

ANNÉE 2009

N° 5

THÈSE

Pour le

DIPLÔME D'ÉTAT

DE DOCTEUR EN PHARMACIE

par

Nicolas EL KOURI

Présentée et soutenue publiquement le 3 mars 2009

**Influence de la compression isostatique
sur l'inactivation bactérienne d'un matériau
phosphocalcique pour comblement osseux**

Président : M. Christian MERLE, Professeur de Pharmacie Galénique,
Faculté de Pharmacie

Membres du jury : Mme Hélène GAUTIER, Maître de conférence en Pharmacie
Galénique, Faculté de Pharmacie (Directeur de thèse)
Mme Jocelyne CAILLON, Maître de conférence en
Bactériologie, Faculté de Médecine
Mr Jean-Michel BOULER, Professeur de Chimie, Faculté de
Chirurgie Dentaire

Liste des abréviations

ARNp	ARN polymérase
BCP	Phosphate de calcium biphasé
BE	Bromure d'éthidium
CDA	Apatite déficiente en calcium
CFU	Colonie formant unité
DAPI	4',6-diamino-2-phenylindole
DPA	Acide pyridine-6,6-dicarboxylique (ou acide dipicolinique)
FDA	Food and Drug Administration
FISIS	Food Safety and Inspection Service
FITC	Isothiocyanate de fluorescéine
HA	Hydroxyapatite
HCT	Traitement par haute pression sous CO ₂
HMP	Solution de pectine à forte teneur en méthoxyle
HPMC	Hydroxypropylméthylcellulose
HPT	Traitement par haute pression hydrostatique
HT	Traitement par la température
IP	Iodure de propidium
LMP	Solution de pectine à faible teneur en méthoxyle
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méticilline
SASM	<i>Staphylococcus aureus</i> sensible à la méticilline
SASPs	Petites protéines acides solubles
SEM	Microscope électronique à balayage
TCP	Phosphate tricalcique
TEM	Microscope électronique à transmission

SOMMAIRE

SOMMAIRE.....	1
INTRODUCTION	4
GENERALITES SUR LA COMPRESSION ISOSTATIQUE.....	6
1. Introduction.....	6
2. Principes de fonctionnement.....	6
2.1. Principes généraux de fonctionnement.....	6
2.2. Propriétés physico-chimiques de l'eau.....	9
2.2.1. La compressibilité.....	9
2.2.2. Interactions thermiques lors d'une compression à température constante.....	10
2.2.3. Influence sur le pH.....	10
3. Effets des hautes pressions sur les molécules et les micro-organismes	11
3.1. Action des hautes pressions sur les liaisons moléculaires	11
3.2. Action des hautes pressions sur les réactions chimiques et molécules biologiques	12
3.2.1. Sur les réactions chimiques ou biochimiques	12
3.2.2. Sur les protéines	12
3.2.3. Sur les glucides.....	13
3.2.4. Sur les lipides	14
3.2.5. Sur les acides nucléiques.....	14
3.3. Action des hautes pressions sur les micro-organismes	15
3.3.1. Actions des hautes pressions	15
3.3.1.1. Actions sur la morphologie.....	16
3.3.1.2. Action sur les membranes cellulaires	19
3.3.1.3. Action sur les protéines et inactivations enzymatiques	23
3.3.1.4. Actions sur le nucléoïde et la synthèse	27
3.3.2. Facteurs influençant l'efficacité de la compression sur les micro-organismes	30
3.3.2.1. Facteurs intrinsèques	30
3.3.2.2. Facteurs extrinsèques	35
4. Applications pratiques	38
4.1. Intérêt en agroalimentaire	39
4.2. Réglementation	39
4.3. Utilisation des hautes pressions en agro-alimentaire à l'échelle mondiale.....	40
4.4. Applications aux jus de fruits.....	41
4.5. Applications aux produits laitiers	41
4.6. Applications aux produits carnés.....	42
5. Intérêt médico-pharmaceutique potentiel	42
5.1. Dénaturation par la pression.....	43
5.2. Modifications chimiques de protéines et autres macromolécules	43
5.3. Réactions chimiques catalysées par les enzymes.....	44
5.4. Gel et dégel assisté par pression et stockage à température inférieure à 0°C sans gel	45
5.5. Inactivation d'agents biologiques.....	45
5.6. Développement de vaccins.....	47
6. Conclusion	47

GENERALITES SUR LES MATERIAUX PHOSPHOCALCIQUES	48
1. Les propriétés physicochimiques	49
2. Les propriétés biologiques.....	50
2.1. La biocompatibilité.....	50
2.2. La bioactivité.....	50
2.3. L'ostéoconduction	50
2.4. La biofonctionnalité.....	51
3. Les céramiques.....	51
3.1. L'hydroxyapatite	51
3.2. Le phosphate tricalcique β	52
3.3. Les phosphate de calcium biphasé.....	52
3.3.1. Décomposition / précipitation	53
3.3.2. Hydrolyse.....	53
3.3.3. Voie sol-gel	54
4. Les substituts osseux injectables.....	54
4.1. Les ciments ioniques	54
4.2. Le substitut phosphocalcique injectable.....	54
EXPERIMENTATIONS.....	56
1. Problématique	56
2. Matériel utilisé	57
2.1. Appareillage utilisé pour l'expérimentation	57
2.2. L'apatite déficiente en calcium (CDA).....	59
2.3. Les bactéries.....	60
2.4. Les milieux de culture	60
2.4.1. Gélose de soja tryptique (TS).....	60
2.4.2. Gélose Mueller-Hinton (MH).....	61
2.4.3. Infusion de cœur cerveau (BCC).....	61
2.4.4. Bouillon Mueller-Hinton (BMH).....	62
2.4.5. Gélose Chapman Mannitée	62
2.5. Le néphélomètre.....	63
3. Expérimentations	63
3.1. Innocuité de la poudre	64
3.1.1. Objectif de la manipulation	64
3.1.2. Principe	64
3.1.3. Méthode	64
3.1.4. Résultats.....	65
3.1.5. Conclusion	66
3.2. Mise au point d'une méthode d'évaluation de la réduction de la charge bactérienne dans la CDA après compression isostatique	66
3.2.1. Objectif de la manipulation	66
3.2.2. Principe	66
3.2.3. Méthode	67
3.2.3.1. Première manipulation	67
3.2.3.2. Seconde manipulation	67
3.2.3.3. Troisième manipulation.....	68
3.2.3.4. Quatrième manipulation	69
3.2.4. Résultats.....	69
3.2.5. Conclusion	70
3.3. Sensibilité de détection de la méthode.....	70
3.3.1. Objectif de la manipulation	70
3.3.2. Principe	71
3.3.3. Méthode	71

3.3.4. Résultats.....	71
3.3.5. Conclusion	73
3.4. Evaluation de l'efficacité stérilisante de la compression isostatique	74
3.4.1. Objectif de la manipulation	74
3.4.2. Principe	74
3.4.3. Méthode	74
3.4.4. Résultats.....	75
3.4.5. Conclusion	75
3.5. Détermination de la charge bactérienne de la poudre de phosphate de calcium	76
3.5.1. Objectif de la manipulation	76
3.5.2. Principe	76
3.5.3. Méthode	76
3.5.4. Résultats.....	77
3.5.5. Conclusion	77
3.6. Mise en culture de la CDA en milieu liquide après une compression.....	78
3.6.1. Objectif de la manipulation	78
3.6.2. Principe	78
3.6.3. Méthode	78
3.6.4. Résultats.....	81
3.6.5. Discussion	83
3.7. Mise en culture de la CDA en milieu liquide après trois compressions	83
3.7.1. Objectif de la manipulation	83
3.7.2. Principe	84
3.7.3. Méthode	84
3.7.4. Résultats.....	86
3.7.5. Conclusion	87
4. Discussion.....	87
CONCLUSION	90
PUBLICATION.....	91
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX	107
1. Liste des figures	107
2. Liste des tableaux.....	108
BIBLIOGRAPHIE.....	110

INTRODUCTION

Les défauts osseux dus à des traumatismes, des ostéolyses, des ostéosarcomes, peuvent être traités par des comblements osseux. Différents matériaux peuvent être utilisés comme du corail, des ciments hydrauliques ou acryliques ou des matériaux phosphocalciques. Ces derniers biomatériaux s'intègrent dans la matrice osseuse et permettent par un mécanisme de recolonisation une reconstruction osseuse.

Les matériaux phosphocalciques peuvent être préparés par synthèse puis mis en forme par différents procédés comme la granulation humide, la compression isostatique ou la compaction dynamique. Ces deux derniers procédés d'agglomération des particules permettent la préparation de blocs adaptés à la morphologie du défaut osseux.

La compression isostatique est particulièrement utilisée. Elle consiste en une consolidation du matériau grâce à une pression transmise uniformément dans toutes les directions. Généralement, les matériaux ainsi mis en forme sont ensuite stérilisés par la chaleur.

Mais cette étape de stérilisation par la chaleur peut être un facteur limitant. En effet, certains principes actifs associés à la matrice phosphocalcique ne supportent pas les températures élevées.

Ce projet a pour objectif de déterminer si la compression isostatique permet de réduire la charge microbienne dans un matériau phosphocalcique destiné à l'implantation osseuse. De nombreuses études agroalimentaires traitent de la compression isostatique comme méthode de pascalisation (réduction de la charge microbienne par la pression) des aliments. Ce procédé est une alternative permettant d'éviter certains désagréments induits par la stérilisation par la température.

Le produit final étant destiné à être implanté, les normes finales microbiologiques sont beaucoup plus strictes que pour l'agroalimentaire. La réduction de la charge bactérienne doit donc être maîtrisée.

La première partie de cette thèse présente les principes de fonctionnement généraux de la compression isostatique, ses effets sur les micro-organismes ainsi que ses diverses applications. La seconde traite des généralités sur les matériaux phosphocalciques. La troisième détaille les expérimentations mises en œuvre pour démontrer l'effet des hautes pressions sur la réduction de la charge bactérienne dans un matériau phosphocalcique, à savoir :

- vérification de l'innocuité du phosphate de calcium utilisé,
- mise au point d'une méthode d'analyse de la charge bactérienne présente dans le phosphate de calcium,
- détermination du seuil de détection de cette méthode,
- évaluation de l'efficacité de la compression isostatique vis-à-vis de la réduction de la charge bactérienne,
- détermination de la charge bactérienne du phosphate de calcium après sa synthèse,
- étude de la réduction de la charge bactérienne pour divers protocoles de compression afin de déterminer leur influence sur l'efficacité de cette réduction.

Pour finir un article (en attente d'acceptation de publication) présente le résumé des points clefs de ces expérimentations ainsi que des résultats.

GENERALITES SUR LA COMPRESSION ISOSTATIQUE

1. Introduction

La pression est un paramètre physique largement utilisé dans l'industrie et ses applications sont variées. Depuis quelques années, la compression isostatique est une technologie qui a été développée pour des applications en stérilisation, en particulier dans le domaine agroalimentaire.

Dans cette première partie, seront expliqués les principes généraux de fonctionnement de la compression isostatique. Viendront ensuite les effets des hautes pressions sur les liaisons moléculaires ainsi que les conséquences sur les molécules, et enfin quelques descriptions générales d'applications pratiques.

2. Principes de fonctionnement

2.1. Principes généraux de fonctionnement

La compression isostatique est une technique consistant à induire une pression uniforme, instantanément transmise à un matériau dans toutes les directions. Pour cela, l'élément à compresser est introduit dans une enceinte étanche remplie d'un fluide (eau, huile, CO₂ supercritique...) et l'enceinte est dégazée avant compression. Deux grands types d'appareillage de pressurisation différents existent (3) :

- *La compression « directe »* : la pression est générée par un piston au contact du milieu à pressuriser (figure 1). Elle autorise une vitesse de montée en pression très rapide mais elle est limitée à des enceintes de faible diamètre en raison de problèmes d'étanchéité. Deux installations industrielles fonctionnent sur ce principe au Japon.

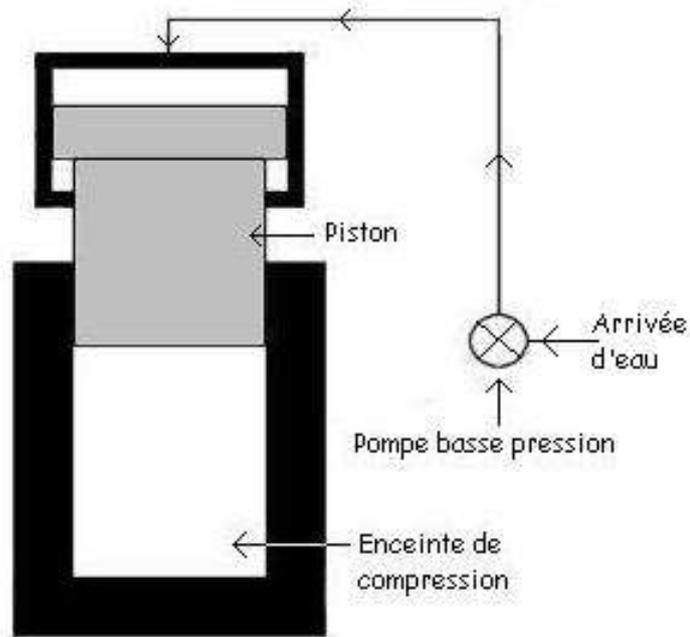


Figure 1 : Principe d'un appareil à compression isostatique directe.

- La compression « indirecte » : une pompe hydraulique de pressurisation envoie un fluide sous haute pression dans une enceinte close (figure 2). Cette méthode est la plus répandue dans le milieu industriel, les produits sont alors pressurisés dans leurs emballages.

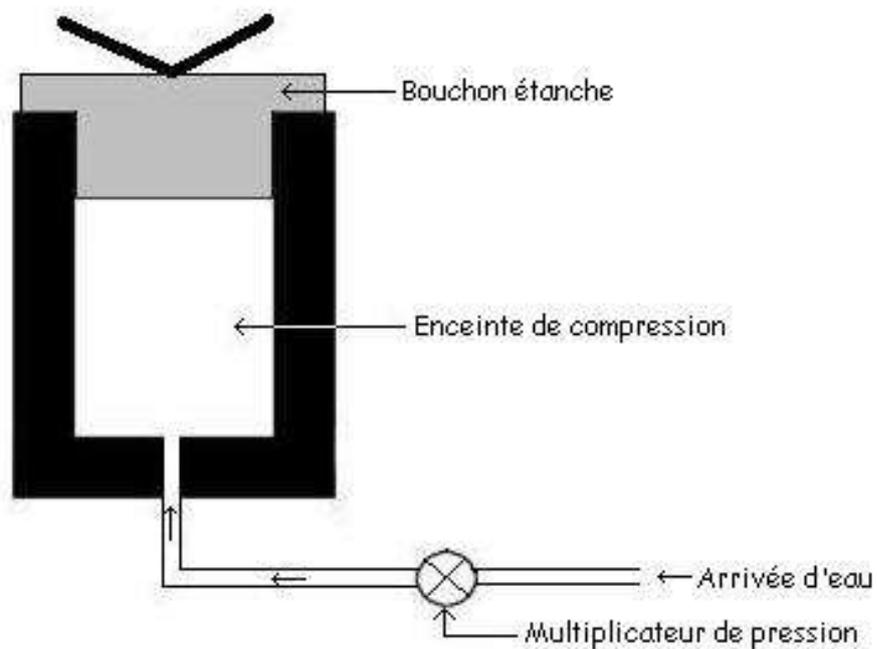


Figure 2 : Principe d'un appareil à compression isostatique indirecte.

Jusque vers 3000 MPa, la géométrie cylindrique est la mieux adaptée. L'épaisseur et les propriétés du matériau de construction du cylindre sont choisies selon les performances recherchées. La cuve doit être en acier inoxydable.

Avec des liquides, il est possible de monter la pression à quelques milliers d'atmosphères dans des enceintes de plusieurs dizaines de litres, ce qui est peu envisageable avec les gaz du fait de leur grande compressibilité et de la forte expansion qui en découle lors d'une décompression rapide (1).

De nouvelles méthodes se développent. Elles sont basées sur la propriété que possèdent les composés normalement gazeux d'être liquides au delà de certaines conditions de température et de pression. Le CO₂ supercritique est le plus employé. Il permet de travailler avec des pressions moindres et d'obtenir une efficacité de réduction de charge microbienne équivalente aux méthodes utilisant un liquide. Il a été démontré qu'un traitement au CO₂ supercritique à 15 MPa durant 15 min donne le même taux de réduction microbien qu'un traitement à 300 MPa par de l'eau et ce sur une même durée (1, 4).

Un traitement comparatif d'*E. coli* par la chaleur (56°C pendant 1 minute), une haute pression hydrostatique (275 MPa, 35°C, 1 minute) et une haute pression sous dioxyde de carbone (4 MPa, 35°C, 1 minute) montre une réduction similaire de la charge bactérienne (figure 3) (68).

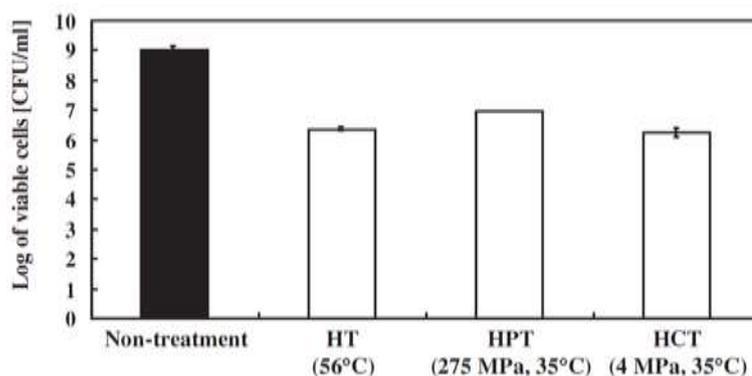


Figure 3 : Nombre de cellules viables restantes après différents traitements (68).
HT : traitement par la température ; HPT : traitement par haute pression hydrostatique ; HCT traitement par haute pression sous CO₂.

La compression peut être modulée à l'aide de plusieurs paramètres :

- Les temps et valeurs de pression de la montée et de la descente en pression.
- La valeur et la durée du palier maximal de pression.
- La température (constante ou variable, selon un schéma prédéterminé).

Le choix de l'appareillage sera déterminé par quatre facteurs essentiels (1) :

- La pression à atteindre.
- Le volume à comprimer.
- Le temps de compression.
- La température de compression.

2.2. Propriétés physico-chimiques de l'eau

L'eau a un rôle essentiel dans la compression isostatique car elle est un composant des éléments à compresser, en tant que composant essentiel des micro-organismes. De plus, c'est un fluide transmetteur de pression de grand intérêt du fait de son coût peu onéreux et de sa faible compressibilité ($5,1 \cdot 10^{-10} \text{ Pa}^{-1}$ à 0°C).

2.2.1. La compressibilité

L'eau peut atteindre des valeurs de compression de plus de 30% pour des pressions proches de 900 MPa.

- En pratique, à 22°C , la réduction du volume de l'eau est de :
- 4 % à 100 MPa
 - 7 % à 200 MPa
 - 11,5 % à 400 MPa
 - 15 % à 600 MPa

Ces valeurs de compression sont largement inférieures à celles obtenues avec un gaz (3).

2.2.2. Interactions thermiques lors d'une compression à température constante

Théoriquement, une compression de 400 MPa à 20°C entraîne une élévation de température de 10°C. De même, on observe un phénomène de refroidissement du même ordre de grandeur lors de la décompression (3).

En pratique, ces variations de température sont grandement atténuées par les échanges thermiques avec l'élément comprimé et avec les parois métalliques de l'enceinte car elles ont une forte conductibilité thermique.

2.2.3. Influence sur le pH

Une augmentation de pression entraîne un abaissement du pH de l'eau. Ceci résulte d'un phénomène d'électrostriction (réarrangement plus compact des molécules d'eau autour des ions) (1, 3).

Par phénomène d'électrostriction, la pression augmente également l'ionisation de l'eau, des sels, des acides et des bases. Le pH de l'eau s'abaisse de 0,2 à 0,5 unités pour une augmentation de pression de 100 MPa.

Bien que ces variations soient réversibles lors de la décompression, elles peuvent altérer la configuration ou la réactivité de certaines molécules à l'intérieur des cellules ; ces dernières étant en grande partie constituées d'eau.

3. Effets des hautes pressions sur les molécules et les micro-organismes

3.1. Action des hautes pressions sur les liaisons moléculaires

L'énergie déployée lors de l'utilisation des hautes pressions est largement inférieure à celle déployée lors de traitements thermiques. De ce fait, seules les liaisons de faible énergie (liaisons hydrogènes, ioniques ou interactions hydrophobes) sont modifiées. Les liaisons covalentes, elles, ne sont pas altérées (tableau 1) (1, 3, 7).

Type de liaison	ΔV de formation (ml/mol)	Action de la pression sur la liaison
Covalente	-10	Renforcement
Ionique	+10 par ion engagé	Rupture
Hydrogène	-3 à +1 < 0	Effet réduit ou renforcement
Hydrophobe	> 0	Déstabilisation Stabilisation si P > 100 MPa Rupture si P < 100 MPa
Aromatique	?	Stabilisation

Tableau 1 : Barosensibilité des liaisons chimiques (3).

Il en résulte que les hautes pressions possèdent des effets différents de la température sur les molécules biologiques (tableau 2).

	Température	Pression
Dénaturation de protéine	+	+
Coagulation de protéine	+	+
Gélification de l'amidon	+	+
Changement chimique (destruction des vitamines, des arômes...)	+	-
Inactivation enzymatique	+	+ / -
Stérilisation de micro-organismes	+	+ / -
Stérilisation d'insectes et de parasites	+	+ / -
Stimulation de la germination de semence	+	+

Légende : + : possible - : impossible + / - : difficile de généraliser

Tableau 2 : Comparaison de l'action de la température et de la pression (1).

3.2. Action des hautes pressions sur les réactions chimiques et molécules biologiques

3.2.1. Sur les réactions chimiques ou biochimiques

Cette perturbation suit la loi de Le Chatelier qui indique que si une contrainte extérieure s'exerce sur un système en équilibre, le système réagit de manière à s'opposer partiellement à cette contrainte. Selon la réaction étudiée, on observe une diminution ou une augmentation de la vitesse de réaction. Les réactions biochimiques ayant une variation de volume molaire (ΔV) positive sont inhibées par une augmentation de pression tandis que les réactions ayant un ΔV négatif sont activées par une haute pression (1, 3).

3.2.2. Sur les protéines

La conformation des protéines est répartie suivant quatre échelles de structure allant de l'enchaînement des acides aminés (structure primaire) à la conformation spatiale de la protéine et ses associations de monomères (structure quaternaire). Les protéines sont des molécules très sensibles à la pression car une modification de leur structure quaternaire suffit à les inactiver (1, 3, 5).

La structure primaire n'est pas affectée par la pression. En effet, elle correspond à l'enchaînement des acides aminés liés entre eux par des liaisons covalentes (3, 5).

La structure secondaire correspond à l'organisation en hélices α ou en feuillets β de la chaîne protéique. Cette dernière est maintenue par des liaisons hydrogènes légèrement renforcées ou fragilisées sous pression selon la valeur du ΔV faiblement positif ou négatif. Les changements apportés dépendent de chaque protéine et sont difficilement prévisibles. Mais quelque soit la protéine, la structure secondaire n'est détruite qu'à de très fortes pressions. Par exemple, le chymotrypsinogène soumis à 760 MPa perd en grande partie sa structure secondaire (3).

La structure tertiaire correspond à l'arrangement spatial de la protéine. Cette organisation est maintenue par des liaisons non covalentes et des ponts disulfures. La

structure tertiaire est désorganisée par rupture des liaisons ioniques (par électrostriction de l'eau voisine) et hydrophobes (par orientation et compression des molécules d'eau proches des groupements hydrophobes) pour des pressions de l'ordre de 100 à 200 MPa (1, 3).

La structure quaternaire correspond à l'association de plusieurs monomères. Cette organisation est maintenue par des liaisons non covalentes. Elle est très barosensible : la pression agit en dissociant les monomères. Cette dissociation se fait avec un ΔV pouvant atteindre -500 ml/mol. Cette structure est généralement détruite à des pressions inférieures à 150 MPa (1, 3).

La rupture des interactions faibles s'accompagne d'une pénétration d'eau dans le core protéique. La protéine gonfle et son volume hydrodynamique augmente. Cet état transitoire, appelé « globule fondu », apparaît entre 100 et 300 MPa et peut conduire à la formation d'agrégats ou de gels protéiques en raison de l'exposition de groupes hydrophobes en surface (71).

3.2.3. Sur les glucides

La pression n'a pas d'influence sur les oses et les oligosides car ces glucides ne font intervenir que des liaisons covalentes (3).

Les polyosides sont constitués de chaînes d'oses reliées entre elles par des liaisons non covalentes qui seront détruites par la pression. Cela se traduit par la formation de gels (3, 5). Le traitement d'une solution de pectine à forte teneur en méthoxyle (HMP) à 400 MPa à 20°C pendant 30 min, provoque une gélification analogue à celle obtenue par chauffage classique à 100°C, suivi d'un refroidissement. Pour une solution de pectine à faible teneur en méthoxyle (LMP), l'addition de 0,1 à 1,5 g/kg de CaCl_2 à 20°C provoque la formation d'un gel hétérogène, devenant homogène après pressurisation entre 200 et 400 MPa. Un gel homogène se forme également en ajoutant du CaCl_2 à une solution préchauffée de LMP. La rigidité et l'élasticité des gels issus des traitements de LMP sous pression sont supérieures à celles des gels obtenus par méthode thermique et plus élevées après traitement à 400 plutôt qu'à 200 MPa (3).

3.2.4. Sur les lipides

L'influence principale des hautes pressions est l'accroissement de la température de transition de phase des lipides. Ce phénomène est linéaire selon la pression. Pour les triglycérides, il est de 20°C tous les 100 MPa. Cela peut entraîner la solidification de lipides normalement liquides à température et pression ambiante (sans variation de température). Dans le cas d'un mélange de lipides avec des points de fusion différents, l'application de hautes pressions entraîne une séparation en différentes phases (3, 5).

Cette propriété provoque des modifications de perméabilité membranaire en induisant la cristallisation des phospholipides de la membrane, ce qui favorise la fuite du matériel intracellulaire. De plus, la pression peut modifier l'environnement lipidique d'une protéine membranaire et donc modifier son fonctionnement, ou même induire son expulsion de la bicouche phospholipidique.

3.2.5. Sur les acides nucléiques

Peu de recherches ont été faites sur le comportement des acides nucléiques soumis à de hautes pressions comparativement aux protéines. Néanmoins, il ressort des recherches effectuées que la double hélice de l'ADN n'est pas détruite par de fortes pressions. Cette résistance peut s'expliquer par le fait que celle-ci est stabilisée par des liaisons hydrogènes qui seraient renforcées sous pression (3). Une étude récente met en évidence une réduction légère de la distance des liaisons hydrogène entre les paires appariées des doubles hélices d'ADN. Ce rapprochement est plus important pour les paires de base AT que pour les paires CG (70).

Peu de données concernant le comportement de la structure tertiaire ont été recensées, mais vraisemblablement l'effet des hautes pressions sur ces structures est le même que dans le cas des protéines (désorganisation de cette structure).

L'ADN des plasmides soumis aux hautes pressions subit un super-enroulement et un compactage. Le traitement par compression isostatique est considéré comme un outil potentiel pour préparer des plasmides compactés (69).

3.3. Action des hautes pressions sur les micro-organismes

De par les modifications sur les constituants biologiques induites par de hautes pressions, des procédés d'inactivation des micro-organismes par la pression ont été développés dans différents domaines, et particulièrement dans l'agroalimentaire.

Afin d'expliquer ce phénomène et de l'optimiser, différentes études ont essayé de mettre en évidence les mécanismes d'inactivation des micro-organismes soumis à des hautes pressions, mais ces derniers sont nombreux et ne sont pas tous identifiés. Les modifications interviennent à différents niveaux et peuvent induire des lésions sublétales ou létales :

- modifications de la membrane cellulaire,
- modifications du nucléoïde,
- dissociation des ribosomes,
- dénaturation des protéines,
- inhibition de la synthèse protéique,
- inactivations enzymatiques.

De plus, divers facteurs peuvent influencer la sensibilité aux hautes pressions, certains intrinsèques (bacilles / cocci à Gram positif / à Gram négatif, souche, sporulation...), d'autres extrinsèques (pression appliquée, température, pH, milieu environnant...).

De nombreuses études mettent en évidence des lésions à différents niveaux de la cellule mais un grand nombre d'entre elles révèlent aussi que ces lésions, à elles seules, ne suffisent pas à expliquer la mort cellulaire. Une des hypothèses envisagées est que la mort cellulaire serait la conséquence de multiples lésions à plusieurs niveaux, ceci entraînant un manque d'adaptabilité irréversible de la cellule à son milieu et aux divers stress rencontrés.

