont des inhibiteurs de la croissance microbologique et que, de ce fait, le suivi de la stabilité microbologique des préparations contenant ces produits n’est pas impératif. Cependant, en s’attardant attentivement sur la littérature, on peut constater que tous les cytotoxiques ne sont pas inhibiteurs de la croissance microbologique et qu’ils ne le sont pas forcément pour toutes les espèces microbologiques et à toutes les concentrations. Un consensus européen d’experts concernant les études de stabilité physico-chimique des préparations hospitalières a recommandé de procéder à des tests de stérilité en cas de préparation de longue durée de conservation (23). De plus, la récente directive internationale consacrée à la question de la stabilité microbologique sur l’attribution de la durée de conservation microbologique pour les préparations aseptiques recommande de mettre en œuvre un processus de validation pour le stockage à long terme et les tests de stérilité pour la libération de lots de routine (24). Dans le cadre d’une production en lot, le stockage prolongé est souhaité, la stabilité microbologique des préparations doit donc être étudiée.

Dans la littérature on peut voir plusieurs études traitant d’une utilisation possible de molécules anticancéreuses comme agent antibactérien pour prévenir d’un avenir où les résistances aux antibiotiques seront trop importantes, une « ère post-antibiotiques ». Les travaux de *Soo et al* (25) sont une revue de la littérature rapportant les effets antimicrobiens

de certains anticancéreux comme le 5FU et la mitomycine C. Les travaux de *Hamilton et al* (26) ont évalué l'action de 21 anticancéreux sur 28 souches de micro-organismes (bactéries Gram positif aérobies, bactéries Gram négatif aérobies, bactéries anaérobies et levures). Sur ces 21 anticancéreux testés, seuls 3 agents : le 5FU, la mitomycine C et le méthotrexate, montrent une activité importante sur certaines bactéries testées. Tous les autres anticancéreux présentés dans cette étude présentaient une activité antimicrobienne faible avec une Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) supérieure à 10mg/ml. Dans le cadre de notre étude, nous avons souhaité nous intéresser plus particulièrement aux molécules, actuellement produites en série, que nous souhaitons produire en lot prioritairement : le 5FU, l'irinotécan et l'oxaliplatine. Certains agents anticancéreux ont une action bactéricide sur les microorganismes, Dans ce cas, il convient de parler de Concentration Minimale Bactéricide (CMB). Dans un souci d'homogénéité de la rédaction, nous parlerons de manière générale de CMI dans la suite de ce travail.

Dans le **Tableau 1** ci-dessous, nous avons regroupé certaines informations concernant l'activité antimicrobienne de ces 3 agents anticancéreux disponibles dans la littérature. Les données concernant ces produits étant limitées et ne concernant pas tous les micro-organismes recommandés par la Ph. Eur., nous nous appliquerons, dans nos travaux, à étudier les CMI de ces agents cytotoxiques concernant le *Staphylococcus aureus*. Nous avons choisi le *Staphylococcus aureus* car il s'agit d'une des bactéries recommandées par la Ph. Eur. Cette bactérie est également régulièrement présente dans les contaminations des zones de productions s'agissant d'une bactérie commensale de la flore cutanée.

Molécule anticancéreuse	Propriétés pharmacodynamiques	Action inhibitrice de la croissance bactérienne		Références bibliographiques
		Agent bactérien	Concentration inhibitrice	
5-fluorouracile	Antimétabolite Analogue de la pyrimidine	E. coli S aureus P. aeruginosa C albicans	8.65 µg/ml 0.5-1µg/ml 10.8 µg/ml 50 mg/ml	(27) (25) (27) (28)
Oxaliplatine	Autres agents antinéoplasiques Dérivés du platine	P. aeruginosa S. aureus E. faecium C.albicans	> 0.4mg/ml	(28)
Irinotécan	Autres agents antinéoplasiques Inhibiteur de l'ADN topoisomérase I	S. aureus B. subtilis C. albicans A. niger S. epidermidis E. coli P. aeruginosa	> 1.15mg/ml < 1.15mg/mL	(29)

Tableau 1 - Données de la littérature concernant l'activité antimicrobienne de cytotoxiques

2) Evaluation de l'effet inhibiteur de la croissance microbologique du 5-fluorouracile, de l'oxaliplatine et de l'irinotécan

Dans cette partie nous allons nous attarder sur l'étude des effets inhibiteurs de la croissance microbologique des 3 molécules sélectionnées : le 5FU, l'oxaliplatine et l'irinotécan. Pour cela nous avons réalisé une évaluation de la CMI de ces agents cytotoxiques sur le *Staphylococcus aureus*. Comme précisé précédemment, nous avons choisi le *Staphylococcus aureus*. Une fois cette évaluation de la CMI réalisée, nous évaluerons la détection de la contamination bactérienne de ces préparations par le système BacT/ALERT®.

a) Méthodologie

Afin de pouvoir déterminer une concentration cible résiduelle de cytotoxiques à obtenir, nous avons déterminé les CMI du 5FU, de l'oxaliplatine et de l'irinotécan pour le *Staphylococcus aureus* à l'aide de la méthode de microdilution liquide. Des gammes de concentrations ont été réalisées dans une microplaque de 96 puits avec un tube de contrôle. La lecture a été faite après 18 heures d'incubation à 37°C. La CMI est la première dilution où la croissance bactérienne n'est pas visuellement observée par un trouble. Cette technique est schématisée dans la **Figure 7** ci-dessous.

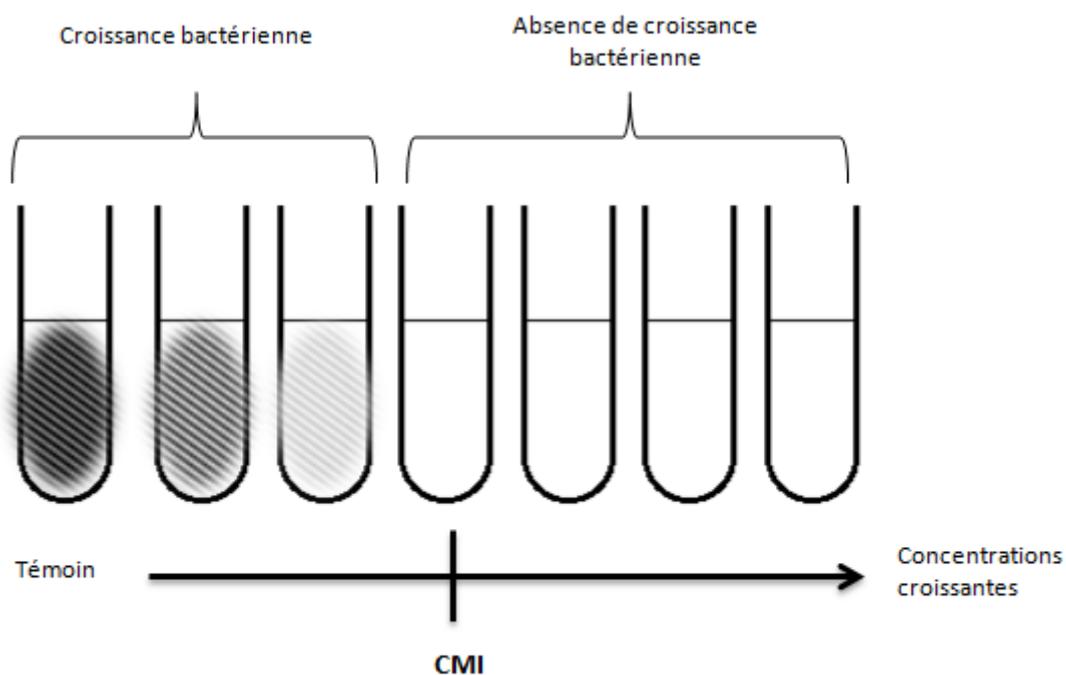


Figure 7 - Schématisation de la méthode de microdilution liquide

A la suite de ces résultats, nous avons souhaité évaluer la détection de la croissance microbiologique dans des échantillons de 5FU, oxaliplatine et irinotécan par le système BA.

