

**UNIVERSITE DE NANTES
FACULTE DE PHARMACIE**

ANNEE 2006

N° 64

**THESE
pour le
DIPLÔME D'ETAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE
par
Mlle Marion BROUILLET**

Présentée et soutenue publiquement le 20 novembre 2006

**INTERET DE LA COMPRESSION ISOSTATIQUE
DANS L'INACTIVATION BACTERIENNE DE
MATERIAUX PHOSPHOCALCIQUES**

Président : M. Christian MERLE, Professeur de Pharmacie Galénique
Membres du jury : Mme. Hélène GAUTIER, Maître de Conférence en Pharmacie
Galénique
Mme Jocelyne CAILLON, Maître de Conférence en Bactériologie
M. Jean-Michel BOULER, Professeur, UFR d'Odontologie

INTRODUCTION..... 8

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE..... 11

I LES PRINCIPALES TECHNIQUES DE STERILISATION..... 12

1 LA STERILISATION PAR VAPEUR D'EAU.....	13
1.1 Mécanisme de stérilisation.....	13
1.2 Réglementation associée à cette technique	14
2 LA STERILISATION PAR LA CHALEUR SECHE	14
2.1 Mécanisme de stérilisation.....	14
2.2 Réglementation associée à cette technique	15
3 LA STERILISATION PAR IRRADIATION IONISANTE.....	15
3.1 Mécanisme de stérilisation.....	15
3.2 Réglementation associée à cette technique	16
3.3 Aspects techniques et industriels.....	17
4 LA STERILISATION PAR LES GAZ	18
4.1 Stérilisation à l'oxyde d'éthylène.....	18
Mécanisme de stérilisation.....	18
Paramètres devant être maîtrisés	18
Phases d'un cycle de stérilisation à l'oxyde d'éthylène	19
Réglementation associée à cette technique	20
4.2 Stérilisation par gaz-plasma	21
Mécanisme de stérilisation.....	21
Cycle de stérilisation par gaz-plasma.....	21
Réglementation associée à cette technique	22
5 STERILISATION PAR FILTRATION STERILISANTE.....	23
5.1 Mécanisme de stérilisation.....	23
5.2 Réglementation associée à cette technique	23

II LA COMPRESSION ISOSTATIQUE..... 24

1 PRINCIPE DE FONCTIONNEMENT	24
2 MECANISME D'ACTION DES HAUTES PRESSIONS	25

2.1 Sur les biomolécules.....	25
2.2 Sur les agents biologiques.....	27
Mécanisme d'action des hautes pressions sur les bactéries végétatives	27
Mécanisme d'action des hautes pressions sur les spores bactériennes	27
Mécanisme d'action des hautes pressions sur les virus.....	28
Mécanisme d'action des hautes pressions sur les agents non conventionnels	28
3 APPLICATIONS DE LA COMPRESSION ISOSTATIQUE	29
3.1 En agro-alimentaire	29
3.2 Applications médicales et pharmaceutiques	30
Stérilisation.....	30
Développement de vaccins.....	30
Conservation au froid sans congélation	31
Synthèse chimique sous hautes pressions	31
Elaboration de gels	31
4.FACTEURS INFLUENÇANT L'EFFICACITE DE LA COMPRESSION HYDROSTATIQUE EN STERILISATION	31
4.1 La pression.....	31
4.2 La température	32
4.3 Le pH du milieu.....	33
4.4 Le pourcentage de graisse dans le milieu	33
III LES SUBSTITUTS OSSEUX.....	34
1.CARACTERISTIQUES D'UN SUBSTITUT OSSEUX	34
2.LES GRANDES FAMILLES DE SUBSTITUTS OSSEUX	35
1.1 Les greffes osseuses.....	35
1.2 Le corail	35
1.3 Les phosphates de calcium.....	36
L'hydroxyapatite	36
Le β -TCP	37
Les matériaux biphasés	37
BIBLIOGRAPHIE.....	38

PARTIE EXPERIMENTALE.....	41
I PROBLEMATIQUE	42
II RESUME ET PRINCIPAUX RESULTATS	43
III PUBLICATION.....	44
INACTIVATION OF <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> IN CALCIUM PHOSPHATE BIOMATERIALS VIA ISOSTATIC COMPRESSION	44
ABSTRACT	44
INTRODUCTION.....	44
MATERIALS AND METHODS	45
MATERIAL.....	45
<i>Bacterial strain</i>	45
<i>Bone substitute</i>	46
METHODS.....	46
<i>Principle</i>	46
Preparation and inoculation of CDA.....	46
High-pressure treatment	46
Microbiological analysis	47
<i>Experimental study</i>	47
Influence of applied pressure	47
Influence of time of plateau	47
Influence of number of compressions, time of plateau of each compression, and waiting time between two compressions.....	47
Influence of fatty acid in CDA on bacterial growth.....	48
Study by scanning electron microscope	48
RESULTS.....	48
INFLUENCE OF APPLIED PRESSURE	48
INFLUENCE OF TIME OF PLATEAU.....	49
INFLUENCE OF NUMBER OF COMPRESSIONS	50
INFLUENCE OF TIME OF PLATEAU OF EACH COMPRESSION	51
WAITING TIME BETWEEN TWO COMPRESSIONS FROM 0 TO 15 MINUTES	52

WAITING TIME OF 24 HOURS BETWEEN TWO COMPRESSIONS.....	52
INFLUENCE OF FATTY ACID IN THE ENVIRONMENT	53
STUDY BY SCANNING ELECTRON MICROSCOPE	53
DISCUSSION	55
CONCLUSION.....	57
REFERENCES.....	57
IV POSTER PRESENTE LORS DU 20EME CONGRES EUROPEEN SUR LES BIOMATERIAUX , 27 SEPTEMBRE AU 1ER OCTOBRE 2006, NANTES, FRANCE	60
1 PRESENTATION.....	60
2 POSTER.....	61
CONCLUSION GENERALE.....	63
BIBLIOGRAPHIE GENERALE.....	66

INTRODUCTION

Actuellement, certains produits, notamment les produits injectables et certains dispositifs médicaux, nécessitent d'être stériles et donc stérilisés. Pour cela, il existe différentes techniques comme par exemple la stérilisation par chaleur sèche ou par irradiation ionisante. Une de ces méthodes est assez peu connue et relativement peu utilisée mais peut être prometteuse, il s'agit de la compression isostatique qui utilise les hautes pressions. Cette méthode est une technique de stérilisation utilisée dans certains pays tels que le Japon depuis les années 1990 dans le domaine de l'agro-alimentaire. Elle permet principalement de conserver le goût et les couleurs de l'aliment. Il s'agit d'une méthode de compression dans laquelle la force est appliquée dans toutes les directions contrairement à la compression « classique » où la force est appliquée dans une seule direction. La force de compression est transmise à l'objet traité par un fluide qui est le plus souvent de l'eau. Le manque de preuves scientifiques sur l'efficacité de stérilisation de cette technique empêche son utilisation en France. Un certain nombre de publications existe mais seul le domaine agroalimentaire est concerné.

La compression isostatique est également utilisée pour la mise en forme de certains biomatériaux, c'est-à-dire de matériaux compatibles avec l'organisme, notamment les substituts osseux. Les principaux substituts concernés sont les matériaux phosphocalciques utilisés notamment en orthopédie et en chirurgie dentaire.

La compression isostatique étant utilisable pour la stérilisation de certains aliments et pour la mise en forme de substituts osseux, il est légitime de se demander si l'étape de mise en forme et de stérilisation ne pourrait pas être réalisée en une seule et même étape dans le cas des biomatériaux. De plus, cela permettrait d'associer à ces biomatériaux certains principes actifs sensibles aux techniques habituelles de stérilisation. Pour cela, il est nécessaire d'étudier l'efficacité des hautes pressions sur la diminution de la quantité de micro-organismes présente dans des substituts osseux. Il a déjà été démontré que les hautes pressions permettent, dans certaines conditions opératoires et dans certains milieux, la destruction de micro-organismes tels que les bactéries et les virus. L'étude de l'efficacité de cette méthode dans le cas de substituts osseux de type phosphocalcique est donc l'objectif de ce travail.

Cette étude se divise en deux parties :

Tout d'abord une partie bibliographique reprenant les principales techniques de stérilisation, les éléments nécessaires à la compréhension de la compression isostatique, puis une revue des différents substituts osseux existants.

Ensuite, une seconde partie pratique présente une publication qui synthétise un travail de recherche effectué au sein du laboratoire d'Ingénierie Ostéo-articulaire et dentaire, UMRS 791(Faculté de Chirurgie Dentaire) et du laboratoire de Pharmacie Galénique (Faculté de Pharmacie). L'objectif de ce travail est de déterminer les conditions opératoires nécessaires à l'inactivation, par compression isostatique, d'une souche de *Staphylococcus aureus* inoculée dans de la poudre de phosphate de calcium.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

I Les principales techniques de stérilisation

La stérilisation est la mise en oeuvre d'un ensemble de méthodes et de moyens visant à éliminer tous les micro-organismes vivants de quelque nature et sous quelque forme que ce soit. Les procédés et les précautions à prendre doivent être tels qu'un niveau théorique de contamination correspondant au plus à un micro-organisme vivant par 10^6 unités soumises à la stérilisation soit atteint dans le produit final.

Donc pour qu'un produit puisse être étiqueté « stérile », la probabilité théorique qu'un micro-organisme viable soit présent doit être égale ou inférieure à 1 pour 10^6 (1).

Avant de débiter une stérilisation par quelque méthode que ce soit, il est indispensable de réaliser une pré-désinfection. Cette pré-désinfection, effectuée sur les objets et matériaux souillés, a pour but de diminuer la population de micro-organismes et de faciliter le nettoyage ultérieur. La pré-désinfection a également pour but de protéger le personnel lors de la manipulation des instruments et d'éviter la contamination de l'environnement (1).

Toute méthode de stérilisation possède un niveau d'assurance de stérilité (NAS) qui indique le degré d'assurance avec lequel une population d'articles est rendue stérile par le procédé utilisé. Le NAS pour un procédé donné est exprimé comme la probabilité d'occurrence d'un article non stérile dans cette population. Un NAS de 10^{-6} , par exemple, correspond à une probabilité d'au plus 1 micro-organisme viable pour 1×10^6 unités stérilisées du produit final (2).

Il existe deux types de stérilisation :

- la stérilisation terminale qui a lieu à la fin du processus de fabrication c'est à dire une fois le produit conditionné. On retrouve dans ce type de stérilisation différentes méthodes dont les principales sont la stérilisation par vapeur d'eau, la stérilisation par la chaleur sèche, la stérilisation par irradiation ionisante et la stérilisation par les gaz. Ce type de stérilisation est le plus fréquemment utilisé, notamment lorsque les principes actifs ne sont pas thermosensibles et dans le cas des dispositifs médicaux.

- la stérilisation en cours de fabrication qui est utilisée pour certains principes actifs ou produits qui ne peuvent faire l'objet d'une stérilisation terminale. Ce type de stérilisation est principalement effectué par filtration.

Tout d'abord, les méthodes de stérilisation terminale seront développées : stérilisation par vapeur d'eau, par chaleur sèche, par irradiation ionisante puis stérilisation par les gaz.

Ensuite la filtration stérilisante sera présentée.

1 La stérilisation par vapeur d'eau

Lorsqu'elle est applicable, la stérilisation par la vapeur d'eau est la méthode recommandée par la Pharmacopée Européenne 5^{ème} édition : c'est le mode de stérilisation le plus répandu.

1.1 Mécanisme de stérilisation

Lors de la stérilisation, la vapeur d'eau présente dans l'enceinte se condense sur le matériel à stériliser dont la température est inférieure à celle de la vapeur au cours de la phase de chauffage. L'eau condensée sur la surface de la charge à stériliser est environ mille fois plus dense que la vapeur environnante ce qui permet un transfert d'énergie assurant l'effet stérilisant. La chaleur libérée lors de la condensation de la vapeur accélère en effet l'élévation de température des objets sur lesquels elle se condense.

Le cycle de stérilisation se compose de 5 phases :

- la purge de l'air,
- le pré-traitement ou chauffage de la charge,
- la stérilisation,
- le refroidissement,
- le séchage.

Pour avoir une bonne diffusion de la vapeur en tout point de l'enceinte, il est indispensable d'y faire le vide. C'est l'objectif de la 1^{ère} phase de purge. Ensuite lors du

chauffage de la charge et de la stérilisation, la charge est mouillée par la vapeur puis est amenée à une température suffisante pour obtenir l'effet souhaité. Les 2 dernières étapes consistent à évacuer la vapeur puis à revaporiser l'eau résiduelle sur la charge.

La phase de refroidissement est une phase à risque car des échanges thermiques trop rapides peuvent provoquer l'explosion de la charge (notamment s'il s'agit de récipients contenant une solution) (3).

1.2 Réglementation associée à cette technique

Selon les Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF), deux paramètres principaux doivent être contrôlés lorsque la stérilisation par vapeur d'eau est utilisée : la température et la pression (4).

Pour la stérilisation de solutions aqueuses, il est recommandé par la Pharmacopée Européenne d'appliquer un traitement à 121°C pendant 15 minutes. D'autres conditions peuvent être utilisées après avoir démontré qu'elles permettent d'obtenir un NAS de 10^{-6} (2).

La température et la pression doivent être enregistrées pendant toute la durée de chaque cycle. Si une défaillance apparaît, elle doit être enregistrée et contrôlée par l'opérateur (2,4).

2 La stérilisation par la chaleur sèche

2.1 Mécanisme de stérilisation

Il s'agit d'une stérilisation à l'air chaud à pression atmosphérique. Elle est réalisée dans un four muni d'une ventilation forcée ou d'un autre dispositif spécialement conçu. Il est indispensable d'appliquer une ventilation afin d'obtenir une bonne homogénéité de température dans l'enceinte.

L'air possédant une faible conductivité thermique, le temps nécessaire pour que la charge à stériliser ait atteint la température requise est long (3).

Le plus souvent, cette technique est utilisée pour la stérilisation d'objets métalliques et de récipients en verre. Lorsque la température est portée à plus de 220°C, la chaleur sèche est

utilisée pour la dépyrogénisation (inactivation des éléments pyrogènes) des contenants en verre qui seront ensuite utilisés dans les procédés de fabrication aseptique.