3.3.1. Actions des hautes pressions

De faibles pressions suffisent à inhiber de nombreuses fonctions cellulaires (tableau 3). Dans ce cas, le phénomène est souvent réversible et de plus fortes pressions sont nécessaires pour déclencher un processus de destruction cellulaire (11).

Structure/processus cellulaire	Pression d'inhibition (MPa)
Motilité	10
Division cellulaire	20
Absorption d'éléments nutritifs	15-20
Fermentation de l'éthanol	25-50
Fonction des protéines membranaires	25-50
Réplication	50
Transcription	50-100
Synthèse protéique	50
Oligomérisation des protéines	50-100
Fonction des enzymes solubles	100
Viabilité	100-200
Structure des protéines (monomères)	200
Structure de l'ADN (double hélice)	1000

Tableau 3 : Structures et processus cellulaires inactivés par les hautes pressions (11).

3.3.1.1. Actions sur la morphologie

Une des observations les plus directes est l'examen des les micro-organismes au microscope électronique. Le microscope électronique à balayage (SEM) permet d'observer une vision de surface des bactéries (taille, forme, surface) tandis que le microscope électronique à transmission (TEM) donne une vision de l'intérieur de la cellule.

L'examen au SEM de *Leuconostoc mesenteroides* juste après un traitement par les hautes pressions à 345 MPa ne fait apparaître aucune différence de taille, de forme, et de structure de la surface par rapport aux cellules normales. Une lyse cellulaire est observée après stockage à 4°C pendant 2 heures (35).

L'étude des structures cellulaires de *Salmonella enterica* et de *Lysteria monocytogenes* par Mackey *et al.* (39) après un traitement à 250 et 500 MPa montre des changements structurels spécifiques à chaque organisme :

- *L. monocytogenes* présente des régions vacuolaires dans le cytoplasme absentes pour *S. enterica*
- Le taux de ribosomes est inférieur dans les *S. enterica* traitées par rapport aux bactéries non traitées évoquant une lyse cellulaire.

Une étude comparative du traitement par des pressions croissantes de *Listeria monocytogenes* et *Salmonella typhimurium* en suspension dans différents milieux (38) indique un volume cellulaire inchangé pour *S. typhimurium* quels que soient le milieu et la pression. Pour *L. monocytogenes*, le volume cellulaire reste inchangé pour les plus faibles pressions mais les plus hautes pressions appliquées causent une augmentation du volume.

Les plus fortes pressions engendrent une lyse cellulaire des deux souches mais aucune lyse cellulaire n'a pu être observée avec le SEM.

Le SEM montre une apparition et augmentation progressive (en relation avec l'accroissement de la pression appliquée) de « boutons » et « d'enflures » à la surface de *L. monocytogenes* (figure 4).

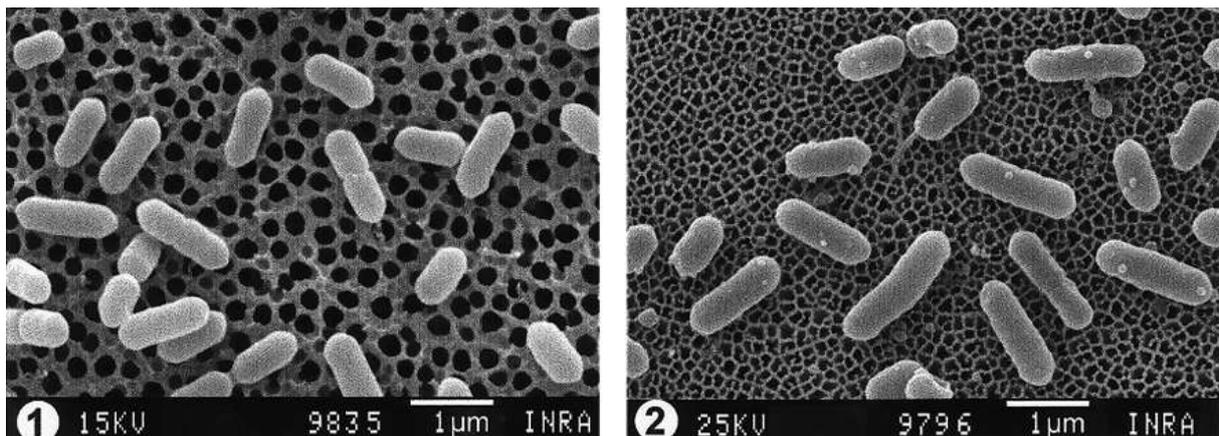


Figure 4 : Images obtenues par SEM avant et après traitement par hautes pressions de *L. monocytogenes* en phase stationnaire dans un milieu de citrate de sodium (pH 5,6). (1) sans traitement par la pression (x16000) ; (2) après un traitement à 400 MPa (10 min, 20°C) (x18000) (38).

Pour *S. typhimurium* le SEM révèle une augmentation progressive d'invaginations dans la cellule quel que soit le milieu de suspension (figure 5).

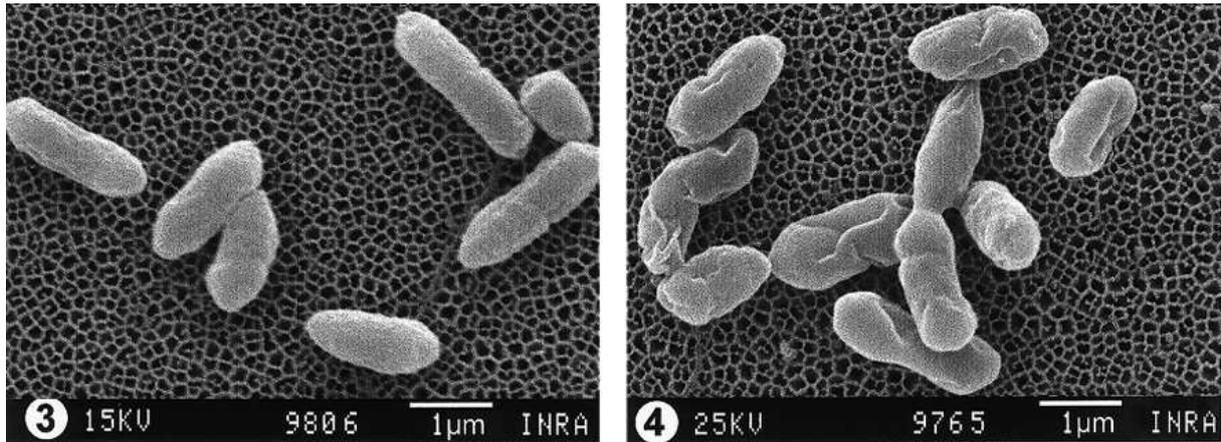


Figure 5 : Images obtenues par SEM avant et après traitement par hautes pressions de *S. typhimurium* en phase stationnaire dans un milieu de phosphate de sodium (pH 7,0). (3) sans traitement par la pression (x16000) ; (4) après un traitement à 325 MPa (10 min, 20°C) (x16000) (38).

L'étude des modifications morphologiques et physiologiques après traitement par les hautes pressions de *Lysteria monocytogenes* (25) révèle qu'il n'y a pas de changement de volume. Par contre, il y a à la surface, une apparition de « bourgeons » (similaires à ceux obtenus dans l'étude précédente) dont le nombre est proportionnel à la pression appliquée.

Le *Leuconostoc* est un cocci à Gram positif formant des chaînes. Kaletunç *et al.* (17) montrent que le traitement par les hautes pressions réduit la longueur des chaînes et qu'il n'y a pas de corrélation entre cette réduction et la viabilité ou non des bactéries. Ces travaux montrent aussi qu'il y a une relation entre la réduction de la longueur des chaînes et l'augmentation de la pression appliquée. Cependant à partir de 500 MPa, même si les bactéries sont non viables, il est possible d'observer des chaînes de 3 cocci (figure 6).

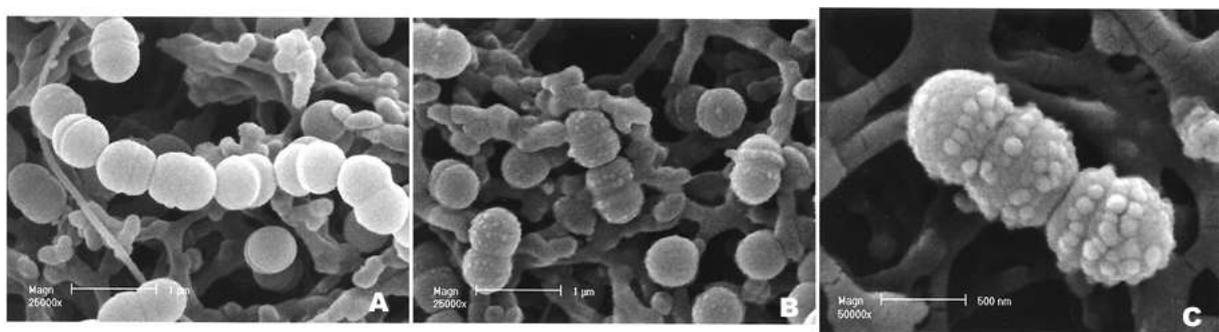


Figure 6 : Image au SEM de *L. mesenteroides*. (A) non traité (focale x25000). (B) après traitement à 500 MPa à 35°C pendant 5 min (focale x25000). (C) Cellules traitées à 500 MPa (focale x50000) (17)

Des protubérances en forme « de vésicules » apparaissent à la surface des bactéries, leur nombre augmente pour être maximal à 500 MPa (figure 7). Cette modification de surface n'est pas observée pour des *E. coli* traités par le même laboratoire (17).

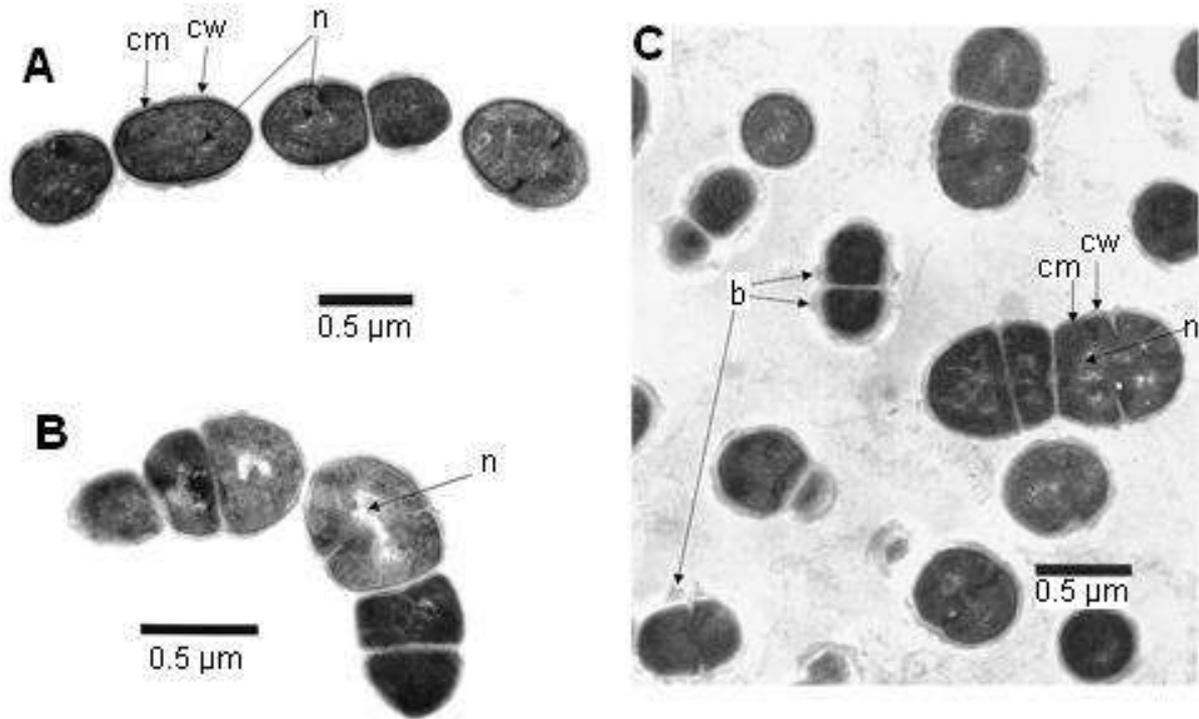


Figure 7 : Image au TEM de *L. mesenteroides*. (A) non traités. (B) traités à 250 MPa à 35°C pendant 5 min. (C) traités à 500 MPa à 35°C pendant 5 min. (légende : cw, paroi cellulaire ; cm, membrane cellulaire ; n, nucléoïde ; b, ampoule) (17)

3.3.1.2. Action sur les membranes cellulaires

Les bactéries sont des organismes unicellulaires procaryotes (caractérisés par une absence de noyau et d'organites). Les levures sont des micro-organismes eucaryotes, elles possèdent donc de nombreuses organelles pourvues de membranes phospholipidiques. L'un des phénomènes d'inactivation les plus mis en avant dans l'inactivation des micro-organismes est l'action des hautes pressions sur la membrane cellulaire.

L'effet des hautes pressions sur différents lipides artificiels en suspension a montré qu'il existe une valeur de pression (dépendante de chaque type de lipide) pour laquelle la concentration micellaire critique est maximale. En dessous, une dissociation des micelles est observée ; au dessus, un phénomène d'agrégation des micelles apparaît (29).

La température de transition de phase des phospholipides dépend de la polarité du groupement de tête et de la longueur de la chaîne carbonée. La transition de phase dépend aussi de la pression appliquée. L'effet des hautes pressions sur des doubles couches phospholipidiques constituées d'acides gras saturés montre trois états de phase de la bicouche selon la pression appliquée. Au repos ou sous faible pression, la bicouche est dans une phase liquide cristallin ; sous l'effet d'une pression plus importante, elle passe à un état de gel. La température de transition de la phase gel à la phase liquide cristallin augmente linéairement avec l'augmentation de pression (29).

A pression plus élevée, une nouvelle phase est observée, nommée « phase d'intercalage » (figure 8). Cette dernière présente une réduction du volume de la double couche de l'ordre de 5% ainsi qu'une diminution de l'épaisseur de la double couche (29).

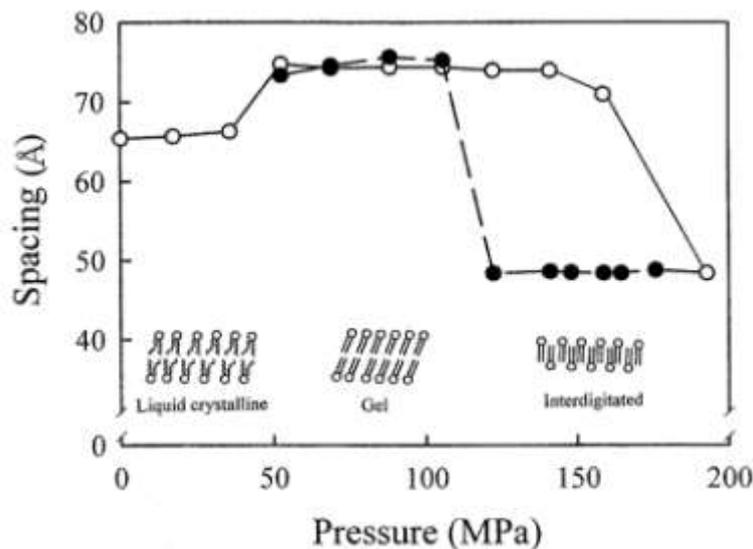


Figure 8 : Epaisseur de la bicouche pour des vésicules multilamellaires de phosphatidylcholine dans une solution de D₂O en fonction de l'augmentation (○) et de la réduction de la pression (●) (29).

Cette phase peut affecter le fonctionnement de protéines membranaires comme la Na⁺, K⁺-ATPase (47).

Les doubles couches constituées d'acides gras insaturés voient leur température et pression de transition augmenter radicalement du fait du désordre conformationnel induit par les doubles liaisons. Le cholestérol joue un rôle régulateur sur la fluidité et l'hydrophobicité

de la double couche. Les membranes sans cholestérol soumises à pression sont plus fines (29, 40).

Les cellules sont plus résistantes aux traitements par les hautes pressions lorsque leur membrane est plus fluide. Inversement, elles sont plus sensibles lorsque leur membrane est plus rigide. La composition des membranes joue donc un rôle important dans la sensibilité aux hautes pressions (28, 54).

La fluidité des membranes biologiques diminue avec l'augmentation de la pression appliquée et peut être associée à des transitions de phase. Sur les érythrocytes, une hémolyse est observée à partir de 140 MPa du fait de la perturbation de la structure du cytosquelette de la membrane cellulaire (29).

Une perte d'intégrité de la membrane cellulaire peut être mise en évidence à l'aide de colorants fluorescents ne passant normalement pas cette barrière (tels que l'iodure de propidium - IP) ou des colorants ayant un passage membranaire mais expulsés via des transporteurs pour des cellules saines (tels que le bromure d'ethidium - BE). Les cellules soumises à pression montrent une présence intracellulaire de ces colorants, traduisant la perte d'intégrité durant la phase de pression (25, 27). Malgré cela, certaines cellules n'ayant plus de croissance sur un milieu non sélectif ne présentaient pas de coloration à l'IP (27), il est donc probable que des dégâts sublétaux précèdent la perméabilité membranaire.

Pagàn et Mackey montrent sur deux souches d'*E. coli* de sensibilité différentes à la pression, qu'en présence d'IP durant la phase de compression, les deux souches présentent une coloration (plus importante pour la souche la plus sensible). Mais que si l'IP est ajouté après la phase de compression alors aucune coloration n'est visible dans les cellules (figure 9) (28).

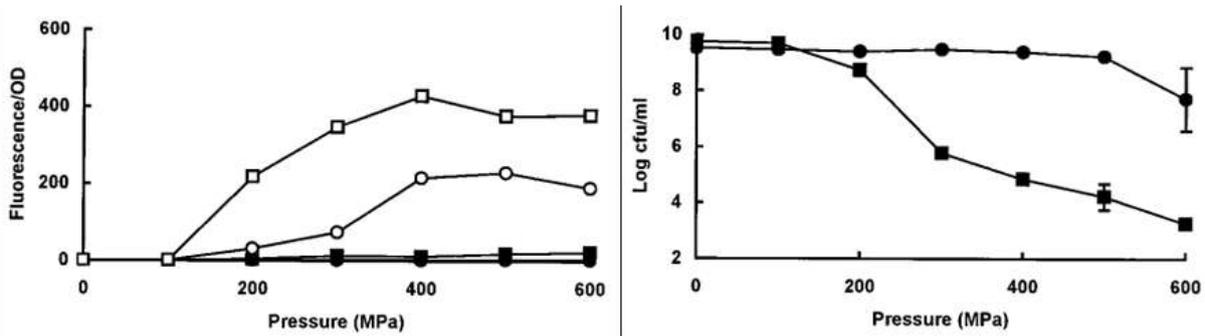


Figure 9 : Absorption d'IP et viabilité :

(1) IP présent pendant le traitement d'*E. coli* C9490 (○) et *E. coli* NCTC 8003 (□)

(2) IP présent après le traitement d'*E. coli* C9490 (●) et *E. coli* NCTC 8003 (■)

La membrane devient donc perméable pendant le traitement par la pression mais elle récupère une partie de son intégrité par la suite. Une réduction du nombre de bactéries viables reste tout de même observable.

Les acides aminés des levures sont relargués du cytosol vers le milieu extracellulaire pour des pressions de 300 MPa et le relargage augmente avec la pression pour atteindre un maximum vers 600 MPa (où le relargage devient équivalent à un traitement par la chaleur à 100°C pendant 5 min) (29). Certaines études montrent aussi un relargage des protéines vers le milieu extracellulaire pour les souches les plus sensibles à la pression (16, 21, 29).

Il est également observé une inhibition de la capacité à réguler le flux d'ions et une fuite des ions métalliques : K^+ , Mn^{2+} , Ca^{2+} et Na^+ à partir de 300 MPa, Mg^{2+} et Zn^{2+} à partir de 400 MPa (29, 43).

L'analyse du potentiel membranaire de *Lysteria monocytogenes* montre que la membrane cellulaire est sujette à une dépolarisation proportionnelle à la pression appliquée (25). Cet effet serait dû à la transition de phase de la membrane.

Si peu d'altérations sont mises en évidence par microscopie électronique, de nombreux changements structurels sont observés sur les organelles intracellulaires de *Saccharomyces cerevisiae* : le noyau présente de nombreux pores ouverts et la morphologie des mitochondries et du cytoplasme sont modifiés par des traitements de 400 MPa. Ces modifications s'accompagnent de fuite des substances intracellulaires (29).

Sur les virus à enveloppe, le traitement par les hautes pressions induit une augmentation de l'exposition des sites hydrophobes à la surface persistant quelques heures après l'exposition. Une réduction du pouvoir infectieux des virus *Sindbis* et *Influenzae* a été mise en évidence après un traitement par compression (24).

3.3.1.3. Action sur les protéines et inactivations enzymatiques

La pression a aussi une influence sur les protéines et les enzymes, qu'elles soient membranaires ou non (14, 32). Pour les protéines membranaires, les hautes pressions modifient, dans un premier temps, l'assemblage des phospholipides plutôt que la conformation de l'association protéine - membrane. Les protéines membranaires sont affectées dans un second temps (29).

De nombreuses activités enzymatiques ont été étudiées, la plupart montrant des inhibitions enzymatiques dès les premières valeurs de pression appliquées. Mais, dans une certaine mesure, certaines réactions peuvent être activées par des hautes pressions modérées, puis inhibées par des pressions plus conséquentes (19, 50).

La mesure de l'activité d'hydrolase de la paroi cellulaire d'une souche de *Lactococcus lactis* indique que l'activité est similaire à 0,1, 200 et 300 MPa, qu'elle est plus importante à 100 MPa et qu'elle est réduite pour des valeurs comprises entre 400 et 800 MPa (figure 10) (21).

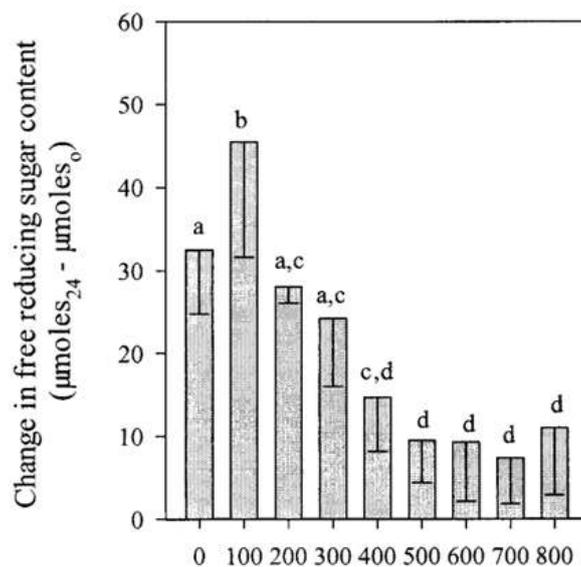


Figure 10 : Activité de l'hydrolase de la paroi cellulaire d'une souche de *L. lactis* traité par des pressions allant de 0,1 à 800 MPa (les valeurs avec la même lettre ne sont pas statistiquement différentes - $\alpha=0,05$) (21)

L'étude du cycle de Calvin-Benson (cycle de la photosynthèse) montre des résultats d'activation enzymatique à pressions modérées similaires pour de nombreuses réactions de ce cycle, certaines enzymes voyant leur activité augmentée tandis que quelques autres seront plus facilement inhibées (31).

Une technique largement employée pour mesurer l'activité enzymatique des bactéries est l'utilisation de certains sels de tétrazolium. Ils sont réduits par les cellules ayant une activité enzymatique normale en composés insolubles colorés. Lors du traitement par hautes pressions, l'activité métabolique d'une souche de *Lactobacillus plantarum* est grandement réduite. Elle décroît proportionnellement à la durée du traitement pour les faibles pressions (de l'ordre de 200 MPa). A plus fortes pressions (à partir de 400 MPa) une réduction rapide et importante de l'activité métabolique est observée. Toutefois, même lorsque le traitement tue plus de 99,99 % des cellules, une activité métabolique au dessus du niveau de base existe. La perte de l'activité métabolique n'explique donc pas, à elle seule, la mort cellulaire (27).

L'activité d'un transporteur (HorA), conférant une multirésistance à de nombreux composés pharmacologiques, peut être mesurée. En effet ce transporteur est responsable de l'efflux du bromure d'ethidium (BE). Ce transporteur est dépendant de l'énergie apportée par le milieu de culture à la cellule. En présence de glucose les cellules saines présentent une

faible concentration intracellulaire de BE tandis qu'en absence de glucose, le taux intracellulaire augmente (figure 11) (27).

Un traitement par la chaleur (à 80°C pendant 10 min) ainsi qu'un traitement par la pression (800 MPa pendant 10 min) d'une souche de *L. plantarum* montrent une augmentation de la concentration intracellulaire du BE (figure 12) traduisant une réduction de l'activité du transporteur HorA (27). Des résultats similaires sont obtenus par le traitement de *L. plantarum* à 200 MPa pour des durées de 5 à 120 min (48).

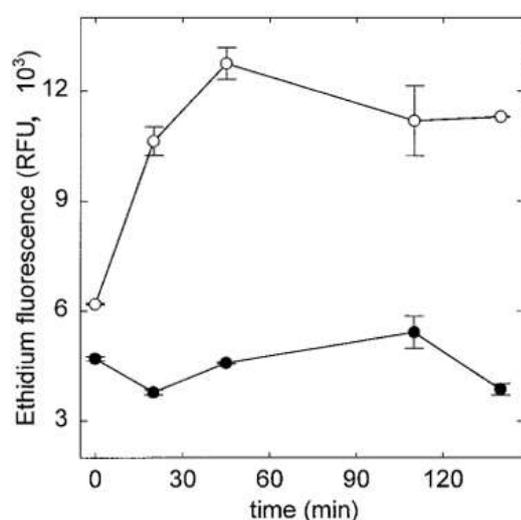


Figure 11 : Cinétique de diffusion du BE pour une souche de *L. plantarum* en présence (●) et en absence (○) de glucose (27).

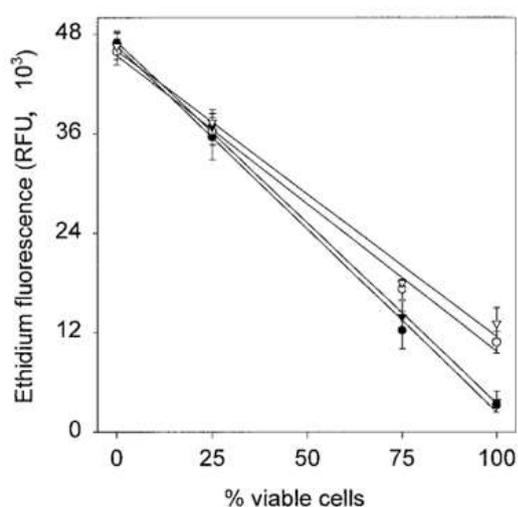


Figure 12 : Corrélation de la fluorescence du BE pour des échantillons de *L. plantarum* en présence (symboles noirs) et en absence (symboles creux) de glucose.

Echantillons préparés à partir du mélange de cellules non traitées (% viable cells) avec des cellules traitées par la chaleur (80°C, 10 min) (triangles) ou des cellules traitées par la pression (800 MPa, 10 min) (cercles) (27).

Les bactéries productrices d'acide lactique, ne contenant pas de chaîne de transport d'électron, ont un gradient de pH maintenu par une ATPase membranaire transporteuse de proton : la F₀F₁ ATPase. Sous l'action de la pression, la capacité du *L. plantarum* à maintenir un gradient de pH est perturbée et la concentration en ATP intracellulaire est augmentée (13). Une étude sur les pompes à proton de type H⁺-pyrophosphatase (30) des vacuoles de plantes révèle une inhibition par la pression de ces enzymes, inactivation en rapport avec la durée du traitement ainsi que la pression appliquée.

L'action de la pression sur l'exocytose des neuromédiateurs montre deux phases, la première immédiatement après l'augmentation de pression où le relargage est fortement inhibé, puis une seconde phase d'inhibition plus modérée. Lors de la décompression, un phénomène de surcompensation de l'exocytose est observable (33). Une inhibition de la transmission de l'influx nerveux due à un ralentissement de la dépolarisation et de la repolarisation est aussi observée dans les neurones d'*Helix pomatia* (34).

Un traitement par hautes pressions (100 MPa, 30°C pendant 30 minutes) sur *S. cerevisiae* dépolymérise les filaments d'actine et induit aussi la dénaturation d'une partie des monomères d'actine. Cela entraîne un retard de croissance de 3,5 heures pendant lequel *S. cerevisiae* synthétise de nouveaux monomères et élimine ceux dénaturés (67).

Après un traitement de 150 MPa pendant 10 minutes, la disparition des microtubules est observée pour *S. cerevisiae* et leur restauration n'intervient qu'au bout de 24 heures (67).