Pour cela, nous avons introduit, dans les flacons de BA, des inocula bactériens de *Staphylococcus aureus* à moins de 100 UFC (conformément aux recommandations de la Ph. Eur. (4)) dans des échantillons de concentrations croissantes en 5FU (de 50 à 5mg/ml), en oxaliplatine (de 0.4 à 0.7mg/ml) et en irinotécan (de 0.9 à 1.5mg/ml) qui correspondent aux concentrations usuelles. Ces flacons ont ensuite été analysés par le système BA. Ce test nous permettra de confirmer la détection d'une croissance microbiologique par le système pour les molécules dont les CMI sont supérieures aux concentrations usuelles. Pour les autres molécules, ce test permettra d'évaluer l'action des résines présentes dans les flacons de BA.

b) Résultats et discussion

Concernant la CMI du 5FU pour le *Staphylococcus aureus*, le trouble provoqué par la croissance microbiologique n'est plus observé à la concentration de 1×10^{-4} mg/ml. La CMI est donc de **1×10^{-4} mg/ml**. Cette CMI correspond aux informations retrouvées dans la littérature (0.5-8 μ g/ml (26)) La CMI du 5FU est extrêmement faible, le pouvoir inhibiteur du 5FU est très important et la concentration cible recherchée du 5FU dans nos travaux sera donc la concentration la plus proche possible de zéro et le rendement de complexation recherché sera le plus proche de 100%.

Concernant les CMI de l'oxaliplatine et de l'irinotécan, les gammes ont été testées jusqu'à respectivement 2.5mg/ml et 10mg/ml sans qu'aucune croissance microbiologique ne soit observée. La CMI de l'oxaliplatine est donc **supérieure à 2.5mg/ml** et celle de l'irinotécan **supérieure à 10mg/ml**, ce qui correspond aux données retrouvées dans la littérature (cf. **Tableau 1**). Ces CMI sont bien supérieures aux concentrations de routine utilisées, le pouvoir inhibiteur de ces molécules est donc faible, ce qui est de bon augure pour l'utilisation de méthode de microbiologie rapide comme le système BA.

Concernant l'évaluation de la détection par le système BA, on peut voir dans le **Tableau 2** ci-dessous qu'aucune dilution réalisée de 5FU n'a permis une détection d'une croissance microbienne tandis que le témoin positif a bien permis cette détection. On peut également noter qu'une dilution au 5^{ème} est réalisée dans les flacons de BA et qu'à cette action s'ajoute l'action des billes de résines présentes dans les flacons. La méthode de dilution proposée par la Ph. Eur. pour neutraliser l'action des inhibiteurs n'est donc pas suffisamment efficace pour le 5FU. Aucune de ces actions n'est suffisante pour permettre de détecter une croissance microbienne dans nos échantillons de 5FU. Ces résultats sont expliqués par la CMI faible déterminée précédemment. Cependant, pour l'oxaliplatine et l'irinotécan, on peut relever que le système BA a pu détecter la croissance du *Staphylococcus aureus* aux concentrations usuelles. Cette méthode alternative est donc envisageable pour ces deux agents cytotoxiques. Pour qu'elle soit validée, il faut envisager la réalisation du test sur les autres microorganismes recommandés par la Ph. Eur.

Agent cytotoxique	Concentration avant incorporation dans les flacons de BacT/ALERT® (mg/ml)	Contamination bactérienne (CFU)	Détection bactérienne par le système BacT/ALERT®
Aucun (NaCl)	0	< 100	(+)
5FU	50	0	(-)
	50	< 100	(-)
	25	< 100	(-)
	15	< 100	(-)
	10	< 100	(-)
	5	< 100	(-)

Oxaliplatine	0.7	0	(-)
	0.7	< 100	(+)
	0.6	< 100	(+)
	0.5	< 100	(+)
	0.4	< 100	(+)
Irinotécan	1.5	0	(-)
	1.5	< 100	(+)
	1.3	< 100	(+)
	1.1	< 100	(+)
	0.9	< 100	(+)

(-) : pas de croissance microbiologique ; (+) : présence d'une croissance microbiologique

Tableau 2 - Détection bactérienne par le système BA d'échantillons de 5FU contaminés par *S. aureus*

3) Méthodes de neutralisation de l'activité des inhibiteurs de la croissance microbiologique

Afin de trouver une solution pour la mise en place d'un contrôle microbiologique rapide concernant les cytotoxiques inhibiteurs de la croissance microbiologique, nous avons axé notre réflexion sur plusieurs méthodes de neutralisation de cette activité antimicrobienne.

a) La méthode de référence de la Pharmacopée Européenne

La première façon d'éliminer l'action antimicrobienne est d'utiliser la méthode de référence de la Ph. Eur. pour réaliser le contrôle microbiologique : la méthode par filtration décrite précédemment. Cependant, comme évoqué, le délai d'incubation de 14 jours imposé

par cette méthode n'est pas compatible avec une activité de production de chimiothérapies à flux tendu.

b) La méthode de dilution de la Pharmacopée Européenne

La Ph. Eur. recommande également une méthode par dilution (4) afin d'éliminer cet effet antimicrobien. Nous testerons cette méthode, cependant, au regard de certaines CMI (ex : CMI du 5FU < 1µg/ml pour le *Staphylococcus aureus*), cela ne semble pas suffisamment efficace pour tous les cas de figure. Cette théorie a été confirmée pour le 5FU dans la partie précédente (II.2), la méthode de dilution n'a pas suffi pour inhiber l'action du 5FU.

c) L'inhibition

L'inhibition de la molécule, inhibant ainsi son action antimicrobienne, a également été envisagée. Cependant, des travaux ont déjà été réalisés antérieurement avec l'uracile, inhibiteur du 5FU (30) et les résultats n'ont pas été concluants. En effet, l'uracile doit être dilué dans l'hydroxyde de sodium (NaOH), ce qui rend la solution très basique et non propice à la croissance bactérienne. De plus, il s'agit d'une méthode spécifique à une molécule et il conviendrait de réaliser la mise en place de la méthode pour chacune des molécules dont la production en lot est souhaitée.

d) La dégradation de la molécule

Il a également été envisagé de dégrader chimiquement la molécule qui ne pourrait plus ainsi exercer son activité inhibitrice de la croissance microbologique. Là encore des

essais ont été réalisés avec le 5FU (résultats non publiés). La dégradation du 5FU nécessite une action de la chaleur et de l'hydroxyde de sodium, engendrant, ici encore, un pH trop basique, non optimal pour la croissance microbologique.

e) La complexation de la molécule

La complexation d'une molécule, l'empêchant ainsi d'exercer son activité antimicrobienne est considérée. Le processus d'échange d'ions est un processus connu depuis l'antiquité. En effet, ce processus était utilisé pour éliminer le sel de l'eau de mer afin d'obtenir de l'eau potable. Le point crucial de l'histoire de l'échange d'ion repose sur deux scientifiques anglais Thomas Way et Harry Thompson en 1850 qui ont étudié le mécanisme de la fertilisation des sols par le sulfate d'ammonium. Ils ont constaté qu'en faisant passer une solution de ce sel dans une colonne de verre remplie de terre, l'ammonium était absorbé. La solution résultante contenait du sulfate de calcium, il y avait donc eu un échange entre les cations calcium de la terre et les cations ammonium de la solution.

On peut également lire dans la littérature que ces agents de complexation sont utilisés, notamment avec des cytotoxiques, comme système de délivrance de médicaments (Drug Delivery System DDS) (31,32). Le concept des billes de polymères retrouvées dans les flacons FAN® plus du système BA pour capter les antimicrobiens présents dans le sang des patients est basé sur l'utilisation de résines échangeuses d'ions pour capter les antimicrobiens. Autrefois ce matériel était du charbon actif, il est aujourd'hui remplacé car il était problématique pour la reconnaissance au microscope de certains micro-organismes. Au regard de ces informations, nous avons donc choisi de travailler dans la partie III à l'étude de deux agents de complexation : les résines échangeuses d'ions et le charbon actif.

PARTIE III

ETUDE DE L'ACTION DES DIFFERENTS AGENTS DE COMPLEXATION SUR LE 5FU

PARTIE III – ETUDE DE L’ACTION DES DIFFERENTS AGENTS DE COMPLEXATION SUR LE 5FU

Dans cette partie, nous allons étudier l’action de différents agents de complexation : les résines échangeuses d’ions (REI) et le charbon actif (CA). Nous réaliserons des travaux d’étude d’efficacité concernant ces agents. Puis, nous analyserons l’évaluation de la reprise de la croissance microbologique après complexation et réaliserons un test pour une éventuelle mise en place en routine.