2.2 Réglementation associée à cette technique

Selon les Bonnes Pratiques de Fabrication (4), le four utilisé pour la stérilisation par chaleur sèche doit comporter une circulation d'air suffisante dans la chambre et pouvoir maintenir une surpression pour empêcher la pénétration d'air non stérile. Tout air entrant doit passer sur un filtre HEPA : « High efficiency air particulate » (filtre absolu à haute efficacité) qui a comme particularité de retenir des particules dans l'air d'un diamètre de 0.3 µm avec un taux d'efficacité de 99,97%.

Selon la Pharmacopée Européenne 5^{ème} édition, les conditions de référence à appliquer lors de la mise en oeuvre de cette technique sont 160°C au minimum pendant au moins 2 heures. D'autres conditions peuvent être utilisées après avoir démontré qu'elles permettent d'obtenir un NAS de 10⁻⁶ (2).

Des sondes doivent être placées à l'intérieur du four afin d'enregistrer tout au long du cycle la température à l'intérieur de l'enceinte. Il est cependant indispensable de charger le stérilisateur de telle sorte que la température soit uniforme à l'intérieur de la charge (2).

3 La stérilisation par irradiation ionisante

La stérilisation par irradiation ionisante est, comme les deux techniques précédemment présentées, une technique de stérilisation terminale. Cependant, dans ce cas, la stérilisation n'est pas basée sur la température. Il s'agit d'un procédé de stérilisation sans élévation significative de température et permettant un traitement en continu.

3.1 Mécanisme de stérilisation

Deux types de rayonnements ionisants sont utilisés en radiostérilisation :

- Les radiations électromagnétiques : gamma
- Les radiations corpusculaires : faisceaux d'électrons accélérés (bêta)

Les radiations électromagnétiques sont des photons énergétiques, spontanément émis par des isotopes radioactifs (cobalt 60, césium 137). Pour des raisons techniques et économiques, le cobalt 60 est la principale source isotopique utilisée. Le pouvoir pénétrant de ce type de rayons est important.

Les radiations corpusculaires ont, quant à elles, un pouvoir pénétrant dépendant de l'énergie de l'accélérateur. En général, le pouvoir pénétrant des électrons accélérés est faible.

Tous les rayonnements ionisants entraînent les mêmes réactions radiochimiques. Il s'agit soit d'absorption directe sur les molécules qui entraînent des modifications chimiques, voire des altérations, soit d'actions indirectes par l'intermédiaire des produits de radiolyse de l'eau (radicaux libres) très réactifs qui entraînent des réactions en chaîne.

Sur les micro-organismes, les radiations ionisantes agissent de façon plus sélective que la chaleur. Les radiations provoquent une mutation génétique responsable d'un fonctionnement cellulaire perturbé. Une atteinte de la membrane et des systèmes enzymatiques est également observée. Les deux mécanismes direct et indirect sont en cause. Tous les micro-organismes ne réagissent pas de la même façon à la radiation. Les bactéries à Gram positif sont plus résistantes que les bactéries à Gram négatif. Les spores bactériennes sont, quant à elles, très résistantes. Les moisissures, les levures et les champignons possèdent une sensibilité intermédiaire entre les bactéries végétatives et sporulées. Les virus, quant à eux, sont très résistants (5).

3.2 Réglementation associée à cette technique

Selon les Bonnes Pratiques de Fabrication et la Pharmacopée Européenne (2,4) la stérilisation par irradiation doit être utilisée principalement pour la stérilisation de produits sensibles à la chaleur. La dose de référence indiquée par la Pharmacopée Européenne est de 25 kGy (2). Des dosimètres doivent être introduits dans l'irradiateur et lus après leur exposition aux radiations. L'objectif est de contrôler le bon déroulement du processus.

3.3 Aspects techniques et industriels

Cette technique étant plus « dangereuse » à mettre en oeuvre que les méthodes de stérilisation par la chaleur, il est indispensable d'évoquer les installations industrielles utilisées. La figure 1 présente le schéma d'une installation industrielle d'irradiation.

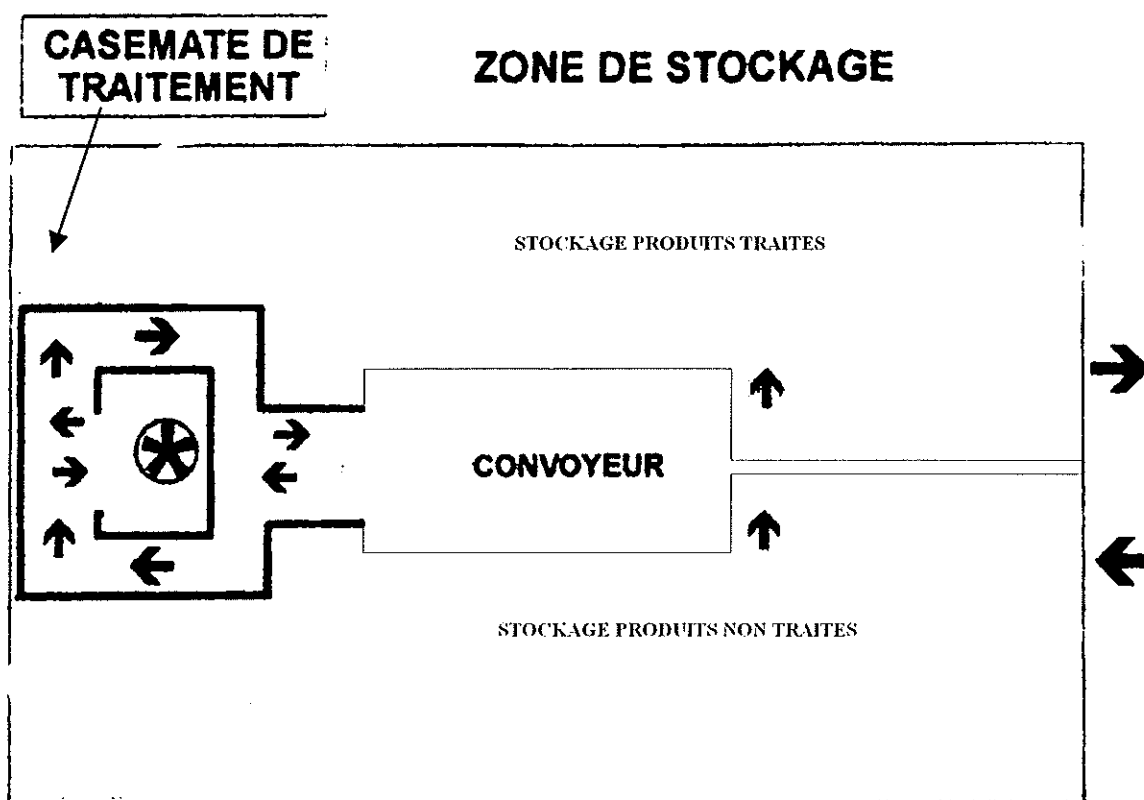


Figure 1 : Schéma de principe d'une installation industrielle d'irradiation (5)

Lors de la mise en place de l'installation, certains points sont particulièrement à étudier :

- Les produits à traiter doivent être pris en charge par un système de convoyage qui les achemine vers la chambre d'irradiation.
- Le générateur de rayonnement doit être placé au sein d'une casemate dont les murs épais (2 mètres au minimum), en béton, forment des chicanes et absorbent le rayonnement primaire ou secondaire non absorbé par le produit. Aucun personnel ne doit se trouver dans la zone en phase de traitement.
- Les produits non encore traités doivent être physiquement séparés des produits traités.

4 La stérilisation par les gaz

La stérilisation par les gaz ne doit être employée que lorsqu' aucune autre méthode n'est utilisable. En effet, ce procédé utilise des gaz toxiques et il est très difficile d'éliminer entièrement ces gaz. Il existe deux procédés importants de stérilisation par les gaz : la stérilisation à l'oxyde d'éthylène et la stérilisation par gaz-plasma.

4.1 Stérilisation à l'oxyde d'éthylène

Le procédé de stérilisation par l'oxyde d'éthylène possède de nombreux avantages : pas de dégradation des produits thermosensibles, stérilisation dans le conditionnement final et dégazage rapide mais les désagréments sont également très présents : coût élevé (20 fois supérieur à la vapeur), surveillance complexe, toxicité élevée entraînant une recherche obligatoire des résidus.

Mécanisme de stérilisation

L'activité de l'oxyde d'éthylène repose sur son activité alkylante de nombreuses fonctions organiques (carboxyle, hydroxyle...). Cette alcoylation bloque les processus métaboliques des bactéries, champignons et virus. L'activité biocide de l'oxyde d'éthylène nécessite une présence d'eau avec laquelle il va réagir pour former de l'éthylène glycol ($C_6H_6O_2$) et des hydrates qui en présence de chlore favorisent la formation de chlorhydrate d'éthylène (C_6H_5OCl). Ces deux dérivés seront recherchés après stérilisation, du fait de leurs toxicités immédiate et chronique cumulatives (6).

Paramètres devant être maîtrisés

Différents paramètres sont à prendre en compte et à maîtriser pour la stérilisation à l'oxyde d'éthylène (3,6) :

- L'humidité relative : l'eau est nécessaire à la réaction d'alkylation à la base de l'effet bactéricide de l'oxyde d'éthylène. C'est pourquoi il est nécessaire d'avoir une humidité relative de l'ordre de 40 à 60% au sein du stérilisateur.

- La concentration en oxyde d'éthylène : les concentrations utiles en oxyde d'éthylène sont comprises entre 400 et 1200 mg/l, en fonction du temps d'exposition. Il est nécessaire que la répartition en oxyde d'éthylène soit homogène dans la chambre afin que l'effet stérilisant soit en tout point équivalent.
- Le conditionnement de la charge : le type de matériau utilisé pour le conditionnement va influencer sur le process de stérilisation. En effet, un matériau hydrophile (papier, cellulose, carton...) va avoir tendance à capter une partie de l'humidité relative présente dans la charge et donc modifier l'efficacité de la stérilisation. Il est donc important de prendre en compte le type de matériau pour adapter au mieux le taux d'humidité à appliquer dans la chambre. Il est parfois nécessaire d'augmenter le taux d'humidité relative jusqu'à 80%.

Phases d'un cycle de stérilisation à l'oxyde d'éthylène

Une fois les différents paramètres décrits ci-dessus fixés, le cycle de stérilisation peut être réalisé. Un cycle de stérilisation à l'oxyde d'éthylène se compose de 4 phases :

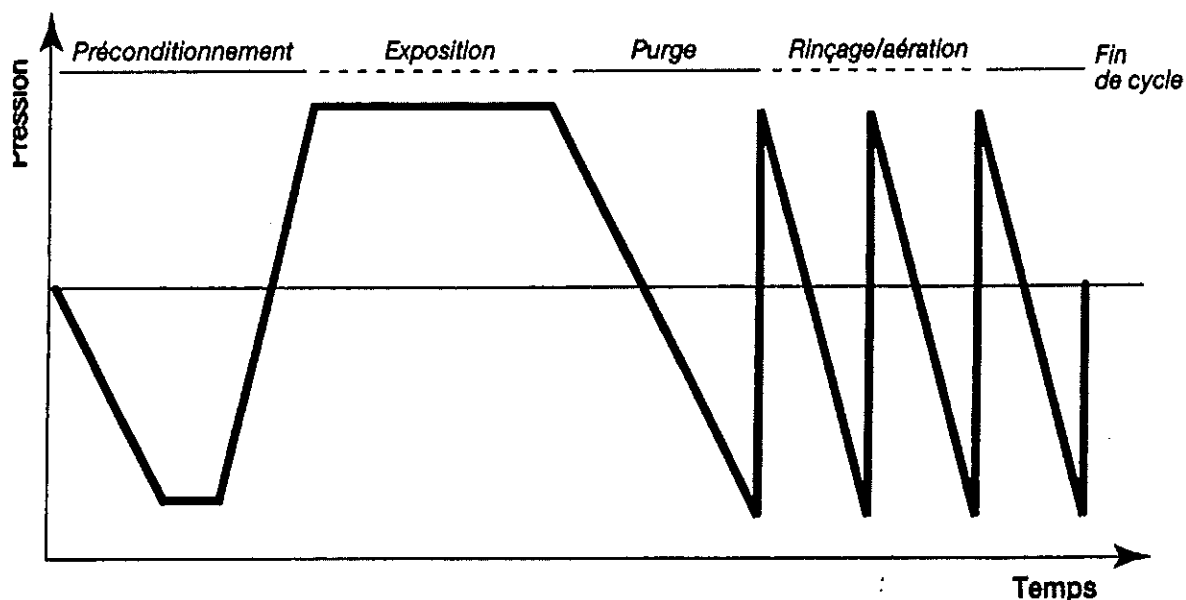


Figure 2 : Cycle de stérilisation à l'oxyde d'éthylène (6)

Tout d'abord le préconditionnement ou conditionnement. Il s'agit d'un préalable incontournable à l'efficacité du traitement stérilisant. Durant cette phase un vide prolongé est réalisé afin que l'oxyde d'éthylène se propage de façon homogène dans la chambre. Ensuite la chambre est amenée à la température souhaitée (environ 30-60°C) et au taux d'humidité relative nécessaire. L'humidification est obtenue par génération de vapeur.

La seconde étape est l'exposition à l'oxyde d'éthylène, c'est l'étape de stérilisation proprement dite. Le gaz est injecté à l'intérieur de l'enceinte ce qui va entraîner une montée en pression. La durée d'exposition à l'oxyde d'éthylène va varier suivant la température et la concentration employée.

Ensuite interviennent les étapes de purge et de rinçage. Dans un premier temps, un maximum d'oxyde d'éthylène est évacué ce qui fait diminuer la pression dans l'enceinte. Après cette purge, des rinçages sont nécessaires afin d'éliminer de la charge ou de la chambre le reste d'agent stérilisant. Ceci est réalisé par injections/évacuations multiples alternées d'air filtré ou de gaz inerte dans la chambre, ou par passage continu d'air à travers la charge et la chambre. Le nombre de vides et d'injections d'air dépend de la nature du produit et doit être validé et contrôlé.