Mañas *et al.* (16) ont mis en évidence une agrégation des protéines cytoplasmiques d'*E. coli* sous l'effet de la pression. Sur les cellules en phase de croissance exponentielle, les agrégats de protéines sont présents de manière diffuse dans le cytoplasme mais préférentiellement à proximité de la membrane. Sur les cellules en phase stationnaire, les agrégats sont de taille plus importante. Ce phénomène d'agrégation est mis en évidence en présence d'isothiocyanate de fluorescéine (FITC, colorant fluorescent se liant spécifiquement aux protéines), il apparaît à partir de 200 MPa et ce phénomène n'est pas significativement modifié par l'application de pressions plus importantes (figure 13). Cet effet a lieu concomitamment à la fuite de protéines vers le milieu extracellulaire (tableau 4).

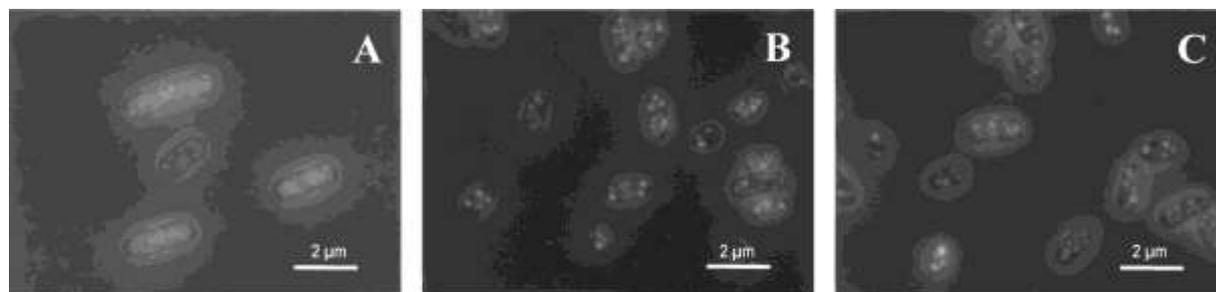


Figure 13 : Effet des hautes pressions sur la répartition des protéines d'*E. coli* (16).

(A) Cellules en phase de croissance exponentielle traitées à 200 MPa pendant 8 min (0,02% de cellules viables).

(B) Cellules en phase stationnaire traitées à 300 MPa pendant 8 min (73% de cellules viables).

(C) Cellules en phase stationnaire traitées à 600 MPa pendant 8 min (0,01% de cellules viables).

Phase	Milieu dosé	Protéine contenue (µg/ml) selon le traitement appliqué		
		Non traité	200 MPa	600 MPa
De croissance exponentielle	Milieu extracellulaire	0	37	N.D.
	Cellules	188	113	N.D.
Stationnaire	Milieu extracellulaire	0	3	12
	Cellules	192	129	115

N.D. : non déterminé

Tableau 4 : Teneur en protéine d'*E. coli* et du liquide de pression (milieu extracellulaire) pour des cellules en phase stationnaires ou exponentielle de croissance, non traité ou soumises à diverses pressions (16).

3.3.1.4. Actions sur le nucléoïde et la synthèse

De nombreuses études comparent l'efficacité des hautes pressions sur des cellules en phase stationnaire ou en phase de croissance exponentielle (16, 26, 28, 45). Toutes ont démontré une efficacité largement supérieure des hautes pressions sur les cellules en phase de croissance exponentielle (tableau 5 et figure 14).

Evénement	Pression d'apparition de l'évènement	
	Cellules en phase de croissance exponentielle	Cellules en phase stationnaire
Perte de la réponse osmotique	100 - 200 MPa	600 MPa (partiel)
Changements visibles sur la structure membranaire (invaginations, ampoules)	100 - 200 MPa	Non observés
Fuite d'ARN hors de la cellule	100 - 200 MPa	Non observée
Condensation du nucléoïde	100 - 200 MPa	100 - 200 MPa
Agrégation de protéines	100 - 200 MPa	100 - 200 MPa
Mort cellulaire (>90%)	100 - 200 MPa	500 - 600 MPa

Tableau 5 : Modifications morphologiques et physiologiques d'une souche *E. coli* exposée à différentes pressions pendant 8 min (16).

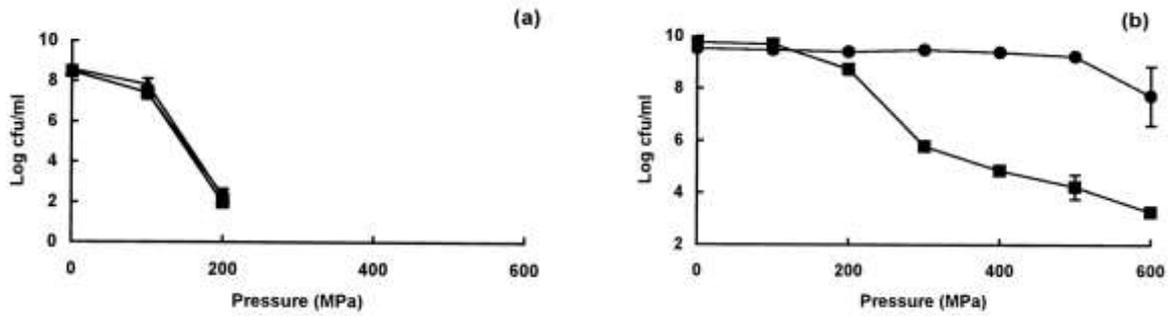


Figure 14 : Nombre de bactéries survivantes d'*E. coli* C9490 (●) et NCTC 8003 (■) en phase de croissance exponentielle (a) ou en phase stationnaire (b) soumises à différentes pressions pendant 8 min (28).

L'exploration de la répartition du nucléoïde dans le cytoplasme peut être réalisée à l'aide du 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, produit fluorescent s'intercalant dans les brins d'ADN). Les essais réalisés sur une souche d'*E. coli* montrent une répartition uniforme de la coloration pour les cellules non traitées, quelque soit la phase (figure 15 A et B). A partir de 100 MPa, on observe une condensation du nucléoïde pour les cellules en phase de croissance exponentielle. A partir de 200 MPa, les cellules en phase stationnaire présentent aussi une condensation, mais moins marquée (figure 15 B, C, D et E) (16). Des résultats similaires ont été obtenus sur une souche de *L. plantarum*, bactérie à Gram positif (13).

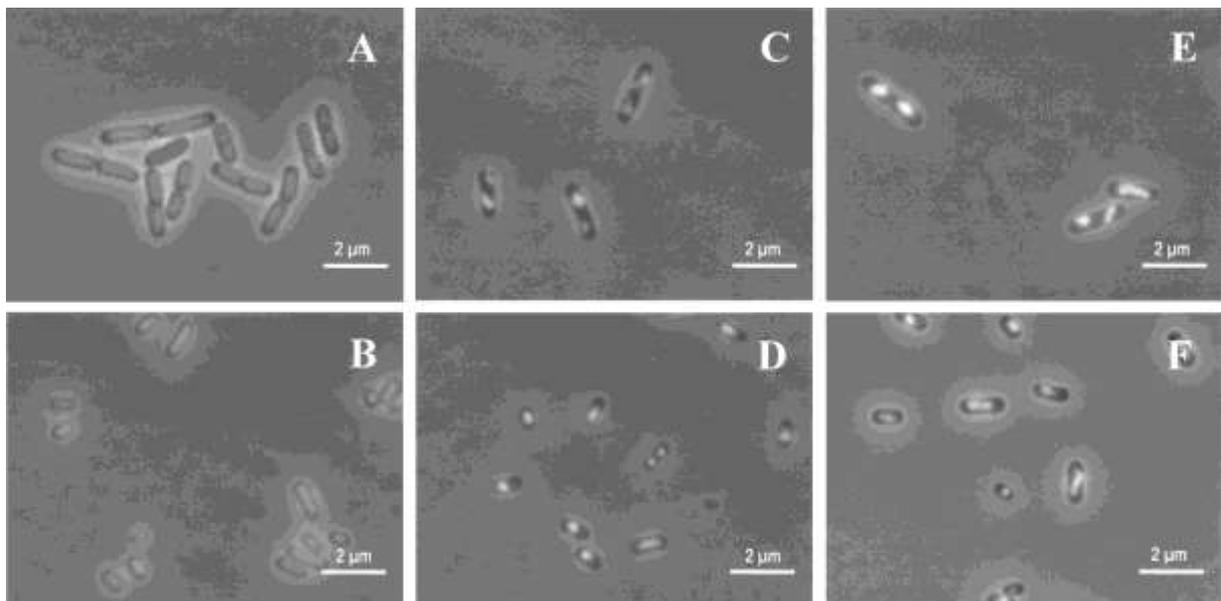


Figure 15 : Effet des hautes pressions sur la répartition du nucléoïde d'*E. coli* en phase exponentielle de croissance (A, C et E) ou en phase stationnaire (B, D et F) (16).

(A et B) non traités (100% de cellules viables pour les deux échantillons).

(C et D) traités à 300 MPa pendant 8 min (respectivement 0,002% et 73% de cellules viables).

(E et F) traités à 400 MPa pendant 8 min (respectivement 0,0001% et 61% de cellules viables).

Après 8 min à 400 MPa environ 60% des cellules en phase stationnaire sont encore viables, mais plus de 90% d'entre elles présentent une condensation du nucléoïde.

Erijman *et al.* ont montré que l'ARN polymérase (ARNp, complexe enzymatique responsable de la transcription) est inhibée à 150 MPa mais ceci de manière réversible dès l'arrêt du traitement. Bien qu'une inactivation irréversible de l'ARNp dans le complexe ternaire n'ait pas lieu à haute pression, la vitesse d'élongation devient plus lente. A partir d'une certaine pression l'enzyme peut être complètement arrêtée. Le complexe ternaire est extrêmement stable et n'a pu être inactivé de manière irréversible (46).

La répartition de l'ARN peut être mise en évidence avec l'acridine orange, se liant spécifiquement aux acides nucléiques simple et double brin en donnant une coloration spécifique rouge pour l'ARN et verte pour l'ADN. L'observation de la répartition de l'ARN pour *E. coli* met en évidence, pour les cellules en phase de croissance exponentielle, que le matériel teint en rouge a une apparence condensée. Il est aussi notable qu'une quantité importante de matériel teint en rouge est relargué dans le milieu extracellulaire (figure 16) (16).

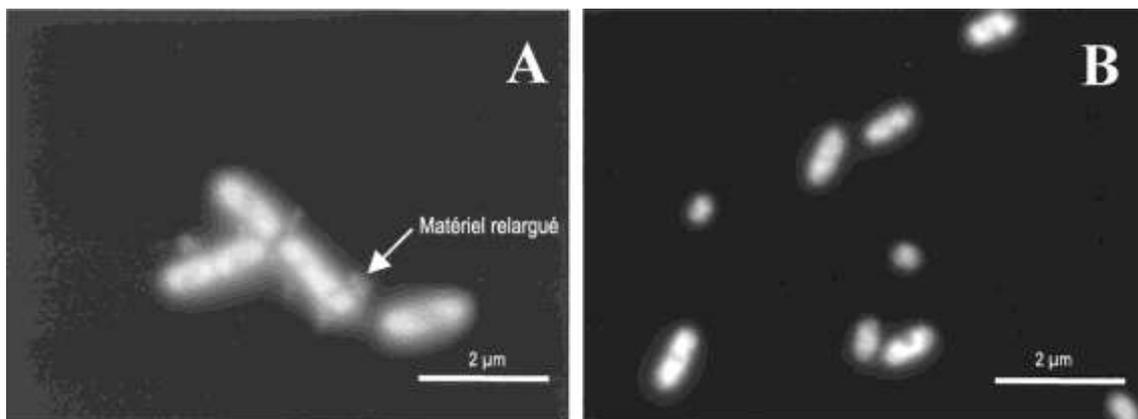


Figure 16 : Effet des hautes pressions sur la répartition de l'ARN d'*E. coli* (16).
(A) Cellules en phase de croissance exponentielle traitées à 200 MPa pendant 8 min (0,02% de cellules viables).
(B) Cellules en phase stationnaire traitées à 600 MPa pendant 8 min (0,01% de cellules viables).

L'analyse *in vitro* des effets de la pression sur les ribosomes montre une dissociation des sous-unités à partir de 60 MPa, les ribosomes non chargés (ne contenant ni ARNt, ni ARNm) sont plus particulièrement sensibles (44, 49). Une autre méthode employée afin d'observer les

effets de hautes pressions sur les ribosomes *in vivo* est l'analyse calorimétrique différentielle (17, 36). Les résultats montrent que le nombre de ribosomes intacts diminue après traitement et que les ribosomes restants adoptent une conformation moins stable (17, 36). La présence de Mg^{2+} a un effet stabilisateur vis-à-vis de la pression, et dans le cas de dégâts sublétaux, les cellules réparent les lésions engendrées (36).

3.3.2. Facteurs influençant l'efficacité de la compression sur les micro-organismes

De par leur diversité, les bactéries n'ont pas toutes la même sensibilité à la pression et les effets décrits précédemment peuvent apparaître pour différentes valeurs de traitement. Les protocoles de compression ainsi que le milieu ont aussi une influence.

3.3.2.1. Facteurs intrinsèques

Différentes études ont mis en évidence que les bactéries à Gram négatif sont généralement plus sensibles à la pression que les bactéries à Gram positif, des pressions de 300 MPa suffisant à inactiver les premières contre des pressions de l'ordre de 400-500 MPa pour les secondes (figure 19). La morphologie des bactéries a aussi un rôle important : les bacilles sont plus sensibles à la pression que les cocci (figure 17) (3, 5, 10).

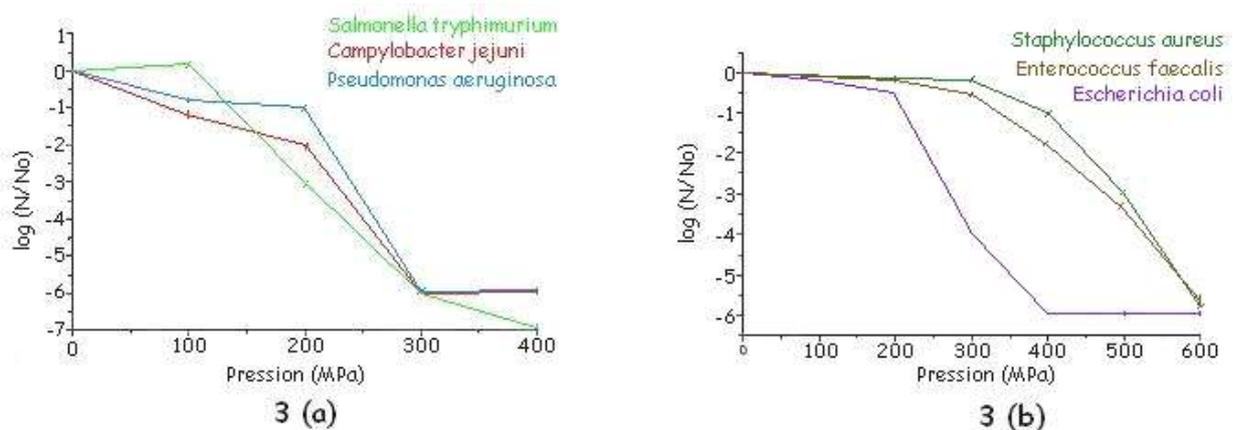


Figure 17 : Inactivation sous pression de *Campylobacter jejuni* (BG-), *Pseudomonas aeruginosa* (BG-) et *Salmonella typhimurium* (BG-) (a) et de *Escherichia coli* (BG-), *Staphylococcus aureus* (CG+) et *Enterococcus faecalis* (CG+) (b) dans la viande de porc (3).

BG- : bacille à Gram négatif ; CG+ : cocci à Gram positif

De plus la sensibilité aux hautes pressions peut fortement varier d'une souche à l'autre (15, 52, 53), voire même au sein d'une même souche (figure 18) (59). Certaines études rapportent même l'isolation de mutants acquérant une résistance à la pression (61, 62).

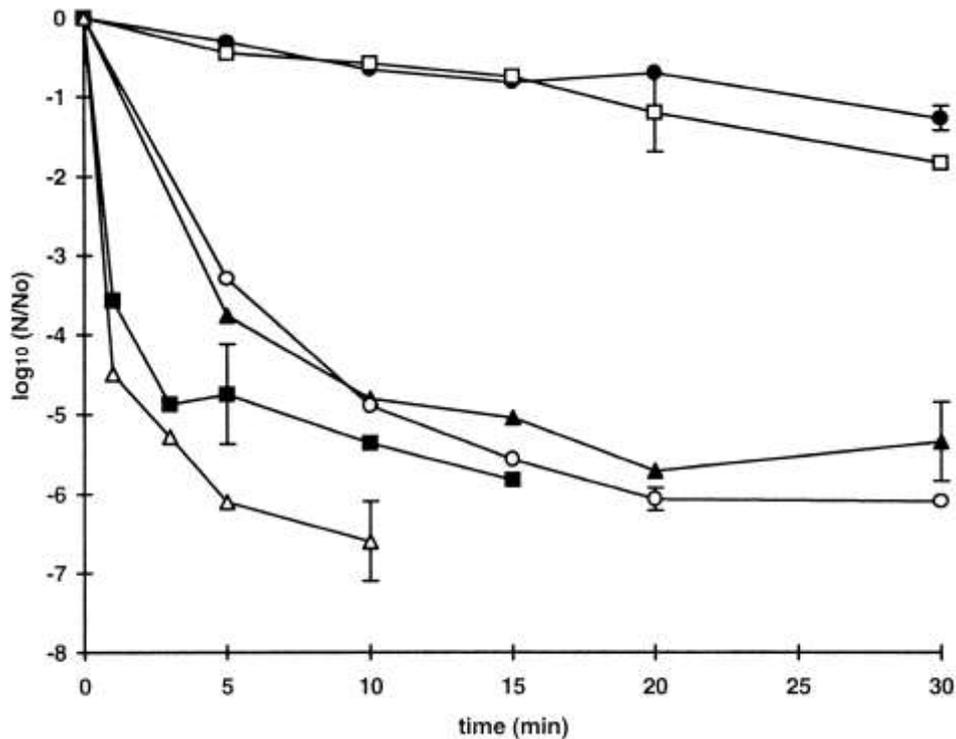


Figure 18 : Résistance à la pression de différentes souches d'*E. coli* en phase stationnaire traitées à 500 MPa (52). Les souches utilisées sont : *E. coli* O157 C9490 (●), 30-2C4 (□), NCTC 12079 (▲), W2-2 (○), et H1071 (■) et *E. coli* O124 NCTC 8003 (Δ).

L'étude de la pression sur l'expression des gènes d'une souche d'*E. coli* montre que soumis à une pression sublétale, cette dernière voit l'expression de plus de 100 gènes modifiés (dont 36 significativement, $p=0,05$). Certains subissent une régulation positive, d'autres une régulation négative (59). De nombreuses explorations restent à faire dans ce domaine afin de comprendre les mécanismes impliqués dans la barotolérance des micro-organismes.

Aertsen *et al.* mettent en évidence que des souches d'*E. coli* soumises à des pressions de 75 et 150 MPa induisent l'expression de gènes de résistance aux chocs thermiques. Cette expression est plus importante à 150 MPa qu'à 75 MPa, mais moins importante qu'après un choc thermique à 50°C. A 200 MPa, la majorité des cellules sont inactivées. De la même

manière, ils mettent en évidence que les cellules soumises à un choc thermique développent une résistance secondaire accrue aux hautes pressions (15).

En général, les levures et moisissures sont plus sensibles à la pression que les bactéries. Des pressions de l'ordre de 250 MPa suffisent à inactiver partiellement *Saccharomyces cerevisiae* et à induire une perte de réponse osmotique et une fuite de matériel cellulaire (43). Les virus sont généralement très sensibles aux pressions modérées (de l'ordre de 100 à 300 MPa) et l'inactivation de virus tels que le *simian immunodeficient virus* (SIV) ont été démontrés (66).

Les spores bactériennes sont très résistantes à la chaleur, aux radiations et aux traitements chimiques. Elles sont aussi moins sensibles à la pression que leurs formes végétatives. Les spores de *B. subtilis* peuvent survivre à des traitements de 1000 MPa pendant 40 minutes à une température inférieure à 10°C (55). Si le manteau joue un rôle important dans la résistance des sports aux agents environnementaux, il n'a pas d'importance dans la résistance aux hautes pressions (23). Avant leur inactivation, les spores subissent une modification physiologique, cette modification intervenant à partir d'un seuil de pression induisant leur germination (42).

Cette germination est fortement dépendante de la température. Elle est quasi nulle vers 10°C et fortement développée pour des températures de l'ordre de 40-50°C. De plus, la germination est plus efficace pour des pressions modérées (de l'ordre de 200-500MPa) plutôt que pour de fortes pressions (supérieures à 500 MPa) (42, 55). Il existe tout de même des spores superdormantes restant viables mais ne germinant pas après un traitement prolongé par compression.

Les spores germinant à de fortes pressions sont moins sensibles à une inactivation par la pression que les spores soumises à des pressions plus faibles. Différentes molécules interviennent dans ce phénomène (37).

L'acide pyridine-2,6-dicarboxylique (ou acide dipicolinique, DPA-Ca²⁺), est un acide associé à des cations bivalents, Ca²⁺ la plupart du temps. Le DPA joue un rôle de protecteur

de l'ADN vis-à-vis des radiations UV (37). Il induit aussi une meilleure résistance à la chaleur mais n'est pas impliqué dans la résistance aux hautes pressions (58).

Les petites protéines acides solubles de type α et β (α/β -SASPs) protègent l'ADN des spores des dégâts induits par la pression, les UV et les traitements chimiques (comme le peroxyde d'hydrogène). La dégradation des SASPs accompagne normalement la germination des spores (37).

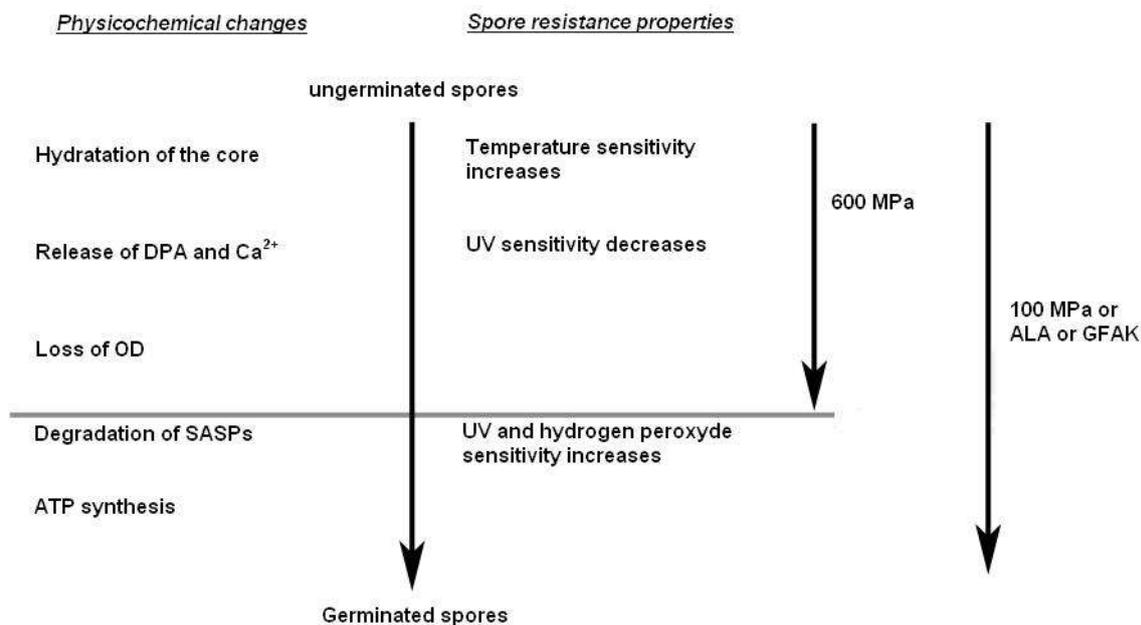
Lors de l'application de pressions modérées, la dégradation des SASPs est observée alors que pour un traitement à 600 MPa la dégradation des SASPs est fortement inhibée (37). Le DPA est relargué dans le milieu extérieur quelle que soit la pression (bien que le relargage soit plus important pour des faibles pressions) (23, 37, 56)

Paidhungat *et al.* mettent en évidence qu'une pression de 100 MPa induit la germination par activation des récepteurs du manteau de la spore, tandis que pour des pressions de 550 MPa il n'y a pas d'activation de ces récepteurs (23).

Elke *et al.* ont mis en évidence, pour des spores de *B. subtilis* dont la germination est induite à 100 ou 600 MPa :

- une sensibilité similaire à l'inactivation par la chaleur,
- une sensibilité légèrement supérieure aux UV pour les spores traitées à 100 MPa,
- une sensibilité supérieure au peroxyde d'hydrogène pour les spores traitées à 100 MPa.

Les spores soumises à de fortes pressions subissent donc une germination incomplète et conservent certaines propriétés de résistance (figure 19). Afin d'éliminer davantage de spores, un traitement par faible pression, suivi d'un autre plus fort, sera plus efficace que deux traitements successifs à fortes pressions (37).



**Figure 19 : schéma des événements intervenant durant la germination induite par des nutriments en comparaison à celles induites par différents traitements (37).
 OD : densité optique ; GFAK : glucose, fructose, asparagine et potassium.**

On observe aussi une synergie d'inactivation des spores par l'application simultanée d'un traitement par la pression et la température (18, 56, 57). Pour des pressions au-delà de 700 MPa, peu de germination est observable. Le mécanisme d'inactivation est donc différent, de grandes variations de résistance à la pression peuvent être observées et l'inactivation est due à des dégâts sublétaux. Les souches résistantes aux hautes pressions relarguent moins de DPA et sont plus résistantes à la chaleur (58). Pour des traitements à très fortes pressions (800 MPa et plus) et température (120°C) simultanés, un phénomène de stabilisation de certaines spores hautement résistantes à la pression est observé, induisant une résistance à la température, alors qu'un traitement à 120°C seul détruit suffisamment de spores pour passer sous le seuil de détection (57).

Les bactéries provenant des abysses possèdent une résistance accrue aux environnements extrêmes et peuvent résister à de fortes pressions. La comparaison de ces bactéries avec des micro-organismes se développant dans des conditions classiques montre plusieurs différences.

L'étude de onze espèces de bactéries des abysses a permis d'isoler la présence d'une grande quantité d'acides gras poly-insaturés à longue chaîne, leur quantité augmentant avec l'accroissement de pression du milieu d'habitat des bactéries concernées. De la même

manière, le ratio « acide gras insaturé total / acide gras saturé total » est augmenté. De plus, les bactéries provenant d'environnements extrêmes contiennent un certain nombre de lipides non usuels dans leurs membranes qui ne sont pas retrouvés dans les organismes adaptés à des conditions normales de survie (29).

Un autre facteur d'adaptation à ces hautes pressions peut se faire par la composition ribosomale. Pour *Pseudomonas bathycetes* (bactérie adaptée aux abysses) l'étude de cette composition montre qu'elle contient, de manière prédominante, des sous-unités 30S (qui sont plus résistantes à la pression), tandis qu'*E. coli* possède plus de 50S (29).

3.3.2.2. Facteurs extrinsèques

Les différentes études réalisées montrent que plus les pressions utilisées sont élevées, plus le nombre de bactéries détruites est important. Cet effet de destruction des bactéries par des pressions élevées est illustré figures 17 (a) et (b). Il en est de même pour la durée : plus la durée du traitement sous haute pression est longue et plus grand sera le nombre de bactéries détruites (figure 20). De plus, des effets destructeurs liés à une cinétique de décompression rapide sont mentionnés (3, 4).

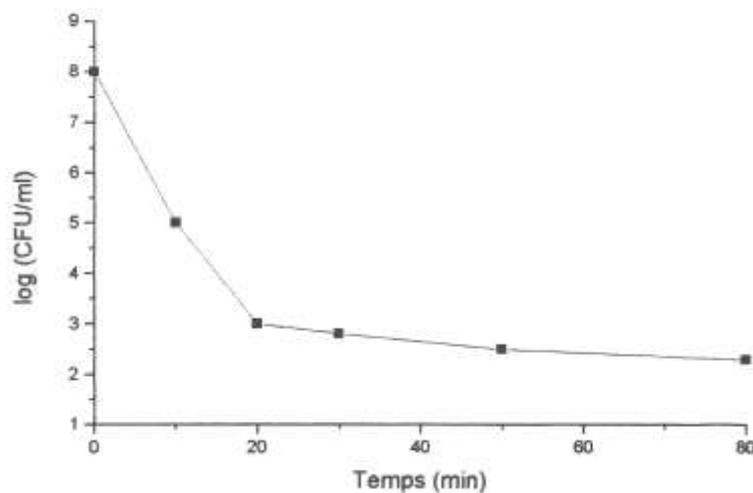


Figure 20 : Cinétique d'inactivation d'*Escherichia coli* sous 250 MPa à 20°C (3).