1) Méthodologie pour l’étude de l’efficacité de la complexation

a) Résumé de la méthodologie générale

Les deux parties suivantes concernent l’évaluation de l’efficacité de la complexation, sur le 5FU, de deux agents de complexation : les REI et le CA. Pour chacun de ces agents nous avons réalisé une étude de l’efficacité de leur complexation selon plusieurs variables : le temps de contact, la concentration en agent de complexation utilisée et la concentration en 5FU utilisée. Le traitement par agent de complexation du 5FU a été réalisé par une mise en contact suivie d’une agitation par vortex et d’une filtration sous vide (via un filtre 0,45µm). Le filtrat a ensuite été dosé trois fois par une méthode HPLC validée (33). La méthode HPLC de dosage du 5FU est composée d’une colonne Kinetex XB-C₁₈ de la société Phenomenex avec une phase mobile composée de 80% de méthanol et 20% d’acide méthanoïque (0.1v/v) et à une longueur d’onde de 266nm. Les caractéristiques de la méthode HPLC validée sont reprises dans le **Tableau 3**. Pour prendre en compte la perte due à la filtration sous vide et les imprécisions de dilution de la solution pure, nous avons

déterminé les pourcentages initiaux en réalisant une filtration sous vide de la solution seule. Les pourcentages de 5FU restants ont été calculés en fonction du pourcentage initial. Lorsque le 5FU n'était plus détectable par la méthode HPLC, les échantillons ont été contaminés (à moins de 100 UFC selon les recommandations de la Ph. Eur.) avant traitement par agent de complexation et mis en incubation dans le système BA. La méthodologie générale est résumée dans la **Figure 8**.

Tableau 3 - Caractéristiques de la méthode HPLC utilisée

Agent cytotoxique	HPLC	Logiciel	Colonne	Phase mobile	Longueur d'onde (nm)	Volume d'injection (µL)	Rétention time (min)
5FU	Dionex Ultimate U3000 (Sunnyvale, USA)	Chromeleon Dionex (Sunnyvale, USA)	Kinetex XB-C18, Phenomenex (Tornano, USA)	80% MeOH/ 20%HCOOH	266	1	2
Irinotécan				H ₂ O/ACN (50/50)	221	3	0.13
Oxaliplatine				H ₂ O/ACN (50/50)	256	20	0.13

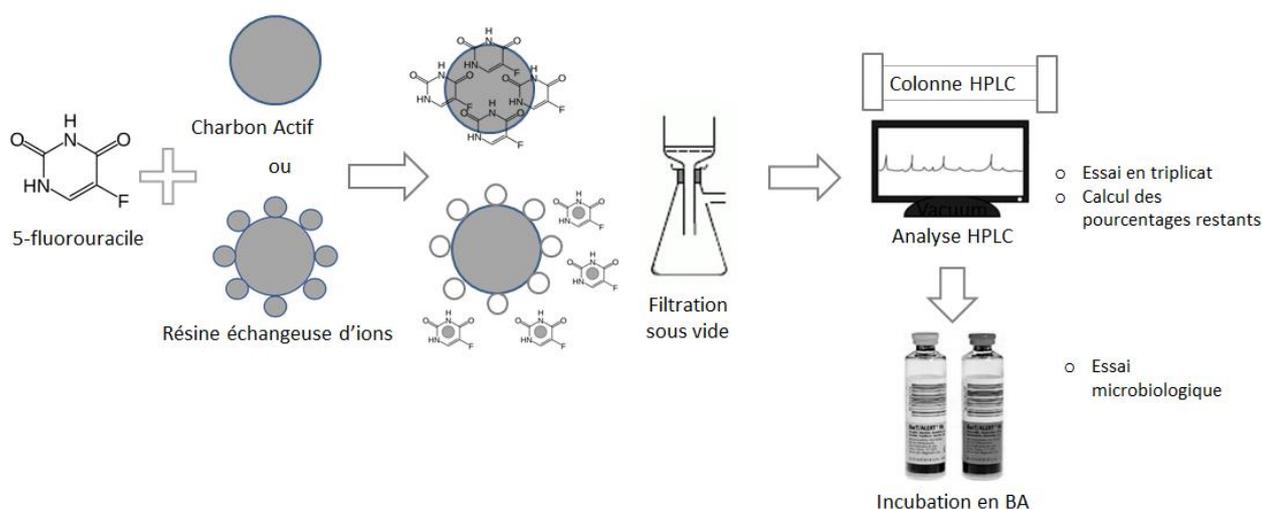


Figure 8 - Méthodologie de l'étude de l'efficacité des agents de complexation

b) Étude de la répétabilité de la méthode de filtration sous vide

Afin de ne réaliser qu'une seule répétition de la filtration sous vide pour chaque condition dans la suite de nos essais, des filtrations sous vide de 5FU à 50mg/ml avec 90 et 150mg/ml de CA ont été réalisées à deux reprises et à deux jours différents avec deux échantillons différents. Les pourcentages résiduels de 5FU ont été déterminés et la variance de répétabilité (sr^2) a été calculée.

Conditions	50mg/ml de 5FU et 900mg/ml de CA		50mg/ml de 5FU et 1500mg/ml de CA	
Echantillons	Echantillon 1	Echantillon 2	Echantillon 3	Echantillon 4
Data	65.381	62.963	38,863	40,498
(mg/ml)	65.835	64.121	39,424	40,657
	65.870	61.817	39,182	42,125
k (nombre d'échantillons)	2		2	
n (nombre de valeurs)	3	3	3	3
m (moyenne)	65,700	62,970	39,156	41,093
s^2 (variance)	0,273	1,152	0,0792	0,805
$T1 = \sum(n*m)$	386,01		240,749	
$T2 = \sum(n*m^2)$	24845,133		9665,641	
$T3 = \sum n$	6		6	
$T4 = \sum n^2$	18		18	
$T5 : \sum((n-1)s^2)$	2,803		1,767	
$sr^2 = T5/(T3-k)$	0,701		0,442	
$r = 2.83*sr^2$	1,983		1,251	

Tableau 4 - Répétabilité de la méthode de traitement par filtration sous vide

On peut voir dans le tableau ci-dessus que pour la première condition (50mg/ml de 5FU et 90mg/ml de CA), $r = 1,983$, ce qui signifie que la différence maximale, au risque de 5%, qui sépare 2 résultats est de 1,983%. Pour la deuxième condition (50mg/ml de 5FU et

150mg/ml de CA), la différence maximale, à risque de 5%, qui sépare 2 résultats, est de 1,251%. Aucune différence significative n'a été constatée sur la concentration résiduelle de 5FU trouvée après le traitement par CA. Pour la suite de nos tests, les dosages seront réalisés en triplicats mais il n'y aura qu'un échantillon par condition.

c) Statistiques

Les pourcentages de 5FU obtenus ont été comparés statistiquement. Pour comparer plusieurs moyennes de dosage en triplicats, un test ANOVA a été utilisé. Avant cela la normalité a été évaluée par le test de Shapiro-Wilks et l'égalité des variances a été vérifiée par le test de Levenne (34). Le seuil choisi était de 0,05.

2) Les résines échangeuses d'ions

a) Définition et mécanisme d'action

Les résines échangeuses d'ions (REI) sont constituées d'un réseau macromoléculaire qui leur confère une résistance mécanique mais également de groupements actifs ionisables (nommés groupements fonctionnels) qui leur permettent d'être des échangeurs ioniques.

Elles peuvent être de deux types différents :

- ✓ Cationique : résine échangeuse de cations (faiblement ou fortement acide). Ce type de REI fixe les cations grâce à des groupements fonctionnels anioniques.

- ✓ Anionique : résine échangeuse d'anions (faiblement ou fortement basique). Ces REI fixent les anions grâce à des groupements fonctionnels cationiques.

Les REI sont synthétisées par polymérisation. La création de gouttelettes d'oligomères augmente le volume et engendre la formation de billes. On peut également noter que ces polymères ont différentes caractéristiques :

- ✓ La forme ionique qui correspond à la nature des ions fixés (exemple : le sodium)
- ✓ La nature chimique du squelette et le taux de réticulation
- ✓ La granularité
- ✓ La porosité du squelette : plus le squelette est réticulé, plus la porosité est importante. Les résines naturelles sont sous forme de gel tandis que les résines auxquelles sont ajoutés des agents porogènes, sont des résines macrosporeuses
- ✓ La capacité d'échange ionique qui correspond au nombre de groupements fonctionnels pour une quantité de résine définie

Ces résines sont fréquemment utilisées de nos jours pour le traitement de l'eau : l'adoucissement, la déminéralisation, la décarbonisation mais également l'élimination de matières organiques et de nitrates. Les plus grands producteurs actuels de résines sont Dowet, Rohm et Haas, Lanxess, Lewatit et Purolite.

Les REI sont attirées par des solutions ioniques contre chargées. Les ions de cette solution pénètrent dans la résine à la recherche de l'équilibre de Donnan, les groupes actifs

se dissocient alors et s'échangent (35). Lorsqu'il existe un potentiel électrochimique inégal, la résine a tendance à retenir les ions de signe opposé créant ainsi l'équilibre de Donnan caractérisé par une différence de potentiel de membrane non nulle.