La dernière étape avant la libération de la charge est l'étape de désorption. Elle correspond à une aération de la charge proprement dite et non plus de l'enceinte. Selon le type de matériau de la charge et du conditionnement et les paramètres de stérilisation (durée d'exposition, concentration...) l'oxyde d'éthylène va pénétrer plus ou moins dans la charge et s'en échapper que de façon progressive. La désorption peut être accélérée par montée en température. Des armoires de désorption chauffées à des températures de l'ordre de 55°C peuvent être utilisées afin de diminuer le temps d'immobilisation du matériel (6).

Réglementation associée à cette technique

La Pharmacopée Européenne ainsi que les BPF indiquent de façon claire que cette technique n'est à utiliser que lorsqu'aucun autre procédé n'est applicable. Il est indispensable d'utiliser un procédé d'élimination du gaz permettant de ramener, dans le produit stérilisé, les résidus ou produits de transformation du gaz à une concentration inférieure à celle qui peut provoquer des effets toxiques lors de l'utilisation du produit. En effet, l'oxyde d'éthylène possède, à long terme, un pouvoir cancérigène (6).

Des indications sont également fournies concernant le cycle de stérilisation. Chaque cycle doit être surveillé au moyens d'indicateurs biologiques appropriés et répartis à travers la

charge. Des enregistrements comportant la durée du cycle, la pression, la température, l'humidité et la concentration en gaz dans la chambre doivent être réalisées à chaque stérilisation. Toutes ces informations doivent être consignées dans le dossier de lot.

4.2 Stérilisation par gaz-plasma

Le développement de cette méthode est lié à la nécessité de trouver une alternative aux procédés utilisant l'oxyde d'éthylène. L'objectif était de mettre au point une méthode sûre et non toxique permettant la stérilisation de produits thermosensibles.

Mécanisme de stérilisation

Le plasma est un état de la matière qui fait suite aux trois états connus traditionnellement : solide, liquide, gaz. Il est obtenu à pression atmosphérique pour des températures très élevées (supérieures à 3000°C).

Le principe de la stérilisation au plasma repose sur la combustion lente des micro-organismes sous l'action des radicaux libres entraînés dans le plasma. Les composés utilisés pour la stérilisation par gaz-plasma sont le plus souvent à base de peroxyde d'hydrogène et de mélange hydrogène, oxygène, argon. Ils possèdent des radicaux libres OH très réactifs qui les rendent capables de réduire les constituants des fonctions vitales des micro-organismes (membranes cellulaires...). Cette réaction, assimilée à une combustion de matière organique vivante, amène à la formation, en présence d'oxygène, de produits volatils : CO₂, CO et H₂O. Cette réaction se produit à l'interface entre la phase solide et la phase gazeuse appelée phase adsorbée. Elle est limitée à la surface et ne se propage, en profondeur, qu'au fur et à mesure que la surface se dégrade (7).

Cycle de stérilisation par gaz-plasma

Il existe plusieurs cycles de stérilisation par gaz-plasma. En effet, les cycles sont variables selon le type d'appareillage utilisé. Deux types de procédés et donc d'appareillage sont présents sur le marché : Sterrad et Plazlyte (7).

Le procédé Sterrad est constitué de 5 étapes :

- Mise sous vide,
- Injection de la solution aqueuse de peroxyde d'hydrogène à 58%,
- Diffusion de la solution de peroxyde d'hydrogène dans l'enceinte,
- Activation plasmatique qui est obtenue par l'application d'un champ électromagnétique de 10eV durant 15 minutes,
- Retour à la pression atmosphérique.

Trois paramètres doivent être particulièrement maîtrisés lors de l'utilisation de ce procédé : la mise sous vide, la concentration de l'agent stérilisant et la durée d'exposition.

Le procédé Plazlyte, quant à lui, est composé de 3 étapes :

- La mise sous vide,
- L'injection de la solution aqueuse d'acide peracétique qui, à cause de la dépression, va se vaporiser dans l'enceinte. L'exposition à ce gaz dure 20 minutes puis le vide est à nouveau réalisé dans l'enceinte,
- La phase plasma qui se traduit par une exposition à un mélange de gaz (Ar, O₂, H₂) à l'état plasma.

Afin d'obtenir une stérilité, il est nécessaire d'enchaîner plusieurs fois ces 3 étapes puis d'effectuer un rinçage afin d'éliminer les résidus d'acide peracétique. Le rinçage est obtenu par une phase de remontée en pression suivie d'une série de dépression afin d'obtenir une bonne ventilation.

Réglementation associée à cette technique

Cette technique n'est pas une méthode évoquée dans les BPF et elle n'est pas reconnue telle quelle dans la Pharmacopée Européenne. En effet la Pharmacopée évoque la stérilisation par les gaz mais il s'agit en réalité de la stérilisation par l'oxyde d'éthylène. La stérilisation par gaz plasma n'est donc pas une méthode reconnue dans les référentiels pharmaceutiques. Cette méthode sera donc à utiliser avec précaution lorsqu'aucun autre procédé n'est applicable et une validation sera obligatoirement réalisée.

Les différentes méthodes de stérilisation terminale ayant été étudiées, la méthode de stérilisation en cours de fabrication va être développée. Il s'agit de la filtration stérilisante.

5 Stérilisation par filtration stérilisante

La filtration stérilisante est une méthode de stérilisation nécessitant des conditions opératoires et des installations parfaitement étudiées afin d'éviter toute contamination microbienne. Cette technique s'applique uniquement aux fluides : gaz et liquides monophasiques.

5.1 Mécanisme de stérilisation

Le principe de cette méthode est simple et repose sur l'utilisation d'une membrane. Le fluide est contraint à passer à travers la membrane qui retient les particules et les micro-organismes.

Plusieurs mécanismes de rétention des particules sur le filtre sont retrouvés :

- l'interception directe : lorsque la particule est de taille supérieure à la taille des pores de la membrane filtrante, celle-ci est retenue.
- l'impact inertiel : permet la rétention de contaminants plus petits que la taille des pores en les piégeant à l'intérieur de la membrane.

Afin de définir la membrane de filtration, plusieurs critères sont utilisés : la nature du média filtrant (cellulose, nylon ...), la porosité (rapport du volume de vide sur le volume total du filtre), le seuil de rétention (lié au diamètre des pores) et la perte de charge (3).

5.2 Réglementation associée à cette technique

D'après les BPF et la Pharmacopée Européenne (2,4), la filtration ne doit être utilisée que lorsque la stérilisation terminale est impossible (le plus souvent lorsqu'il y a présence de produits thermosensibles). Les solutions doivent être filtrées sur une membrane

antibactérienne de porosité nominale inférieure ou égale à 0.22 μm . Un autre type de filtre peut être utilisé si ses propriétés de rétention bactérienne sont équivalentes. L'intégrité des filtres utilisés doit être contrôlée avant usage et confirmée immédiatement après usage par la méthode du point de bulle ou de maintien en pression. Il est indispensable de s'assurer également que le filtre n'altère pas le produit par adsorption du soluté sur le filtre ou par relargage de contaminants.

Tous les équipements et récipients intervenant dans le processus de filtration doivent évidemment être stérilisés au préalable (2,4).

Les principales méthodes de stérilisation reconnues par la Pharmacopée Européenne ont été présentées sur le plan technique et réglementaire. La méthode qui sera présentée ci-dessous est une technique pour laquelle les effets d'inactivation bactérienne sont actuellement en recherche. Un certain nombre de travaux présentés dans la 2^{ème} partie de cette thèse, ont été réalisées sur cette méthode et ont montré son éventuel intérêt dans l'obtention d'une stérilité. Elle n'est donc pas utilisable actuellement dans le domaine pharmaceutique puisque non reconnue par les textes référentiels. Il s'agit de la compression isostatique.

II La compression isostatique

1 Principe de fonctionnement

Dans l'industrie pharmaceutique la compression est couramment utilisée pour la réalisation de comprimés. Il s'agit dans ce cas d'une compression uniaxiale : la force est appliquée dans une seule direction. En effet, cette technique étant basée sur l'utilisation de poinçons, la force est transmise uniquement dans la direction des poinçons. Dans le domaine des biosciences, la pression isostatique, c'est à dire une pression qui va être transmise dans toutes les directions, peut être utilisée. Cette pression est transmise au matériau par un fluide, généralement de l'eau, on parle alors de compression hydrostatique. Cette transmission de la pression est instantanée et uniforme.

Les pressions appliquées lors de la compression isostatique sont élevées (on parle de hautes pressions hydrostatiques) c'est pourquoi l'unité de pression la plus couramment utilisée est le mégapascal (10^6 Pa ou 1MPa).

Le principe de fonctionnement est simple : le produit à traiter est conditionné dans un emballage hermétique déformable puis est placé dans une enceinte. La pression hydrostatique est transmise à l'échantillon par l'intermédiaire d'un liquide : le fluide transmetteur. La pression générée s'exerce uniformément à travers tout le produit (8).

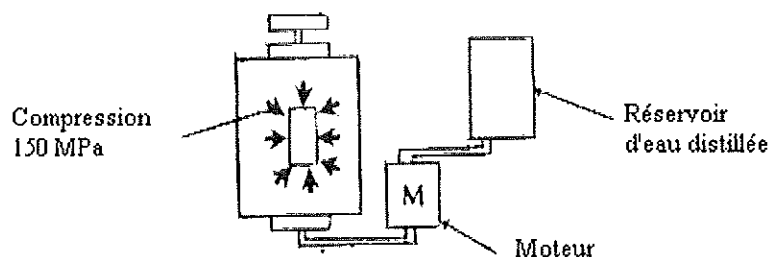


Figure 3 : *Principe de la compression isostatique* (9)

2 Mécanisme d'action des hautes pressions

Les hautes pressions agissent sur les biomolécules et les agents biologiques notamment les bactéries, les spores bactériennes et les virus.

2.1 Sur les biomolécules

La pression va avoir une action sur les liaisons chimiques des molécules. La quantité d'énergie transmise par la pression hydrostatique étant faible, les liaisons covalentes ne sont pas altérées. Par contre, les liaisons de faible énergie (interactions hydrophobes, liaisons hydrogènes, ioniques et électrostatiques) peuvent être modifiées de façon irréversible. (8)

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 10 à 20	Déstabilisation Stabilisation si $P > 100 \text{ MPa}$ Rupture si $P < 100 \text{ MPa}$

Tableau 1 : Barosensibilité des liaisons chimiques (1)

La pression n'agit donc pas de la même manière sur toutes les molécules, les plus sensibles étant les protéines.

La structure primaire des protéines est assurée par des liaisons covalentes qui ne sont donc pas détruites par la pression, cette structure étant barotolérante. Les modifications de la structure secondaire dépendent des protéines et sont difficiles à prévoir (les modifications n'apparaissent que pour des pressions d'environ 1,2 GPa). Par contre, la pression affecte la structure tridimensionnelle des protéines en provoquant la rupture des liaisons hydrogènes et ioniques qui stabilisent la structure tertiaire. La rupture de ces interactions s'accompagne d'une pénétration de l'eau dans la protéine ; elle gonfle et son volume hydrodynamique augmente. Cet état transitoire qui apparaît entre 100 et 300 MPa est appelé globule fondu et peut conduire à la formation d'agrégats ou de gels protéiques.

La structure quaternaire est également touchée par les hautes pressions. La dissociation des monomères constituant la protéine peut avoir lieu pour des pressions inférieures à 150 MPa (8, 10).

Les acides nucléiques sont barorésistants car leur structure secondaire est principalement stabilisée par des liaisons hydrogènes qui sont pratiquement insensibles à la pression.

Il en est de même pour les polysaccharides dont la structure tridimensionnelle stabilisée par des liaisons hydrogènes les rend barorésistants.

Au niveau des lipides, l'action principale des hautes pressions est l'accroissement de la température de leur transition de phase (11). Cela signifie que lorsque l'on augmente la pression, les lipides ne vont plus se trouver à l'état semi-liquide mais à l'état solide à température ambiante. Ceci a des conséquences notamment au niveau des biomembranes.

2.2 Sur les agents biologiques

Mécanisme d'action des hautes pressions sur les bactéries végétatives

Les hautes pressions permettent l'inactivation d'un grand nombre de bactéries. La dénaturation des protéines semble jouer un rôle clé dans l'inactivation de ces micro-organismes. La pression élevée a une action sur les réactions enzymatiques mais également sur les membranes bactériennes. Les transitions de phase des lipides provoquées par les hautes pressions contribuent à diminuer la fluidité des membranes.

Les bactéries à Gram négatif (ex : *Escherichia. Coli*) sont moins résistantes aux hautes pressions que les bactéries à Gram positif (ex : *Staphylococcus aureus*). Les bactéries à Gram négatif sont détruites à partir d'une pression de 350 MPa alors qu'une pression de 600 MPa est nécessaire pour détruire les bactéries à Gram positifs. Ce phénomène est probablement dû à la différence de structure entre leurs parois : les bactéries à Gram positif possèdent une paroi contenant une forte proportion de peptidoglycanes et une plus faible proportion de lipides et de protéines. Ces proportions s'inversent dans le cas des bactéries à Gram négatif. Le peptidoglycane est formé de liaisons covalentes résistantes à la pression alors que les protéines et les lipides sont fortement affectés (8).

Mécanisme d'action des hautes pressions sur les spores bactériennes

Les spores bactériennes sont des formes très résistantes à la pression. Leur inactivation n'est réalisable en toute sécurité qu'en y associant des traitements synergiques (chaleur, agent chimique...)

La pression peut agir de deux façons sur les spores bactériennes : une pression modérée (de l'ordre de 50 MPa pour *Bactillus subtilis* et de 200 MPa pour *Bacillus stearothermophilus*) va induire leur germination alors qu'une pression élevée (très variable selon les souches bactériennes, de 200 à 600 MPa) va entraîner leur inactivation.