Il a également été prouvé que la température joue un rôle dans la destruction des bactéries : il existe une température optimale pour laquelle la souche est la plus résistante à la pression. D'après certaines recherches, il apparaît même que la température ambiante serait la

plus favorable à la résistance des micro-organismes à la pression (figure 21) (3, 5). Il y a une dépendance des hautes pressions à la température pour leur effet antimicrobien, l'augmentation de cette dernière permet d'améliorer l'inactivation bactérienne.

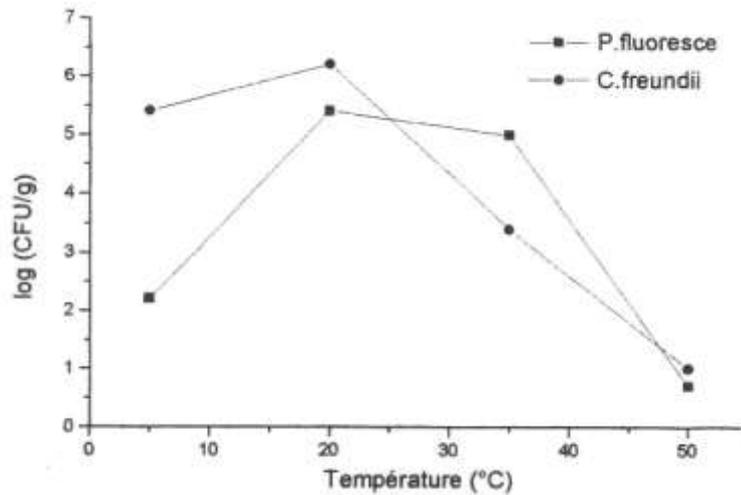


Figure 21 : Effet de la température sur l'inactivation, dans du bœuf haché, de *Pseudomonas fluorescens* sous 150 MPa et de *Citrobacter freundii* sous 200 MPa, durant 20 min (3).

Le cas des températures inférieures à 0°C est particulier. L'effet des basses pressions (jusqu'à 250 MPa) est renforcé par les basses températures, mais les fortes pressions (supérieures à 250 MPa) voient leur effet inhibé à basse température par rapport à la température ambiante (figure 22 et tableau 6) (12, 60).

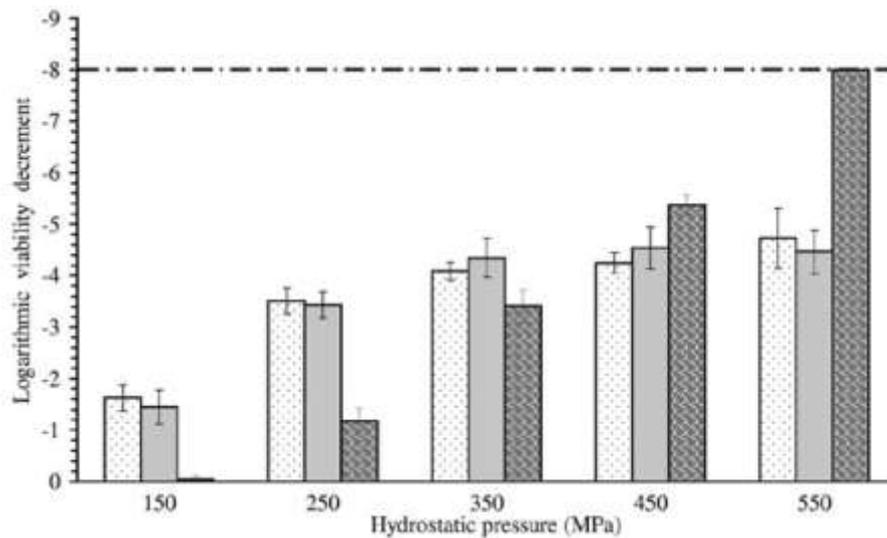


Figure 22 : Inactivation d'*E. coli* K-12TG1 après 10 minutes de traitement à différentes pressions à -20°C (◐), -10°C (◑) et +25°C (◒). La ligne pointillée indique la limite de détection de la méthode (60).

Conditions de traitement	% de cellules présentant :		% d'inactivation (\log_{10})
	une condensation du nucléoïde	une agrégation des protéines	
150 MPa, +25°C	10	01	08,80 (-0,04)
150 MPa, -20°C	78	45	97,66 (-1,63)
250MPa, +25°C	83	89	93,24 (-1,17)
250 MPa, -20°C	88	88	99,97 (-3,51)
350 MPa, +25°C	89	94	99,96 (-3,41)

Tableau 6 : Changements structurels d'*E. coli* K-12TG1 observés au TEM pour des cellules soumises à différents traitements pendant 10 minutes (60).

L'activité de l'eau (A_w) joue aussi un rôle dans l'inactivation microbienne. Elle se définit comme le rapport entre la pression de vapeur de l'eau d'un matériau et la pression de vapeur pure à la même température. Elle représente la disponibilité de l'eau dans le matériau, et non la teneur en eau (ou humidité).

Les micro-organismes ont besoin d'eau « libre » (disponible pour les réactions biochimiques) pour se développer. Plus l' A_w est élevé, plus la quantité d'eau libre est élevée (1 étant le maximum), plus les micro-organismes se développeront dans des conditions normales de pression et température. Une réduction de l'activité de l'eau augmente la résistance aux hautes pressions des micro-organismes (figure 23) (12).

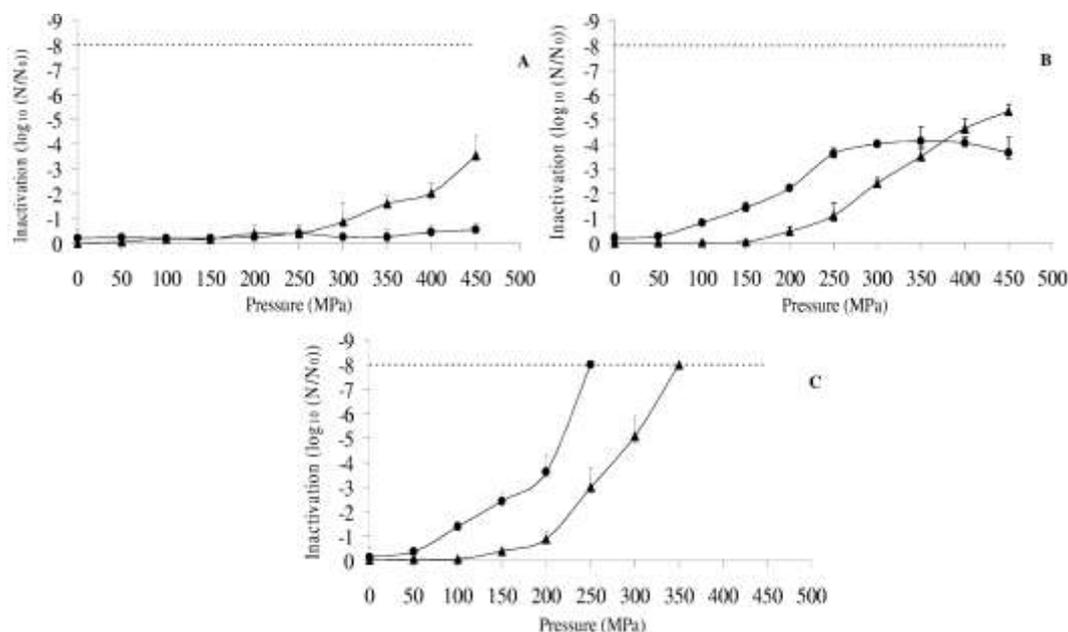


Figure 23 : Inactivation d'*E. coli* K-12TG1 par des traitements de 10 minutes à +25°C (▲) et à -20°C (●) à diverses pressions dans une suspension d'activité d'eau contrôlée (12) :
 (A) eau additionnée de glycérol ($A_w=0,850$).
 (B) milieu de culture standard ($A_w=0,992$).
 (C) eau distillée (A_w proche de 1).

Le pH du milieu influence l'efficacité de la réduction de la charge bactérienne. Un milieu acide est généralement décrit comme facilitant la destruction bactérienne (38, 63). Une étude montre qu'un prétraitement par les hautes pressions diminue la résistance d'*E. coli* inoculé en milieu acide par rapport à un milieu neutre (41).

Une étude réalisée sur *L. plantarum* montre que les cellules ayant eu une croissance en milieu acide sont plus résistantes à un traitement secondaire par la pression que celles cultivées en milieu neutre (13).

La composition en ions du milieu de compression influence l'efficacité du traitement, l'inactivation d'*E. coli* est accrue en présence de Cu^{2+} (dès 0,1 mmol/l), Zn^{2+} , Ni^{2+} ou Co^{2+} (à partir de 0,5 mmol/l). Au contraire, elle est réduite en présence de Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} ou Fe^{2+} (à 0,5 mmol/l). Cette protection n'est pas accrue par l'augmentation de la concentration en sels sauf pour Ca^{2+} qui a un effet protecteur dose dépendant (64).

4. Applications pratiques

Les hautes pressions sont utilisées dans de nombreux domaines de l'industrie, pour des finalités diverses. Elles sont parfois associées à d'autres paramètres physiques (température, atmosphère gazeuse ou utilisation de solvants) (3).

Ces applications sont entre autres :

- le frittage des métaux en poudre (100 à 500 MPa) très souvent suivi d'un traitement à chaud,
- la compaction (consolidation de poudres céramiques) à froid ou à chaud,
- la synthèse du diamant et du nitrure de bore (6 à 7 GPa et 1200 à 1400°C),
- le découpage par jet d'eau sous haute pression (360 MPa),
- la « stérilisation » agroalimentaire : l'utilisation des hautes pressions en agroalimentaire sert à la pascalisation de divers produits comme les jus de fruits, les confitures, les produits laitiers, les produits carnés et le poisson.

4.1. Intérêt en agroalimentaire

Le principal intérêt de l'utilisation des hautes pressions comme moyen de réduction de la charge microbienne alternatif à la température en agroalimentaire est la préservation des caractéristiques organoleptiques et de la teneur de certains éléments comme les vitamines dans les aliments.

En effet, les composés aromatiques appartiennent souvent au groupe chimique des esters, des aldéhydes ou des cétones : ce sont des molécules, qui, au même titre que les vitamines, ne font intervenir que des liaisons covalentes dans leur structure. Ils ne sont donc pas affectés par des traitements pascalisants réalisés par des hautes pressions à basse ou moyenne température (1, 3, 5, 6).

De plus, cela permet de prévenir la formation potentielle de produits toxiques due à une dégradation induite par la chaleur.

Les gels obtenus par pressurisation sont adhésifs et tendres ; leur dureté est inférieure aux gels obtenus par température, leur élasticité et leur adhérence sont supérieures. Par contre, leur adhérence diminue avec l'augmentation de pression (3).

4.2. Réglementation

La législation européenne sur les produits traités par hautes pressions dans l'industrie agro-alimentaire est basée sur le règlement CE 258/97, en vigueur depuis le 15 mai 1997. Il introduit, avant toute commercialisation, une autorisation de mise sur le marché (directives « *novel food* ») de nouveaux aliments ou ingrédients dans l'Union Européenne. Cette démarche est obligatoire pour l'ensemble des états membres (78).

Tout industriel doit constituer un dossier d'autorisation de mise sur le marché pour tout nouvel aliment suivant la recommandation du 27 Juillet 1997. Ce dossier comprend (78) :

- des données administratives,
- une description générale,

- des informations essentielles : spécification du nouvel aliment, effet du procédé de production, utilisation antérieure du produit de base pour le nouvel aliment, consommation et niveau d'utilisation prévus, informations d'ordre nutritionnel, microbiologique et toxicologique du nouvel aliment,

- une évaluation et une conclusion du demandeur : la conclusion doit dire si le nouvel aliment est substantiellement équivalent à l'aliment de référence et dans le cas contraire, les différences entre les deux. De plus, le demandeur doit proposer un contenu pour l'étiquetage,

- un résumé, destiné à être transmis aux états membres.

Cette législation contraignante retarde l'utilisation des procédés basés sur les hautes pressions en Europe.

Aux États-Unis, la réglementation est beaucoup plus favorable au développement de « nouveaux produits ». Les deux services responsables de l'autorisation de commercialisation du produit sont : la FDA (Food and Drug Administration) et la FSIS (Food Safety and Inspection Service). La FDA autorise la commercialisation mais décline toute responsabilité. L'industriel est seul responsable. Et la FSIS demande simplement que le traitement par hautes pressions soit capable de détruire *Listeria monocytogenes* dans les plats cuisinés ou dans les produits prêts à consommer à base de viande ou de volaille (78).

4.3. Utilisation des hautes pressions en agro-alimentaire à l'échelle mondiale

Quelques travaux pionniers de groupes américains peuvent être soulignés, mais c'est l'industrie japonaise qui développe le plus les méthodes de traitement agroalimentaire. Les industriels japonais sont d'ailleurs devenus leaders dans la réalisation d'équipements hautes pressions. En Europe, ce procédé se développe de plus en plus (1).

4.4. Applications aux jus de fruits

Les confitures et les jus de fruits furent les premiers produits ayant subi une inactivation bactérienne par la pression à être commercialisés. Leur pH acide facilite en effet la destruction des micro-organismes et empêche la germination des spores pendant leur conservation (3).

Grâce à l'utilisation de ce procédé, le goût du jus de fruit frais est préservé. Les hautes pressions (150-200 MPa pendant 10-15 min) présentent même l'avantage d'atténuer l'amertume du jus de pamplemousse (inhibition de la formation de limonine).

Un jus d'orange pressurisé à 400 MPa pendant 10 min à 40°C se conserve réfrigéré pendant 2 à 3 mois sans que sa teneur en vitamine C diminue (alors qu'un jus d'orange frais se conserve uniquement quelques heures). Une étude montre qu'il est possible de détruire les spores d'*Alicyclobacillus acidoterrestris* dans du jus de pomme en combinant un traitement par haute pression à des températures moyennes ou élevées (22).

4.5. Applications aux produits laitiers

Il a été montré que le traitement du lait par la pression à 460 MPa préserve le lait pendant 24h à température ambiante. De même une pression de 1400 MPa préserve le lait pour 4 jours. Un traitement combinant la pression isostatique et la chaleur permet d'augmenter la durée de conservation du lait (6, 9, 2).

Dans la production des fromages, le traitement par hautes pressions peut être utilisé à de diverses fins (3, 8, 9, 2). Il permet de :

- réduire la charge microbienne, ce qui est utile en particulier pour détruire les *Lysteria monocytogenes* : un traitement de 450 MPa pendant 10 min ou de 500 MPa pendant 5 min diminue de plus de 5,6 unités logarithmiques la proportion de *Lysteria monocytogenes* dans du fromage au lait de chèvre cru,
- préserver les qualités organoleptiques du fromage,
- préserver sa consistance.

Ces fromages frais pressurisés peuvent se conserver 60 jours à 3°C, sans croissance microbienne (7).

Des traitements sous hautes pressions sont également utilisés pour stabiliser les yaourts en empêchant leur acidification durant la conservation réfrigérée, tout en maintenant le nombre de bactéries lactiques à un niveau élevé ainsi que la texture (3).

4.6. Applications aux produits carnés

Le rôle des hautes pressions sur les produits carnés est de permettre de prolonger leur durée de conservation. Le produit peut être pascalisé dans son emballage sous vide ce qui permet de prolonger significativement sa durée de stockage réfrigéré. Des viandes ou du jambon cru ou cuit peuvent être traités par pascalisation.

Pour des pressions dépassant 150 MPa, on observe un changement de couleur de la viande crue qui tend vers l'apparence d'une viande cuite. Aucun changement d'apparence n'est observé pour une viande déjà cuite (5).

Pour des pressions inférieures à 200 MPa, les lysosomes se rompent et des activités autolytiques améliorent les propriétés tendres de la viande (5).

5. Intérêt médico-pharmaceutique potentiel

L'action sur la viabilité des micro-organismes soumis aux hautes pressions peut avoir un intérêt direct pour la transposition de ces utilisations dans les domaines médicaux et pharmaceutiques. Mais, d'autres propriétés des hautes pressions sur les molécules peuvent aussi présenter un intérêt dans ces domaines.

5.1. Dénaturation par la pression

Comme le chauffage, la pression peut dénaturer les protéines. La dénaturation due à la pression est un processus complexe dépendant de nombreux facteurs :

- la pression,
- le taux de compression,
- la durée d'exposition à la pression.

Des pressions inférieures à 300 MPa peuvent inactiver les enzymes mais ne pas causer de changements conformationnels dans la structure des protéines (20).

La formation et l'homogénéité des gels de protéine, des gels de polysaccharide, et des gels mixtes protéines-polysaccharides sous pression, est d'un grand intérêt pour les applications en cosmétologie et en pharmacie. Les gels obtenus par pression et les émulsions flocculées de protéines peuvent être utilisés pour leurs propriétés rhéologiques ou en tant que support pour la libération lente de composés actifs incorporés (20).

L'application de pressions autour de 200 MPa a été utilisée afin d'inverser l'agrégation de protéines mal repliées avec des corps d'inclusion, et d'augmenter les repliements corrects. Cela a été appliqué avec succès à des protéines recombinantes d'intérêt pharmaceutique (20).

5.2. Modifications chimiques de protéines et autres macromolécules

Les protéines peuvent être modifiées chimiquement sous la pression pour se lier à des groupes aromatiques. Cela conduit à des protéines facilement émulsifiables. Fait intéressant, la formation de mélanoidines brunâtres est inhibée par la pression. La réaction de Diels-Alder (addition d'un alcène à un diène conjugué pour former un dérivé de cyclohexène) peut être utilisée pour la modification chimique des protéines ou la bioimmobilisation sélective de protéines et de molécules biologiquement actives. Ces ajouts pourraient être utilisés comme des systèmes de délivrance de médicaments ou comme composants biologiques dans les biocapteurs (20).

Des modifications enzymatiques des protéines et des polysaccharides peuvent être réalisées sous pression. En particulier, la pression peut moduler l'activité spécifique de certaines enzymes telles que la protéase. La protéolyse partielle de protéines de lait a été appliquée pour accroître leur digestibilité (20).

5.3. Réactions chimiques catalysées par les enzymes

La synthèse de produits pharmaceutiques catalysés par des enzymes sous conditions modérées s'est révélée possible. En particulier, la synthèse énantiosélective des esters comme l'ibuprofène par estérification par les lipases (20) ou la production de peptides d'intérêt pharmacologiques par la thermolysine (65).

Pour cela, des enzymes dont la stabilité n'est pas affectée par des hautes pressions de faible intensité (de l'ordre de 300 MPa maximum) et dont l'activité est accrue à ces pressions sont utilisées (19).

La pression peut être utilisée pour catalyser des réactions enzymatiques ayant lieu naturellement dans des cellules de plantes. Par exemple, il a été montré que la pression favorise l'hydrolyse des glucosinolates des plantes crucifères en isothiocyanates bioactifs. C'est le cas du glucoraphanine qui sera converti en sulforaphane sous l'action de la myrosinase. Le sulforaphane possède des propriétés antitumorales et nématocides. Ces réactions peuvent être utilisées pour la production de nutraceutiques, utilisés dans des thérapies complémentaires (20).

Le traitement par la pression a prouvé qu'il pouvait réduire l'activité allergénique de certains aliments. Une des trois structures allergéniques connues du céleri est complètement détruit après un traitement de 600 MPa à 20°C. La compagnie Echigo-Seika a mis sur le marché depuis plusieurs années un riz hypoallergénique précuit. Ce procédé breveté applicable au riz pourrait également être utilisé pour le traitement du blé et de l'orge (20).

5.4. Gel et dégel assisté par pression et stockage à température inférieure à 0°C sans gel

Le diagramme de transition de phase de l'eau montre que l'eau reste à l'état liquide jusqu'à -20°C à une pression de 200 MPa. Plusieurs applications de l'effet des hautes pressions sur la transition de phase de l'eau sont actuellement en cours de développement dans la technologie alimentaire et plus récemment pour les applications possibles pour la préservation de produits biopharmaceutiques comme les produits dérivés du sang ou les cellules et organes destinés à la transplantation. Une étude de 1960 a montré que le dégel assisté par pression pourrait améliorer le taux de survie de conjonctive humaine et des cellules de peau de poussin congelées lentement (20).

L'induction de la congélation d'un produit refroidi à une température de -10°C à -20°C sous une pression de 100 MPa à 400 MPa est instantanée lorsque la pression est relâchée. Moins de dommages structurels sont observés pour les produits congelés à l'aide de la pression que pour ceux congelés à -30 ° C à l'air ou à l'azote liquide à la pression atmosphérique. Cette technique a été utilisée pour la cryo-fixation d'échantillons pour la microscopie électronique. Cela pourrait sans doute permettre la congélation de produits biopharmaceutiques fragiles sans dommage (20).

Cela permet aussi de maintenir des produits à basse température sans former de gel à conditions de les maintenir sous pression (20).

5.5. Inactivation d'agents biologiques

L'action combinée des hautes pressions associée à des températures modérées peut être utilisée afin de stériliser des produits sensibles à la chaleur, des liposomes, des cosmétiques et même de petits outils endoscopiques ou chirurgicaux (20). Les spores bactériennes sont très résistantes à la pression. Leur inactivation peut être obtenue par l'association à un traitement par la chaleur, chimique et/ou par l'association de multiples cycles de pression (37).

Rigaldie (79) a étudié les effets des hautes pressions sur les molécules thérapeutiques fragiles particulièrement sensibles à la chaleur. Il a démontré qu'aucune altération de la

structure chimique n'est observable par traitement jusqu'à 500 MPa (10 minutes à température ambiante) de l'insuline de l'héparine et d'anticorps. Pour les anticorps monoclonaux une première altération irréversible s'observe à partir de 600 MPa. Il a de plus démontré une efficacité destructrice de ces hautes pressions pour des pressions allant jusqu'à 500 MPa en solution aqueuse. Des méthodes de stérilisation de ces molécules en solution aqueuse peuvent donc être envisagées (79,81).

Brigger *et al.* ont étudié les effets des hautes pressions sur les nanosphères et les nanocapsules obtenues à partir de divers polymères par nanopréciipitation ou par émulsion/évaporation de solvant. Après traitement par diverses pressions (200-500 MPa, 10-30 minutes, $26^{\circ}\text{C}\pm 3$) les analyses ont montré que la structure chimique reste inchangée. Ils ont aussi démontré une réduction de la charge bactérienne dans une suspension de nanosphères (80,81).

Des applications sont envisagées pour l'inactivation des virus dans les composés biologiques, la stérilisation des matériels biologiques, du sang, et des outils. Le recours aux hautes pressions afin de réduire la concentration de virus dans le sang des patients souffrant de graves infections virales comme le sida par traitement du sang par la pression *ex vivo* a aussi été proposé (20).

Les agents non conventionnels, c'est-à-dire, les isoformes mal repliées de protéines prion (PrPc), sont très stables. Ils peuvent résister à un traitement à 160°C pendant 24 heures. Toutefois, les résultats préliminaires ont montré que la protéine du prion responsable de l'encéphalopathie spongiforme du hamster syrien peut être inactivée par des pressions supérieures à 500 MPa (Cléry, Masson, Dormont, données non publiées, 2000). Toutefois, l'intégralité et la sécurité de l'inactivation des protéines prion nécessiteraient probablement l'application de pressions supérieures à 1000 MPa (20).

5.6. Développement de vaccins

Le dépliement des protéines induit par les hautes pressions démasque les sites antigéniques et peut accroître les propriétés immunogènes des protéines traitées, des virus ou des micro-organismes tués. L'inactivation du virus de la fièvre de la vallée du Grand Rift (RVFV) à 275 MPa et 25°C pendant 30 minutes montre que la capacité immunogénique des particules virales obtenues par la pression est plus élevée que celle obtenue pour les virus traités au formaldéhyde (20).

6. Conclusion

De par ses effets sur les molécules chimiques et les organelles, l'application des hautes pressions pour l'inactivation microbienne est une technique largement utilisée dans certains domaines agroalimentaires. De plus, les hautes pressions présentent de nombreux champs d'actions potentiels médico-pharmaceutiques, dérivés de ses propriétés.

De nombreuses études relatent les effets des hautes pressions sur les micro-organismes ce qui tend à appuyer l'intérêt de l'évaluation de l'inactivation bactérienne d'un matériau phosphocalcique pour comblement osseux.

GENERALITES SUR LES MATERIAUX PHOSPHOCALCIQUES

Lors de défauts osseux importants ou lorsque les capacités de régénération osseuse sont réduites, une substitution osseuse peut s'avérer utile. Les greffes osseuses possèdent de nombreuses limites, de quantités dans les cas des autogreffes, de rejet et de transmission de pathologie dans le cas des allogreffes et xéno-greffes. Des substituts de synthèse ont donc été développés afin de pallier à ces inconvénients.

Les substituts osseux à base de phosphate de calcium sont employés depuis de nombreuses années. Pour cela, deux types de matériau ont été développés, les céramiques et les substituts osseux injectables.

Plusieurs paramètres physicochimiques caractérisent ces substituts osseux phosphocalciques :

- Le rapport des proportions de calcium sur celles du phosphore (Ca/P) il est lié aux matériaux utilisés dans la fabrication du substitut osseux.
- Dans le cas d'une céramique composée d'hydroxyapatite (HA) et de phosphate tricalcique β (β -TCP), le rapport HA/ β -TCP.
- La porosité de la céramique, elle sera fonction du procédé de fabrication du substitut.
- La surface spécifique.

Tous ces substituts possèdent des propriétés biologiques fondamentales de biocompatibilité, de bioactivité, d'ostéoconduction et de biofonctionnalité dépendant de leur composition (74, 75, 76).

1. Les propriétés physicochimiques

Le β -TCP étant plus soluble que l'hydroxyapatite, le rapport HA/ β -TCP est inversement proportionnel au taux de dissolution de la céramique et donc à sa résorption. Plus ce rapport est élevé moins le substitut osseux sera soluble, mais ce paramètre est nuancé par la surface spécifique du substitut, une faible valeur de surface spécifique réduisant la vitesse de dissolution tandis qu'une valeur plus importante la favorisera (74).

Le rapport Ca/P indique si la structure minérale est proche de l'os (ce rapport est de 1,71 pour l'os).

La porosité reflète les propriétés de résistance mécanique et d'ostéoconduction du matériau. Elle se compose de deux types de pores :

- La microporosité : elle correspond aux pores existant entre les cristaux de phosphate de calcium, leur diamètre est inférieur à 10 μm . Cette microporosité est déterminée par la température de frittage du matériau et intervient dans les phénomènes d'échange ioniques et humoraux (73).

- La macroporosité : elle correspond à des pores dont le diamètre est supérieur à 100 μm . elle est produite par l'addition de porogène (naphtalène, sucre, peroxyde d'hydrogène, billes de polymère, fibres...) lors de la synthèse de la biocéramique. Elle est un facteur déterminant pour l'invasion vasculaire et la colonisation cellulaire ainsi que dans la résistance de l'implant (73).

La surface spécifique est dépendante de la porosité, elle s'exprime en m^2/g . Elle traduit la surface d'échange potentielle du substitut osseux avec les fluides environnants. Plus ce rapport est élevé plus la surface d'échange est importante et plus la vitesse de résorption est grande.

2. Les propriétés biologiques

2.1. La biocompatibilité

C'est la capacité d'un matériau à induire une réponse appropriée de l'hôte dans une application spécifique. La biocompatibilité intègre l'ensemble des phénomènes mis en jeu dans un environnement biologique : absence de toxicité du matériau pour l'organisme et dégradation contrôlée du matériau par l'organisme. Ainsi biocompatible signifie d'une part que le matériau n'est pas à l'origine de phénomènes locaux ou systémiques néfastes pour la santé du receveur (toxicité, carcinogénicité) et d'autre part que les tissus du receveur et les fluides physiologiques ne sont pas susceptibles d'altérer le matériau au détriment de ses qualités intrinsèques ou au risque de générer des produits de dégradation toxiques.

2.2. La bioactivité

C'est la capacité d'échange entre la céramique et les tissus vivants environnants, sa capacité à induire des réactions biochimiques spécifiques, à être biodégradable et donc à terme être substituée par un os néoformé. Elle n'implique pas l'existence d'une ostéoconduction (74, 75, 76).

2.3. L'ostéoconduction

C'est la capacité passive du matériau à favoriser l'ostéogénèse par invasion vasculaire et cellulaire à partir du tissu osseux au contact de ce matériau. Elle est conditionnée par la porosité de la céramique (micro et macroporosité).

La macroporosité (présence de pores de 100 à 200 μm de diamètre) est indispensable pour la colonisation osseuse du substitut. Pour des céramiques ayant des macroporosités différentes, la pénétration des fluides biologiques, la résorption osseuse et la colonisation cellulaire vont être différentes (72).

2.4. La biofonctionnalité

C'est l'aptitude du matériau à répondre à la fonction pour laquelle il est mis en place. Généralement les céramiques osseuses sont mises en place pour combler un défaut osseux ou pour aboutir à une fusion osseuse entre deux berges. Elles doivent initialement présenter des propriétés mécaniques suffisantes pour conserver leur macrostructure pendant la phase de « réhabilitation osseuse ». Il est donc nécessaire d'optimiser les propriétés mécaniques initiales tout en conservant le potentiel ostéoconducteur lié aux macropores (72, 74, 76).