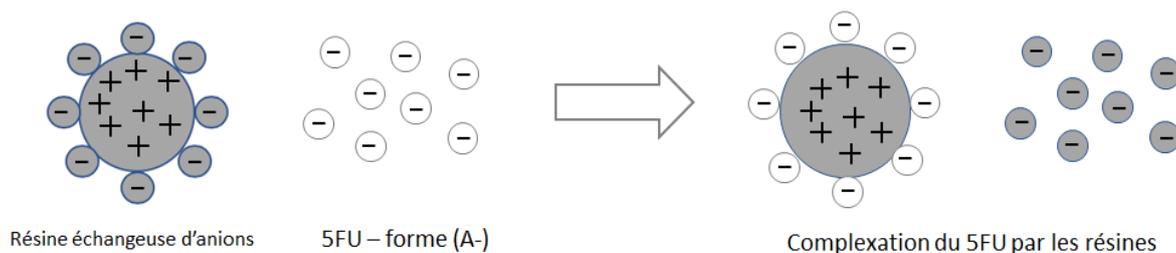


Figure 9 - Schématisation du mécanisme d'action des REI

b) Caractéristiques des résines choisies

Nous avons choisi de travailler avec 5 types de résines échangeuses d'ions dénommées de R1 à R5. Nous avons tout d'abord étudié la REI présente dans les flacons BA que nous appellerons R1. Cette résine est de composition inconnue et le laboratoire n'a pas souhaité nous donner plus d'informations. Nous avons également étudié quatre autres résines. Deux de ces REI ont été offertes par Purolite : une REI échangeuse de cations faible (C104E+ appelée R2) et une échangeuse de cations forte (C150S appelée R3). Les deux autres résines ont été achetées auprès de Sigma-Aldrich : une échangeuse d'anions faible (Amberlyst A-21 appelée R4) et une échangeuse d'anions forte (Dowex AX8-200 appelée R5). Les caractéristiques de ces REI sont résumées dans le **Tableau 5** ci-dessous.

Numérotation	Référence	Echange	Composition du squelette	Groupement fonctionnel	Structure
R1	Système BacT/ALERT	Inconnu	Inconnu	Inconnu	Inconnu
R2	Purolite C104E+	Cation faible	Acide polyacrylique	Acide carboxylique	Gel
R3	Purolite C150S	Cation fort	Polysulfonate de styrène	Acide sulfonique	Macroporeuse
R4	Amberlyst A-21	Anion faible	Polysulfonate de styrène	Alkyl amine	Macroporeuse
R5	Dowex 1X8-200	Anion fort	Polysulfonate de styrène	Triméthyl ammonium	Gel

Tableau 5 - Caractéristiques des REI étudiées

c) Évaluation de la complexation du 5FU

a. **Méthodologie**

Pour R1 :

Concernant la résine R1, nous l'avons étudiée de deux façons :

- ✓ **R1 à l'intérieur des flacons de BA** : des échantillons de 5FU (de 5 à 50mg/ml) ont été introduits dans les flacons de BA, ce qui correspond à des concentrations de 10 à 1mg/ml (dilution au 5^{ème} dans les flacons de BA). Les flacons ont ensuite été prélevés après 5min et 24h de temps de contact et trois dosages du 5FU par HPLC ont été réalisés pour chaque condition.

- ✓ **R1 extraite des flacons de BA** : des échantillons de 5FU (de 5 à 50mg/ml) ont été mis en contact avec des concentrations croissantes de R1 extraites des flacons (200, 300, 400 et 500mg/ml) puis filtrés sous vide et dosé 3 fois par HPLC.

Pour R2 à R5 :

Pour étudier la complexation du 5FU par les REI, des échantillons de 5FU (de 5 à 50mg/ml) ont été mis en contact avec des concentrations croissantes en REI (200, 300, 400 et 500mg/ml) à des temps de contact de 5min et 24h (pour évaluer l'action du temps de contact). Ils ont ensuite été filtrés sous vide et dosé trois fois par HPLC.

b. Résultats et discussion

- ✓ R1 à l'intérieur des flacons de BA :

Concentration initiale théorique en 5FU (mg/ml)	Concentration théorique en 5FU après dilution par le flacon de BA (mg/ml)	Moyenne des pourcentages restants de 5FU par rapport à la concentration après dilution par le flacon de BA	
		t = 5min	t = 24h
50	10	106.8 ± 1.42	96.4 ± 0.65
25	5	98.2 ± 0.25	93.3 ± 0.10
10	2	104.0 ± 5.96	107.6 ± 0.25
5	1	113.5 ± 4.38	104.9 ± 0.60

Nombre de mesures = 3 ; Format : Moyenne ± écart-type

Tableau 6 - Complexation du 5FU par R1 à l'intérieur des flacons de BA

Les résultats que l'on peut voir dans le **Tableau 6** ci-dessus montrent une diminution du pourcentage de 5FU d'environ 20%, quelle que soit la concentration initiale. Ce pourcentage correspond à la dilution au 1/5 réalisée dans le flacon. Cependant la méthode HPLC utilisée n'est pas validée dans ce type de milieu de culture (dont la composition est inconnue et non divulguée par le laboratoire). Nous devons donc prendre en compte ces résultats avec prudence.

Concentration en 5FU (mg/ml)	Concentration en REI (mg/ml)	Temps de contact	Moyenne des pourcentages restant de 5FU				
			R1	R2	R3	R4	R5
50	200	5min	87.5 ± 0.15	57.1* ± 0.31	91.1 ± 0.20	83.6 ± 0.05	60.6 ± 0.14
		24h	nr	21.1* ± 0.05	91.9 ± 0.22	79.4 ± 0.15	50.1 ± 0.03
	300	5min	84.2 ± 0.04	36.1* ± 0.28	82.9 ± 0.28	74.7 ± 0.06	nr
	400	5min	79.4 ± 0.10	41.8* ± 0.05	82.9 ± 0.07	68.4 ± 0.05	nr
	500	5min	78.7 ± 0.03	31.3* ± 0.05	86.6 ± 2.43	62.5 ± 0.06	34.4 ± 0.04
25	200	5min	89.3 ± 0.33	71.1 ± 0.07	nr	72.2 ± 0.24	49.0 ± 0.04
	300	5min	82.7 ± 0.03	72.6 ± 0.65	nr	nr	nr
	400	5min	77.8 ± 0.10	66.9 ± 0.39	nr	nr	nr
10	200	5min	84.3 ± 0.54	84.6 ± 0.29	nr	68.0 ± 0.21	40.1 ± 0.07
	300	5min	78.0 ± 0.02	81.3 ± 0.29	nr	nr	nr
	400	5min	73.2 ± 0.04	77.7 ± 0.30	nr	nr	nr
5	200	5min	84.6 ± 0.292	84.6 ± 0.29	95.6 ± 0.06	66.9 ± 0.39	40.2 ± 0.06
		24h	nr	73.8 ± 0.22	95.6 ± 0.51	63.0 ± 0.39	39.2 ± 0.10
	300	5min	76.0 ± 0.08	77.5 ± 0.08	90.7 ± 0.25	52.4 ± 0.06	nr
	400	5min	72.9 ± 0.09	72.9 ± 0.09	87.0 ± 0.09	43.0 ± 0.05	nr
	500	5min	73.81 ± 0.12	73.8 ± 0.12	89.4 ± 1.15	36.3 ± 0.06	47.2 ± 0.06

*Nombre de mesures = 3 ; Format : Moyenne ± écart-type ; nr : non réalisé ; * : précipité blanc*

Tableau 7 - Efficacité de la complexation de 5FU par les REI

- ✓ Étude de la complexation des 5 résines (dont R1 extraites des flacons de BA) :

Nous avons souhaité évaluer plusieurs paramètres qui peuvent influencer l'efficacité de la complexation : la concentration initiale de 5FU, le temps de contact et la nature et la concentration de l'agent de complexation. On peut observer dans le **Tableau 7** ci-dessus que la variation des moyennes des pourcentages restants de 5FU après traitement est dépendante de la concentration en résines et du temps de contact. Par ailleurs, celle-ci n'est pas dépendante de la concentration initiale en 5FU ($p < 0.05$). Cette notion fait exception pour les points à 50mg/ml de 5FU pour R2. A ces conditions, nous avons pu observer un précipité blanc. Cette réaction peut être expliquée par une réaction d'estérification entre le 5FU et le groupement carboxylique de R2.

Ces résultats montrent que l'efficacité de la complexation du 5FU par les REI (R1 à R5) n'est pas suffisante, en un seul traitement, pour restaurer la croissance microbologique dans les échantillons contaminés.