Des pressions relativement faibles (aux alentours de 50 MPa) permettent la germination de la plupart des spores. La réaction semble température-dépendante puisque l'utilisation de températures plus élevées permet la germination à des pressions moindres. Une étude de Sojka *et al.* en 1997 montre que la germination de spores de *Bacillus subtilis* nécessite, à 30°C, une pression de 50 MPa alors qu'à 50°C une pression de 30 MPa est suffisante. Il est ensuite nécessaire d'appliquer des pressions beaucoup élevées (variables selon la souche bactérienne) pour obtenir leur inactivation.

Les mécanismes de résistance des spores aux hautes pressions ne sont actuellement pas encore bien connus.

La sensibilité des spores aux hautes pressions hydrostatiques varie selon différents critères : la température de sporulation des bactéries (les bactéries sporulant à faible température sont plus résistantes), la température de travail et le pH du milieu (un pH acide augmenterait l'efficacité des hautes pressions) (12, 13).

Mécanisme d'action des hautes pressions sur les virus

Contrairement aux spores bactériennes, les virus sont très sensibles aux hautes pressions. La plupart des virus sont inactivés par des pressions modérées (comprises entre 100 et 300 MPa). L'inactivation semble être due à une dissociation des capsides virales par les hautes pressions (8).

La décontamination virale de produits sanguins semble être possible par la technique des hautes pressions. Il a même été envisagé d'utiliser les hautes pressions pour un traitement *ex vivo* du sang de patients souffrant d'affections virales graves pour diminuer la charge virale circulante (8, 10, 11).

Mécanisme d'action des hautes pressions sur les agents non conventionnels

Les prions sont des petites protéines sans structure secondaire importante. Elles sont donc très stables. Leur dénaturation irréversible par la pression semble nécessiter l'application de pressions supérieures à 1 GPa (8, 10, 11).

3 Applications de la compression isostatique

La compression isostatique peut être utilisée dans deux domaines importants : le domaine de l'agro-alimentaire et le domaine médical.

3.1 En agro-alimentaire

L'utilisation des hautes pressions hydrostatiques dans le domaine agro-alimentaire a débuté au Japon dans les années 1990 pour la conservation des aliments. A la fin de l'année 1995, sept compagnies japonaises fabriquaient des produits traités par haute pression et à partir de 1994 cette technologie a commencé à se développer en Europe. On dit de ces produits qu'ils sont « pascalisés » : ce terme est donné aux produits alimentaires traités sous hautes pressions et température ordinaire ; c'est une dénomination symétrique de « pasteurisation » caractérisant un traitement à haute température, mais à pression ordinaire (8).

Cette technique permet d'augmenter la conservation des aliments tout en préservant les vitamines, le goût et les couleurs. En effet, les groupements aromatiques, appartenant souvent au groupe chimique des esters, des aldéhydes ou des cétones, ainsi que les vitamines sont des molécules constituées de liaisons covalentes qui ne sont pas détruites par les hautes pressions. Ceci est un grand avantage par rapport à d'autres techniques de conservation telle que la pasteurisation (11). Le traitement par les hautes pressions s'inscrit donc dans la lignée des traitements « doux » qui ne modifient que légèrement les aliments auxquels on les applique. Cependant cette technique ne permet pas d'atteindre une stérilité, mais uniquement une grande diminution de la contamination bactérienne. Il faut donc conserver ces produits au froid, d'autant plus que certaines enzymes qui résistent à la destruction risqueraient de dégrader les aliments à température ambiante.

Actuellement de nombreux aliments peuvent être « pascalisés » notamment les produits laitiers (fromage, lait, crème glacée...), les boissons (principalement des jus de fruits) et les produits carnés.

Les hautes pressions ont également d'autres applications que la stérilisation en agro-alimentaire. En effet, elles permettent de confire les fruits en dix minutes plutôt qu'en sept jours, elles améliorent la cohésion entre les morceaux (propriété utile dans la fabrication des terrines et des pâtés)... Les Japonais utilisent également cette technique pour « désamériser »

le jus de pamplemousse car elle permet de détruire la limonine responsable du goût amer du pamplemousse.

3.2 Applications médicales et pharmaceutiques

Dans le domaine médical et pharmaceutique, plusieurs applications de la compression isostatique sont possibles. Tout d'abord pour la stérilisation, qui est le sujet principal de cette thèse, mais également pour le développement de vaccins, la conservation au froid sans congélation, la synthèse chimique et l'élaboration de gels.

Stérilisation

L'action combinée de la pression et de températures modérées pourrait être envisagée pour la stérilisation de molécules thérapeutiques sensibles aux procédés usuels trop énergétiques (chaleur, rayonnements ionisants) ou inadaptés (filtration stérilisante). Mais également pour la stérilisation de formes galéniques modernes (ex : systèmes nanodispersés à base de polymères biodégradables), de matériaux implantables et de matériel médico-chirurgical (ex : petit matériel de chirurgie). Le traitement des déchets hospitaliers serait également possible par les hautes pressions mais il faudrait alors en plus y ajouter un agent chimique comme de la soude 2N (8,10).

L'action des hautes pressions sur les bactéries et les virus a été largement étudiée. Par contre peu d'études concernent l'effet de ces pressions sur les parasites. Cependant les quelques travaux réalisés semblent montrer une bonne efficacité (8, 14).

Développement de vaccins

L'utilisation des hautes pressions sur les virus permet la perte de leur caractère infectieux et la conservation (parfois même le renforcement) de leur pouvoir immunogène. Les procédés hautes pressions peuvent être considérés comme une méthode alternative aux méthodes chimiques couramment utilisés dans la fabrication des vaccins. Les travaux actuels de virologie moléculaire s'orientent vers l'étude des mécanismes qui conduisent à l'assemblage des particules virales et à la perte du caractère infectieux des virus après traitement sous haute pression (8, 11).

Conservation au froid sans congélation

Le diagramme de phase de l'eau varie en fonction de la pression. A pression atmosphérique le point de congélation de l'eau se trouve à 0°C alors que lorsque l'on applique une pression de 200 MPa l'eau reste liquide jusqu'à -20°C (8, 10). Cette propriété pourrait être utile pour la conservation de produits à températures négatives sans congélation (puisque l'eau reste liquide). Cette technique n'a actuellement pas d'applications médicales, par contre en agroalimentaire elle permet de congeler des aliments en un temps record sans la formation de cristaux qui altèrent habituellement la structure des aliments congelés.

Synthèse chimique sous hautes pressions

Sous hautes pressions, le rendement de certaines réactions chimiques peut être amélioré. On peut par exemple noter que les substitutions nucléophiles aromatiques et les additions de Diels-Alder sont favorisés par des pressions élevées. La pression va également permettre un meilleur contrôle de la stéréochimie (11).

Elaboration de gels

En utilisant les hautes pressions hydrostatiques, il est possible de produire des gels protéiques ou des gels mixtes protéine-saccharide de structure très régulière. Ceci peut présenter un intérêt en cosmétique et en pharmacie galénique (8, 11).

4.Facteurs influençant l'efficacité de la compression hydrostatique en stérilisation

L'efficacité de la compression hydrostatique est influencée par quatre facteurs principaux : la pression, la température, le pH et le pourcentage de graisse dans le milieu.

4.1 La pression

La pression nécessaire pour inactiver une bactérie dépend de la souche bactérienne et de sa sensibilité à la pression. En général l'efficacité de la stérilisation augmente avec la pression

appliquée. Prenons l'exemple de *Campylobacter jejuni* introduit dans du lait (15). La figure 4 représente l'inactivation bactérienne en fonction de la pression appliquée et du milieu. Un effet est observé à partir de 250 MPa et plus la pression augmente, plus le nombre de bactéries diminue (jusqu'à 400 MPa où une disparition des bactéries est observé).

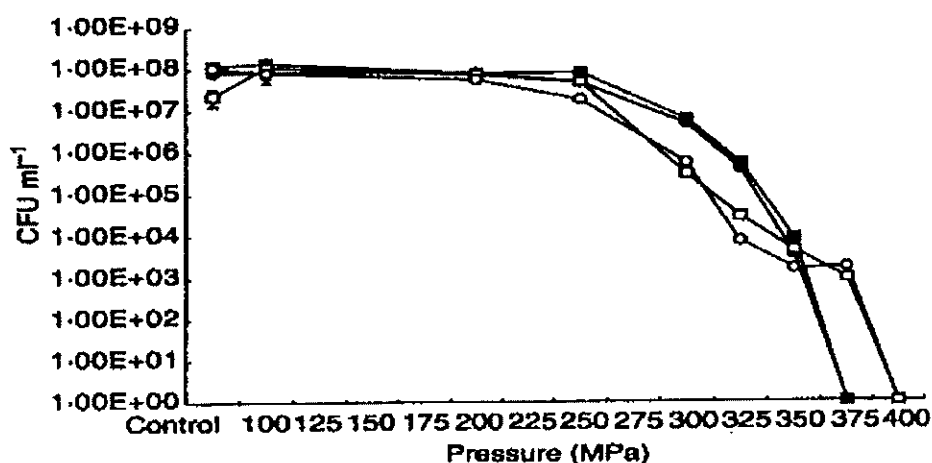


Figure 4 : Response of *Campylobacter jejuni* 35921 to 10-min HPP treatments at 25°C in UHT whole milk (■), UHT skim milk (●), soya milk (□) and chicken puree (○) (15).

4.2 La température

Il est important de noter que la température joue un rôle important dans l'action des hautes pressions. En effet, l'action des hautes pressions semblent plus marquée si on lui associe des températures basses (0-4°C) ou élevées (> 30°C). Cela est dû au fait que les protéines supportent mieux la pression à température ambiante (10).

Au niveau des spores bactériennes la température est l'un des paramètres jouant le plus sur la sensibilité aux hautes pressions. L'utilisation de températures croissantes favorise l'inactivation des spores (13).

4.3 Le pH du milieu

Le pH du milieu semblerait jouer un rôle sur l'effet des hautes pressions. Un pH plutôt bas augmenterait l'action des hautes pressions. Roberts et Hoover (1996) ont montré que sur les spores de *Bacillus coagulans* on peut observer une diminution de 1.5 log lorsque le milieu passe de pH = 7 à pH = 4 (12).

4.4 Le pourcentage de graisse dans le milieu

Les graisses auraient un effet baroprotecteur pour certaines souches bactériennes. Une étude (16), effectuée sur différents laits plus ou moins écrémés, a montré que les graisses ne présentaient pas d'effet baroprotecteur sur *Escherichia coli*. Sur *Staphylococcus aureus* et *Lactobacillus helveticus*, les graisses produisent un effet baroprotecteur mais la protection n'augmente pas proportionnellement au pourcentage de graisse. Pour *Listeria innocua* l'augmentation des graisses dans le milieu va entraîner une protection croissante contre les hautes pressions. Par contre les résultats pour *Pseudomonas fluorescens* semblent opposés puisque l'on observe une augmentation de l'inactivation par les hautes pressions lorsque le pourcentage de graisse dans le milieu augmente (16).

Le rôle de ce facteur semble donc très variable selon la bactérie étudiée.

Dans cette étude, l'effet de la compression isostatique sur *Staphylococcus aureus* associé à un matériau phosphocalcique de substitution osseuse a été étudié. Après la présentation de la compression isostatique et de son mécanisme d'action, il est indispensable de présenter les différents types de substituts osseux ainsi que leur utilisation.

III LES SUBSTITUTS OSSEUX

Les substituts osseux sont des biomatériaux ayant pour objectif le renforcement de la structure osseuse, le comblement d'une perte de substance ou la consolidation d'une fracture (17). Dans certains cas, des principes actifs tels qu'antibiotiques et hormones de croissance peuvent y être associés.

Les premières études scientifiques sur les substituts osseux de synthèse ont eu lieu dans les années 1970 et le développement clinique 20 ans plus tard. Trois points essentiels caractérisent les substituts osseux : biodégradabilité, porosité et bioactivité.

Ces matériaux peuvent être classés dans la classe III des dispositifs médicaux car ils sont implantables, invasifs et destinés à rester au contact du corps sur le long terme (17).

Dans un premier temps, les caractéristiques des substituts osseux vont être développées puis les principaux substituts osseux vont être présentés.

1.Caractéristiques d'un substitut osseux

Les substituts osseux doivent répondre à un certain nombre de critères. Ils doivent tout d'abord être biocompatibles, comme tous les biomatériaux mais également bioactifs car leur objectif est de faciliter l'ostéosynthèse et ils doivent enfin être biodégradables.

La biocompatibilité d'un biomatériau représente son absence de toxicité envers l'organisme et l'absence de réaction inflammatoire consécutive à l'implantation de ce dispositif.

La bioactivité est une seconde caractéristique des matériaux de substitution osseuse. Cela représente la capacité de ces substituts à se lier avec le tissu osseux et à entraîner des interactions et échanges avec les cellules et tissus vivants. Ces interactions sont possibles grâce à la porosité de ce type de biomatériau.

La biodégradabilité est la troisième caractéristique de ces biomatériaux. Les substituts osseux favorisant la repousse osseuse, il est nécessaire qu'ils se résorbent afin que l'os nouveau poursuive sa croissance. La vitesse de résorption est variable selon le type et la composition du substitut osseux (18).

D'autres propriétés sont également importantes notamment de bonnes qualités mécaniques, une facilité de manipulation ; ils doivent être économiquement et technologiquement accessibles (17).

2. Les grandes familles de substituts osseux

1.1 Les greffes osseuses

Une greffe osseuse consiste à remplacer une partie de l'os enlevé ou abîmé par un autre morceau d'os. Il existe 3 types de greffes :

- les autogreffes où l'os provient de l'individu lui-même,
- les allogreffes où l'os provient d'un cadavre d'individu de la même espèce,
- les xénogreffes où l'os est d'origine animale, en général bovine (18).

1.2 Le corail

Le squelette de corail est constitué de carbonate de calcium (CaCO_3) et sa structure est très proche de celle de l'os humain : poreux avec des pores interconnectés (18). Pour ces raisons, le squelette de corail peut être utilisé comme matériau de substitution osseuse.