3. Les céramiques

Les principaux matériaux phosphocalciques utilisés en substitution osseuse sont :

- l'hydroxyapatite (HA),
- le phosphate tricalcique β (β -TCP),
- les phosphates de calcium biphasé (BCP) composés d'un mélange d'HA et de β -TCP en proportions variables.

Ces matériaux sont disponibles sous de nombreuses formes galéniques (poudre, granules, blocs) ou anatomiques (coins d'ostéotomie, inserts de cages intervertébrales) avec des caractéristiques structurales variables en fonction de leur application finale (73).

3.1. L'hydroxyapatite

La formule chimique de l'hydroxyapatite est : $(\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2)$ (76). Le terme « apatite » définit une famille de solides ioniques cristallisant dans le système hexagonal. L'une des principales caractéristiques de la structure apatitique est d'admettre un grand nombre de substitutions qui laissent inchangées la structure cristallographique, l'ion Ca^{2+} pouvant indifféremment être remplacé par un ion trivalent, bivalent, monovalent ou par une lacune, de même que les anions associés (76, 77).

Si elle est en proportions stoechiométriques (pas de lacunes, et uniquement composée d'ions Ca^{2+}), elle possède un rapport Ca/P (1,67) légèrement inférieur à celui du minéral

osseux (1,71), ce qui la rend peu soluble et donc faiblement dégradable *in vivo*. En contrepartie elle possède de bonnes propriétés mécaniques et une structure très proche de celle de l'os ce qui favorise l'ostéoconduction (73, 76, 77). La solubilité de l'HA sera d'autant plus augmentée que l'on s'éloigne des proportions stoechiométriques (77).

3.2. Le phosphate tricalcique β

Le β -TCP ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) est obtenu par chauffage à 900°C du phosphate tricalcique apatitique ou de mélanges ayant le bon rapport Ca/P. Il cristallise dans le système rhomboédrique (l' α -TCP possède une symétrie hexagonale). Il possède un ratio Ca/P de 1,5 ce qui le rend plus soluble que l'HA et permet une meilleur biodégradation *in vivo* (73, 76, 77).

Cette solubilité particulière participe également à l'augmentation locale des concentrations en ion calcium et phosphate ce qui induit (73) :

- une plus faible activité ostéoclasique,
- le recrutement de cellules ostéoprogénitrices (donc, une stimulation du remodelage osseux),
- la précipitation d'une apatite carbonatée à la surface du matériau favorisant la minéralisation de la matrice extracellulaire.

3.3. Les phosphate de calcium biphasé

Les BCP sont obtenus à partir d'un mélange d'HA et de β -TCP. Leur rapport Ca/P varie entre 1,5 (β -TCP) et 1,67 (HA en conditions stoechiométriques). La vitesse de résorption peut être modulée selon les quantités de chaque fraction.

Trois méthodes de mise au point des BCP peuvent être utilisées :

- La première par frittage soit d'un mélange à sec de poudres pures d'HA et de β -TCP en proportions désirées, soit d'un mélange de sels de calcium et de sels de phosphate (76).
- La seconde consiste à synthétiser une apatite déficiente en calcium (CDA), cette CDA pouvant ensuite subir un frittage à 900°C pour donner un BCP (76).

- Une troisième méthode consiste à effectuer un séchage lent à température ambiante ou à froid de la CDA. Pour cette dernière méthode, la céramique obtenue sera composée d'apatite non stoechiométrique (déficiente en calcium) (77).

L'ajout de porogène peut être effectué avant frittage pour améliorer la porosité de la BCP. La mise en forme pièces de la CDA peut être réalisée par une compaction à froid à l'aide d'une presse uniaxiale ou isostatique (76).

Ces céramiques présentent l'intérêt d'allier les avantages de l'HA (bonne ostéoconduction) à ceux du β -TCP (bonne biodégradation) selon les proportions souhaitées. Les inconvénients majeurs restent la fragilité et la faible résistance mécanique (73, 77)

La méthode de céramisation à froid permet d'obtenir une céramique à base d'apatite non stoechiométrique (déficiente en calcium) à laquelle il sera possible d'associer des agents thérapeutiques (antibiotiques, facteurs de croissance osseuse...) ou même certains polymères ou plastifiants pour réaliser des matériaux composites (77).

La synthèse de la CDA peut être effectuée de différentes manières en milieux aqueux.

3.3.1. Décomposition / précipitation

Cette méthode est la plus courante. Elle s'effectue en milieu basique par décomposition / précipitation de précurseurs de calcium et de phosphate à des températures comprises entre 37 et 100°C (76).

3.3.2. Hydrolyse

Cette méthode est basée sur le fait que l'HA est la phase phosphocalcique la plus stable dans un milieu ayant un pH supérieur à 4,5. Tout orthophosphate de calcium, mis en suspension dans une solution maintenue à un pH au dessus de 4,5, s'hydrolysera en HA (76).

La formation de ces CDA dépend du pH de la solution, de la température de réaction, ainsi que des espèces ioniques présentes en solution. Il a été ainsi prouvé que la présence

d'ions Mg^{2+} favorise l'hydrolyse du phosphate dicalcique dihydraté en β -TCP substitué par du magnésium au détriment de l'HA (76).

3.3.3. Voie sol-gel

Des BCP de rapport Ca/P variable peuvent être synthétisés par voie sol-gel. Cette réaction a souvent lieu dans une solution d'éthanol. Les alkoxydes sont fréquemment utilisés comme précurseurs de calcium et de phosphore. Après hydrolyse, il y a précipitation d'un phosphate de calcium amorphe, de rapport Ca/P contrôlé (76).

4. Les substituts osseux injectables

4.1. Les ciments ioniques

Les ciments ioniques sont des pâtes phosphocalciques composées d'une phase aqueuse et d'une phase solide (une poudre de céramique phosphocalcique). Ces deux phases sont mélangées juste avant l'implantation. Après mélange, les phosphates de calcium sont dissous et précipitent en éléments moins solubles. Durant cette réaction de précipitation, les cristaux phosphocalciques grossissent et s'entremêlent, donnant une certaine rigidité au ciment. Ce phénomène de durcissement est non exothermique.

Le produit final possède une résistance mécanique correcte. Ces matériaux sont bioactifs et résorbables, mais l'absence de macroporosité entraîne une résorption uniquement superficielle du matériau et une absence de colonisation cellulaire (73, 75, 77).

4.2. Le substitut phosphocalcique injectable

Ce substitut est basé sur le mélange de particules de BCP avec un gel vecteur d'hydroxypropylmethylcellulose (HPMC). Des résultats expérimentaux chez le lapin montrent une repousse osseuse équivalente à celle obtenue avec des blocs de BCP.

Ces résultats peuvent s'expliquer par les espaces inter-grains créés par le gel qui favorisent l'ostéoconduction. La taille des grains de céramique est également un facteur déterminant (73).

Après injection, le matériau reste visqueux *in situ*, ce produit ne dispose donc pas de propriétés mécaniques (75).

EXPERIMENTATIONS

1. Problématique

L'objectif de ces expérimentations est de déterminer si l'étape de compression isostatique de préparation de l'apatite déficiente en calcium (CDA = calcium deficient apatite), diminue le taux de contamination microbienne.

Cette hypothèse s'appuie sur le fait que la compression isostatique permet d'infliger aux micro-organismes de nombreux dégâts en différents points. C'est une méthode d'inactivation bactérienne couramment utilisée dans divers secteurs de l'agroalimentaire dans certains pays, bien qu'en France, du fait de la législation, cette technique connaisse un essor moins important dans ce domaine.

Ceci permettrait de simplifier l'étape de stérilisation du matériau de comblement osseux et du vecteur chargé en agent thérapeutique. En effet, le projet actuel consiste à associer la CDA à de la calcitonine dans l'objectif de traiter des tumeurs osseuses à cellules géantes. Or la calcitonine est sensible à la température tandis que le gel d'hydroxy propyl méthyl cellulose (HPMC) est sensible aux radiations gamma. Il en résulte que ces deux méthodes ne peuvent être utilisées pour la stérilisation du produit. Si la compression isostatique permettait une réduction de charge microbienne, le matériau phosphocalcique pourrait être préparé et associé stérilement à de la calcitonine, le gel d'HPMC serait stérilisé à part et le chirurgien, lors de l'opération, assurerait la reconstitution du produit.

Le produit final étant destiné à être implanté, les normes microbiologiques sont très strictes afin de limiter tout risque lors de l'utilisation ultérieure. La réduction de la charge microbienne devra donc être bien plus importante que pour une application agroalimentaire.

Pour cela différentes expérimentations sont mises en œuvre afin de mettre en évidence une inactivation microbienne sur la CDA par la compression isostatique. Pour cela, la mise au point d'une méthode afin d'évaluer la réduction de la charge bactérienne ainsi que la détermination de la sensibilité de cette méthode sont nécessaires. Afin de mettre plus aisément

au point une méthode, la poudre de CDA est contaminée artificiellement avec une souche déterminée ; il est nécessaire de s'assurer, dans un premier temps, de l'innocuité de la poudre de CDA vis-à-vis de la bactérie sélectionnée pour la contamination. Puis, une évaluation de l'efficacité de réduction de la charge bactérienne de la méthode mise au point, ainsi qu'une détermination de la charge bactérienne initialement présente dans la poudre non contaminée sont effectuées. Enfin d'autres protocoles de compressions sont étudiés afin de déterminer leur influence sur l'efficacité de la réduction de la charge bactérienne et d'améliorer la réduction de cette charge.

Ces expérimentations font l'objet de la rédaction d'un article (encore soumis à acceptation de publication) présenté après les expérimentations.

2. Matériel utilisé

2.1. Appareillage utilisé pour l'expérimentation

L'appareillage utilisé pour cette expérimentation est une « presse isostatique 150MPa, N° FF558, Nova Swiss ». Il est situé au LIOAD, UMR Inserm 791.



Figure 24 : presse isostatique 150MPa, N° FF558, Nova Swiss.

C'est un appareil à compression indirecte : l'enceinte de pressurisation est un cylindre de 90 mm de diamètre pour 250 mm de longueur, soit un volume de $6,36 \text{ dm}^3$. Le fluide de compression utilisé est de l'eau osmosée.



Figure 25 : Enceinte de compression.

Deux paramètres sont modulables sur cet appareil :

- la pression dans l'enceinte de compression, qui peut être augmentée jusqu'à 150MPa (palier maximal),
- le temps du palier maximal.

Il est impossible de programmer la montée et la descente en pression, ni la température de l'enceinte (celle-ci reste à température ambiante).

2.2. L'apatite déficiente en calcium (CDA)

L'apatite déficiente en calcium (CDA = Calcium deficient apatite) utilisée dans cette étude est obtenue par hydrolyse du phosphate dicalcique dihydraté en solution ammoniacale pendant 5 heures.

Après lavage à l'eau déminéralisée, la poudre est séchée à l'étuve à 50°C jusqu'à poids constant.

La caractérisation physico-chimique de la CDA utilisée est effectuée par diffraction des rayons X et spectrophotométrie infrarouge.

Pour le lot utilisé dans cette expérimentation (CDA lot 5, fabrication : 13/01/03) les analyses indiquent les résultats suivants :

- Analyse par diffraction des rayons X :

Rapport Hydroxy apatite (HA)/Phosphate tricalcique β (β TCP)= 16,2/83,8

Ratio Ca/P = 1,53

- Analyse par spectrophotométrie infrarouge :

Absence de pyrophosphates.

Ces résultats sont conformes aux spécifications requises pour une bonne utilisation de ce matériau.



Figure 26 : CDA après compression isostatique.

2.3. Les bactéries

Les différents germes utilisés pour contaminer la CDA au cours des manipulations sont :

- Une souche de *Staphylococcus aureus* ATCC (American type culture collection) 25923 sensible à la méticilline et possédant une pénicillinase (SASM).
- Une souche de *Staphylococcus aureus* P9 résistant à la méticilline et sensible à la gentamycine et l'érythromycine (SARM).

2.4. Les milieux de culture

Divers milieux de culture sont utilisés au cours des manipulations.

2.4.1. Gélose de soja tryptique (TS)

Cette base sert de milieu universel et permet le développement de la plupart des micro-organismes.

Informations générales :

- Marque : Difco, Le-Pont-de-Claix, France.
- Références : 236950.
- Lot n° : 1331008.

Composition approximative par litre d'eau :

- Tryptone peptone, digestion pancréatique de caséine 15,0 g
- Soytone peptone, digestion papaïque de farine de soja 5,0 g
- Chlorure de sodium 5,0 g
- Gélose 15,0 g

2.4.2. Gélose Mueller-Hinton (MH)

Cette gélose est un milieu solide de référence utilisée pour l'étude de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques.

Informations générales :

- Marque : Difco, Le-Pont-de-Claix, France.
- Références : 225250.
- Lot n° : 1303004.

Composition approximative par litre d'eau :

- Viande de bœuf, infusion..... 300,0 g
- Casamino acides, techniques..... 17,5 g
- Amidon 1,5 g
- Gélose 17,5 g

2.4.3. Infusion de cœur cervelle (BCC)

Ce milieu liquide permet de cultiver des micro-organismes exigeants, notamment les streptocoques, les pneumocoques et les méningocoques. Il permet d'obtenir des suspensions bactériennes.

Informations générales :

- Marque : Difco, Le-Pont-de-Claix, France.
- Références : 237500.
- Lot n° : 1212004.

Composition approximative par litre d'eau :

- Cerveau de veau, infusion..... 200,0 g
- Cœur de bœuf, infusion 250,0 g
- Peptone de protéose..... 10,0 g
- Dextrose 2,0 g
- Chlorure de sodium 5,0 g
- Phosphate disodique 15,0 g

2.4.4. Bouillon Mueller-Hinton (BMH)

Ce bouillon de référence est utilisé pour l'étude de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques.

Informations générales :

- Marque : Difco, Le-Pont-de-Claix, France.
- Références : 237500.
- Lot n° : 1212004.

Composition approximative par litre d'eau :

- Cerveau de veau, infusion.....	200,0 g
- Cœur de bœuf, infusion	250,0 g
- Peptone de protéose.....	10,0 g
- Dextrose	2,0 g
- Chlorure de sodium	5,0 g
- Phosphate disodique	15,0 g

2.4.5. Gélose Chapman Mannitée

Ce milieu est sélectif pour la culture du staphylocoque, mais exceptionnellement d'autres bactéries peuvent y végéter.

- Les souches de *S. aureus* forment une auréole jaune par fermentation du mannitol (entraînant une acidification du milieu donc un changement de teinte du rouge de phénol qui vire du rouge au jaune).

- Les autres souches de staphylocoques se développent, dans la grande majorité, sans changer la teinte rosacée du milieu.

Informations générales :

- Marque : Becton Dickinson, Le-Pont-de-Claix, France
- Références : 211407.
- Lot n° : 1130004.

Composition approximative par litre d'eau :

- Digestion pancréatique de caséine 5,0 g
- Digestion enzymatique de tissus animaux 5,0 g
- Extraits de bœuf 1,0 g
- D-mannitol 10,0 g
- Chlorure de sodium 75,0 g
- Rouge de phénol..... 0,025 g
- Gélose 15,0 g

2.5. Le néphélomètre

Afin de réaliser des suspensions bactériennes en ayant une idée approximative du nombre de bactéries/ml, nous utilisons un densitomètre (le Densimat de BioMérieux, Craponne, France).

L'échelle de Mc Farland que nous avons utilisée afin d'évaluer approximativement le nombre de bactéries/ml dans une suspension est reportée dans le tableau 7.

Densité lue (en McF)	Nombre de bactéries/ml
0,5	$1,5 \cdot 10^8$
1	$3 \cdot 10^8$
2	$6 \cdot 10^8$
3	$9 \cdot 10^8$

Tableau 7 : Correspondance entre la concentration bactérienne d'une suspension et la densité lue en Mc Farland.

3. Expérimentations

Le projet a pour objectif de montrer une réduction de la charge bactérienne par la compression isostatique, différentes manipulations sont donc mises au point afin de valider les résultats. En premier lieu, l'innocuité de l'apatite déficiente en calcium est vérifiée. Puis une méthode de détection des bactéries dans la poudre est élaborée et sa sensibilité déterminée. L'efficacité de l'inactivation des bactéries par la compression isostatique est

évaluée ainsi que la charge bactérienne contenue dans la poudre de phosphate de calcium. D'autres protocoles sont étudiés afin d'améliorer la réduction de la charge bactérienne de la compression isostatique.

3.1. Innocuité de la poudre

3.1.1. Objectif de la manipulation

Le but de cette manipulation est de mettre en évidence l'absence de propriétés antibactériennes de la CDA. Pour démontrer une réduction de la charge bactérienne par la compression isostatique, il faut s'assurer que la poudre est dénuée de toute activité antibactérienne.

3.1.2. Principe

Afin de déterminer l'innocuité de la CDA, un antibiogramme sur une gélose MH et un dénombrement des bactéries survivantes après un contact de la CDA avec une suspension bactérienne pendant 24 heures sont réalisés.

3.1.3. Méthode

Pour l'antibiogramme, une suspension de *S. aureus* ATCC 25923 à 0,5 McF est préparée et diluée au 100^{ème}. Une gélose MH de format 120 x 120 mm est inondée avec cette dilution. Après avoir enlevé l'excédent de liquide et séché la boîte pendant quelques minutes, 4 puits sont réalisés dans la gélose, à distance les uns des autres, avec un emporte pièce de diamètre 1 cm. Ils sont remplis respectivement de 10 mg, 20 mg, 30 mg, et 40 mg de CDA et complétés par 50 µl de sérum physiologique. Les résultats sont lus après 24 heures d'incubation à 37°C.

Une suspension de *S. aureus* ATCC 25923, dans un BMH, à 0,5 McF diluée au 100^{ème} est préparée afin d'obtenir un volume de 35 ml. Un dénombrement bactérien sur gélose TS de cette dilution est effectué. 10 ml de la dilution sont introduits dans 3 erlenmeyers, le premier

servant de témoin, le second est additionné d'1 g de CDA et le troisième de 2 g de CDA. Au bout de 24 heures, un dénombrement dans chaque erlenmeyer est réalisé.

Une numération bactérienne est réalisée sur la suspension de départ (Témoin t=0) et dans les 3 erlenmeyers : pour cela, une dilution au 100^{ème} (appelée 10⁻²), au 10000^{ème} (appelée 10⁻⁴) et au 1000000^{ème} (appelée 10⁻⁶) sont effectuées dans de l'eau physiologique. 50 µl de chaque dilution, sont répartis sur des géloses TS à l'aide d'un râteau. Après 24 heures d'incubation à 37°C, les colonies microbiennes sont dénombrées.

3.1.4. Résultats

En ce qui concerne l'antibiogramme, un tapis uniforme s'est développé sur toute la boîte et aucune zone d'inhibition n'est visible autour des puits.

Les résultats du dénombrement des bactéries survivantes après un contact du CDA en milieu liquide sont présentés dans le tableau 8.

Dilutions	10 ⁻²		10 ⁻⁴		10 ⁻⁶	
	Bactéries /50 µl	Bactéries /ml (susp. mère)	Bactéries /50 µl	Bactéries /ml (susp. mère)	Bactéries /50 µl	Bactéries /ml (susp. mère)
Témoin t=0	#1500	3.10 ⁶	36	7,2.10 ⁶	0	
Témoin t=24h	N.I.		#2000	4.10 ⁸	51	10 ⁹
1 g t=24h	N.I.		#700	1,4.10 ⁸	7	0,14.10 ⁹
2 g t=24h	N.I.		#1840	3,7.10 ⁸	38	0,76.10 ⁹

N.I. : numération impossible (développement bactérien trop important).

Tableau 8 : Vérification de l'innocuité du CDA sur le *S. aureus* ATCC 25923 en milieu liquide.

Une augmentation du nombre de colonies entre t=0 et t=24h (quel que soit l'échantillon) démontre qu'il y a eu croissance de la bactérie. Avec 1 g ou 2 g de CDA, le nombre de bactéries est sensiblement le même que celui du témoin à 24h.

3.1.5. Conclusion

L'antibiogramme montre que la poudre de CDA n'a pas d'activité bactériostatique car aucune zone d'inhibition n'apparaît. Ce résultat est confirmé par l'étude du dénombrement bactérien de *S. aureus* ATCC 25923 en milieu liquide en présence de 1 g et 2 g de poudre.

Ces résultats sont en concordance avec ceux obtenus par Gautier *et al.* (82) qui démontrent que la poudre de BCP n'a aucune efficacité antimicrobienne contre *M luteus*, contrairement à ceux obtenus par Opalchenova *et al.* (83) et Ingram *et al.* (84), dus probablement à des conditions opératoires différentes. Les céramiques utilisées dans ces deux dernières études sont respectivement un BCP (70% HA / 30% β -TCP) et une HA ; les bactéries sont *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* ou *Staphylococcus epidermidis* ; et les milieux sont un milieu liquide au thioglycolate et une gélose MH.

3.2. Mise au point d'une méthode d'évaluation de la réduction de la charge bactérienne dans la CDA après compression isostatique

3.2.1. Objectif de la manipulation

Le but de cette étude est l'élaboration d'une méthode répétable et facile à mettre en œuvre permettant la mise en évidence d'une réduction de la charge bactérienne dans la CDA après compression isostatique.

3.2.2. Principe

La CDA est contaminée par une souche de *S. aureus* ATCC 25923 de différentes manières, puis la charge bactérienne avant et après compression isostatique est évaluée.

3.2.3. Méthode

3.2.3.1. Première manipulation

Un milieu MH estensemencé par la souche de *S. aureus* ATCC 25923 et incubé 24 heures à 37°C. 15 g de CDA sont répartis sur cette gélose MH. La poudre est récupérée au moyen d'un écouvillon. Après homogénéisation de la poudre et des bactéries, 100 mg sont prélevés pour servir de poudre témoin. La poudre restante subit une compression isostatique (à 140 MPa pendant 5 min). Une fois le bloc obtenu brisé, 1g de poudre est prélevé.

La poudre témoin est mise en suspension dans 1 ml d'eau physiologique et l'échantillon dans 2 ml. Les deux prélèvements sont ensuite filtrés séparément sur des membranes Milipore de 0,22 µm. Ces membranes sont déposées sur des géloses TS et mises à incuber à 37°C pendant 24 heures. A la suite de ce délai, un tapis bactérien est obtenu sur la poudre témoin et aucun développement n'apparaît sur l'échantillon. L'échantillon semble stérile après compression isostatique mais la trop grande quantité de poudre sur le filtre (pouvant masquer le développement bactérien) nous a conduit à modifier la technique.

3.2.3.2. Seconde manipulation

Une seconde manipulation est donc réalisée, mais cette fois, après les 24 heures d'incubation, la gélose MH est remise 24 heures à 37°C en laissant le couvercle ouvert afin de la sécher. 1g de CDA est réparti sur la gélose, il est récupéré comme précédemment puis mélangé à 14g de CDA. L'ensemble est plus sec ce qui permet une meilleure homogénéisation de la poudre. 50 mg de poudre témoin sont prélevés puis la CDA est soumise à une compression isostatique. Une fois le bloc obtenu brisé, 50 mg sont prélevés. Ces deux prélèvements sont mis en suspension dans 1ml d'eau physiologique et sont filtrés séparément sur des membranes de 0,22 µm. Ces dernières sont déposées sur des géloses TS et incubées à 37°C pendant 24 heures. Sur le filtre, le dénombrement est impossible car les colonies sont confluentes.

Par cette méthode, une réduction de la charge bactérienne n'a pas pu être démontrée après compression car le nombre de bactéries initial est trop élevé. De plus avec ces deux méthodes il est impossible de mettre un nombre de bactéries déterminé en contact avec la

La suspension à 10^7 est un échec car le filtre se déchire à chaque fois. Cependant, cette dilution semble la plus appropriée pour déterminer une réduction bactérienne étant donné qu'à 10^8 il est difficile de numérer le nombre de bactéries et qu'à 10^6 il est trop faible pour être significatif.

3.2.3.4. Quatrième manipulation

Une nouvelle manipulation est réalisée afin de déterminer si la suspension à 10^7 bactéries/ml est la plus appropriée et de pouvoir tester l'uniformité de répartition des bactéries au sein de la CDA. La filtration de la suspension avec 50 mg de CDA étant difficile, la suspension est filtrée sans la poudre.

3 ml d'un inoculum proche de 10^7 bactéries/ml sont préparés (à partir d'une suspension à 3 McF) et filtrés. Les bactéries sont récupérées à l'aide d'un écouvillon et mises en contact avec 15 g de CDA, 5 poudres témoins de 50 mg (T_1 à T_5) et 5 poudres témoins de 500 mg (T_6 à T_{10}) sont ensuite prélevées en différents endroits afin d'évaluer l'homogénéité de la répartition bactérienne. Le reste de la poudre subit une compression isostatique. Le bloc ainsi obtenu est broyé et quatre échantillons sont prélevés : deux de 50 mg (E_1 et E_2) et 2 de 500 mg (E_3 et E_4). Les différents prélèvements (témoins et échantillons) sont techniqués comme précédemment et incubés à 37°C pendant 24 heures.

3.2.4. Résultats

Les résultats de la détermination de l'uniformité de contamination de la poudre, réalisés sur la quatrième méthode mise au point, sont présentés dans les tableaux 10 et 11 suivants.

Poudres témoins (T) et comprimés (E) (50 mg)	T_1	T_2	T_3	T_4	T_5	E_1	E_2
Nombre de bactéries/filtre	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.	2	3

N.I. : numération impossible (développement bactérien trop important).

Tableau 10 : Témoins et échantillons de 50 mg filtrés sur membrane de $0,22\ \mu\text{m}$.

Poudres témoins (T) et comprimées (E) (500 mg)	T ₆	T ₇	T ₈	T ₉	T ₁₀	E ₃	E ₄
Nombre de bactéries/filtre	#540	#600	#430	#460	#500	6	10

Tableau 11 : Témoins et échantillons de 500 mg dilués dans 1 ml d'eau physiologique.

Les témoins T₁ à T₅ ne permettent pas de conclure à l'uniformité de répartition des bactéries dans la CDA, mais pour les témoins T₆ à T₁₀, les numérations des colonies sont proches. Donc la répartition bactérienne semble homogène dans la poudre. De plus une réduction du nombre de colonies bactériennes est notée entre les témoins T₁ à T₅ et les échantillons compressés E₁ et E₂. Il en est de même entre les témoins T₆ à T₁₀ et les échantillons E₃ et E₄.

3.2.5. Conclusion

Les témoins 6 à 10 présentant un nombre de colonies assez proches, nous pouvons donc conclure que la contamination bactérienne se répartit de façon uniforme dans la CDA. De plus la réduction de charge bactérienne entre l'échantillon ayant subi la compression isostatique et le témoin, laisse envisager un résultat probant du procédé de stérilisation. La méthode de détection sélectionnée pour être utilisée lors des manipulations suivantes sera celle utilisant la filtration des 50 mg de CDA car elle se rapproche le plus des recommandations de la Pharmacopée Européenne (6ème édition, 6.3, 2008).

3.3. Sensibilité de détection de la méthode

3.3.1. Objectif de la manipulation

L'objectif de la manipulation est de déterminer la sensibilité de détection de la méthode mise au point précédemment, c'est-à-dire jusqu'à quel nombre de bactéries/g de CDA un développement peut être détecté.

3.3.2. Principe

Afin de déterminer la sensibilité de la méthode de détection, différentes suspensions bactériennes seules et en présence de la CDA sont numérotées. La suspension bactérienne pour laquelle aucun développement bactérien n'est observé correspondra au seuil de cette méthode.

3.3.3. Méthode

A partir d'une suspension de *S. aureus* ATCC 25923 à 1,5 McF (soit environ 10^8 bactéries/ml) des dilutions successives sont réalisées de façon à obtenir des suspensions de 10^3 , 10^2 , 10 et 5 bactéries/ml. 1 ml de chacune d'elles est mélangé à 50 mg de CDA.

Ces suspensions sont diluées au $10^{\text{ème}}$ (10^{-1}) et au $1000^{\text{ème}}$ (10^{-3}).

Ces suspensions (pures et diluées) sont filtrées sur des membranes de 0,22 μm . Les membranes sont déposées sur des géloses TS et incubées à 37°C pendant 24 heures. Les résultats obtenus sont reportés dans le tableau 6.

Parallèlement, un dénombrement bactérien est effectué sur chaque inoculum. 50 μl de chaque inoculum de départ estensemencé à l'aide d'un râteau sur une gélose TS, puis incubé à 37°C pendant 24 heures.

3.3.4. Résultats

La concentration de chaque inoculum de départ est déterminée, les résultats sont présentés dans le tableau qui suit (tableau 12).