3) Le charbon actif

a) Définition et mécanisme d'action

Le charbon devient actif par un processus d'élimination du goudron. Il a des groupements de structures complexes présents à sa surface et il possède une structure très poreuse. Ces caractéristiques lui confèrent une surface de contact étendue et des propriétés adsorbantes importantes. Ces propriétés sont la raison pour laquelle le CA est fréquemment utilisé dans le traitement de l'eau. On peut également noter qu'il est adapté pour adsorber des composés organiques, en particulier des molécules contenant des fonctions aromatiques (36). Selon sa granulométrie, il peut retenir des particules d'un diamètre allant de 1 à 10 μ m, ce qui correspond, dans le traitement de l'eau, au chlore, aux pesticides et aux composés organiques qui donnent à l'eau le goût et l'odeur. Les molécules adsorbées se lient ensuite à sa surface par des liaisons faibles. On peut également noter que le CA est un milieu favorable à la croissance bactérienne et ne favorise pas l'adsorption des bactéries.

b) Évaluation de la complexation du 5FU

a. **Méthodologie**

Nous avons d'abord recherché la concentration optimale de CA à utiliser. Pour cela nous avons mis en contact des concentrations croissantes en 5FU (de 5 à 50mg/ml) avec 30mg/ml de CA. Une concentration de 50mg/ml est retrouvée dans la littérature (31), nous avons donc choisi une concentration de départ à 30mg/ml afin de pouvoir correctement observer l'influence de la concentration en CA sur la complexation. Cet échantillon a ensuite été centrifugé (3800 rpm pendant 10 minutes) et le surnageant a été dosé 3 fois par HPLC. A la suite de ce test préliminaire la concentration minimale de CA utilisée sera de

30mg/ml et le traitement se fera par filtration sous vide afin de pouvoir évaluer le traitement de l'échantillon dans sa totalité.

Pour étudier la complexation du 5FU par le CA, des échantillons de 5FU (de 5 à 50mg/ml) ont été mis en contact avec des concentrations croissantes de CA (30, 60, 90, 150, 200 et 300mg/ml) à différents temps de contact (5min, 30min, 1h et 24h) puis filtrés par filtration sous vide. Le filtrat a été dosé 3 fois par HPLC. Le maximum de concentration de CA (300mg/ml) a été choisi car il est impossible de manipuler avec plus de 3g de CA dans notre échantillon de 10ml. En effet, une pâte impossible à filtrer se forme. Cette méthode de traitement par filtration sous vide a été choisie dans le but de traiter l'échantillon dans sa totalité et de récupérer un maximum de filtrat.

b. Résultats et discussion

Les tests préliminaires par centrifugation ont permis d'obtenir des pourcentages restants de 5FU de 87,37%, 58,29% et 48,18% pour les concentrations de 5FU de 50, 10 et 5mg/ml. Ces concentrations de 5FU restantes ont montré qu'une concentration de 30mg/ml de CA n'était pas suffisante pour complexer complètement le 5FU. Nous utiliserons donc des concentrations supérieures dans la suite des tests.

Nous avons regroupé les résultats de l'étude de la complexation du 5FU par le CA dans le **Tableau 8** ci-dessous :

Concentration en 5FU (mg/ml)	Concentration en CA (mg/ml)	Pourcentages de 5FU restants par rapport à la concentration initiale			
		t=5min	t=30min	t=1h	t=24h
50	30	98.6 ± 0.15	77.2 ± 0.16	84.3 ± 0.08	77.5 ± 0.18
	60	70.6 ± 0.11	66.3 ± 0.09	67.5 ± 0.18	68.0 ± 0.06
	90	73.7 ± 0.11	53.5 ± 0.06	58.9 ± 0.23	61.9 ± 0.05
	150	46.1 ± 0.34	39.3 ± 0.05	41.0 ± 0.03	39.4 ± 0.05
	200	31.0 ± 0.02	nr	nr	nr
	300	28.3 ± 0.08	8.9 ± 0.01	12.4 ± 0.01	8.0 ± 0.01
25	30	78.6 ± 0.02	89.8 ± 0.10	78.0 ± 0.06	75.3 ± 0.06
	60	58.0 ± 0.09	61.5 ± 0.12	56.6 ± 0.11	55.7 ± 0.11
	90	43.0 ± 0.01	41.9 ± 0.05	42.5 ± 0.05	38.4 ± 0.00
	150	19.0 ± 0.05	16.0 ± 0.011	18.2 ± 0.03	14.5 ± 0.05
	200	9.0 ± 0.02	nr	nr	nr
	300	1.0 ± 0.01	1.1 ± 0.00	1.2 ± 0.01	< LOQ
10	30	44.8 ± 0.07	54.9 ± 0.10	56.9 ± 0.13	57.8 ± 0.30
	60	28.5 ± 0.10	25.4 ± 0.03	29.8 ± 0.03	27.3 ± 0.08
	90	10.4 ± 0.02	9.2 ± 0.02	12.2 ± 0.02	8.9 ± 0.96
	150	1.3 ± 0.01	0.3 ± 0.01	0.6 ± 0.01	0.2 ± 0.01
	300	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
5	30	37.9 ± 0.02	40.4 ± 0.56	25.3 ± 0.02	30.1 ± 0.11
	60	6.6 ± 0.02	4.9 ± 0.01	2.7 ± 0.02	4.7 ± 0.03
	90	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
	150	< LQ	< LQ	< LQ	< LD
	300	< LQ	< LQ	< LQ	< LD

Nombre de mesures = 3 ; Format : Moyenne ± écart-type ; nr : non réalisé ; LQ : limite de quantification, LD : limite de détection

Tableau 8 - Efficacité de la complexation du 5FU par le CA

On peut voir dans ces résultats que plus la concentration en CA utilisée est importante, plus le pourcentage restant de 5FU est faible. Plus la concentration initiale en 5FU est faible, plus le traitement par CA est efficace. On notera que la variation du temps de contact a un impact significatif sur l'efficacité du traitement par CA statistiquement ($p < 0,05$) pour 5min et 30min de temps de contact, mais ce n'est pas statistiquement significatif ($p > 0,05$) pour les temps de contact supérieurs à 30min. Enfin, il faut relever qu'un échantillon de 5FU à 5mg/ml traité par 90mg/ml de CA n'est plus détecté par la méthode HPLC. Dans ces conditions, on peut supposer qu'une croissance bactérienne peut être observée mais il convient de la vérifier par un test de microbiologie.

4) Croissance microbiologique après traitement par agent de complexation

a) Méthodologie

Lorsque la méthode de complexation permet de ne plus détecter de 5FU via la méthode HPLC, nous avons souhaité évaluer la détection de la croissance bactérienne par le système BA. Pour cela nous avons sélectionné les concentrations de CA et 5FU les plus défavorables selon les résultats précédents. Trois échantillons de 5FU de 25 et 10mg/ml, traités par respectivement 300 et 150 mg/ml de CA et contaminés par un inoculum bactérien de moins de 100 UFC de *Staphylococcus aureus*. Des échantillons de 10ml ont ensuite été introduits dans les flacons de BA (entraînant une dilution au 5^{ème}) afin de vérifier la neutralisation de l'action inhibitrice de la croissance bactérienne du 5FU par traitement via CA.

b) Résultats et discussion

On peut voir dans le **Tableau 9** ci-dessous que pour 2 des 3 échantillons, une contamination bactérienne a été détectée. Le traitement par CA a donc permis de neutraliser l'effet inhibiteur de la croissance bactérienne du 5FU et cette neutralisation peut être détectée par le système BA. Cependant, seuls deux échantillons sur trois sont positifs, la neutralisation n'est donc pas complète. Il conviendra donc d'associer une deuxième méthode de neutralisation, comme la dilution, afin que celle-ci soit complète.

Concentration en 5FU avant incorporation dans les flacons de BacT/ALERT® (mg/ml)	Concentration en CA (mg/ml)	Contamination bactérienne (UFC)	Détection bactérienne par le système BacT/ALERT®
25	300	<100	(+)
25	300	< 100	(+)
25	300	< 100	(-)
10	150	< 100	(+)
10	150	< 100	(+)
10	150	< 100	(-)
0	0	< 100	(+)

Tableau 9 - Détection de la croissance bactérienne par le système BA après traitement par CA

Par ailleurs, il n'existe pas de dispositif prêt à l'emploi adapté pour cette situation. Ce dispositif pourrait s'apparenter à un filtre à charbon permettant de mettre en contact l'agent cytotoxique et le charbon et de récupérer un filtrat que l'on puisse mettre à incuber dans des flacons de BA. Cependant, les dispositifs que nous avons pu trouver contiennent des volumes morts beaucoup trop importants (car ils sont adaptés à un traitement pour des

volumes beaucoup plus importants de liquide) ou alors ils contiennent des filtres stérilisants (0,22µm) , empêchant ainsi la mise en incubation des potentiels microorganismes dans la préparation. En l'absence d'un tel dispositif, nous avons donc recherché une solution différente afin de pouvoir mettre en place ce contrôle dans une unité de production.