1.3 Les phosphates de calcium

Les phosphates de calcium sont obtenus par synthèse chimique mais leur comportement biologique varie notamment selon la nature des phases minérales, la porosité obtenue et la présence d'impuretés (19). Ces produits se présentent sous forme de poudre qui subissent tout d'abord une calcination à 900°C puis un compactage sous pression et enfin un frittage entre 1100 et 1500°C qui permet une fusion des constituants. Lors du refroidissement, des microcristaux se forment. Ce sont les interstices entre ces microcristaux qui déterminent la porosité (20).

Les principaux phosphates de calcium existants sont présentés dans le tableau 2 ci-dessous et sont :

- L'hydroxyapatite (HA ou HAP),
- Le phosphate tricalcique (TCP),
- Le phosphate octocalcique (OCP),
- Les produits biphasés qui sont constitués d'un mélange en proportions variables d'HA et de TCP.

Symbole	Nom	Formule	Ca/P
HA ou HAP	Hydroxyapatite	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1,67
TCP	Phosphate tricalcique	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,5
OCP	Phosphate octocalcique	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_65\text{H}_2\text{O}$	1,33

Tableau 2 : *Principaux phosphates de calcium* (18).

L'hydroxyapatite

L'hydroxyapatite est le constituant minéral principal du tissu osseux. Il existe deux types d'hydroxyapatite :

- L'HA dense dans laquelle il y a une absence de pores.
- L'HA poreuse qui peut être macroporeuse si les pores ont une taille supérieure à 100 µm ou microporeuse si les pores sont de taille inférieure à 5µm (20).

Le β -TCP

Contrairement à l'hydroxyapatite, le phosphate tricalcique n'est pas un constituant naturel du tissu osseux. Cependant ce produit possède une très bonne biocompatibilité.

Le β -TCP est un matériau poreux dont la taille des pores varie principalement entre 100 et 300 μm (20).

Les matériaux biphasés

Les matériaux biphasés sont des mélanges d'HA et de TCP. Les proportions de ces deux constituants varient aux environs de 20 à 75% selon le mode opératoire. La variation du taux d'HA et de TCP joue principalement sur les capacités de dissolution du biomatériau. Plus le rapport β -TCP/HA est faible, plus la dissolution est lente (18).

Le substitut osseux utilisé dans la partie expérimentale de cette thèse est une CDA (calcium deficient apatite) qui est un produit biphasé constitué en proportions variables d'HA et de β -TCP. Le rapport HA/TCP de ce substitut a été fixé comme étant : 17,3/82,7.

Bibliographie

- 1 Association Française de Stérilisation. www.afs.asso.fr
- 2 Pharmacopée Européenne 5^{ème} édition. Conseil de l'Europe, Strasbourg 2006.
- 3 Y. Rosseto, le ϕ 41 : Pharmacotechnie industrielle, IMT éditions, 1998.
- 4 Les Bonnes Pratiques de Fabrication, Bulletin officiel, 1998.
- 5 P. Sébert, P. Arnaud, D. Catteau, J.C. Darbord, J.C. Gallié, M. Gominet, A. Guichon, Y. Hénou, E. Le Huédé, N. Mondoly, E. Zerbib; Radiostérilisation des médicaments : de la matière première au produit fini; S.T.P. Pharma pratiques; 1998; volume 8 :214-232.
- 6 D. Thiveaud ; Stériliser à l'oxyde d'éthylène ; Hygiène en milieu hospitalier ; 1998 ; volume 9 : 21-28.
- 7 D. Thiveaud ; Stérilisation par gaz-plasma ; Hygiène en milieu hospitalier ; 1998 ; volume 7 : 19-23.
- 8 Y. Rigaldie, G. Demazeau ; Apport des hautes pressions aux sciences pharmaceutiques et médicales ; Annales Pharmaceutiques Françaises ; 2004 ; volume 62 :116-127.
- 9 L. Migné ; Modulation de la libération de vancomycine par adjonction d'agent liant dans des matériaux de comblement osseux préparés par compression isostatique ; Thèse pour le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie ; Septembre 2003, Faculté de Pharmacie de Nantes.
- 10 P. Masson ; Action de la pression hydrostatique sur les protéines : émergence de la biotechnologie des hautes pressions, applications pharmaceutiques et médicales potentielles ; Annales Pharmaceutiques Françaises ; 1999 ; volume 57 :49-55.

- 11 P. Masson, C. Tonello ; Potential Applications of high pressures in pharmaceutical science and medicine ; High pressure Research ; 2000 ; volume 19 :223-231.
- 12 H. Delacour; Intérêts des hautes pressions hydrostatiques dans l'inactivation des spores bactériennes ; Thèse pour le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie ; Septembre 2000, Faculté de Pharmacie de Lyon.
- 13 H. Delacour, C. Clery, P. Masson, D.R. Vidal ; Inactivation des spores bactériennes par les hautes pressions hydrostatiques ; Annales Pharmaceutiques Françaises ; 2002 ; volume 60 : 38-43.
- 14 TR. Slifko, E. Raghubeer, J-B. Rose ; Effect oh high hydrostatic pressure on *Cryptosporidium parvum* infectivity ; Journal of food protection ; 2000; volume 63: 1262-1267
- 15 E.B. Solomon, D.G. Hoover ; Inactivation of *Campylobacter jejuni* by high hydrostatic pressure ; Letters in Applied Microbiology ; 2004 ; volume 38 :505-509.
- 16 R. Gervilla, V. Ferragut, B. Guamis; High pressure inactivation of microorganisms inoculated into ovine milk of different fat contents; Journal Dairy of Science; 2000; volume 84: 674-682.
- 17 www.geco-medical.org/geco2006 ; GECCO= Groupe d'Etude en Chirurgie Osseuse, D. Mainard, Service Orthopédie-Traumatologie, CHU de Nancy.
- 18 H. Gautier ; Evaluation de deux procédés de granulation de la vancomycine associée à un substitut osseux : la compression isostatique et la compaction dynamique ; Thèse Doctorat de l'Université de Nantes, Janvier 2000.
- 19 www.maitrise-orthop.com/gesto; GESTO = Association pour l'étude des greffes et substituts tissulaires de l'appareil locomoteur

- 20 L. Dayan ; Les biomatériaux de substitution et de régénération osseuse d'origine non biologique ; Thèse pour le Diplôme d'Etat de Docteur en Chirurgie Dentaire ; Janvier 2005, Faculté de Chirurgie Dentaire de Paris 7.

PARTIE EXPERIMENTALE

I Problématique

Un travail de recherche effectué sur l'inactivation de *Staphylococcus aureus* inoculé dans de la poudre de CDA (Calcium Deficient Apatite) a été réalisé. En effet, un certain nombre d'études ont démontré l'efficacité des hautes pressions pour l'inactivation des micro-organismes présents dans les aliments. L'efficacité de ce traitement par haute pression dépend des conditions opératoires et du milieu utilisé. Les principaux facteurs à prendre en compte sont ceux qui ont été présentés dans la 1^{ère} partie de cette thèse, c'est-à-dire la pression, la température, le pH du milieu et le pourcentage de graisse dans le milieu.

Ce travail fait suite à une étude préliminaire réalisée par N. El Kouri qui avait démontré que la compression isostatique permettait une diminution de la biomasse de matériaux phosphocalciques pour substitution osseuse. Lors de cette étude préliminaire, la mise au point de la méthode permettant de déterminer la biomasse présente dans les matériaux phosphocalciques avaient été réalisés. C'est donc cette méthode qui a été utilisée.

L'objectif de l'étude a été de déterminer les conditions opératoires optimales permettant d'obtenir une diminution maximale de la biomasse. Les principaux facteurs étudiés ont été la pression, le temps pendant laquelle cette pression devait être appliquée et le nombre de cycles devant être réalisés ainsi que le temps d'attente entre ces cycles. Le pourcentage de graisse dans le milieu a été modifié uniquement dans le but d'expliquer certains résultats.

La réalisation de cette étude a permis d'aboutir à la rédaction d'un article présenté ci-après ainsi qu'un poster qui a été présenté au 20^{ème} Congrès Européen sur les Biomatériaux qui s'est déroulé du 27 septembre au 1^{er} octobre 2006 à Nantes en France. Ces deux documents constituent la suite de cette présentation.

II Résumé et principaux résultats

L'inactivation de *Staphylococcus aureus*, par les hautes pressions isostatiques, dans les matériaux de substitution osseuse de type Apatite Déficiante en Calcium (CDA) a été étudiée. L'objectif de l'étude a été de déterminer les conditions opératoires permettant d'inactiver les micro-organismes inoculés dans la CDA soumise par la suite à un traitement par hautes pressions. Différents paramètres ayant une influence sur l'efficacité de la compression isostatique ont été étudiés : la pression, le temps de plateau, le nombre de compressions et le temps d'attente entre deux compressions. Les résultats ont démontré que l'efficacité de la compression augmentait avec la pression appliquée mais que le temps de plateau ne jouait pas un rôle primordial. Le nombre de compressions a une action importante sur l'efficacité de la technique à condition de garder un temps d'attente suffisant entre deux compressions pour que les bactéries puissent reprendre leur cycle de multiplication. Les conditions opératoires permettant de diminuer au maximum le taux de *Staphylococcus aureus* dans ce matériau phosphocalcique sont 2 compressions de 5 minutes à 140 MPa à 24 heures d'intervalle.

Il a été également démontré que l'absence de corps gras dans les biomatériaux permettait d'obtenir une diminution de la contamination bactérienne avec une pression beaucoup plus faible que les pressions nécessaires lorsque l'on se trouve en présence de produits alimentaires. Les corps gras jouent donc un rôle baroprotecteur vis-à-vis des bactéries.

III Publication

INACTIVATION OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* IN CALCIUM PHOSPHATE BIOMATERIALS VIA ISOSTATIC COMPRESSION

M Brouillet, H Gautier, A-F Miègeville, J-M Boulter, C Merle, J Caillon.

ABSTRACT

The inactivation of *Staphylococcus aureus* in bone substitution materials composed of calcium deficient apatite (CDA) was studied under conditions of high hydrostatic pressure. The objective of this study was to determinate the conditions which ensure the inactivation of this microorganism. *Staphylococcus aureus* was inoculated in calcium phosphate powder and then subjected to isostatic compression. Several parameters which influence compression were tested: application of pressure, time of plateau, number of compressions, and waiting time between two compressions. The results showed that the efficacy of compression increased with applied pressure and that time of plateau did not play an important role. The number of compressions influenced the efficiency of the technique and it was necessary to allow ample time between two compressions for bacteria to sufficiently multiply. The most effective protocol for preventing the growth of *Staphylococcus aureus* in calcium phosphate involved two compressions of 5 minutes each at 140 MPa spaced at a 24 hour interval.

INTRODUCTION

The use of high hydrostatic pressure is a sterilization technique that has been increasingly popular in the food processing industry since the 1990s. High pressure allows for bacterial inactivation without a massive increase in temperature. It, therefore, ensures conservation of the quality of the food, preserving vitamin content, taste, and color. Indeed,

vitamins often incorporate aromatic groups, containing esters, aldehydes, or ketones, which utilize covalent bonds that are not destroyed by high pressure (1). The products most often treated with these high pressure protocols include fruit juices and a few meat-based products (ham and ready-to-eat products composed of chicken or turkey).

A great number of studies have shown that Gram-negative bacteria are more sensitive to high pressure than Gram-positive bacteria, like *Staphylococcus aureus*. It is well known that pressures between 500 and 600 MPa are necessary to inactivate Gram-positive bacteria (2). However, most of these studies have focused on the effect of high pressure on food: ovine milk (3), cow's milk (4,5), and cheese (6,7).

Recently, an increasing number of researchers have begun to study methods for the sterilization of surgical materials, particularly the eradication of thermosensitive organisms (2). This study explores the potential use of high hydrostatic pressure for sterilization of bone substitution materials composed of calcium deficient apatite (CDA). These substitutes are produced commercially under isostatic compression at 140 MPa. If the current manufacturing technique also has applications in sterilization, it would allow preparation and sterilization to occur simultaneously.

The objective of this study was to determine the different operating conditions necessary to obtain maximal bacterial inactivation in CDA by high hydrostatic pressure. Several parameters were considered. First, optimum pressure was defined (between 50 and 140 MPa), then the influence of the time of compression and the number of sequential compressions (between 1 and 3) was determined, and finally, time of plateau for each successive compression as well as the time interval between two compressions were explored. The influence of the composition of the calcium phosphate powder, particularly the presence of lipids, was also studied.

MATERIALS AND METHODS

Material

Bacterial strain

Staphylococcus aureus was isolated from blood culture. The strain was resistant to methicillin (MRSA) and susceptible to gentamicin, vancomycin, and teicoplanin.

Bone substitute

The bone substitute used is a CDA (calcium deficient apatite) prepared by ammoniacal synthesis from Dibasic Calcium Phosphate Dihydrate (DCPD) (Sigma-Aldrich chimie, St Quentin-Fallavier, France).

Physicochemical analysis was performed by X-ray diffraction (PW1830, Philips, France) and showed that the HA/TCP (hydroxyapatite/tricalcium phosphate) ratio was equal to 17.3/82.7 and the Ca/P (calcium/phosphate) ratio equal to 1.53. Analysis by FTIR spectrophotometer (Magna 500, Nicolet Inc., France) revealed neither pyrophosphates nor carbonates.

Methods

Principle

Preparation and inoculation of CDA

MRSA was inoculated in brain heart infusion broth (Difco, Spark, USA) and was incubated at 37°C. Dilutions were performed 24 hours later in brain heart broth to obtain an approximate concentration of 10^7 bacteria/ml. 0.5 ml of this broth culture were used to inoculate 7.5 grams of CDA. The sample was then homogenized with an oscillatory agitator (Turbula Schatz T2C, Willy A. Bachofer, Switzerland) for 5 minutes. 50 milligrams of inoculated powder were drawn to constitute a control. The remaining powder was put in an elastic waterproof mould under vacuum in order to be compressed.

High-pressure treatment

Samples were pressurized in an isostatic press (N° FF558, Nova Swiss, Cesson, France) with a pressure chamber of 90 mm diameter and 25 cm length and a maximum pressure of 140 MPa. The pressure fluid used was distilled water. The temperature inside the chamber was room temperature.

Resistance of MRSA was studied under various pressure conditions (from 50 to 140 MPa), times of plateau (from 5 to 45 minutes), and number of compressions (from one to three).