Inoculum de départ théorique	10^3	$10^2(\text{a})$	$10^2(\text{b})$	10	5
Bactéries/boîte	35	6	8	1	0
Bactéries/ml	$\#7.10^2$	$\#1,2.10^2$	$\#1,6.10^2$	$\#20$	$\#0$
Masse de CDA introduite (en mg)	50,5	50,2	51,2	50,3	52,4

Tableau 12 : Concentration des inoculum de départ et quantité de CDA ajouté.

Le nombre de bactéries inoculées par ml est extrapolé grâce au nombre de bactéries comptées sur les géloses TS ensemencées avec 50 µl d'une suspension de concentration voisine de l'inoculum de départ.

Dans le tableau 13 sont récapitulées les croissances des suspensions bactériennes en présence de CDA.

Inoculum de départ théorique	10^3	$10^2(a)$	$10^2(b)$	10	5
Dilutions					
Pur	N.I.s	30	28	2	0
10^{-1}	70	8	7	1	0
10^{-3}	0	0	0	0	0

N.I. : numération impossible (développement bactérien trop important).

Tableau 13 : Détermination du seuil minimal de sensibilité de la méthode.

La suspension pour laquelle 5 bactéries/ml sont mises en contact de la CDA ne permet pas de détecter de développement bactérien au bout de 24 heures, mais la mise en culture de 50 µl de l'inoculum de départ ne met pas en évidence de développement sur la gélose TS. Les faibles concentrations bactériennes utilisées peuvent expliquer le risque d'erreur.

Pour déterminer le nombre minimal de bactéries/g de CDA détectable, les calculs doivent se baser sur la suspension ayant la plus faible concentration bactérienne pour laquelle un développement bactérien est détecté. Cette suspension est celle à 10 bactéries/ml mais le risque d'erreur étant important à ce niveau (du fait de la faible concentration des suspensions bactériennes) le seuil minimal de détection retenu est celui à 10^2 bactéries/ml.

Le calcul du seuil de détection (en bactéries/g) a été développé et les résultats sont les suivants :

- Suspension (a) (proche de $1,2 \cdot 10^2$ bactéries/ml)
 - Dans la dilution pure nous avons : 50,2 mg de CDA - 5,02 mg pris pour réaliser la dilution à 10^{-1} .
 - Soit : 45,28 mg pour 0,9 ml de suspension à 120 bactéries/ml.
 - Dans 45,28 mg il y a théoriquement : 108 bactéries.
 - Soit un seuil de détection à environ : $2,4 \cdot 10^3$ bactéries/g.

- Suspension (b) (proche de $1,6 \cdot 10^2$ bactéries/ml)
 - Dans la dilution pure nous avons : 51,2 mg de CDA - 5,12 mg pris pour réaliser la dilution à 10^{-1} .
 - Soit : 46,08 mg pour 0,9 ml de suspension à 160 bactéries/ml.
 - Dans 46,08 mg il y a théoriquement : 144 bactéries.
 - Soit un seuil de détection à environ : $3,1 \cdot 10^3$ bactéries/g.

Le seuil moyen de détection est donc de : $2,8 \cdot 10^3 \pm 5 \cdot 10^2$ bactéries/ml (n=2).

3.3.5. Conclusion

Cette méthode permet de détecter une contamination bactérienne du CDA avec certitude s'il y a plus de $2,8 \cdot 10^3$ bactéries/g de poudre.

Cette sensibilité est à analyser avec prudence car de faibles concentrations bactériennes sont utilisées. Il serait donc nécessaire de réaliser plusieurs fois cet essai afin de confirmer les résultats obtenus. La méthode n'est pas assez sensible lorsque l'utilisation future de la CDA est prise en compte. Celle-ci étant destinée à l'implantation osseuse il nous serait nécessaire de détecter un nombre beaucoup plus faible de bactéries/g de CDA afin de pouvoir valider l'étape de stérilisation par compression isostatique.

Le seuil de sensibilité sélectionné pour la méthode de détection utilisée est très élevé, des colonies sont détectées pour une quantité de bactéries/g de CDA moindre mais lors de la mise en évidence de la sensibilité, la concentration des suspensions bactériennes à ce niveau était très faible et donc le risque d'erreur associé important. De plus, cette méthode présente le désavantage de ne pas pouvoir révéler les bactéries naturellement présentes dans la CDA, ce qui empêche de conclure sur le taux de ces bactéries survivantes. Ce produit étant destiné à être implanté, il faudra mettre en évidence une réduction de charge bactérienne supérieure pour être acceptable.

3.4. Evaluation de l'efficacité stérilisante de la compression isostatique

3.4.1. Objectif de la manipulation

L'objectif est de déterminer si la compression isostatique réduit le taux de bactéries contenues dans la CDA et d'en valider le résultat.

3.4.2. Principe

Dans le but de démontrer une réduction de la charge bactérienne suite à une compression isostatique, la CDA est contaminée par du *S. aureus* ATCC 25923 avant de subir la compression. La manipulation est réalisée trois fois afin de valider les résultats.

3.4.3. Méthode

Une suspension proche de 10^7 bactéries/ml est réalisée et 1 ml est filtré sur une membrane de $0,22\mu\text{m}$. Puis, les bactéries à la surface du filtre sont prélevées à l'aide d'un écouvillon et introduites dans 15 g de CDA. La poudre contenant la bactérie est mélangée à l'aide d'un agitateur oscillant (turbula : Schatz type T2C, Willy A. Bachofer, Suisse) pendant 5 min puis deux poudres témoins de 50 mg sont prélevées. Le reste de la poudre subit une compression isostatique suivant le protocole précédemment décrit (140 MPa, 5 minutes). Le bloc ainsi obtenu est broyé et deux échantillons de 50 mg sont prélevés.

Les quatre prélèvements sont mis en suspension dans 1 ml d'eau physiologique et une dilution au $10^{\text{ème}}$ et au $1000^{\text{ème}}$ sont réalisées

Les prélèvements et dilutions sont filtrés sur des membranes de $0,22\mu\text{m}$. Ces dernières sont déposées sur des géloses TS et incubées à 37°C pendant 24 heures.

Les colonies s'étant développées sur les filtres sont réisolées sur un milieu Chapman mannité dans le but de déterminer si ces bactéries sont des SASM.

Cette manipulation est répétée trois fois (manipulations A, B et C).

3.4.4. Résultats

Le dénombrement des bactéries survivantes avant et après la compression isostatique est présenté dans le tableau qui suit (tableau 14).

	Pur	10^{-1}	10^{-3}
T _{A1}	110	16	0
T _{A2}	85	35	1
E _{A1}	4	0	0
E _{A2}	1	1	0
T _{B1}	95	10	0
T _{B2}	120	17	0
E _{B1}	2	0	0
E _{B2}	0	0	0
T _{C1}	153	23	0
T _{C2}	167	36	2
E _{C1}	0	0	0
E _{C2}	2	0	0

T_A, T_B et T_C : témoins respectivement réalisés lors des manipulations A, B et C

E_A, E_B et E_C : échantillons respectivement compressés lors des manipulations A, B et C

Tableau 14 : Bactéries survivantes avant et après compression isostatique.

Le dénombrement des bactéries survivantes entre les prélèvements témoins (non compressés) et échantillons (140 MPa, 5 minutes) des trois manipulations (A, B, et C) montre une réduction du nombre de bactéries après compression.

Les bactéries isolées sur milieu Chapman mannité sont toutes des SASM.

3.4.5. Conclusion

La synthèse des résultats met clairement en évidence la réduction de la charge bactérienne (tableau 15).

Avant compression isostatique 122 ± 34 CFU / filtre	Après compression isostatique 2 ± 1 CFU / filtre
--	---

CFU : Colonies formant unité

Tableau 15 : Nombre de bactéries/filtre avant et après compression isostatique.

La compression isostatique entraîne une réduction du nombre de bactéries survivantes pour les trois manipulations avec des résultats similaires. Cette méthode permet donc une inactivation bactérienne.

Certaines publications du domaine agroalimentaire rapportent qu'un effet de réduction sur la charge bactérienne par la compression isostatique commence à être perçue vers 400 MPa pour les bactéries à Gram positif. Lors des manipulations, un effet de réduction de cette charge étant observé à une pression moindre, cela peut être dû au fait que la CDA n'est pas une matrice nutritive comme peut l'être un aliment et que les bactéries s'en trouvent fragilisées.

3.5. Détermination de la charge bactérienne de la poudre de phosphate de calcium

3.5.1. Objectif de la manipulation

Le but de cette manipulation est de déterminer dans quelles proportions le taux de contamination de la CDA sera détectable par la méthode.

3.5.2. Principe

Pour déterminer le taux de contamination de la CDA après sa synthèse, deux méthodes sont mises en œuvre, utilisant plus de CDA que dans la méthode de détection mise en place, afin d'augmenter la sensibilité, la poudre étant naturellement peu contaminée.

3.5.3. Méthode

Dans la première méthode, 100 mg de CDA sont prélevés et mis en suspension dans 1 ml d'eau physiologique, puis homogénéisés à l'aide d'un pilon et un potter. Une dilution au $10^{\text{ème}}$ et une dilution au $1000^{\text{ème}}$ sont réalisées. Chaque suspension est ensuite filtrée sur un filtre de $0,22 \mu\text{m}$, puis incubée à 37°C sur une gélose TS pendant 24 heures.

Dans la seconde méthode, 500 mg de CDA sont prélevés et mis en suspension dans 1 ml d'eau physiologique. Après homogénéisation à l'aide d'un pilon et un potter, des dilutions à 10^{-1} , 10^{-3} et 10^{-5} sont réalisées. Chaque dilution est filtrée, la membrane déposée sur une gélose TS et incubée à 37°C pendant 24 heures. La suspension première n'est pas filtrée car la quantité de CDA qu'elle contient aurait colmaté le filtre, empêché la filtration et gêné le développement bactérien.

Tous les milieux sont mis à 37°C pendant 48h puis laissés sur la paillasse pendant 72h pour permettre la croissance éventuelle de bactéries se développant à des températures moins importantes.

3.5.4. Résultats

Le tableau 16 récapitule les développements bactériens observés entre 24 et 120 heures pour chaque suspension.

Temps	24h	48h	72h	96h	120h
100 mg pur	0	0	0	0	0
100 mg 10^{-1}	1 bactérie	1 bactérie	1 bactérie	1 bactérie	1 bactérie
100 mg 10^{-3}	0	0	0	0	0
500 mg 10^{-1}	0	0	0	0	0
500 mg 10^{-3}	0	0	0	0	0
500 mg 10^{-5}	0	0	1 champignon	1 champignon	1 bactérie + 1 champignon

Tableau 16 : Evaluation de la contamination naturelle de la CDA sur 5 jours.

Les bactéries détectées pour la dilution 10^{-5} avec 500 mg de CDA sont probablement dues à des contaminations externes venant du fait que les géloses n'ont pas été examinées sous une hotte stérile et que des germes de l'air se sont déposés sur la membrane.

3.5.5. Conclusion

La poudre ne semble pas contaminée ou le taux de contamination naturelle de la CDA est trop faible pour qu'il puisse être déterminé par les méthodes mises en œuvre.

La technique développée afin de numérer les bactéries survivantes, avant et après compression isostatique, n'est pas réalisée dans de parfaites conditions de stérilité et d'asepsie. Ceci a une influence mineure lorsque la poudre est fortement chargée en bactéries (car le nombre de colonies dues à la contamination sera négligeable) ou qu'elle est contaminée par un *S. aureus* (ce dernier pouvant être identifié par un réisolement sur un milieu Chapman mannité). Par contre la contamination externe a une grande influence sur les résultats lorsque la numération concerne les bactéries naturellement contenues dans la CDA (car elles sont présentes en petit nombre et leur espèce est variable).

3.6. Mise en culture de la CDA en milieu liquide après une compression

3.6.1. Objectif de la manipulation

Du fait du seuil de détection trop élevé de la méthode permettant de mettre en évidence la réduction de la charge bactérienne et de son inadéquation à la mise en évidence de la réduction de la charge bactérienne présente naturellement dans la poudre de CDA, une nouvelle méthode est mise au point

3.6.2. Principe

Après compression d'échantillons additionnés de 10^2 , 10^3 ou 10^5 bactéries/ml de *S. aureus* et d'échantillons non additionnés de bactéries, les blocs obtenus sont brisés stérilement. Un prélèvement est mis dans un bouillon BCC un autre dans un bouillon Shaedler additionné de vitamine K3 (ANA) pour être incubé pendant 10 à 15 jours

Une évaluation de la préparation de l'échantillon après compression isostatique est réalisée dans un premier temps afin de déterminer s'il y a un risque de contamination externe durant cette étape.

3.6.3. Méthode

Afin de vérifier les bonnes conditions de préparation de l'échantillon après compression isostatique, deux prélèvements de 7g chacun subissent chacun une compression à 140 MPa pendant 10 minutes, puis l'un des échantillons est stérilisé par la chaleur au poupinel à 121°C

pendant 20 minutes. Ensuite, après désinfection de la paillasse et des instruments à l'alcool chacun des 2 blocs est brisé dans une compresse stérile sur un champ stérile puis placé sous une hotte à flux laminaire. De chaque prélèvement, 2g sont introduits dans un milieu BCC et 2g dans un milieu ANA puis placés à l'étuve pendant 10 à 15 jours avec agitation quotidienne. En parallèle 2 prélèvements de 2g de CDA non compressés sont aussi distribués dans un milieu BCC et un milieu ANA pour servir de témoin (figure 27).

La manipulation est effectuée trois fois et deux témoins de poudre non compressées sont réalisés pour chaque compression isostatique.

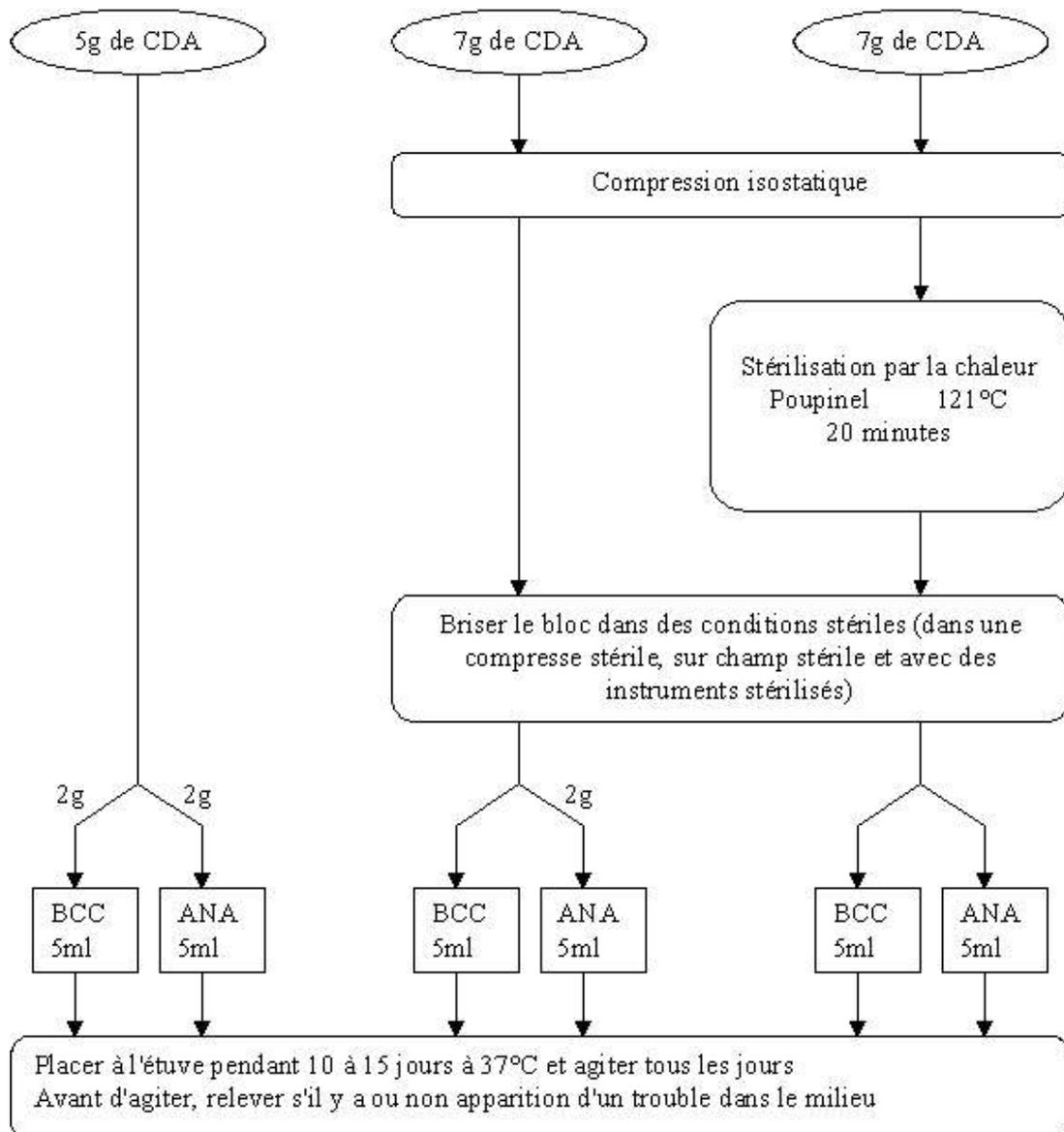


Figure 27 : Protocole de l'expérimentation sur poudre non contaminée artificiellement (palier de compression : 140 MPa, 10 minutes).

Pour les échantillons contaminés, des suspensions bactériennes de 10^2 , 10^3 et 10^5 bactéries/ml sont préparées, 12ml de chacune de ces suspensions sont filtrés et les bactéries récupérées à l'aide d'un écouvillon sont mélangées à 3 prélèvements distincts de 12g chacun. Une agitation à l'aide d'un mélangeur Turbula (Schatz type T2C, Willy A. Bachofer, Suisse) est ensuite effectuée pendant 5 minutes. 5g sont ensuite isolés et les 7g restants subissent une compression isostatique (140 MPa, 10 minutes). Les blocs ainsi obtenus sont ensuite brisés dans les mêmes conditions que précédemment et 2g sont introduits dans un milieu BCC ainsi que dans un milieu ANA. Les 5g de poudre contaminée et non compressée sont récupérés. 2g sont introduits, de la même manière, dans un milieu BCC et dans un milieu ANA. Tous les tubes sont ensuite placés à l'étuve pendant 10 à 15 jours et agités tous les jours (protocole A, figure 28).

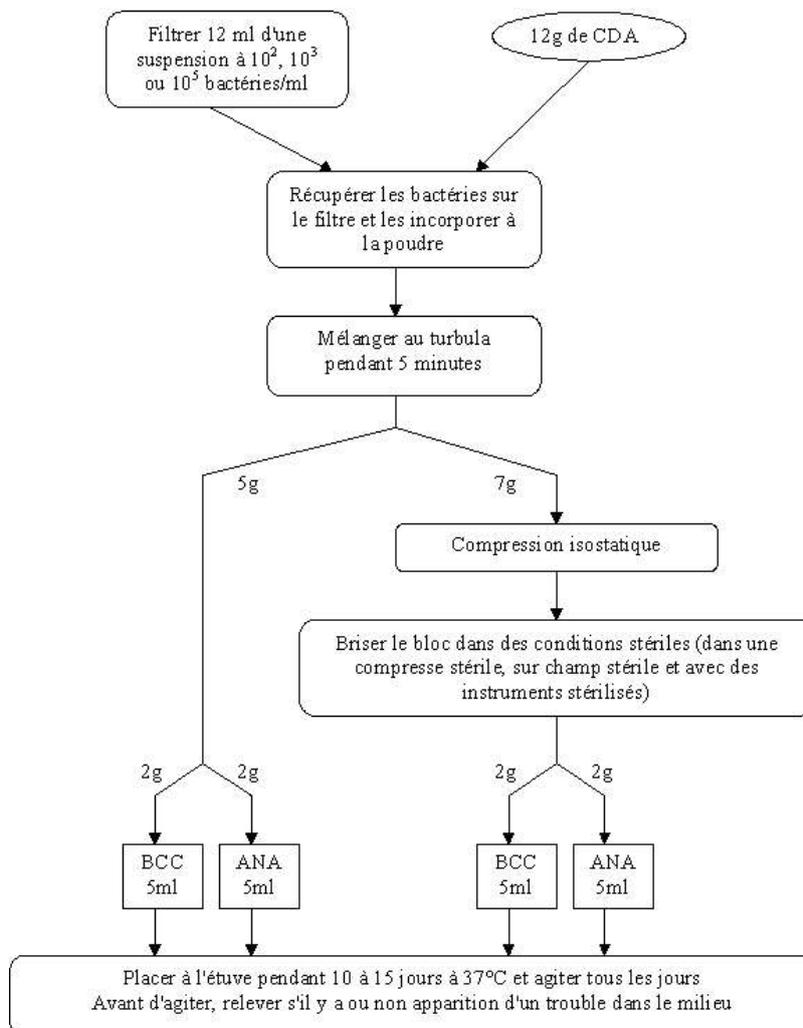


Figure 28 : Protocole A : poudre contaminée artificiellement par du *S. aureus* P9 (SRAM) à 3 charges bactériennes différentes traitée par une compression isostatique (palier de compression : 140 MPa, 10 minutes).

Au bout de 10 à 15 jours les tubes sont ouverts et 3 gouttes déposées sur une gélose TS en vue de l'identification des bactéries s'étant développées dans les milieux BCC ou ANA.

Les colonies sont isolées et séparées dans le cas où différents types de bactéries se sont développées sur la gélose. Puis un Gram est réalisé ainsi qu'une catalase. Pour les *Bacillus*, la sporulation est mise en évidence. Lorsque des cocci à Gram positif et à catalase positive sont identifiés, les colonies sont repiquées sur des milieux chapman. Les colonies se développant sur le milieu et fermentant le mannitol subissent alors un antibiogramme sur gélose MH avec de l'oxacilline, de la gentamycine et de l'érythromycine afin de déterminer si ces colonies sont des *S. aureus* P9 (SRAM).

3.6.4. Résultats

Le tableau 17 récapitule les germes identifiés lors de la mise en évidence de la stérilité de l'étape de broyage du bloc de CDA.

Durée d'incubation	Poudre non compressée	Poudre compressée et stérilisée	Poudre compressée non stérilisée
14 jours	Bacilus	Stérile	Bacilus et Microcoque
14 jours	Bacilus		
11 jours	Bacilus	Stérile	Microcoque
14 jours	Bacilus		
12 jours	Bacilus	Stérile	Bacilus
14 jours	Bacilus et Microcoque		

Tableau 17 : Evaluation du risque de contamination lors de l'étape de broyage du bloc de CDA compressé.

Le tableau 18 récapitule les différents germes identifiés sur les poudres compressées et non compressées ainsi que le temps nécessaire à l'apparition d'un trouble.

Durée d'incubation	Poudre compressée 10 ² bactéries/g	Poudre non compressée 10 ² bactéries/g	Poudre compressée 10 ³ bactéries/g	Poudre non compressée 10 ³ bactéries/g	Poudre compressée 10 ⁵ bactéries/g	Poudre non compressée 10 ⁵ bactéries/g
13 jours	Trouble : 48 heures Germe identifié : Staphylocoque à coagulase négative	Trouble : 24 heures Germe identifié : SRAM	Trouble : 72 heures Germe identifié : Microcoque et SRAM	Trouble : 24 heures Germe identifié : SRAM	Trouble : 48 heures Germe identifié : SRAM	Trouble : 24 heures Germe identifié : SRAM
12 jours	Trouble : 48 heures Germe identifié : Microcoque et SRAM	Trouble : 48 heures Germe identifié : SRAM	Trouble : 48 heures Germe identifié : SRAM	Trouble : 72 heures Germe identifié : SRAM	Trouble : 48 heures Germe identifié : SRAM	Trouble : 48 heures Germe identifié : SRAM
12 jours	Trouble : +/- Germe identifié : SRAM	Trouble : 48 heures Germe identifié : SRAM	Trouble : +/- Germe identifié : Microcoque et SRAM	Trouble : 48 heures Germe identifié : SRAM	Trouble : +/- Germe identifié : SRAM	Trouble : 24 heures Germe identifié : SRAM

Tableau 18 : Germes identifiés après une compression isostatique à 140 MPa pendant 10 minutes (protocole A).

3.6.5. Discussion

Les résultats mettent en évidence que lorsque la poudre est stérilisée après la compression il n'y a pas de contamination non désirée durant la préparation de l'échantillon afin de révéler la présence de bactéries revivifiables.

De plus malgré le fait que lors des premières manipulations réalisées, aucun développement bactérien n'était mis en évidence sur la poudre non compressée et non additionnée de staphylocoque, lors de ces manipulations, des *Bacillus* ont été mis en évidence dans les milieux BCC et ANA même si le trouble du bouillon de culture du au développement bactérien n'était pas évident.

Pour les échantillons de CDA contaminés avec du *S. aureus* P9 en quantités croissantes, la période nécessaire à l'apparition d'un trouble dans le milieu de culture des échantillons non compressés est supérieure ou au pire égale à celle des échantillons compressés (exception faite pour l'une des périodes d'incubation de 12 jours avec l'échantillon additionné de 10^3 bactéries/g de CDA). Nous pouvons donc envisager un retard de prolifération bactérienne due à la compression isostatique dès 140 MPa, ce qui est en accord avec de nombreuses études faisant apparaître un retard de croissance lors de dégâts sublétaux (25, 28, 46).

3.7. Mise en culture de la CDA en milieu liquide après trois compressions

3.7.1. Objectif de la manipulation

Le but de cette expérimentation est de déterminer si la répétition de plusieurs cycles de compression à des intervalles de temps réguliers permet d'inhiber la croissance du *S. aureus* P9 dans les échantillons d'apatite ayant subi une compression isostatique afin d'obtenir un échantillon ne présentant pas de développement bactérien après traitement.

3.7.2. Principe

Deux protocoles sont mis en place : les échantillons additionnés de quantités croissantes de *S. aureus* P9 subissent 3 compressions à 2 heures ou à 15 minutes d'intervalle avant d'être incubés dans des milieux BCC et ANA.

3.7.3. Méthode

Les échantillons sont traités de la même manière que précédemment, des suspensions bactériennes de 10^2 , 10^3 et 10^5 bactéries/ml sont préparées. 7ml de chacune de ces suspensions sont filtrés et les bactéries récupérées à l'aide d'un écouvillon sont mélangées à 3 prélèvements distincts de 7g chacun. Une agitation au mélangeur Turbula est ensuite effectuée pendant 5 minutes. Les 7g subissent ensuite trois compressions isostatiques (140 MPa, 10 minutes pour chaque cycle) soit avec 15 minutes soit avec 2 heures d'intervalle. Les blocs ainsi obtenus sont ensuite brisés dans les mêmes conditions que précédemment et 2g sont introduits dans un milieu BCC ainsi que dans un milieu ANA. Tous les tubes sont ensuite placés à l'étuve et agités quotidiennement (Protocoles B et C, figure 29).

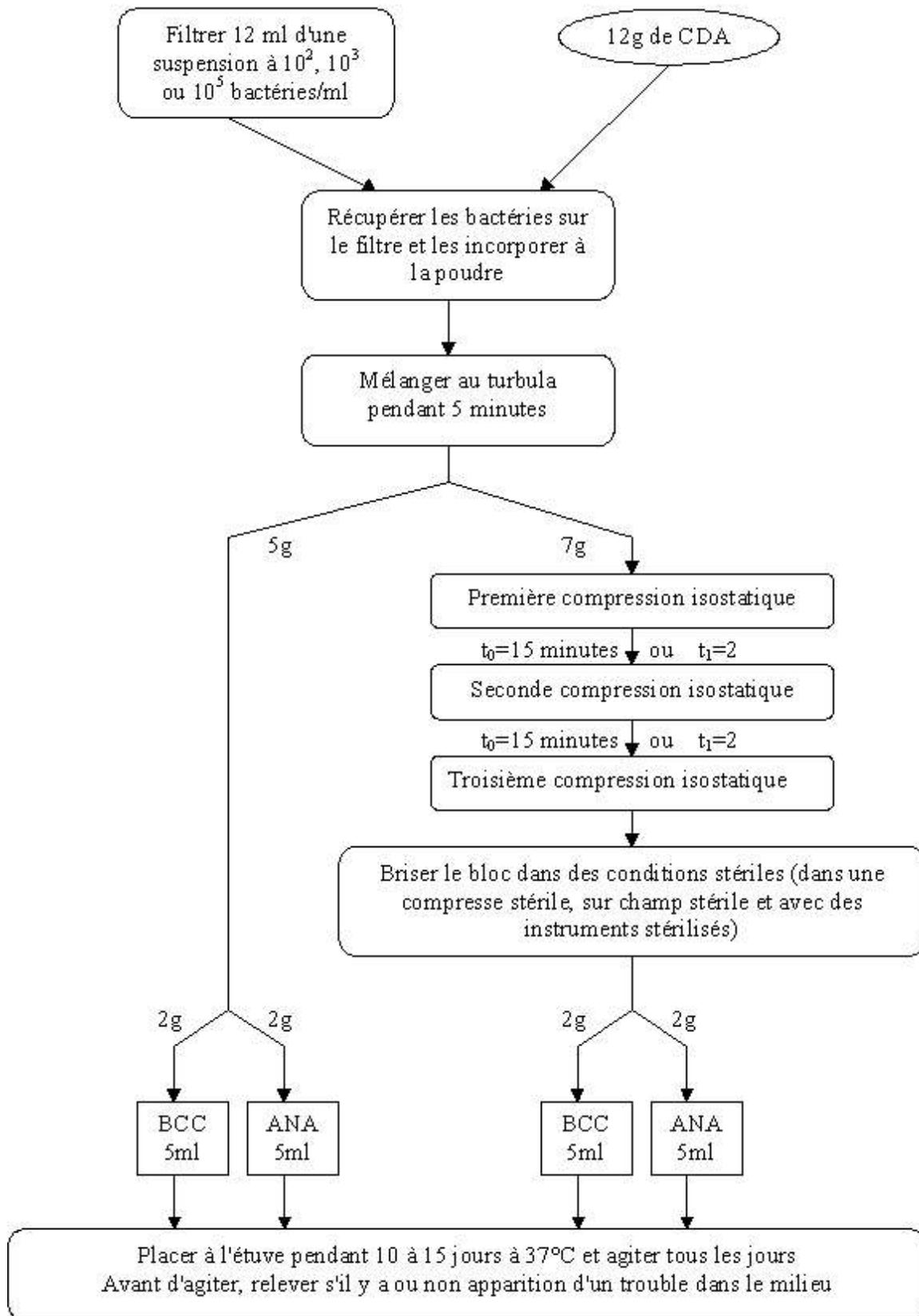


Figure 29 : Protocole B et C : poudre contaminée artificiellement par du *S. aureus* P9 à 3 charges bactériennes différentes traitée par 3 compressions isostatiques à 15 minutes (B) ou 2 heures (C) d'intervalle (pallier 140 MPa, 10 minutes).