5) Test de mise en place en routine

a) Choix des microorganismes étudiés

La Ph. Eur. recommande l'utilisation de différentes souches de microorganismes appropriées pour les essais de fertilité et d'applicabilité d'une méthode biologique (**Figure 10** ci-dessous).

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

Figure 10 - Souches de microorganismes recommandés par la Pharmacopée Européenne

Nous avons choisi de valider notre méthode avec chacun de ces microorganismes mis à part le *Clostridium sporogenes*. En effet, les milieux utilisés ne sont pas propices à la pousse de cette bactérie et elle ne fait pas partie des microorganismes retrouvés dans les contaminations de zones de production.

b) Méthodologie

Nous avons réalisé un test pour la mise en place d'une méthode utilisable en routine dans les unités de production. Pour cela nous avons réalisé l'expérience à trois reprises : trois échantillons de 20ml de 5FU 50mg/ml (concentration usuelle maximale) ont été prélevés. Dans chaque échantillon, un inoculum contenant moins de 100 UFC théoriques d'inoculum bactérien (~80 UFC) a été ajouté. Ces échantillons ont ensuite été introduits dans des poches de 200ml pré-remplies de Tryptone Soja, contenant ainsi du 5FU à 5mg/ml. Ensuite, 20ml ont été prélevés dans ces poches à l'aide de seringues pré-remplies de 2g de CA. Nous avons choisi d'utiliser les résultats concluants retrouvés dans les essais précédents avec 5mg/mL de 5FU traités par 90mg/mL de CA (cf. [Tableau 8](#)). Nous avons augmenté légèrement la concentration de CA (à 100mg/mL), afin de permettre de prendre en compte les pertes liées à l'utilisation de la seringue et la précision d'une pesée de 2g par seringue. Les prélèvements ainsi traités ont enfin été incorporés dans les flacons de BA pour incubation. Cette méthode est schématisée dans la [Figure 11](#) ci-dessous :

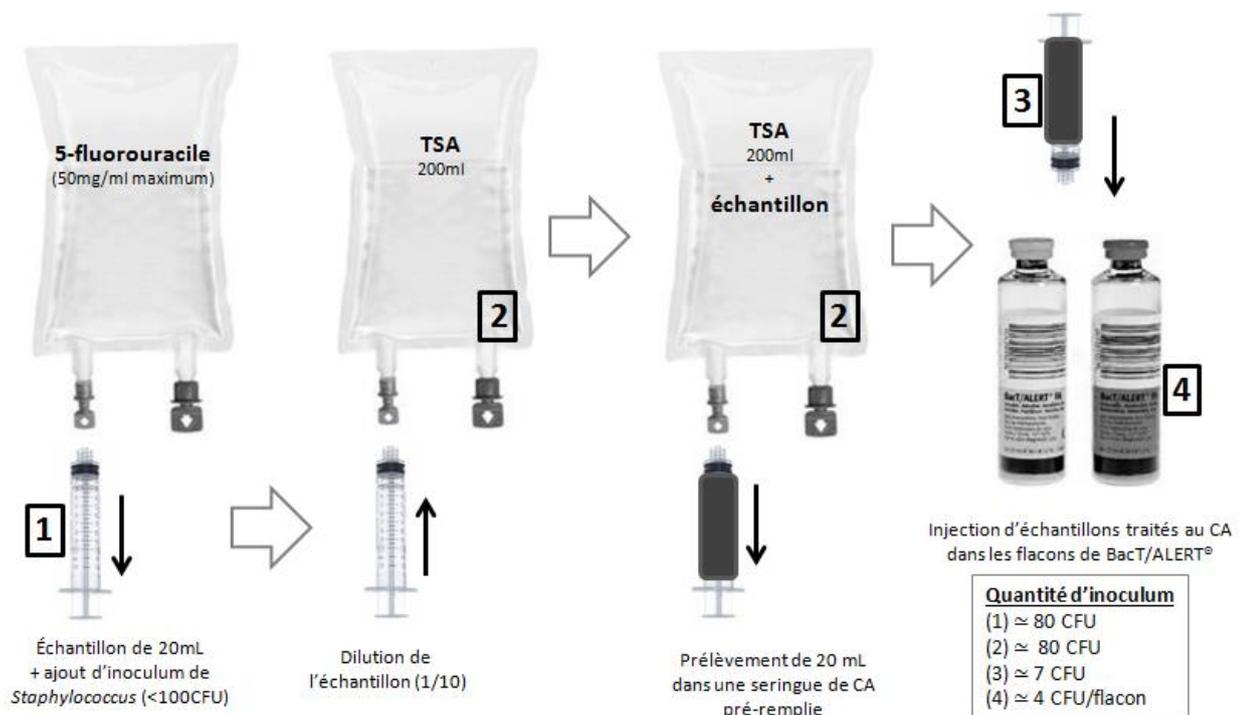


Figure 11 - Schématisation du test de mise en place en routine

La contamination théorique d'environ 80 UFC d'inoculum bactérien, qui correspond à environ 4 UFC par flacon de BA, est comprise dans la limite de détection du système BA qui est de 1 à 10 UFC. Enfin, des témoins positifs ont été réalisés selon la même méthode en utilisant du NaCl en remplacement du 5FU.

c) Résultats et discussion

Concentration en 5FU (mg/ml)	Concentration en CA (mg/ml)	Nombre d'échantillons	Contamination bactérienne initiale (UFC)	Détection bactérienne par le système BacT/ALERT®	Moyenne des temps de détection
0	200	3	<i>S. aureus</i> < 100	(+)	Aérobie : 7,3h Anaérobie : 9,2h
50				(+)	Aérobie : 16,2h Anaérobie : 15,2h
0	200	3	<i>P. aeruginosa</i> < 100	(+)	Aérobie : 9,5h Anaérobie : 12,0h
50				(+)	Aérobie : 33,9h Anaérobie : 12,9h
0	200	3	<i>B. subtilis</i> < 100	(+)	Aérobie : 9,8h Anaérobie : 11,5h
50				(+)	Aérobie : 36,1h Anaérobie : 19,4h
0	200	3	<i>C. albicans</i> < 100	(+)	Aérobie : 9,8h Anaérobie : 12,5h
50				(+)	Aérobie : 34,4h Anaérobie : 18,6h
0	200	3	<i>A. brasiliensis</i> < 100	(+)	Aérobie : 8,2h Anaérobie : 11,2h
50				(+)	Aérobie : 23,7 Anaérobie : 17,6

Tableau 10 - Résultats du test de mise en place en routine

On observe dans le tableau ci-dessus que les résultats du test de mise en place de notre méthode en routine sont concluants. En effet, la croissance bactérienne des 4 microorganismes sélectionnés est détectée via notre méthode. On peut cependant observer un temps de détection plus long après le traitement par CA mais cette période reste inférieure à 48h, ce qui est tout à fait compatible avec une activité de production.

Cependant, à cause notamment des propriétés du 5FU et du CA, ce test n'est pas forcément transposable en l'état à d'autres cytotoxiques. Il serait donc judicieux d'essayer ce test sur d'autres cytotoxiques reconnus pour leurs propriétés inhibitrices de la croissance microbiologique comme la mitomycine C, le méthotrexate, ... etc.

CONCLUSION

L'objectif de notre étude était de trouver une méthode capable de tester la stérilité des cytotoxiques produits en lots par microbiologie rapide, y compris pour les cytotoxiques qui présentent un effet inhibiteur de la croissance bactérienne via une méthode de neutralisation réalisable en routine. L'utilisation du système BA pour la détection de la croissance microbologique a été possible pour l'oxaliplatine et l'irinotécan. Les CMI mesurées ont confirmées l'absence d'inhibition aux concentrations de routine. À l'inverse, le 5FU a montré une activité inhibitrice sur la croissance microbologique, qui n'a pas été suffisamment contrecarrée ni par la méthode de dilution de la Ph. Eur. ni par la REI incluse dans le système BA. Cette absence d'efficacité est justifiée par une très faible CMI du 5FU sur le *S. aureus* qui explique la nécessité d'un rendement de complexation attendu très important (rendement recherché de 99,9998 % pour une concentration de 50mg/mL de 5FU).