Microbiological analysis

Immediately after pressurization, the block of CDA obtained was broken. The powder was recovered under sterile conditions and then ground. Four samples of 50 milligrams each were recovered. Three of these samples and the control (described above) were diluted at 1/10 and at 1/1000 in 0.9% sodium chloride and filtered through a 0.22 µm filter (GSWP, Millipore, France). The filter was then put on tryptone soy agar (Difco, Sparks, USA) and incubated at 37°C for 24 or 48h to determine the number of surviving bacteria.

The fourth sample was directly introduced into brain heart infusion broth and incubated at 37°C. The sample was considered to be sterile when no bacteria development was observed after 1 month at 37°C. When bacterial development was observed in this broth, identification of the bacteria and a susceptibility test were performed to verify the resistance to antibiotics.

Experimental study

Several parameters were studied in order to determine the operating conditions that will prevent the growth of MRSA in CDA. All experiments performed as previously described.

Influence of applied pressure

Pressures of 50, 100, and 140 MPa were applied to the samples.

Influence of time of plateau

Several plateau times were tested: 5, 15, 30, and finally, 45 minutes.

Influence of number of compressions, time of plateau of each compression, and waiting time between two compressions

In order to determine the role of several successive compressions, one, two, and three compressions of 140 MPa were tested.

The importance of the plateau time of each compression was also assessed by performing 3 successive compressions of 5 minutes at 140 MPa or 3 successive compressions of 15 minutes at 140 MPa.

Finally, the waiting time between two compressions was tested by performing two compressions without any waiting time, then after 15 minutes, and finally, after 24 hours.

Each experiment was repeated twice. For each experiment, four samples were drawn: three were inoculated on tryptone soy agar and another was introduced into brain heart infusion broth. N was the number of surviving bacteria obtained by calculating the average results of 3 samples and N0 was the number of bacteria of the control. For each experiment, results were given as logarithmic decrease of bacterial charge: $d = \log (N_0/N)$.

Influence of fatty acid in CDA on bacterial growth

Increasing quantities of stearic acid, from 25% to 75%, were added to CDA before inoculation with MRSA. A compression of 5 minutes at 140 MPa was performed.

Study by scanning electron microscope

In order to highlight the effect of high pressure on the MRSA strain, bacteria were observed by scanning electron microscopy before and after compression. Bacteria were fixed with 0.525% glutaraldehyde for 30 min and then washed several times in PBS. The cells were dehydrated through a graded ethanol series and alcohol-freon substitution was performed. Before examination under scanning electron microscope (Jeol 6400 F), specimens were coated with 100 Å of a gold-palladium mix in an ion sputter (Jeol JFC 1100) (8).

RESULTS

Influence of applied pressure

Initially, the influence of pressure on bacterial destruction was studied. The results are presented in Figure 1, which shows the logarithmic decrease of bacterial survival as a

function of the increase in pressure (MPa). In these experiments, time of plateau was 5 minutes.

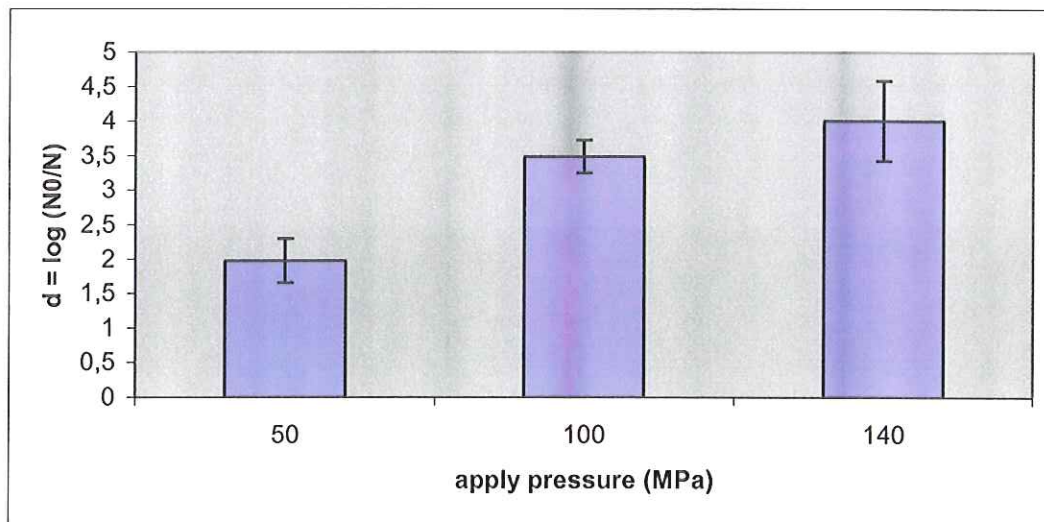


Figure 1: logarithmic decrease (+/- SD) according to applied pressure

The results indicate that the rate of bacterial destruction increased as applied pressure increased. We observed a logarithmic decrease of 1.98 (+/- 0.32) at 50 MPa and 4.01 (+/- 0.58) at 140 MPa.

Influence of time of plateau

In the previous experiment, optimal pressure was fixed at 140 MPa. Next, we investigated the role of plateau time in bacterial destruction. Compressions of 5, 15, 30 and 45 minutes at a pressure of 140 MPa were tested. Results are presented in Figure 2, which shows the logarithmic decrease in bacterial concentration according to the time of plateau.

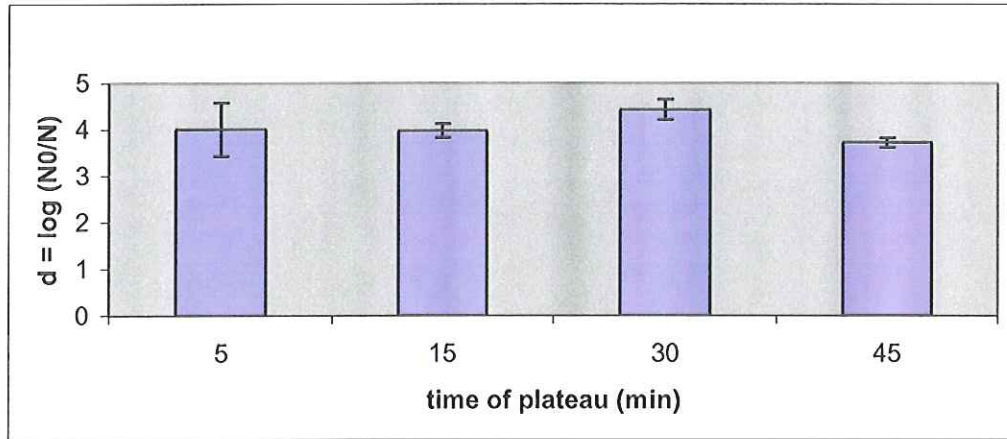


Figure 2 : logarithmic decrease (+/- SD) according to time of plateau

Analysis of the results revealed that the logarithmic decrease in the number of bacteria varied between 3.72 (+/- 0.11) and 4.43 (+/- 0.22). Therefore, we determined that increasing the time of plateau does not improve efficacy.

Influence of number of compressions

The influence of the number of sequential compressions (from one to three) was studied. Results are presented Figure 3.

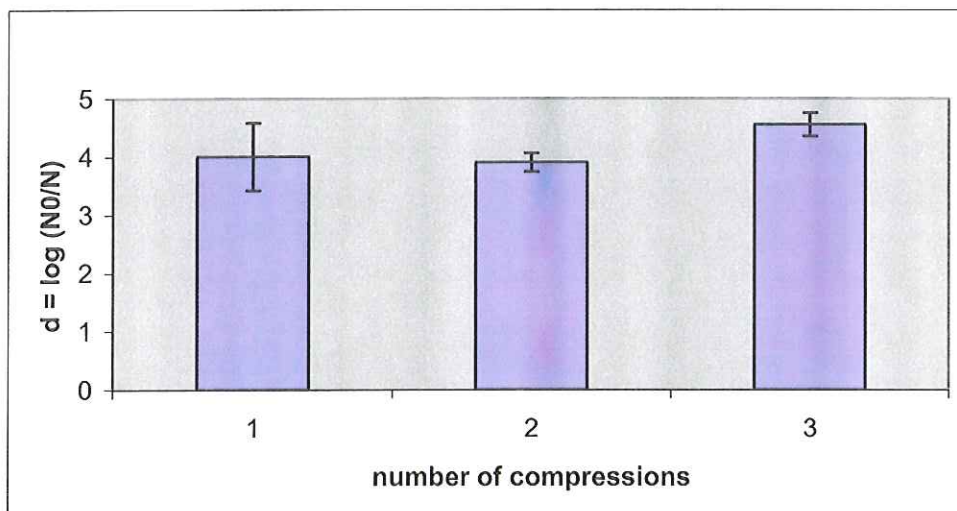


Figure 3 : logarithmic decrease (+/- SD) according to sequential number of 5 minute compressions

Logarithmic decrease ($d = 4$) in bacterial survival was similar for one, two, or three compressions. However, after three compressions, the logarithmic decrease was slightly higher.

Influence of time of plateau of each compression

We investigated the role of plateau time in combination with sequential compressions. The results of three compressions of 5 minutes each at 140 MPa and 3 compressions of 15 minutes each at 140 MPa are compared in Figure 4.

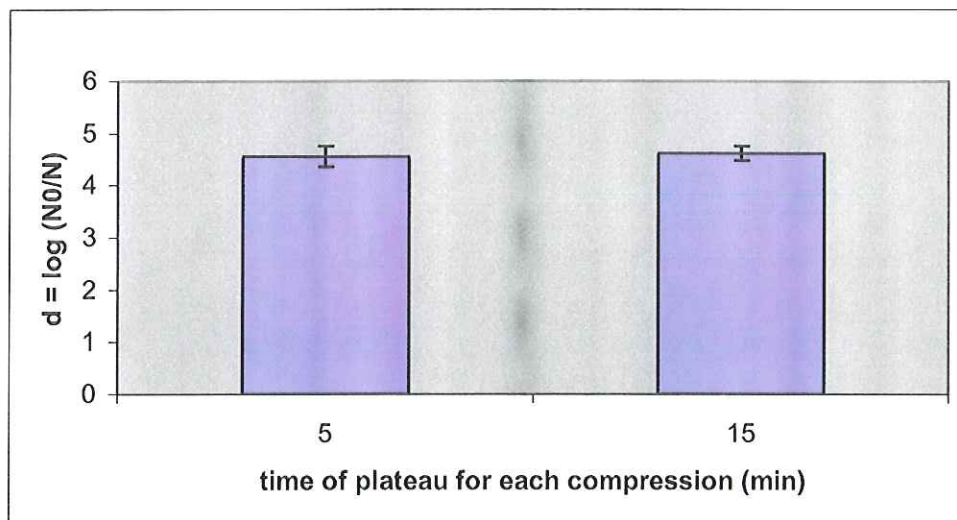


Figure 4 : logarithmic decrease (+/- SD) as a function of the time of plateau during multiple compressions.

For each experiment, we obtained a logarithmic decrease of approximately 4.5. Therefore, plateau time during multiple compressions does not seem to play an important role in compression efficacy.

Waiting time between two compressions from 0 to 15 minutes

We compared the results obtained when a waiting period was instituted between multiple compressions. The results of waiting times of 0 and 15 minutes are presented in Figure 5.

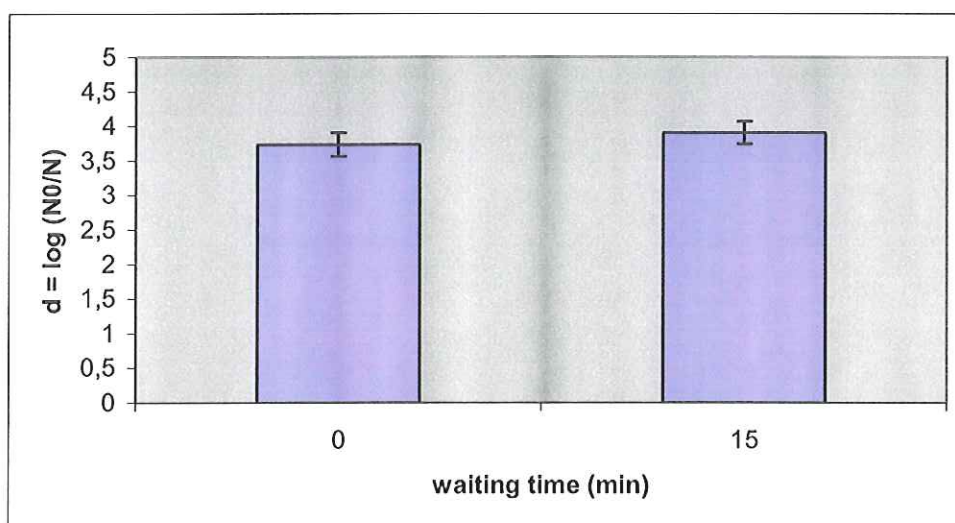


Figure 5: logarithmic decrease (+/- SD) in number of bacteria as a function of the waiting time between two compressions

There is practically no difference between the two conditions tested (both conditions yielded results of around 3.8). A waiting time of 0 or 15 min between two subsequent compressions was not relevant to the bactericidal properties of isostatic compression.

Waiting time of 24 hours between two compressions

Finally, a waiting time of 24 h was allowed between the two compressions. Out of 5 experiments, sterilization was obtained four times. In one experiment, MRSA was observed in the brain heart infusion broth after 48 hours.

Influence of fatty acid in the environment

We evaluated the effect on bacterial survival of adding stearic acid to the CDA. The results are presented Figure 6.