Dès l'apparition d'un trouble les tubes sont ouverts et 3 gouttes déposées sur une gélose TS en vue de l'identification des bactéries s'étant développées dans les milieux BCC ou ANA.

Les colonies sont isolées et séparées dans le cas où différents types de bactéries se sont développés sur la gélose. Puis un Gram ainsi qu'une catalase sont réalisés. Pour les Bacilus, la sporulation est mise en évidence. Lorsque des cocci à Gram positif et à catalase positive sont identifiés, les colonies sont repiquées sur des milieux chapman. Les colonies se développant sur le milieu et fermentant le mannitol subissent un antibiogramme sur gélose MH avec de l'oxacilline, de la gentamycine et de l'érythromycine afin de déterminer si ces colonies sont des *S. aureus* P9.

3.7.4. Résultats

Les tableaux 19 et 20 présentent les souches identifiées pour les échantillons d'apatite ayant respectivement subi des cycles de 15 minutes (protocole B) et 2 heures (protocole C) d'intervalle.

Durée d'incubation	Poudre compressée 10 ² bactéries/g	Poudre compressée 10 ³ bactéries/g	Poudre compressée 10 ⁵ bactéries/g
5 jours	Staphylocoque à coagulase négative Bacilus	Staphylocoque à coagulase négative	Staphylocoque doré autre que P9
1 mois	Microcoque Bacilus	Staphylocoque à coagulase négative Microcoque	Staphylocoque à coagulase négative Microcoque

Tableau 19 : Protocole B, germes identifiés après trois compressions distantes de 15 minutes d'intervalle (pallier à 140 MPa, 10 minutes).

Durée d'incubation	Poudre compressée 10 ² bactéries/g	Poudre compressée 10 ³ bactéries/g	Poudre compressée 10 ⁵ bactéries/g
5 jours	Staphylocoque à coagulase négative Bacilus	Staphylocoque à coagulase négative Bacilus	Staphylocoque à coagulase négative SRAM
1 mois	Staphylocoque à coagulase négative Bacilus	Staphylocoque à coagulase négative Microcoque	Staphylocoque à coagulase négative SRAM

Tableau 20 : Protocole C, germes identifiés après trois compressions distantes de 2 heures d'intervalle (pallier à 140 MPa, 10 minutes).

3.7.5. Conclusion

Après 3 compressions distantes de 2 heures la souche de *S. aureus* est détruite dans les échantillons ayant 10^2 et 10^3 bactéries/g. Elle est présente uniquement dans l'échantillon présentant la plus forte charge bactérienne initiale

Après 3 compressions distantes de 15 minutes, la souche de *S. aureus* n'est pas retrouvée.

Les différents protocoles de compression isostatique mis en œuvre permettent de réduire et modifier la charge bactérienne mais ils ne permettent pas d'obtenir la stérilité de l'apatite.

4. Discussion

L'objectif de cette expérimentation est de mettre au point une méthode permettant d'évaluer l'effet de la compression isostatique (étape du processus de fabrication d'un substitut osseux à base d'apatite déficient en calcium) sur la charge microbienne puis de déterminer si cette compression permet d'obtenir des normes satisfaisantes en vue de son usage ultérieur. En effet, cette étape de compression est une étape du processus de mise en forme du biomatériau et un effet de réduction de charge bactérienne suffisant permettrait de s'affranchir d'une étape de stérilisation supplémentaire ce qui simplifierait la stérilisation du biomatériau lors de son association avec des principes actifs thermosensibles.

Différentes études menées plus particulièrement dans l'industrie agroalimentaire montrent une différence de sensibilité des bactéries aux hautes pressions. Les bactéries à Gram négatif sont plus sensibles que les bactéries à Gram positif, la forme de la bactérie joue un rôle important aussi, les bacilles sont plus sensibles que les cocci (3, 5, 10). L'efficacité des hautes pressions comme méthode de pascalisation est améliorée avec l'augmentation du palier maximal de pression et avec l'augmentation de la durée d'exposition au palier maximal (3, 4). De plus des effets destructeurs liés à une cinétique de décompression rapide ont été démontrés. La température joue aussi un rôle important. Il existe une température optimale

pour laquelle la souche sera plus résistante à la pression (3, 5, 12, 60). Les spores résistent bien à des pressions élevées, par contre des valeurs plus faibles de pressions peuvent induire leur germination. Ce phénomène est favorisé par des températures modérées (42, 55). Il apparaît donc que le procédé le plus efficace pour inactiver les spores serait d'effectuer des cycles à des pressions plus faibles suivis de cycles à des pressions plus élevés (37).

Ce procédé de stérilisation est particulièrement utilisé dans l'agroalimentaire pour la pascalisation de différents aliments comme les jus de fruits, les produits laitiers ou les produits carnés. L'intérêt de cette technique est double. Dans l'industrie agroalimentaire elle permet de conserver certaines caractéristiques organoleptiques ainsi que la teneur de certains éléments comme les vitamines. De plus cela permet de prévenir la potentielle formation de certains produits toxiques dus à une dégradation induite par la chaleur.

Le biomatériau utilisé pour cette expérimentation est une apatite déficiente en calcium. Le choix s'est porté vers ce support car c'est un matériau couramment utilisé dans le domaine médical pour la reconstruction osseuse, principalement en chirurgie dentaire et orthopédique (73, 75, 76, 77).

Le *S. aureus* est suggéré comme micro-organisme d'essai approprié pour les tests de validation de stérilité selon la Pharmacopée Européenne (6ème édition, 6.3, 2008). De plus, du fait que ce soit un cocci à Gram positif, ce germe présente plus de chances d'être résistant à la pascalisation (3, 5, 10).

Lors des expérimentations, les résultats du protocole A (souche de *S. aureus* P9 présente dans la quasi-totalité des échantillons parfois associée à d'autres bactéries de l'environnement) montrent qu'avec une compression isostatique nous n'obtenons pas une réduction de la charge bactérienne suffisante, par contre nous observons un temps de développement allongé, ce qui traduit un retard de croissance. Lorsque plusieurs compressions isostatiques successives sont effectuées, la stérilité n'est pas obtenue, et un développement bactérien est mis en évidence. Mais, les résultats montrent que pour le protocole C (3 compressions distantes de 2 heures), le *S. aureus* ensemencé n'est retrouvé que dans l'échantillon présentant la plus grosse charge bactérienne inoculée et, pour le protocole B (3 compressions distantes de 15 minutes), les résultats montrent que le *S. aureus* n'est retrouvé dans aucun des échantillons. Lorsque l'on

compare ces résultats aux études agro-alimentaires, les pressions utilisées sont généralement plus fortes. Elles sont de l'ordre de 150 MPa pour la pascalisation de viandes crues, mais peuvent monter à plus de 400 MPa pour la conservation de jus de fruits et au-delà pour des produits laitiers.

L'objectif étant d'obtenir la stérilité du biomatériau destiné à l'implantation osseuse, il est important de déterminer si la prolifération bactérienne résiduelle (lorsqu'une autre bactérie que le *S. aureus* inoculé initialement est identifiée) est due à une contamination externe intervenant après la compression isostatique ou à des germes revivifiables déjà présents. Le fait que l'échantillon compressé mais n'étant pas stérilisé au poupinel présente un développement bactérien contrairement à celui stérilisé au poupinel, démontre que les protocoles mis en œuvre afin d'isoler et d'identifier les germes ne sont pas soumis à une contamination externe après compression isostatique et qu'il reste une contamination résiduelle effective après traitement.

CONCLUSION

L'objectif de cette expérimentation était de déterminer si la compression isostatique permettait de réduire la charge microbienne dans un matériau phosphocalcique destiné à l'implantation osseuse et d'en certifier sa stérilité le cas échéant.

Selon les résultats obtenus, les protocoles testés permettent de réduire la charge bactérienne dans les échantillons contaminés et lorsque plusieurs compressions successives sont appliquées la réduction de la charge bactérienne est améliorée. Mais les protocoles mis en œuvre ne permettent pas d'atteindre un niveau de stérilité suffisant pour envisager une utilisation médicale sans autre procédé de stérilisation associé. En effet, le produit final étant destiné à être implanté, les normes finales microbiologiques sont beaucoup plus strictes que pour l'agroalimentaire, et il est nécessaire d'obtenir un complément osseux stérile.

Les paramètres pouvant influencer l'efficacité de la réduction de la charge bactérienne étant nombreux, il serait envisageable qu'un protocole (étudiant d'autres conditions opératoires, à des paliers de pression, des temps de compression ainsi que des temps d'attente différents) permette d'obtenir une apatite satisfaisant les normes microbiologiques inhérentes à son utilisation. Il serait aussi nécessaire de vérifier si les bactéries ne sont pas en dormance et qu'il puisse y avoir une reprise de l'activité bactérienne.

Le résumé des points clefs de ces expérimentations et la présentation des résultats font l'objet de la rédaction d'un article présenté ci-après.

PUBLICATION

Influence of isostatic compression on the reduction of the bacterial load of a calcium phosphate biomaterial for osseous fill in.

H. Gautier^{1,2}, N. El Kouri¹, A. F. Miegerville³, C. Merle^{1,2}, J. M. Bouler², and J. Caillon^{3*}

Université de Nantes, Nantes Atlantique Universités, ¹Laboratoire de Pharmacie Galénique, Faculté de Pharmacie, ² Inserm UMRS 791, Laboratoire d'Ingénierie Ostéo-articulaire et dentaire, LIOAD, Faculté de chirurgie dentaire, ³ EA 3826 Laboratoire de Thérapeutiques Cliniques et Expérimentales des Infections, Faculté de Médecine, Nantes, France.

High pressure effect on bacterial reduction

*Corresponding author: mailing address: Jocelyne Caillon, Laboratoire de Thérapeutiques Cliniques et Expérimentales des Infections EA 3826, Faculté de Médecine 1 rue Gaston Veil, 44035 Nantes Cedex01, France. Phone and Fax (33) 240 41 2854. Email: jocelyne.caillon@univ-nantes.fr

Abstract

Aims: Isostatic compression was used in the shaping of calcium phosphate biomaterials intended for osseous implant. The purpose of this experiment was to determine whether isostatic compression reduces the microbial load in a calcium phosphate biomaterial and whether sterility could be achieved.

Methods and results: Samples of calcium deficient apatite seeded with *S. aureus* were treated with different isostatic compression protocols. A pressure of 140 MPa had an effect on the bacterial growth and 3 isostatic compressions at 140 MPa with 2h intervals between them may induce a destruction of *S. aureus*.

Conclusions: Several successive compressions induced a destruction of microbial load in a calcium-phosphate biomaterial.

Significance and impact of study: This high pressure process could be use to inactivate bacterial load of thermo sensitive calcium phosphate biomaterials.

Keywords : Isostatic compression, high pressure, bacterial destruction, biomaterial, calcium phosphate

Introduction

Osseous defects due to trauma, osteolyses, and osteosarcomes can be treated by osseous fill in [1]. Various materials can be used, such as coral [2], hydraulic or acrylic cements [3] or calcium phosphate biomaterials [4]. These biomaterials become integrated into the osseous matrix and allow reconstruction by a recolonization mechanism. Calcium phosphate biomaterials can be synthesized and subsequently shaped by various processes including wet granulation, isostatic compression, and dynamic compaction. Processes of compression and compaction allow the preparation of blocks adapted to the osseous defect morphology.

Isostatic compression is typically used in the shaping of calcium phosphate biomaterials intended for osseous implant [5]. Pressure is applied uniformly and from all directions to consolidate the material by compression. Compression is followed by heat sterilization. Unfortunately, the required heat sterilization step prevents the incorporation of thermo-sensitive therapeutic agents into the calcium phosphate matrix.

Isostatic compression has been investigated as a method of food pascalisation (sterilization by pressure). Various studies demonstrate a reduction of the bacterial load in various types of food using various protocols of pascalisation [6]. Some pascalisation processes are used in the agro-alimentary industry in large scale production. Pascalisation avoids some disadvantages of sterilization by high temperature. Pascalisation can also be combined in some uses with lower temperatures to achieve a similar sterilizing efficiency as high temperature alone. Lower temperatures might be better tolerated by thermo-sensitive components. The efficiency of pascalisation varies according to the pressure applied to the plateau, the

rate of pressure increase or decrease, the time of compression, the temperature of compression, as well as the number of successive compressions.

The purpose of this experiment was to determine whether isostatic compression reduces the microbial load in a calcium phosphate biomaterial intended for osseous implants and whether sterility could be achieved. Isostatic compression could be a useful alternative to sterilization by temperature. Samples of calcium deficient apatite were seeded with bacterial contamination and treated with one of several isostatic compression protocols to determine whether the compression was sterilizing.

Materials and methods

Calcium deficient apatite (CDA) powder was prepared by alcalin synthesis. Physicochemical characterization gave a hydroxy apatite (HA) / beta-tricalciumphosphate (β TCP) ratio equal to 16.2/83.8 and a Ca/P ratio of 1.53. No pyrophosphate was observed by infrared spectrophotometer analysis.

A methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain isolated from clinical samples was used in these experiments.

Antibactericidal activity of CDA on *S. aureus*

Plate assay. A Mueller-Hinton (MH) agar plate was seeded with a 10^6 CFU/ml suspension of *Staph. aureus*. Four separate wells 1 cm in diameter were created in the agar with a pastry cutter and filled with 10 mg, 20 mg, 30 mg, or 40 mg of CDA followed by 50 μ l of physiological serum. The results were read after 24 h of incubation at 37°C.

Broth assay. A suspension of *Staph. aureus* at 10^6 CFU/ml was prepared and a bacterial numeration was performed on MH agar. Ten ml of this suspension were introduced into 3 flasks: the first served as control, the second was spiked with 1 g of CDA and the third with 2 g of CDA. After 24 h of incubation at 37°C, bacteria in each flask were enumerated on MH agar.

Compression protocol studies

Samples were prepared for compression as follows. Bacterial suspensions of *S. aureus* (10^2 , 10^3 and 10^5 bacteria/ml) were prepared and 12 ml of each suspension were collected on a filter. Bacteria were lifted from the filter with a swab and were mixed with 12 g of CDA powder. The mixture was then homogenized for 5 min with an oscillatory agitator (Turbula Schatz kind T2C, Willy A. Bachofer, Switzerland) and 7 g were subjected to isostatic compression. oscillatory agitator

Three protocols of compression (A, B and C) were used (Table 1). The applied pressure was 140 MPa for 5 min at ambient temperature. The number of isostatic compressions and the lapse of time between successive isostatic compressions were different for each protocol. For each protocol, three samples loaded with 10^2 , 10^3 and 10^5 bacteria/g of powder were introduced into different elastic molds under vacuum.

Table 1. Compression protocols applied to CDA loaded with *S. aureus*

Protocol	Isostatic pressure (MPa)	Number of compressions	Delay between compressions
A	140	1	-
B	140	3	15 min
C	140	3	2 h

- Protocol A: one isostatic compression

Each mold underwent one 5 min isostatic compression at 140 MPa.

- Protocol B: three isostatic compressions at 15 min intervals

Each mold underwent a 5 min isostatic compression at 140 MPa. Samples were then removed from the compression cylinder for 15 min before undergoing a second and a third compression under the same conditions.

- Protocol C: three isostatic compressions at 2 h intervals

As in protocol B but with a 2 h resting interval.

Each block was broken under sterile conditions and examined for the presence of bacteria by enrichment culture as follows. Two grams of CDA were put into Brain

Hearth Infusion (BHI) broth (Biomerieux France) and 2 g into Schaedler broth (Biomerieux France). The broth was incubated at 37°C for 15 days and shaken every day. Two control samples of 2 g of uncompressed CDA loaded with S. aureus were also put into BCC broth and ANA broth.

If growth was observed in the broth, samples were plated on trypticase soy agar (TS) (Becton France) and Chapman agar (selective for Staphylococcus, Becton France) to determine whether S. aureus was present.

Results

Antibacterial activity of CDA powder.

We first determined whether CDA had any effect on the viability of S. aureus by culturing the bacteria in the presence of CDA. In a plate assay, CDA did not cause any zones of growth inhibition. In liquid culture there was also no effect of CDA on bacterial cell number. The count of surviving bacteria after growth in liquid medium with added CDA are presented in Table 2. CDA appears to have no effect on the viability of S. aureus under these typical culture conditions.

Table 2. Bacteria count after 24 h with or without 1 g or 2 g of CDA

	Bacteria /mL
Control T=0	3×10^6
Control T=24 h	4×10^8
1 g CDA T=24 h	1.4×10^8
2 g CDA T=24 h	3.7×10^8

Compression studies

Table 3 presents the results of studies using a single isostatic compression (protocol A) to attempt to sterilize CDA samples seeded with varying numbers of S. aureus. Bacterial growth was noted after 1 or 2 days when the powder was not compressed, but was delayed to more than 3 days when the powder was compressed. Thus, after one isostatic compression, none of the compressed CDA samples were sterile.

Table 3. Protocol A: *S. aureus* isolated after one isostatic compression (+ :growth; - :no growth)

	Duration of incubation	<i>S. aureus</i> inoculum		
		10 ² bacteria/mL	10 ³ bacteria/mL	10 ⁵ bacteria/mL
Sample 1	13 days	-	+	+
Sample 2	12 days	+	+	+
Sample 3	12 days	+	+	+

Table 4 presents the results of studies with CDA samples that were subjected to 3 successive isostatic compressions with 15 min intervals between compressions (protocol B). Three samples were tested for each concentration of bacteria. After 3 compressions no *S. aureus* were detected.

Table 4. Protocol B: *S. aureus* isolated after 3 compressions separated by 15 min intervals (+ :growth; - :no growth).

Duration of incubation	<i>S. aureus</i> inoculum		
	10 ² bacteria/mL	10 ³ bacteria /mL	10 ⁵ bacteria /mL
1 month	-	-	-

Table 5 presents the data from 3 successive isostatic compressions with 2 h intervals between compressions (protocol C). After 3 compressions no *S. aureus* was detected in samples with 10² or 10³ bacteria inoculated. However *S. aureus* was detected in the samples with 10⁵ bacteria/ml. Thus several of these protocols of isostatic compression reduced the bacterial load.

Table 5. Protocol C: S. aureus identified after 3 compressions at 2 h intervals (+: growth; - : no growth).

Duration of incubation	<i>S. aureus</i> inoculum		
	10 ² bacteria /g	10 ³ bacteria /g	10 ⁵ bacteria /g
1 month	-	-	+

Discussion

The objective of this experiment was to determine if isostatic compression could reduce or sterilize the microbial load in a calcium phosphate biomaterial intended for osseous implant. Isostatic compression is currently used simply as a stage to shape biomaterials that must then be sterilized, typically by heat. If isostatic compression were also sterilizing, this subsequent sterilization step could be avoided, allowing the loading of thermo sensitive therapeutic agents into the biomaterial.

Various types of bacteria display varying sensitivity to high pressure. Gram negative bacteria are, in general, more sensitive to high pressure than gram-positive bacteria. Additionally, the shape of the bacterium plays an important role; bacilli are more sensitive than cocci [7, 8, 9]. The efficiency of high pressure sterilization was improved with increased maximum pressure and with increased duration of exposure at the maximum level [7, 10]. Rapid decompression has also been demonstrated to improve sterilization. Temperature also plays an important role; there is an optimal temperature at which a strain will be more resistant to pressure [7, 8]. Spores resist high pressures well but lower values of pressures can lead to their germination, which is favored by moderate temperatures [11, 7]. It seemed that the most effective process to inactivate spores would be to make cycles with lower pressures followed by cycles with higher pressures. Generally yeasts and fungi were more sensitive to pressure than bacteria.

Pressure is often used in the agro-alimentary industry for the pascalisation of foods as fruit juices, dairy products or meat-based products. Pressure sterilization is the technique of choice for some purposes because it allows the preservation of some organoleptic characteristics as well as the content of some nutritional elements such

as vitamins. Furthermore it does not lead to the formation of some toxic products generated by heat.

The biomaterial used for this experiment was a calcium deficient apatite, chosen because it is a commonly used material for osseous reconstruction, particularly in dental and orthopedic surgery [12].

No antibacterial activity of CDA was observed. This result was similar to that obtained in another study [11], contrary to the findings of Opalchenova [13] and Ingram [14] possibly because of differences in experimental conditions.

A *S. aureus* strain was used in this study because of its frequent involvement in osteoarticular infections[15]. Moreover gram-positive cocci were resistant to pascalisation [16]

A single isostatic compression was not sterilizing. However, a lengthened time of development of microbial colonies was observed, suggesting that the isostatic compression had an effect on bacterial growth. When several successive isostatic compressions were performed in protocol B, *S. aureus* was not found in any samples with a pressure of 140 MPa. In agro-alimentary studies, pressures used are generally higher, about 150 MPa for the pascalisation of raw meats, and up to 400 MPa for conservation of fruit juices and higher for dairy products.

Conclusion

The objective of this study was to determine if the isostatic compression could minimize or sterilize the microbial load in a calcium phosphate biomaterial intended for osseous implant.

We found that the studied protocols reduced the bacterial load in the samples and when several successive compressions were applied the reduction was enhanced. However, these protocols did not achieve the sterility required for medical uses. Further experiments examining times of compression and intervals between compression may allow improvement of the isostatic compression protocol.

References

- [1] Daculsi G, Passuti N, Martin S, *et al.*. Macroporous calcium phosphate ceramic for long bone surgery in human dogs. Clinical and histological study. *J Biomed Mater Res* 1990;24: 379-396B.
- [2] Freiermuth M. Corail et biocéramiques utilisés dans le comblement osseux. *Pharm Hosp* 1993;28: 113, 17-24.
- [3] Hamanishi C, Kitamoto K, Tanaka S, *et al.* A self-setting TTCP-DCPD apatite cement for release of vancomycin. *J Biomed Mater Res (Applied Biomaterials)* 1996;33: 139-143.
- [4] Koeneman J, Lemons J, Ducheyne P, *et al.*. Workshop on characterization of calcium phosphate materials. *J Applied Biomater* 1990;1: 79-90.
- [5] Gautier H, Merle C, Auget JL, *et al.* Isostatic compression, a new process for incorporating vancomycin into biphasic calcium phosphate : comparison with a classical method. *Biomaterials* 2000;21: 243-249.
- [6] Solomon EB, Hoover DG. Inactivation of *Campylobacter jejuni* by high hydrostatic pressure. *Letters in Applied Microbiology* 2004;38: 505-509.
- [7] Lambert Y.. Ph D thesis 1999. University of Bordeaux, France. Application du paramètre pression dans les procédés de l'agro-alimentaire : pascalisation, transport de masse, congélation et mise au point d'une gamme d'emballage.
- [8] Hugas M, Garriga M, Monfor JM. New mild technologies in meat processing : high pressure as a model technology. *Meat Science* 2002;62: 359-371.
- [9] Ponce E, Pla R, Sendra E, *et al.* Combined effect of nisin and high hydrostatic pressure on destruction of *Listeria innocua* and *Escherichia coli* in liquid whole egg. *Int J Food Microbiol* 1998;43: 15-19.

- [10] Spilimbergo S, Elvassore N, Bertuc A. Microbial inactivation by high-pressure. *The Journal of Supercritical Fluids*, 2000;22: 55-63.
- [11] Gautier H, Caillon J, LeRay AM, *et al.*. Influence of isostatic compression on the stability of vancomycin loaded with a calcium phosphate-implantable drug delivery device. *J Biomed Mater Res* 2000;52: 308-314.
- [12] Bourgeois O, Laboux L, Obadia O, *et al.* Calcium deficient apatite: a first in vivo study concerning bone ingrowth. *J Biomed Mater Res (part A)* 200;365: 402-403.
- [13] Opalchenova G, Dyullgerova E, Petrov OE. Effect of calcium phosphate ceramics on Gram-negative bacteria resistant to antibiotics. *J Biomed Mater Res* 1996;32: 473-479.
- [14] Ingram AE, Robinson J, Rohrich RJ. The antibacterial effect of porous hydroxyapatite granules. *Plast Reconstr Surg* 1996;98: 1119-1120.
- [15] Zalavras CG, Dellamaggiora R, Patzakis MJ, *et al.* Recalcitrant septic knee arthritis due to adjacent osteomyelitis in adults. *Clin Orthop Relat Res* 2006;451: 38-41.
- [16] Rigaldie Y, Demazeau G. Apport des hautes pressions aux sciences pharmaceutiques et médicales. *Annales Pharmaceutiques Françaises* 200;462: 116-127.

Liste of tables

Table 1. Compression protocols applied to CDA loaded with *S. aureus*

Table 2. Bacteria count after 24 h with or without 1 g or 2 g of CDA

Table 3. Protocol A: *S. aureus* isolated after one isostatic compression (+ :growth; - :no growth)

Table 4. Protocol B: *S. aureus* isolated after 3 compressions separated by 15 min intervals (+ :growth; - :no growth).

Table 5. Protocol C: *S. aureus* identified after 3 compressions at 2 h intervals (+ :growth; - : no growth).