Pour tester la neutralisation de l'inhibition de la croissance bactérienne, nous avons choisi d'utiliser le 5FU. Concernant les agents de complexation, nous avons choisi des agents déjà utilisés dans le traitement de l'eau : les REI et le CA. *Haddad et al.* (37) ont obtenu une complexation de plus de 80% de certains médicaments (par exemple fluoxétine, diclofénac) en utilisant des résines anioniques ou cationiques. Cette méthode de neutralisation a l'avantage d'être non spécifique à un médicament donné mais elle dépend de la charge ionique du médicament. L'efficacité de la complexation peut toutefois dépendre de l'attrait entre le médicament et l'agent de complexation. L'action de ces billes de polymères contenues dans les flacons de BA (R1), dont la composition n'a pas été fournie par le fabricant, n'a pas permis une complexation suffisante du 5FU pour permettre la croissance bactérienne, elles ne sont donc pas suffisantes pour neutraliser les effets

inhibiteurs microbiologiques du 5FU. Même après extraction des résines (R1) des flacons de BA, nous avons constaté que leur action n'était pas suffisante pour capturer complètement le 5FU. Le seul léger effet que nous avons trouvé peut-être attribué à la dilution finale dans le flacon au 1/5. De meilleurs résultats ont été constatés dans la littérature pour les antibiotiques. Par exemple, Mitteregger et al (10) ont évalué le temps de détection de la croissance bactérienne dans le sang du patient après l'administration des antibiotiques et ont montré que les antibiotiques tels que la clindamycine, la gentamicine et la vancomycine présents dans le sérum du patient étaient entièrement complexés par les REI des flacons de BA. Mais, il convient de noter que la concentration sanguine en antibiotiques est à un niveau bien plus faible que les concentrations en anticancéreux retrouvées dans nos préparations. Une autre étude (29), évaluant l'efficacité de la croissance microbiologique avec un autre système de microbiologie rapide, le Bactec® sur des préparations cytotoxiques, a montré une efficacité de ce système pour plusieurs médicaments cytotoxiques à l'exception du 5FU et de la gemcitabine, confirmant la difficulté de tester la stérilité des solutions de 5FU par une méthode de microbiologie rapide. Concernant les autres REI étudiées, les résines échangeuses d'anions (R4 et R5) ont montré de meilleurs résultats de complexation pour le 5FU en raison de leur structure de base ($pK_a = 8,02(16)$). En fait, le pH du 5FU en solution est d'environ 9 ($pH > pK_a$), le 5FU est donc sous forme basique (A^-) et est attiré par les charges positives présentes dans la structure des résines échangeuses d'anions. Lors de nos expériences, nous avons trouvé une exception pour une concentration de 50mg/ml de 5FU traitée par la résine R2 (par exemple 31,32% pour 200mg/ml de CA à 24h). Un précipité blanc a été observé. Cette réaction pourrait s'expliquer par une réaction d'estérification entre le 5FU et le groupe carboxylique R2.

Outre les résines, nous avons étudié le CA comme autre agent de complexation. Dans le traitement de l'eau, seuls des contaminants à l'état de traces sont capturés. Pour des

préparations de cytotoxiques, la quantité à neutraliser est très élevée. Concernant la complexation des médicaments, la concentration élevée de CA s'est avérée efficace pour la complexation de la mitomycine C. À titre expérimental, pour le ciblage des médicaments, le CA (50mg/mL) a été utilisé avec succès pour complexer plus de 99 % de la mitomycine C (1mg/mL) (31). On peut noter également que le CA ne favorise pas l'adsorption des bactéries et constitue un milieu favorable à la croissance bactérienne (38). Dans les conditions limites, lorsque le 5FU n'était pas totalement complexé par le CA, une croissance microbienne a été observée dans deux des trois échantillons évalués pour le test de stérilité par le système BA. Afin de garantir une croissance dans 100% des cas de contamination dans le cadre d'une utilisation en routine, nous avons décidé de combiner deux méthodes de neutralisation : la dilution recommandée par la Ph. Eur. et la neutralisation du médicament. Les conditions permettant une croissance dans 100% des cas sur toutes les microorganismes étudiés étaient une dilution au 1/10^{ème} du médicament avec un agent de complexation dans la seringue à une quantité jugée optimale (c'est-à-dire 2g de CA) pour recueillir correctement le filtrat. Même si le temps de détection observé est plus long, il reste inférieur à 48 heures, ce qui est acceptable pour une mise en quarantaine avant libération des lots. Des tests doivent être effectués sur d'autres agents cytotoxiques ayant des propriétés inhibitrices reconnues (par exemple, la mitomycine, le méthotrexate) afin de pouvoir justifier sa transposition à d'autres médicaments. Cette méthode conçue pour les tests de stérilité de routine permettrait une production de lots des préparations de 5FU et un stockage prolongé de celles-ci, par exemple 28 jours pour des concentrations à 8, 10 et 50mg/mL, compte tenu des résultats des études de stabilité physico-chimique. Les méthodes microbiologiques rapides par le système BA seront utilisables sans agent de complexation pour l'oxaliplatine et l'irinotécan pour les tests de stérilité des lots. Cette utilisation en routine pourra être faite sous réserve de validation de la méthode par les autres microorganismes recommandés par la Ph. Eur.

Notre étude a permis d'utiliser une méthode de microbiologie rapide pour tester la stérilité de trois médicaments cytotoxiques (l'irinotécan, l'oxaliplatine et le 5FU). Même lorsque le médicament présentait un effet inhibiteur sur la croissance microbologique, la méthode de neutralisation associée (prétraitement par CA) a permis de réaliser le test de stérilité. La méthode doit donc être validée pour d'autres médicaments présentant un effet inhibiteur sur la croissance microbologique afin de déterminer son applicabilité à grande échelle. En parallèle, nous travaillons actuellement au développement d'un dispositif spécifique qui permettra le transfert de cette nouvelle technologie pour le test de stérilité de la production de lots dans les pharmacies hospitalières.

BIBLIOGRAPHIE :

1. Cancers : les chiffres clés - Qu'est-ce qu'un cancer ? [Internet]. [cité 1 mai 2020]. Disponible sur: <https://www.e-cancer.fr/Comprendre-prevenir-depister/Qu-est-ce-qu-un-cancer/Chiffres-cles>
2. 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.
3. Bonnes pratiques de préparation 2007 - ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé.
4. European Pharmacopoeia Online 10.2 - European Directorate for the Quality of Medicines. Council of Europe. Strasbourg; 2020.
5. Plumridge RJ, Sewell GJ. Dose-banding of cytotoxic drugs: a new concept in cancer chemotherapy. *Am J Health-Syst Pharm AJHP Off J Am Soc Health-Syst Pharm.* 15 sept 2001;58(18):1760-4.
6. Textes en enquête publique - ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé.
7. Tests for sterility 3.2 - World Health Organization (WHO); march 2012.
8. Sterility Test 71 - US. Pharmacopeia (USP); june 2009.
9. 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.* 19 oct 2011;29(45):8012-23.
10. Mitteregger D, Barousch W, Nehr M, Kundi M, Zeitlinger M, Makristathis A, et al. Neutralization of antimicrobial substances in new BacT/Alert FA and FN Plus blood culture bottles. *J Clin Microbiol.* mai 2013;51(5):1534-40.
11. Fiche info - Fluorouracile 50 mg/ml, solution à diluer pour perfusion - Base de données publique des médicaments [Internet]. [cité 23 janv 2020]. Disponible sur: <http://base-donnees-publique.medicaments.gouv.fr/extrait.php?specid=65502207>
12. Duschinsky R, Plevin E, Heidelberger C. The synthesis of 5-fluoropyrimidines. *J. Am. Chem. Soc.* August 1957;79(16):4559-4560.
13. Koenig H, Patel A. Biochemical basis of the acute cerebellar syndrome in 5-fluorouracil chemotherapy. *Trans Am Neurol Assoc.* 1969;94:290-2.
14. Tuchman M, Stoeckeler JS, Kiang DT, O'Dea RF, Ramnaraine ML, Mirkin BL. Familial pyrimidinemia and pyrimidinuria associated with severe fluorouracil toxicity. *N Engl J Med.* 25 juill 1985;313(4):245-9.
15. Stéphan F, Etienne MC, Wallays C, Milano G, Clergue F. Depressed hepatic dihydropyrimidine dehydrogenase activity and fluorouracil-related toxicities. *Am J Med.* déc 1995;99(6):685-8.