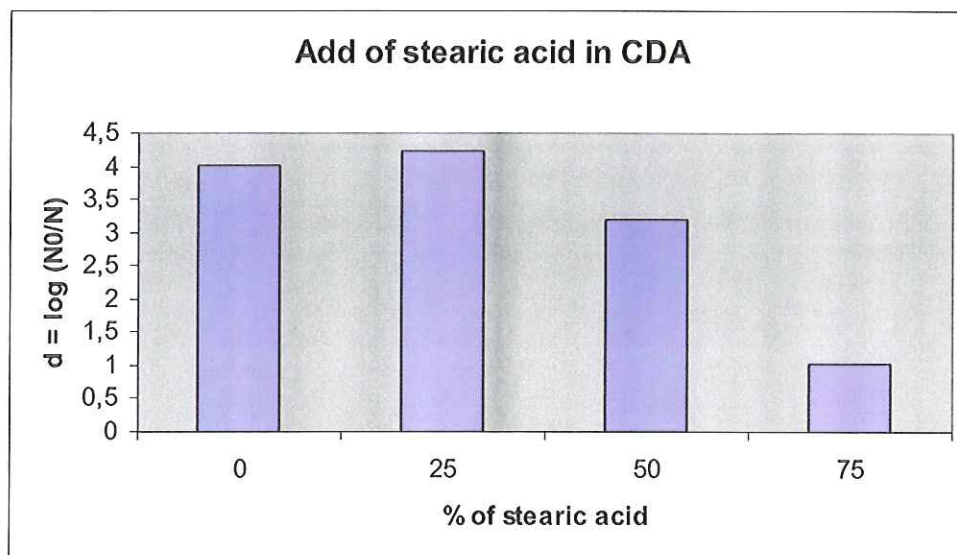


Figure 6: Addition of stearic acid to CDA.

The rate of MRSA inactivation decreased when stearic acid was mixed into the CDA matrix. With 25% stearic acid in the CDA, there was no change in bacterial concentration, but at concentrations of 50 and 75 % stearic acid, bacterial destruction was less pronounced.

Study by scanning electron microscope

In order to highlight the effect of a pressure of 140 MPa on MRSA, bacteria were observed by scanning electron microscopy (SEM) before (Figure 7) and after compression (Figure 8).

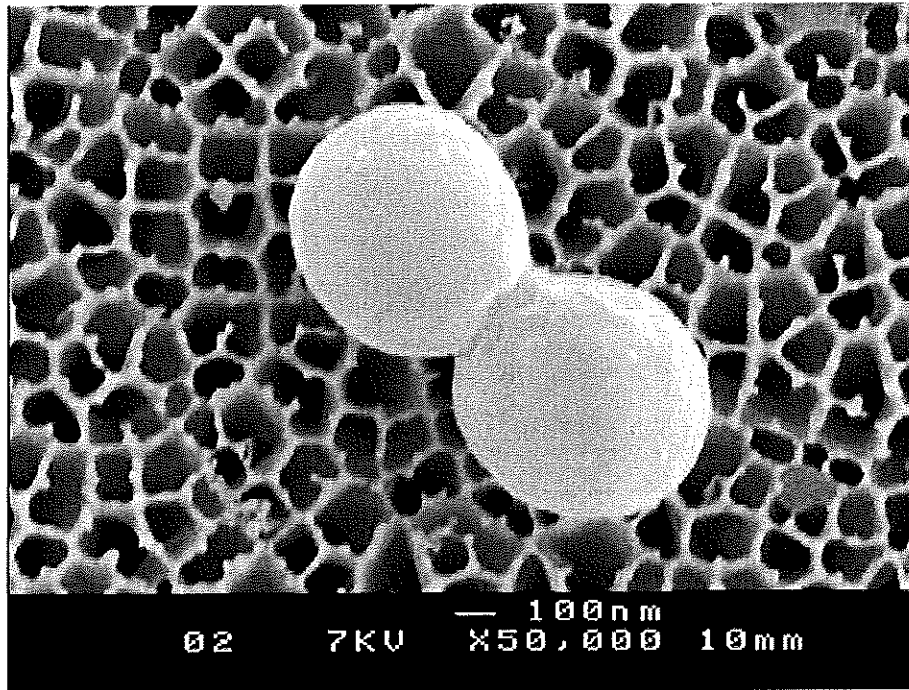


Figure 7: *Staphylococcus aureus* P9 before compression

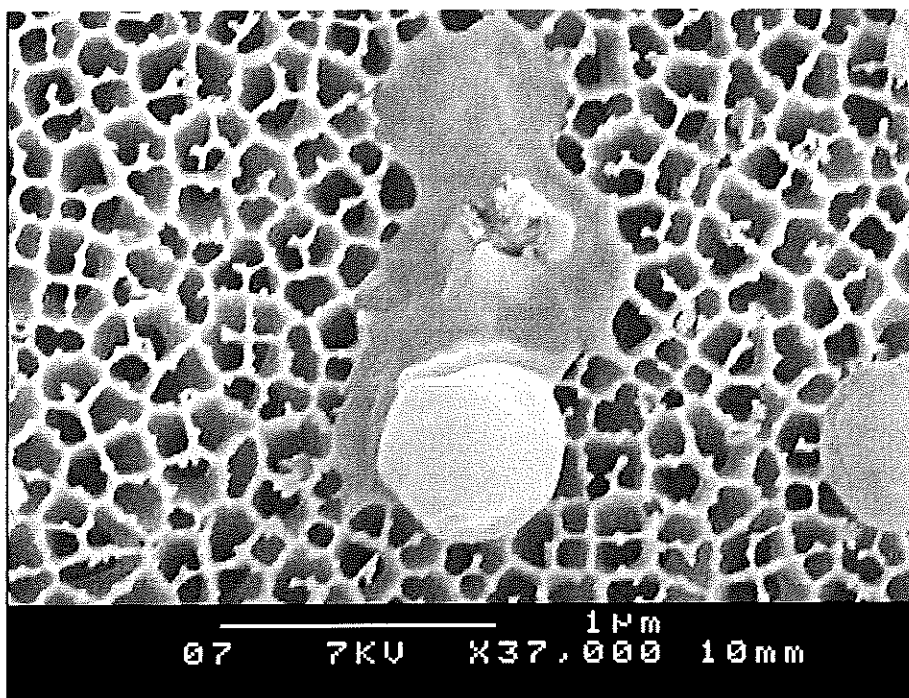


Figure 8: *Staphylococcus aureus* P9 after compression

Clearly, high hydrostatic pressure causes the destruction of the bacterial wall. Photographs obtained after compression are very similar to photographs obtained after β -lactam treatment.

DISCUSSION

High pressure isostatic compression has been used since 1990 as a sterilization technique in the food processing industry (2) and could be used advantageously in the biomaterials industry. This technique is already in use for the manufacture of bone substitution materials and the expansion of the technique to include sterilization would be economically advantageous. Moreover, although it is possible to associate active substances (antibiotics, cytostatics) to these bone substitution materials, some of these substances are sensitive to standard sterilization techniques. It is worth developing a technique which does not damage these substances. It is known, for example, that vancomycin is not damaged by high hydrostatic pressure (9).

The objective of this work was to evaluate the efficacy of high hydrostatic pressure in the sterilization of a bone substitution material. In addition, we sought to determine the conditions under which an optimal decrease of contamination by *Staphylococcus aureus* would be ensured. In this study, CDA bone substitution material was used. This material is often used in dental surgery and in orthopedic surgery to fill a bone defect (10). The CDA powder was inoculated with a strain of MRSA because these bacteria are often responsible for bone infection. Also, *Staphylococcus aureus* is a Gram-positive bacteria, and particularly resistant to antibiotics and to treatment with high pressure. Preliminary results obtained in our laboratory, which are being submitted separately, confirmed that CDA alone had no bacteriostatic activity.

We obtained a distinct logarithmic decrease of bacteria (mean decrease of 4.01 log) after a compression of 5 minutes at 140 MPa. This result was really surprising because several studies (3, 5, 6, 7) have shown that the minimum pressure necessary to cause bacterial inactivation is between 300 and 400 MPa. However, all of those studies were performed on food or infusions containing lipids. Indeed, lipids could have a pressure-protective effect on *Staphylococcus aureus* strains (3). In another study (5), food was shown to have a more profound protective effect than other media on bacteria exposed to high pressure. For example, a decrease of 100 CFU/ml of *C. jejuni* after 10 minutes of treatment at 375 MPa was observed when bacteria were suspended in whole milk, whereas only 300-325 MPa were required when the bacteria were suspended in broth (5). We observed a pressure-protective

effect towards MRSA when stearic acid was mixed with the CDA. Indeed, bacterial inactivation was less marked when a large concentration of stearic acid (75 %) was added to the matrix. CDA alone does not contain any lipids, which could explain why *Staphylococcus aureus* inactivation occurred at a lower pressure in our study (140 MPa) than in the previous studies (500-600 MPa) (3, 5, 6, 7).

After determining the optimal pressure (140 MPa) for bacterial inactivation, we studied the effect of various plateau times. Time of plateau does not seem to play an important role in compression efficacy because results were similar between 5 and 45 minutes (logarithmic decrease did not vary more than ± 1 log). In contrast, a previous study showed that the time necessary for a 5 log decrease in *Salmonella* grown in orange juice varied with pressure. As the pressure increased, the necessary time decreased. Indeed, at 300 MPa a time of 369 seconds was necessary while a mere 5 seconds were enough at 600 MPa (11). A second study, on the inactivation kinetics of *Y. enterocolitica* in skim milk, showed that bacterial contamination decreased as the duration of pressure increased (12). In our study, the maximum bacterial inactivation was obtained with a plateau time of 5 minutes. A longer time does not seem to improve the efficacy of the treatment.

The effect of multiple compressions (from 1 to 3), including the importance of plateau time, was also investigated. However, these modifications did not improve the logarithmic decrease in bacterial survival. Waiting time between the two compressions was then examined. Two 5 minute compressions were spaced 0 minutes, 15 minutes, and 24 hours apart. This protocol was similar to the tyndalisation process which recommends three sterilization cycles at 70°C with 24 hours between each cycle. No difference was observed between 0 and 15 minute intervals, but after a 24 hour interval between the two compressions, sterility was obtained for four samples out of five. Waiting 24 hours between the two compressions may have permitted the elimination of bacterial stress factors. After the first compression, bacteria were prevented from having a normal multiplication cycle. The 24 hour interval between compressions gave surviving bacteria the time and opportunity to multiply again, making the second compression more efficient. Several studies have demonstrated the impact of stress on bacteria (13, 14). Stress can have various effects; for example, oxidative stress induces genetic mutation in *M. tuberculosis* (13) and freezing and frozen storage of smoked salmon causes injury and stress to *L. monocytogenes*, and such stress is manifested by an increase in latency time and a decrease in specific growth rate (14).

This study showed that pressures of 140 MPa could be enough to inactivate a MRSA strain present in CDA although such pressures do not have an effect on bacteria present in food (6). According to several studies (15, 16), an increase or decrease in temperature (depending on bacteria) could improve the efficacy of high pressure treatments. A new study performed on *E.coli* inoculated into carrot juice showed that at constant pressure, bacterial inactivation increases when temperature increases (17). It should be interesting to study the results of our compressions performed at higher temperatures.

CONCLUSION

In conclusion, a pressure of 140 MPa over 5 minutes was sufficient to inactivate MRSA in CDA. This study showed that this pressure could be effective in bacterial inactivation in biomaterials containing no lipids. The best operating conditions were determined to be two compressions of 5 minutes each at 140 MPa separated by a 24 hour wait period. Further investigations could include the study of the impact of this protocol on Gram-negative bacteria.

REFERENCES

1. P.Masson, C.Tonello ; Potential applications of high pressures in pharmaceutical science and medicine ; High Pressure Research ; 2000 ; volume 19 : 223-231
2. Y.Rigaldie, G.Demazeau; Apport des hautes pressions aux sciences pharmaceutiques et médicales; Annales pharmaceutiques françaises; 2004; volume 62: 116-127
3. R.Gervilla, V.Ferragut, B.Guamis; High pressure inactivation of microorganisms inoculated into ovine milk of different Fat contents; Journal Dairy of Science; 2000; volume 84: 674-682
4. F.Bozoglu, H.Alpas, G.Kalentunc; Injury recovery of foodborne pathogens in high hydrostatic pressure treated milk during storage; Immunology and Medical Microbiology; 2004; volume 40: 243-247
5. E.B.Solomon, D.G.Hoover; Inactivation of *Campylobacter jejuni* by high hydrostatic pressure; Letters in Applied Microbiology; 2004; volume 38: 505-509

6. S.Lamo-Castellvi, M.Capellas, T.Lopez-Pedemonte, M.Hernandez-Herrero, B.Guamis; Behavior of *Yersinia enterocolitica* inoculated in model cheese treated with high hydrostatic pressure; Journal of food protection; 2005; volume 68: 528-533
7. C.O'Reilly, P.O'Connor, A.Kelly, T.Beresford, P.Murphy; Use of hydrostatic pressure for inactivation of microbial contaminants in cheese, Appl. Environ. Microbiol.; 2000; volume 66: 4890-4896
8. C.Jacqueline, J.Caillon, V.Le Mabecque, AF. Miègeville, PY. Donnio, D.Bugnon, G.Potel ; In vitro activity of linezolid alone and in combination with gentamicin, vancomycin or rifampicin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by time-kill curve methods ; Journal of Antimicrobial Chemotherapy ; 2003 ; volume 51 :857-864
9. H.Gautier, J.Caillon, AM.Le Ray, G.Daculsi, C.Merle ; Influence of isostatic compression on the stability of vancomycine loaded with a calcium phosphate implantable drug delivery device ; Journal of Biomedical Material Research ; 2000 November ; volume 52(2) :308-14
10. S.Koeneman, S.Lemons, P.Ducheyne, W.Lacefield, F.Magee, T.Calahan, J.Kay ; Workshop on characterization of calcium phosphate materials, Journal Application Biomaterial ; 1990; volume 1: 79-90
11. M.Bull, E.Szabo, M.Cole, C.Stewart ; Toward validation of process criteria for high-pressure processing of orange juice with predictive models; Journal of food protection ; 2005; volume 68: 949-954
12. S.De Lamo-Castellvi, A.Roig-Sagues, M.Capellas, M.Hernandez-Herrero, B.Guamis; Survival and growth of *Yersinia enterocolitica* strains inoculated in skimmed milk treated with high hydrostatic pressure; International Journal of Food Microbiology; 2005; volume 102: 337-342
13. D. O'Sullivan, T. McHugh, S.Gillepsie; Analysis of *rpoB* and *pncA* mutations in the published literature: an insight into the role of oxidative stress in *Mycobacterium tuberculosis* evolution?; Journal of Antimicrobial Chemotherapy; 2005; volume 55: 674-679
14. K.S.Yoon, C.N. Burnette, K.A. Abou-zeid, R.C. Whiting; Control of growth and survival of *Listeria monocytogenes* on smoked salmon by combined potassium lactate and sodium diacetate and freezing stress during refrigeration and frozen storage; Journal of food protection; 2004; volume 67: 2465-2471

15. K.Suzuki, K.Batarume; Inactivation of enzyme under high pressure. Studies on the kinetics of inactivation of α -amylase of *Bacillus subtilis* under high pressure; J.Bioch.; 1963; volume 53: 214-219
16. H.Ludwig, G. Van Almisck, B. Sojka; High pressure inactivation of microorganisms; High pressure Bioscience and Biotechnology; Elsevier Science B.V., Amsterdam, 1996, 237-244
17. I.Van Opstal, S.Vanmuysen, E.Wuytack, B.Masschalck, C.Michiels; Inactivation of *Escherichia coli* by high hydrostatic pressure at different temperatures in buffer and carrot juice; International journal of food microbiology; 2005; volume 98: 179-191

IV Poster présenté lors du 20ème congrès européen sur les biomatériaux , 27 septembre au 1er octobre 2006, Nantes, France

1 Présentation

Use of hydrostatic compression to inactivate bacteria in calcium phosphate biomaterials

H. Gautier^{1,2}, M Brouillet¹, JM Bouler², P Weiss², C. Merle^{1,2}, J Caillon³

¹ Laboratoire de Pharmacie Galénique, Faculté de Pharmacie, 44035 Nantes Cedex, France.