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

1. Liste des figures

Figure 1 : Principe d'un appareil à compression isostatique directe.....	7
Figure 2 : Principe d'un appareil à compression isostatique indirecte.....	7
Figure 3 : Nombre de cellules viables restantes après différents traitements (68).	8
Figure 4 : Images obtenues par SEM avant et après traitement par hautes pressions de <i>L. monocytogenes</i> en phase stationnaire dans un milieu de citrate de sodium (pH 5,6). (1) sans traitement par la pression (x16000) ; (2) après un traitement à 400 MPa (10 min, 20°C) (x18000) (38).....	17
Figure 5 : Images obtenues par SEM avant et après traitement par hautes pressions de <i>S. typhimurium</i> en phase stationnaire dans un milieu de phosphate de sodium (pH 7,0). (3) sans traitement par la pression (x16000) ; (4) après un traitement à 325 MPa (10 min, 20°C) (x16000) (38).	18
Figure 6 : Image au SEM de <i>L. mesenteroides</i> . (A) non traité (focale x25000). (B) après traitement à 500 MPa à 35°C pendant 5 min (focale x25000). (C) Cellules traitées à 500 MPa (focale x50000) (17).....	18
Figure 7 : Image au TEM de <i>L. mesenteroides</i> . (A) non traités. (B) traités à 250 MPa à 35°C pendant 5 min. (C) traités à 500 MPa à 35°C pendant 5 min. (légende : cw, paroi cellulaire ; cm, membrane cellulaire ; n, nucléoïde ; b, ampoule) (17).....	19
Figure 8 : Epaisseur de la bicouche pour des vésicules multilamellaires de phosphatidylcholine dans une solution de D ₂ O en fonction de l'augmentation (○) et de la réduction de la pression (●) (29).	20
Figure 9 : Absorption d'IP et viabilité :.....	22
Figure 10 : Activité de l'hydrolase de la paroi cellulaire d'une souche de <i>L. lactis</i> traité par des pressions allant de 0,1 à 800 MPa (les valeurs avec la même lettre ne sont pas statistiquement différentes - $\alpha=0,05$) (21)	24
Figure 11 : Cinétique de diffusion du BE pour d'une souche de <i>L. plantarum</i> en présence (●) et en absence (○) de glucose (27).....	25
Figure 12 : Corrélation de la fluorescence du BE pour des échantillons de <i>L. plantarum</i> en présence (symboles noirs) et en absence (symboles creux) de glucose.	25
Figure 13 : Effet des hautes pressions sur la répartition des protéines d' <i>E. coli</i> (16).....	26
Figure 14 : Nombre de bactéries survivantes d' <i>E. coli</i> C9490 (●) et NCTC 8003 (■) en phase de croissance exponentielle (a) ou en phase stationnaire (b) soumises à différentes pressions pendant 8 min (28). .	28
Figure 15 : Effet des hautes pressions sur la répartition du nucléoïde d' <i>E. coli</i> en phase exponentielle de croissance (A, C et E) ou en phase stationnaire (B, D et F) (16).....	28
Figure 16 : Effet des hautes pressions sur la répartition de l'ARN d' <i>E. coli</i> (16).....	29
Figure 17 : Inactivation sous pression de <i>Campylobacter jejuni</i> (BG-), <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (BG-) et <i>Salmonella typhimurium</i> (BG-) (a) et de <i>Escherichia coli</i> (BG-), <i>Staphylococcus aureus</i> (CG+) et <i>Enterococcus faecalis</i> (CG+) (b) dans la viande de porc (3).	30

Figure 18 : Résistance à la pression de différentes souches d' <i>E. coli</i> en phase stationnaire traités à 500 MPa (52). Les souches utilisées sont : <i>E. coli</i> O157 C9490 (●), 30-2C4 (□), NCTC 12079 (▲), W2-2 (○), et H1071 (■) et <i>E. coli</i> O124 NCTC 8003 (Δ).	31
Figure 19 : schéma des événements intervenant durant la germination induite par des nutriments en comparaison à celles induites par différents traitements (37).	Erreur ! Signet non défini.
Figure 20 : Cinétique d'inactivation d' <i>Escherichia coli</i> sous 250 MPa à 20°C (3).	35
Figure 21 : Effet de la température sur l'inactivation, dans du bœuf haché, de <i>Pseudomonas fluorescens</i> sous 150 MPa et de <i>Citrobacter freundii</i> sous 200 MPa, durant 20 min (3).	36
Figure 22 : Inactivation d' <i>E. coli</i> K-12TG1 après 10 minutes de traitement à différentes pressions à -20°C (○), -10°C (■) et +25°C (■). La ligne pointillée indique la limite de détection de la méthode (60).	36
Figure 23 : Inactivation d' <i>E. coli</i> K-12TG1 par des traitements de 10 minutes à +25°C (▲) et à -20°C (●) à diverses pressions dans une suspension d'activité d'eau contrôlée (12) :	37
Figure 24 : presse isostatique 150MPa, N° FF558, Nova Swiss.	57
Figure 25 : Enceinte de compression.	58
Figure 26 : CDA après compression isostatique.	59
Figure 27 : Protocole de l'expérimentation sur poudre non contaminée artificiellement (palier de compression : 140 MPa, 10 minutes).	79
Figure 28 : Protocole A : poudre contaminée artificiellement par du <i>S. aureus</i> P9 (SRAM) à 3 charges bactériennes différentes traitée par une compression isostatique (palier de compression : 140 MPa, 10 minutes).	80
Figure 29 : Protocole B et C : poudre contaminée artificiellement par du <i>S. aureus</i> P9 à 3 charges bactériennes différentes traitée par 3 compressions isostatiques à 15 minutes (B) ou 2 heures (C) d'intervalle (pallier 140 MPa, 10 minutes).	85

2. Liste des tableaux

Tableau 1 : Barosensibilité des liaisons chimiques (3).	11
Tableau 2 : Comparaison de l'action de la température et de la pression (1).	11
Tableau 3 : Structures et processus cellulaires inactivés par les hautes pressions (11).	16
Tableau 4 : Teneur en protéine d' <i>E. coli</i> et du liquide de pression (milieu extracellulaire) pour des cellules en phase stationnaires ou exponentielle de croissance, non traité ou soumises à diverses pressions (16).	27
Tableau 5 : Modifications morphologiques et physiologiques d'une souche <i>E. coli</i> exposée à différentes pressions pendant 8 min (16).	27
Tableau 6 : Changements structurels d' <i>E. coli</i> K-12TG1 observés au TEM pour des cellules soumises à différents traitements pendant 10 minutes (60).	37
Tableau 7 : Correspondance entre la concentration bactérienne d'une suspension et la densité lue en McFarland.	63

Tableau 8 : Vérification de l'innocuité du CDA sur le <i>S. aureus</i> ATCC 25923 en milieu liquide.....	65
Tableau 9 : Comparaison des résultats de contamination avec des suspensions de concentration croissantes (nombre de colonies/boîte)	68
Tableau 10 : Témoins et échantillons de 50 mg filtrés sur membrane de 0,22 µm.....	69
Tableau 11 : Témoins et échantillons de 500 mg dilués dans 1 ml d'eau physiologique.	70
Tableau 12 : Concentration des inoculum de départ et quantité de CDA ajouté.	71
Tableau 13 : Détermination du seuil minimal de sensibilité de la méthode.	72
Tableau 14 : Bactéries survivantes avant et après compression isostatique.	75
Tableau 15 : Nombre de bactéries/filtre avant et après compression isostatique.....	75
Tableau 16 : Evaluation de la contamination naturelle de la CDA sur 5 jours.....	77
Tableau 17 : Evaluation du risque de contamination lors de l'étape de broyage du bloc de CDA compressé. .	81
Tableau 18 : Germes identifiés après une compression isostatique à 140 MPa pendant 10 minutes (protocole A).....	82
Tableau 19 : Protocole B, germes identifiés après trois compressions distantes de 15 minutes d'intervalle (pallier à 140 MPa, 10 minutes).....	86
Tableau 20 : Protocole C, germes identifiés après trois compressions distantes de 2 heures d'intervalle (pallier à 140 MPa, 10 minutes).....	86

BIBLIOGRAPHIE

- (1) **Balny C., Heremans K., Masson P.**
Haute pression et biologie : une démarche d'avenir.
Biofutur ; mai 1992 ; n°112 ; pp. 37-42(6).
- (2) **Mussa D. M. and Ramaswamy H. S.;**
Ultra High Pressure Pasteurization of Milk: Kinetics of Microbial Destruction and Changes in Physico-chemical Characteristics.
Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie ; Volume 30, Issue 6, September 1997, Pages 551-557.
- (3) **Lambert Y.**
Application du paramètre pression dans les procédés de l'agro-alimentaire : pascalisation, transport de masse, congélation et mise au point d'une gamme d'emballage.
Thèse de doctorat ; 06/10/1999 ; Bordeaux ; 275 p.
- (4) **Spilimbergo S., Elvassore N., Bertucci A.**
Microbial inactivation by high-pressure.
The Journal of supercritical fluids ; 2002, vol. 22, n°1, pp. 55-63(9).
- (5) **Hugas M., Garriga M., Monfort J. M.**
New mild technologies in meat processing : high pressure as a model technology.
Meat Science, Volume 62, Number 3, November 2002 , pp. 359-371(13).
- (6) **Mussa D. M., Ramaswamy H. S., J. P. Smith J. P.**
High pressure (HP) destruction kinetics of *Listeria monocytogenes* Scott A in raw milk.
Food Research International, Volume 31, Issue 5 ; June 1998 ; p. 343-350.
- (7) **Trujillo A. J., Capellas M., Buffa M., Royo C., Gervilla R., Felipe X., Sendra E., Saldo J., Ferragut V., Guamis B.**
Application of high pressure treatment for cheese production.
Food Research International, Volume 33, Number 3, April 2000 , pp. 311-316(6).
- (8) **O'Reilly Ciara E., O'Connor Paula M., Murphy Patrick M., Kelly Alan L., Beresford Thomas P.**
Effects of high-pressure treatment on viability and autolysis of starter bacteria and proteolysis in Cheddar cheese.
International Dairy Journal, Volume 12, Number 11, 2002 , pp. 915-922(8).
- (9) **O'Reilly Ciara E., Kelly Alan L., Murphy Patrick M., Beresford Thomas P.**
High pressure treatment: applications in cheese manufacture and ripening.
Trends in Food Science and Technology, Volume 12, Number 2, February 2001 , pp. 51-59(9).
- (10) **Ponce E., Pla R., Sendra E., Guamis B., Mor-Mur M.**
Combined effect of nisin and high hydrostatic pressure on destruction of *Listeria innocua* and *Escherichia coli* in liquid whole egg.
International Journal of Food Microbiology, Volume 43, Number 1, 18 August 1998 , pp. 15-19(5).

- (11) **Abe F.**
Exploration of the effects of high hydrostatic pressure on microbial growth, physiology and survival: perspectives from piezophysiology.
Biosci Biotechnol Biochem. 2007 Oct;71(10):2347-57.
- (12) **Moussa M, Perrier-Cornet JM, Gervais P.**
Synergistic and antagonistic effects of combined subzero temperature and high pressure on inactivation of *Escherichia coli*.
Appl Environ Microbiol. 2006 Jan;72(1):150-6.
- (13) **Wouters PC, Glaasker E, Smelt JP.**
Effects of High Pressure on Inactivation Kinetics and Events Related to Proton Efflux in *Lactobacillus plantarum*.
Appl Environ Microbiol. 1998 Feb;64(2):509-514.
- (14) **Scarlata S.**
Determination of the Activation Volume of PLC β by G β γ -Subunits through the Use of High Hydrostatic Pressure.
Biophys J. 2005 Apr;88(4):2867-74.
- (15) **Aertsen A, Vanoirbeek K, De Spiegeleer P, Sermon J, Hauben K, Farewell A, Nyström T, Michiels CW.**
Heat shock protein-mediated resistance to high hydrostatic pressure in *Escherichia coli*.
Appl Environ Microbiol. 2004 May;70(5):2660-6.
- (16) **Mañas P, Mackey BM.**
Morphological and physiological changes induced by high hydrostatic pressure in exponential- and stationary-phase cells of *Escherichia coli*: relationship with cell death.
Appl Environ Microbiol. 2004 Mar;70(3):1545-54.
- (17) **Kaletunç G, Lee J, Alpas H, Bozoglu F.**
Evaluation of structural changes induced by high hydrostatic pressure in *Leuconostoc mesenteroides*.
Appl Environ Microbiol. 2004 Feb;70(2):1116-22.
- (18) **Cléry-Barraud C, Gaubert A, Masson P, Vidal D.**
Combined effects of high hydrostatic pressure and temperature for inactivation of *Bacillus anthracis* spores.
Appl Environ Microbiol. 2004 Jan;70(1):635-7.
- (19) **Malone AS, Wick C, Shellhammer TH, Courtney PD.**
High pressure effects on proteolytic and glycolytic enzymes involved in cheese manufacturing.
J Dairy Sci. 2003 Apr;86(4):1139-46.
- (20) **Masson P, Tonello C, Balny C.**
High-Pressure Biotechnology in Medicine and Pharmaceutical Science.
J Biomed Biotechnol. 2001;1(2):85-88.
- (21) **Malone AS, Shellhammer TH, Courtney PD.**
Effects of high pressure on the viability, morphology, lysis, and cell wall hydrolase activity of *Lactococcus lactis* subsp. cremoris.
Appl Environ Microbiol. 2002 Sep;68(9):4357-63.

- (22) **Lee SY, Dougherty RH, Kang DH.**
Inhibitory effects of high pressure and heat on *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in apple juice.
Appl Environ Microbiol. 2002 Aug;68(8):4158-61.
- (23) **Paidhungat M, Setlow B, Daniels WB, Hoover D, Papafragkou E, Setlow P.**
Mechanisms of induction of germination of *Bacillus subtilis* spores by high pressure.
Appl Environ Microbiol. 2002 Jun;68(6):3172-5.
- (24) **Gaspar LP, Silva AC, Gomes AM, Freitas MS, Ano Bom AP, Schwarcz WD, Mestecky J, Novak MJ, Foguel D, Silva JL.**
Hydrostatic pressure induces the fusion-active state of enveloped viruses.
J Biol Chem. 2002 Mar 8;277(10):8433-9.
- (25) **Ritz M, Tholozan JL, Federighi M, Pilet MF.**
Morphological and physiological characterization of *Listeria monocytogenes* subjected to high hydrostatic pressure.
Appl Environ Microbiol. 2001 May;67(5):2240-7.
- (26) **O'Reilly CE, O'Connor PM, Kelly AL, Beresford TP, Murphy PM.**
Use of hydrostatic pressure for inactivation of microbial contaminants in cheese.
Appl Environ Microbiol. 2000 Nov;66(11):4890-6.
- (27) **Ulmer HM, Gänzle MG, Vogel RF.**
Effects of high pressure on survival and metabolic activity of *Lactobacillus plantarum* TMW1.460.
Appl Environ Microbiol. 2000 Sep;66(9):3966-73.
- (28) **Pagán R, Mackey B.**
Relationship between membrane damage and cell death in pressure-treated *Escherichia coli* cells: differences between exponential- and stationary-phase cells and variation among strains.
Appl Environ Microbiol. 2000 Jul;66(7):2829-34.
- (29) **Kato M, Hayashi R.**
Effects of high pressure on lipids and biomembranes for understanding high-pressure-induced biological phenomena.
Biosci Biotechnol Biochem. 1999 Aug;63(8):1321-8.
- (30) **Yang SJ, Ko SJ, Tsai YR, Jiang SS, Kuo SY, Hung SH, Pan RL.**
Subunit interaction of vacuolar H⁺-pyrophosphatase as determined by high hydrostatic pressure.
Biochem J. 1998 Apr 15;331 (Pt 2):395-402.
- (31) **Prat-Gay G, Paladini A Jr, Stein M, Wolosiuk RA.**
The effect of high hydrostatic pressure on the modulation of regulatory enzymes from spinach chloroplasts.
J Biol Chem. 1991 Nov 5;266(31):20913-21.
- (32) **Jaenicke R, Bernhardt G, Lüdemann HD, Stetter KO.**
Pressure-Induced Alterations in the Protein Pattern of the Thermophilic Archaeobacterium *Methanococcus thermolithotrophicus*.
Appl Environ Microbiol. 1988 Oct;54(10):2375-2380.

- (33) **Heinemann SH, Conti F, Stühmer W, Neher E.**
Effects of hydrostatic pressure on membrane processes. Sodium channels, calcium channels, and exocytosis.
J Gen Physiol. 1987 Dec;90(6):765-78.
- (34) **Harper AA, Macdonald AG, Wann KT.**
The action of high hydrostatic pressure on the membrane currents of *Helix* neurones.
J Physiol. 1981 Feb;311:325-39.
- (35) **Kalchayanand, N., C. Frethem, P. Dunne, A. Sikes, B. Ray.**
Hydrostatic pressure and bacteriocin-triggered cell wall lysis of *Leuconostoc mesenteroides*.
Innovative Food Science and Emerging Technologies, Volume 3, Number 1, April 2002 , pp. 33-40(8).
- (36) **Niven GW, Miles CA, Mackey BM.**
The effects of hydrostatic pressure on ribosome conformation in *Escherichia coli* : and in vivo study using differential scanning calorimetry.
Microbiology. 1999 Feb;145 (Pt 2):419-25.
- (37) **Wuytack EY, Boven S, Michiels CW.**
Comparative study of pressure-induced germination of *Bacillus subtilis* spores at low and high pressures.
Appl Environ Microbiol. 1998 Sep;64(9):3220-4.
- (38) **Tholozan JL, Ritz M, Jugiau F, Federighi M, Tissier JP.**
Physiological effects of high hydrostatic pressure treatments on *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium*.
J Appl Microbiol. 2000 Feb;88(2):202-12.
- (39) **Mackey, B. M., K. Forestie ´re, N. S. Isaacs, R. Stennig, B. Brooker.**
The effect of high hydrostatic pressure on *Salmonella thompson* and *Listeria monocytogenes* examined by electron microscopy.
Letters in applied microbiology, 1994, vol. 19, n°6, pp. 429-432.
- (40) **Mozhaev VV, Heremans K, Frank J, Masson P, Balny C.**
High pressure effects on protein structure and function.
Proteins. 1996 Jan;24(1):81-91.
- (41) **Pagán R, Jordan S, Benito A, Mackey B.**
Enhanced acid sensitivity of pressure-damaged *Escherichia coli* O157 cells.
Appl Environ Microbiol. 2001 Apr;67(4):1983-5.
- (42) **Clouston JG, Wills PA.**
Initiation of germination and inactivation of *Bacillus pumilus* spores by hydrostatic pressure.
J Bacteriol. 1969 Feb;97(2):684-90.
- (43) **Perrier-Cornet JM, Hayert M, Gervais P.**
Yeast cell mortality related to a high-pressure shift: occurrence of cell membrane permeabilization.
J Appl Microbiol. 1999 Jul;87(1):1-7.
- (44) **Schulz E, Lüdemann HD, Jaenicke R.**
High pressure equilibrium studies on the dissociation-association of *E. coli* ribosomes.
FEBS Lett. 1976 Apr 15;64(1):40-3.

- (45) **Yayanos AA, Pollard EC.**
A study of the effects of hydrostatic pressure on macromolecular synthesis in *Escherichia coli*.
Biophys J. 1969 Dec;9(12):1464-82.
- (46) **Erijman L, Clegg RM.**
Reversible stalling of transcription elongation complexes by high pressure.
Biophys J. 1998 Jul;75(1):453-62.
- (47) **Chong PL, Fortes PA, Jameson DM.**
Mechanisms of inhibition of (Na,K)-ATPase by hydrostatic pressure studied with fluorescent probes.
J Biol Chem. 1985 Nov 25;260(27):14484-90.
- (48) **Ulmer HM, Herberhold H, Fahsel S, Gänzle MG, Winter R, Vogel RF.**
Effects of pressure-induced membrane phase transitions on inactivation of HorA, an ATP-dependent multidrug resistance transporter, in *Lactobacillus plantarum*.
Appl Environ Microbiol. 2002 Mar;68(3):1088-95.
- (49) **Gross M, Lehle K, Jaenicke R, Nierhaus KH.**
Pressure-induced dissociation of ribosomes and elongation cycle intermediates. Stabilizing conditions and identification of the most sensitive functional state.
Eur J Biochem. 1993 Dec 1;218(2):463-8.
- (50) **Fujiwara S, Kunugi S, Oyama H, Oda K.**
Effects of pressure on the activity and spectroscopic properties of carboxyl proteinases. Apparent correlation of pepstatin-insensitivity and pressure response.
Eur J Biochem. 2001 Feb;268(3):645-55.
- (51) **Serrano J, Velazquez G, Lopetcharat K, Ramírez JA, Torres JA.**
Effect of moderate pressure treatments on microstructure, texture, and sensory properties of stirred-curd cheddar shreds.
J Dairy Sci. 2004 Oct;87(10):3172-82.
- (52) **Benito A, Ventoura G, Casadei M, Robinson T, Mackey B.**
Variation in resistance of natural isolates of *Escherichia coli* O157 to high hydrostatic pressure, mild heat, and other stresses.
Appl Environ Microbiol. 1999 Apr;65(4):1564-9.
- (53) **Alpas H, Kalchayanand N, Bozoglu F, Sikes A, Dunne CP, Ray B.**
Variation in resistance to hydrostatic pressure among strains of food-borne pathogens.
Appl Environ Microbiol. 1999 Sep;65(9):4248-51.
- (54) **Casadei MA, Mañas P, Niven G, Needs E, Mackey BM.**
Role of membrane fluidity in pressure resistance of *Escherichia coli* NCTC 8164.
Appl Environ Microbiol. 2002 Dec;68(12):5965-72.
- (55) **Nakayama A, Yano Y, Kobayashi S, Ishikawa M, Sakai K.**
Comparison of Pressure Resistances of Spores of Six Bacillus Strains with Their Heat Resistances.
Appl Environ Microbiol. 1996 Oct;62(10):3897-3900.
- (56) **Ahn J, Balasubramaniam VM.**
Physiological responses of *Bacillus amyloliquefaciens* spores to high pressure.
J Microbiol Biotechnol. 2007 Mar;17(3):524-9.

- (57) **Margosch D, Ehrmann MA, Buckow R, Heinz V, Vogel RF, Gänzle MG.**
High-pressure-mediated survival of *Clostridium botulinum* and *Bacillus amyloliquefaciens* endospores at high temperature.
Appl Environ Microbiol. 2006 May;72(5):3476-81.
- (58) **Margosch D, Gänzle MG, Ehrmann MA, Vogel RF.**
Pressure inactivation of *Bacillus* endospores.
Appl Environ Microbiol. 2004 Dec;70(12):7321-8.
- (59) **Malone AS, Chung YK, Yousef AE.**
Genes of *Escherichia coli* O157:H7 that are involved in high-pressure resistance.
Appl Environ Microbiol. 2006 Apr;72(4):2661-71.
- (60) **Moussa M, Perrier-Cornet JM, Gervais P.**
Damage in *Escherichia coli* cells treated with a combination of high hydrostatic pressure and subzero temperature.
Appl Environ Microbiol. 2007 Oct;73(20):6508-18.
- (61) **Hauben KJ, Bartlett DH, Soontjens CC, Cornelis K, Wuytack EY, Michiels CW.**
Escherichia coli mutants resistant to inactivation by high hydrostatic pressure.
Appl Environ Microbiol. 1997 Mar;63(3):945-50.
- (62) **Karatzas KA, Bennik MH.**
Characterization of a *Listeria monocytogenes* Scott A isolate with high tolerance towards high hydrostatic pressure.
Appl Environ Microbiol. 2002 Jul;68(7):3183-9.
- (63) **Ritz M., Jugiau F., Rama F., Courcoux P., Semenou M., Federighi M.**
Inactivation of *Listeria monocytogenes* by high hydrostatic pressure : effects and interactions of treatment variables studied by analysis of variance.
Food Microbiology, 2000, n° 17, p. 375-382
- (64) **Hauben KJ, Bernaerts K, Michiels CW.**
Protective effect of calcium on inactivation of *Escherichia coli* by high hydrostatic pressure.
J Appl Microbiol. 1998 Oct;85(4):678-84.
- (65) **Kunugi S, Kitayaki M, Yanagi Y, Tanaka N, Lange R, Balny C.**
The effect of high pressure on thermolysin.
Eur J Biochem. 1997 Sep 1;248(2):567-74.
- (66) **Jurkiewicz E, Villas-Boas M, Silva JL, Weber G, Hunsmann G, Clegg RM.**
Inactivation of simian immunodeficiency virus by hydrostatic pressure.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1995 Jul 18;92(15):6935-7.
- (67) **Kawarai T, Arai S, Furukawa S, Ogihara H, Yamasaki M.**
High-hydrostatic-pressure treatment impairs actin cables and budding in *Saccharomyces cerevisiae*.
J Biosci Bioeng. 2006 Jun;101(6):515-8.
- (68) **Watanabe T, Furukawa S, Kawarai T, Wachi M, Ogihara H, Yamasaki M.**
Cytoplasmic acidification may occur in high-pressure carbon dioxide-treated *Escherichia coli* K12.
Biosci Biotechnol Biochem. 2007 Oct;71(10):2522-6.

- (69) **Kimura T, Horiuchi K, Kurita K, Ono T, Yoshizawa H, Fujisato T, Kishida A.**
Characteristics of compacted plasmid DNA by high pressurization.
Nucleic Acids Symp Ser (Oxf). 2007;(51):343-4.
- (70) **Wilton DJ, Ghosh M, Chary KV, Akasaka K, Williamson MP.**
Structural change in a B-DNA helix with hydrostatic pressure
Nucleic Acids Res. 2008 Jul;36(12):4032-7.
- (71) **Delacour H.**
Intérêt des hautes pressions hydrostatiques dans l'inactivation des spores bactériennes.
Thèse de doctorat ; 28/09/2000 ; Lyon
- (72) **Gauthier O, Bouler J-M, Aguado E, Pilet P, Daculsi G.**
Macroporous biphasic calcium phosphate ceramics : influence of macropore diameter and macroporosity percentage on bone ingrowth.
Biomaterials 19 ; 1998 ; 133-139
- (73) **Le Nihouannen D.**
Matériaux multiphasés pour l'ingénierie tissulaire osseuse.
Thèse de doctorat ; 09/03/2006 ; Nantes ; 119 p.
- (74) **Dalibert E.**
Utilisation du gel de concentré plaquettaire autologue avec des céramiques phosphocalciques biphasées dans le comblement de défauts osseux ulnaires chez le chien.
Thèse pour le diplôme d'état de docteur vétérinaire ; 06/07/2007 ; Nantes ; 127 p.
- (75) **Le Breuil F.**
Approche préventive chirurgicale des fractures ostéoporotiques fémorales et vertébrales par injection d'un substitut osseux au phosphate de calcium. Etude expérimentale chez la brebis.
Thèse pour le diplôme d'état de docteur vétérinaire ; 06/07/2007 ; Nantes ; 226 p.
- (76) **Obadia L.**
Synthèse et caractérisation de phosphates de calcium d'intérêt biologique : structure et propriétés de phosphates tricalciques β dopés au sodium - formation d'apatites non stoechiométriques par hydrolyse de phosphates dicalcique dihydratés.
Thèse de doctorat ; 05/11/2004 ; Nantes ; 188 p.
- (77) **Banu M.**
Mise en forme d'apatites nanocristallines : céramiques et ciments.
Thèse de doctorat ; 10/06/2005 ; Toulouse ; 183 p.
- (78) **Chéret R.**
Effet des hautes pressions sur les indicateurs de maturation de la viande et d'altération du muscle de poisson.
Thèse de doctorat ; 14/10/2005 ; Nantes ; 176 p.
- (79) **Rigaldie Y.**
Sur l'impact des traitements sous hautes pressions dans la décontamination et la stérilisation de formes pharmaceutiques renfermant des molécules thérapeutiques sensibles aux procédés énergétiques
Thèse de doctorat ; 2002 ; Bordeaux ; 252 p.

- (80) **Brigger I, Armand-Lefevre L, Chaminade P, Besnard M, Rigaldie Y, Largeteau A, Andreumont A, Grislain L, Demazeau G, Couvreur P.**
The stening effect of high hydrostatic pressure on thermally and hydrolytically labile nanosized carriers.
Pharm Res. 2003 Apr;20(4):674-83.
- (81) **Berbari G.**
Méthodes non conventionnelles de stérilisation appliquées à l'industrie pharmaceutique
Thèse d'exercice ; 26/10/2006 ; Bordeaux ; 166 p.
- (82) **Gautier H., Caillon J., LeRay A. M., Daculsi G., Merle C.**
Influence of isostatic compression on the stability of vancomycin loaded with a calcium phosphate-implantable drug delivery device.
J Biomed Mater Res ; 2000 ; 52 : 308-314.
- (83) **Opalchenova G., Dyullgerova E., Petrov O. E.**
Effect of calcium phosphate ceramics on Gram-negative bacteria resistant to antibiotics
J Biomed Mater Res ; 1996 ; 32 : 473-479.
- (84) **Ingram A.E., Robinson J., Rohrich R.J.**
The antibacterial effects of porous hydroxyapatite granules.
Plast Reconstr Surg ; 1996 ; 98 : 1119.

Nom - Prénoms : EL KOURI Nicolas, Yves, Jacques

Titre de la thèse : Influence de la compression isostatique sur l'inactivation bactérienne d'un matériau phosphocalcique pour comblement osseux

Résumé de la thèse :

L'application des hautes pressions et la compression isostatique sont des méthodes particulièrement utilisées dans certains domaines de l'agro-alimentaire pour l'inactivation bactérienne. Les effets sur les constituants biochimiques et les organelles sont nombreux. Dans une première partie, cette thèse a pour objectif d'essayer de présenter une synthèse de ces effets ainsi que les conséquences pouvant induire l'inactivation microbienne. Puis une seconde partie présente succinctement les matériaux phosphocalciques de comblement osseux utilisés dans cette étude. Enfin la troisième partie est consacrée à l'étude expérimentale de l'influence de la compression isostatique sur la réduction de la charge bactérienne d'un matériau phosphocalcique destiné à l'implantation osseuse. Les résultats ont montré que les hautes pressions (140 MPa) peuvent inactiver les *Staphylocoques dorés* présents dans un phosphate de calcium.

MOTS CLÉS :

- COMPRESSION ISOSTATIQUE - BIOMATÉRIAUX - INACTIVATION BACTÉRIENNE
- PHOSPHATE DE CALCIUM - HAUTES PRESSIONS

JURY :

PRESIDENT : Monsieur Christian MERLE, Professeur de Pharmacie Galénique, Faculté de Pharmacie de Nantes

ASSESEURS : Madame Hélène GAUTIER, Professeur de Pharmacie Galénique, Faculté de Pharmacie de Nantes

Madame Jocelyne CAILLON, Professeur de Bactériologie, Faculté de Médecine de Nantes

Monsieur Jean-Michel BOULER, Professeur de Chimie, Faculté de Chirurgie Dentaire de Nantes

Adresse de l'auteur : 6, rue Stéphane Leduc 44300 Nantes