16. Etienne MC, Milano G, Renée N, Lagrange JL, Dassonville O, Thyss A, et al. [Population study of dihydropyrimidine dehydrogenase in cancer patients]. *Bull Cancer (Paris)*. sept 1995;82(9):705-10.
17. Loison G. Mise en place des doses standards de chimiothérapies au centre hospitalier du Mans. [Angers]: Université d'Angers; 2013.
18. Galanti L, Lebitasy MP, Hecq J-D, Cadrobbi J, Vanbeckbergen D, Jamart J. Long-Term Stability of 5-Fluorouracil in 0.9% Sodium Chloride after Freezing, Microwave Thawing, and Refrigeration. *Can J Hosp Pharm*. 2009;62(1):34-8.
19. Rochard EB, Barthès DM, Courtois PY. Stability of fluorouracil, cytarabine, or doxorubicin hydrochloride in ethylene vinylacetate portable infusion-pump reservoirs. *Am J Hosp Pharm*. mars 1992;49(3):619-23.
20. Benvenuto JA, Anderson RW, Kerkof K, Smith RG, Loo TL. Stability and compatibility of antitumor agents in glass and plastic containers. *Am J Hosp Pharm*. déc 1981;38(12):1914-8.
21. André P, Cisternino S, Roy A-L, Chiadmi F, Schlatter J, Agranat P, et al. Stability of oxaliplatin in infusion bags containing 5% dextrose injection. *Am J Health Syst Pharm*. 15 sept 2007;64(18):1950-4.
22. Thiesen J, Krämer I. Physicochemical stability of irinotecan injection concentrate and diluted infusion solutions in PVC bags. *J Oncol Pharm Pract*. September 2000;6(3):115-121.
23. 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. *Ann Pharm Fr*. juill 2011;69(4):221-31.
24. Crauste-Manciet S, Krämer I, Sautou V, Beaney A, Hecq J-D, Le Brun P. GERPAC Consensus Conference -Guidance on the assignment of microbiological shelf-life for hospital pharmacy aseptic preparations. *Pharm Technol Hosp Pharm*. 2020;in press.
25. 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.
26. Hamilton-Miller JM. Antimicrobial activity of 21 anti-neoplastic agents. *Br J Cancer*. mars 1984;49(3):367-9.
27. 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*. mars 1983;23(3):374-8.
28. Krämer I. Viability of microorganisms in novel antineoplastic and antiviral drug solutions. *J Oncol Pharm Pract*. March 1998;4(1):32-37.

29. Matheron A, Guerault-Moro M-N, Vasquez R, Cheron M, Crauste-Manciet S. Parenteral cytotoxic drugs of standardized dosing batch produced in hospital pharmacy: Long term microbial stability and overwrapping physical integrity assessment. *Pharm Technol Hosp Pharm*. 2020;under submission.
30. Amy J. Stérilité des préparations injectables hospitalières de 5-Fluorouracile : recherche d'une méthode alternative à l'essai de stérilité de la Pharmacopée Européenne. Université de Limoges; 2018.
31. Ito K, Kiriya K, Watanabe T, Yamauchi M, Akiyama S, Kondou K, et al. A newly developed drug delivery system using fine particles of activated charcoal for targeting chemotherapy. *ASAIO Trans*. sept 1990;36(3):M199-202.
32. Miriyala N, Ouyang D, Perrie Y, Lowry D, Kirby DJ. Activated carbon as a carrier for amorphous drug delivery: Effect of drug characteristics and carrier wettability. *Eur J Pharm Biopharm*. 1 juin 2017;115:197-205.
33. Delmas A, Gordien JB, Bernadou J-M, Roudaut M, Gresser A, Malki L, et al. Quantitative and qualitative control of cytotoxic preparations by HPLC-UV in a centralized parenteral preparations unit - ScienceDirect. *J Pharm Biomed Anal*. juill 2009;49(5):1213-20.
34. Complex online web statistical calculators [Internet]. [cité 1 mai 2020]. Disponible sur: <https://astatsa.com/>
35. Zorić K. Types of ion exchangers for use in water technology. In 2014.
36. Dabrowski A, Podkoscielny P, Hubicki Z, Barczak M. Adsorption of phenolic compounds by activated carbon—a critical review - ScienceDirect. *Chemosphere*. févr 2005;58(8):1049-70.
37. Haddad M, Oie C, Duy SV, Sauvé S, Barbeau B. Adsorption of micropollutants present in surface waters onto polymeric resins: Impact of resin type and water matrix on performance - ScienceDirect. *Sci Total Environ*. 10 avr 2019;660:1449-58.
38. Tchobanoglous G, Burton F, Stensel HD. Wastewater engineering: Treatment and reuse. ProQuest; May 2003;95(5):201.

SERMENT DE GALIEN

Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des Pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruite 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 et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

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

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

Que je sois couverte d'opprobre et méprisée de mes confrères si j'y manque.

Titre : Essai de stérilité des préparations produites en lot : Neutralisation du pouvoir inhibiteur de la croissance bactérienne de certains cytotoxiques par des agents de complexation

Résumé : Dans les pharmacies hospitalières, la production de cytotoxiques en lot nécessite un test de stérilité. L'objectif de ce travail était de valider l'utilisation d'une méthode de microbiologie rapide, et de développer une méthode de neutralisation adéquate en cas d'inhibition de la croissance bactérienne. L'effet potentiel d'inhibition de la croissance microbiologique de trois anticancéreux sélectionnés pour la production en lot (5 fluorouracil irinotécan et oxaliplatine) a été évalué sur le système BacT/ALERT®. Parmi les médicaments cytotoxiques, seul le 5FU a montré un effet inhibiteur sur la croissance microbiologique. Pour contrecarrer cet effet, notre objectif était d'utiliser des agents neutralisants complexant la molécule, du charbon actif ou des résines échangeuses d'ions. La concentration microbiologique bactéricide du 5FU était très faible (1.10^{-4} mg/mL), ce qui indique la nécessité absolue de neutraliser la totalité du médicament avant le test de stérilité. La complexation a été validée par un dosage HPLC de la concentration résiduelle de 5FU en solution après l'utilisation d'agents neutralisants. Seul le charbon actif était capable de capturer complètement le 5FU lorsqu'il était préalablement dilué à 5mg/ml. Inversement, les résines, dans l'état de l'étude, n'ont pas été capables de capturer complètement le 5FU quelle que soit la dilution. La croissance microbiologique sur le système BacT/ALERT® après le traitement au charbon actif a été confirmée avec succès sur *Staphylococcus aureus*. Sur la base des résultats de cette validation, une méthode a ensuite été mise au point pour pouvoir effectuer en routine un test de stérilité des lots. Elle a été confirmée sur 5 espèces microbiologiques (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Aspergillus brasiliensis*). Ces résultats offrent un nouvel éclairage pour envisager des tests de stérilité par microbiologie rapide, même pour les médicaments présentant un effet inhibiteur sur la croissance microbiologique.

Mots clés : 5-fluorouracil, croissance microbiologique, test de stérilité, production en lot, charbon actif, résine échangeuse d'ions

Title: Sterility testing of batch preparations: Neutralization of some cytotoxics bacterial growth inhibition using complexation materials

Abstract: In the context of batch production of cytotoxic drugs in hospital pharmacies with the need of sterility testing, the objective was to validate the use of Rapid Microbiological Method (RMM), and to develop adequate neutralization method in case of inhibition of bacterial growth. The potential microbiological growth inhibitory effect of 3 anticancer drugs (5 fluorouracil, irinotecan and oxaliplatin) selected for batch production was assessed on BacT/ALERT® system. Among cytotoxic drugs, only 5FU exhibited inhibitory effect on microbiological growth using rapid microbiological method. To counteract this effect our purpose was to use neutralizing agents complexing the drug i.e. activated carbon or ion exchange resins. The microbiological bactericidal concentration of 5FU was very low (1.10^{-4} mg/mL) indicating the absolute need to neutralize the whole drug before sterility test. The complexation was validated by High Performance Liquid Chromatography control of the residual 5FU concentration in solution after the use of neutralizing agents. Only activated carbon was able to fully capture 5FU when previously diluted at 5 mg/ml. Conversely, the resins, in the condition of the study, were not able to fully capture 5FU whatever the dilution. The microbiological growth on BacT/ALERT® system after active carbon treatment was successfully confirmed with *Staphylococcus aureus*. Based on this validation results a method was then developed to routinely be able to perform sterility test of the batches produced and was confirmed on 5 microbiological species (i.e *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Aspergillus brasiliensis*). Our work gives a new insight for considering sterility testing by rapid microbiological method even for drugs exhibiting inhibitory effect on microbiological growth.

Keywords: 5-fluorouracil, microbiological growth, sterility testing, batch production, activated carbon, ion exchange resin