² Inserm UMRS 791, Laboratoire d'Ingénierie Ostéo-articulaire et dentaire, LIOAD, Faculté de chirurgie dentaire, 44042 Nantes Cedex, France.

³ Laboratoire de Thérapeutiques Cliniques et Expérimentales EA 3826, Faculté de Médecine, 44035 Nantes Cedex, France.

The use of high hydrostatic pressure is a technic of bacterial destruction which expanded in food processing industry since the years 1990 but is no used in medical or pharmaceutical field (1). In this study, the inactivation, by high hydrostatic pressure, of *Staphylococcus aureus* in bone substitution materials of calcium deficient apatite was studied. The objective was to determinate the conditions of operating which ensure to inactive this microorganism inoculated in calcium phosphate powder subjected then to an isostatic compression.

Materials and methods

0.5 ml of 10⁸cfu/mL *S aureus* was inoculated in 7.5 grams of calcium deficient apatite CDA (HA/TCP = 17.3/82.7; Ca/P = 1.53). 50 milligrams of powder were kept as control. The powder rest was pressurized in an isostatic press

(N° FF558, Nova Swiss, France). Blocks of CDA were broken and four samples of 50 milligrams each were recovered. Three of these samples and the control were diluted and filtered and filter was put on a tryptone soy agar and incubated at 37°C for 24 at 48h. The fourth sample was introduced directly in brain heart infusion broth and incubated at 37°C. If bacteria development was observed, identification was realized. The sample was considered to be sterile when no bacteria development was observed after 1 month at 37°C. Identification of *S aureus* P9 was realized by a latex agglutination test (Pastorex Staph plus, Bio-Rad) and a susceptibility testing was performed. Several conditions were tested : pressure conditions (from 50 to 140 MPa), times of plateau (from 5 to 45 minutes) and number of compressions (from 1 to 3). Each experiment had been realized 2 times with each time 4 samples. For each experiment, results were given as

logarithmic decrease of bacterial charge: $d = \log (N_0/N)$, N was obtained by calculated average of results of 3 samples.

Results

When pressures of 50, 100 and 140 MPa were applied during 5 min, the rate of bacteria destruction increased with the pressure ($d = 1.98 \pm 0.32$ at 50 MPa, $d = 4.01 \pm 0.58$ at 140 MPa).

The role of time of plateau in compression efficacy had been studied with compressions of 5, 15, 30 and 45 minutes at pressure of 140 MPa. The results analysis showed that values of logarithmic decrease between 3.72 (± 0.11) and 4.43 (± 0.22). So the increase of time of plateau was not able to improve treatment efficacy. Influences of number of compressions have been tested with 1, 2 or 3 compressions of 5 min at 140MPa: values of logarithmic decrease had low variations. Influence of time of plateau, with 3 successive compressions, had been evaluated with 5 minutes at 140 MPa or 15 minutes at 140 MPa, the results were similar ($d = 4.5$). The time necessary between 2 compressions (0 or 15 minutes) was no important. 5 experiments were performed with a time of 24h between 2 compressions, and showed sterilization four times. Scanning electronic microscopy study of *S aureus* P9 in CDA before and after compression showed a destruction of bacterial wall.

Discussion and conclusion

Results have shown a significantly logarithmic decrease of bacterial contamination (mean decrease = 4.01 log) with a 5 minutes compression at 140MPa. This result is very different from those obtained with food because a minimal pressure of 300 or 400 MPa was required to obtain a total bacterial degradation (2). This could be explain by the fact that CDA, does not contain any lipid which could have a pressure protective effect towards bacteria (3). Preliminary results of addition of growing quantities of stearic acid in CDA showed that the rate of *S aureus* P9 inactivation decrease with growing quantities of lipids.

Conditions of operating which ensure to inactivate a maximum of bacterial contamination in CDA are 2 compressions of 5 min at 140 MPa with 24 hours of waiting between the 2 compressions. This waiting time allow to eliminate the bacteria stress factor which prevent them to have a normal multiplication cycle and the second compression is more efficient

References

1. Rigaldie Y *et al.* (2004) Ann Phram Fr, **62**, 116-127.
2. Solomon EB *et al.* (2004) Letters Appl Microbio, **38**, 205-509.
3. De Lamo-Castellvi S. *et al.* (2005) Int J Food Microbiol, **102**, 337-342.

2 Poster

USE OF HYDROSTATIC COMPRESSION TO INACTIVATE BACTERIA IN CALCIUM PHOSPHATE BIOMATERIALS

H Gautier^{1,2}, M Brouillet¹, JM Bouler², P Weiss², C Merle^{1,2}, J Caillon³

¹ Laboratoire de Pharmacie Galénique, Faculté de Pharmacie, 44035 Nantes, Cedex, France

² Inserm UMRS 791, Laboratoire d'Ingénierie Ostéoarticulaire et Dentaire LIOAD, Faculté de Chirurgie Dentaire, 44042 Nantes, Cedex, France

³ Laboratoire de Thérapeutiques Cliniques et Expérimentales EA 3826, Faculté de Médecine, 44035 Nantes Cedex, France

The use of high hydrostatic pressure is a technic of bacterial destruction which expanded in food processing since the years 1990 but is not used in medical or pharmaceutical field (1). In this study, the inactivation, by high hydrostatic pressure, of *Staphylococcus aureus* (SARM) in bone substitution materials of calcium deficient apatite (CDA) was studied. The objective was to determinate the conditions of operating which ensure to inactivate this microorganism inoculated in calcium phosphate powder subjected then to an isostatic compression.

MATERIALS AND METHODS

S. aureus + CDA
(N0 : 10⁷ UFC/ml)

isostatic compression

pressure conditions : 50, 100, 140 MPa
time of plateau : 5, 15, 30, 45 min
number of compressions: 1, 2, 3
+ 15 min or 24 h of waiting between 2 or 3 compressions

block

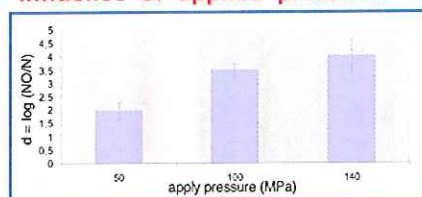
- dilution-filtration-tryptone soy agar: 37 °C - 24-48 h
- brain-heart infusion broth: 37 °C

if bacteria development (N : UFC/ml): identification
if no bacteria development after 1 month: sample sterile

Result → logarithmic decrease of bacteria charge: $d = \log N0/N$

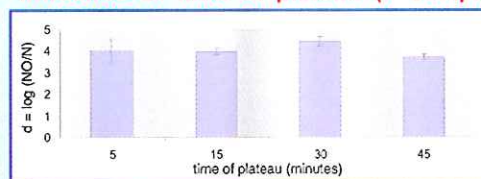
RESULTS

1 - Influence of applied pressure



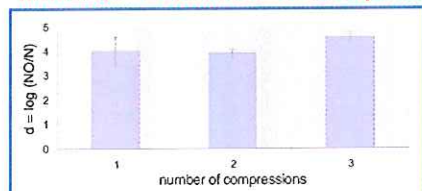
more the pressure increase, more the d value decrease

2 - Influence of time of plateau (1 compression)



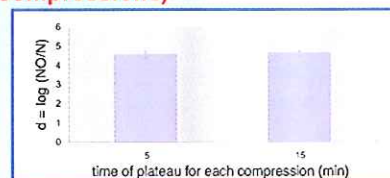
no influence

3 - Influence of number of compressions



no influence

4 - Influence of time of plateau of each compression (3 compressions)



no influence

5 - Influence of waiting time between 2 compressions (0 and 15 minutes)

no role in isostatic compression efficacy

6 - Influence of waiting time of 24 hours between 2 compressions (3 compressions)

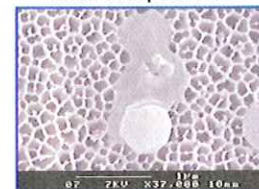
5 experiments

- sterilization : 4 samples
- SARM : 1 sample

7 - Scanning electronic microscopy of SARM

before compression

after compression



→ destruction of the bacterial wall

DISCUSSION AND CONCLUSION

Isostatic compression at 140 MPa allows a bacterial destruction. This pressure is very low compared to pressure used in agroalimentary field where a minimal pressure of 300 or 400 MPa was required to obtained a total bacterial degradation (2). This could be explained by the fact that CDA does not contain any lipids which could have a pressure protective effect towards bacteria (3). Preliminary results of addition of growing quantities of stearic acid (25, 50, 75 %) in CDA showed that the rate of *S. aureus* inactivation decrease with growing quantities of lipids.

Conditions of operating which ensure to inactivate a maximum of bacteria contamination in CDA are 2 compressions of 5 min at 140 MPa with 24 hours of waiting between the 2 compressions. This waiting time allow to eliminate the bacteria stress factor which prevent them to have a normal multiplication cycle and the second compression is more efficient (4).

References (1). Rigaldie Y et al. (2004) Ann Pharm Fr, 62, 116-127
(2). Solomon EB et al. (2004) Letters Appl microbiol, 38, 205-209

(3). De Iamo-Castellvi S. et al. (2005) Int J Food microbiol, 102, 337-342
(4). O'Sullivan D et al. (2005) J Antimicrobial Chemother, 55, 674-679.

CONCLUSION GENERALE

Actuellement, différentes techniques de stérilisation comme la stérilisation par vapeur d'eau ou par irradiation ionisante sont autorisées par les autorités de santé. Il s'agit de méthodes très étudiées et encadrées par une législation stricte.

D'autres techniques sont actuellement en cours d'évaluation et d'optimisation, il s'agit notamment de la compression isostatique. Cette méthode a déjà fait preuve de son efficacité dans le domaine de l'agroalimentaire (jus de fruits, produits laitiers..) depuis une quinzaine d'années, en particulier au Japon.

La compression isostatique est cependant utilisée en France dans un tout autre domaine : la mise en forme de matériaux de substitution osseuse, utilisés en chirurgie orthopédique et en chirurgie maxillo-faciale. Ces substituts peuvent être associés à des principes actifs, qui, dans certains cas, ne supportent pas les techniques de stérilisation conventionnelles. C'est pourquoi il est intéressant d'étudier la possibilité d'utiliser la compression isostatique pour la stérilisation de ce type de biomatériaux.

Les expérimentations effectuées dans le cadre de ce travail avaient pour objectif l'optimisation des conditions opératoires permettant une diminution maximale de la contamination bactérienne dans de la CDA. Différents paramètres ont été étudiés : la pression à appliquer, le temps de palier, le nombre de compressions et le temps d'attente entre chaque compression. Il a été démontré que la pression la plus efficace était de 140 MPa mais que le temps de palier de compression ne jouait pas un rôle primordial. Le nombre de compressions joue un rôle important si un temps d'attente suffisant entre chaque compression est respecté (24 heures). Le mode opératoire permettant de réduire au maximum le taux de *Staphylococcus aureus* dans de la CDA est le suivant : 2 compressions de 5 minutes à 140 MPa avec 24 heures d'intervalle entre ces deux compressions. Ce protocole testé 5 fois a permis d'obtenir une stérilisation dans 4 cas sur 5.

Il serait par la suite intéressant de continuer ces recherches en effectuant une série de tests sur de la CDA inoculée avec des bactéries à Gram négatif, comme *Escherichia coli* ou *Pseudomonas aeruginosa*, car leur sensibilité aux hautes pressions est différente de celle des bactéries à Gram positif. Afin d'améliorer les résultats, il serait également intéressant de voir si la réalisation de 3 compressions de 5 minutes à 140 MPa avec 24 heures d'intervalle entre chacune de ces compressions apporte un bénéfice dans l'obtention de la stérilité. En effet, le protocole utilisant 2 compressions à 140 MPa à 24 heures d'intervalle ne permettant pas d'obtenir une stérilisation totalement systématique, il serait intéressant d'étudier 3

compressions à 24 heures d'intervalle afin de fiabiliser le protocole. Un axe de travail serait également de faire les essais avec une presse à comprimer permettant de travailler avec des températures variables. En effet, la température est un des facteurs influençant l'efficacité de la compression. Des températures plus élevées ou plus faibles que la température ambiante pourraient avoir un impact sur l'efficacité du protocole.

BIBLIOGRAPHIE GENERALE

Association Française de Stérilisation. www.afs.asso.fr

Bozoglu F., Alpas H., Kalentunc G. ; Injury recovery of foodborne pathogens in high hydrostatic pressure treated milk during storage; Immunology and Medical Microbiology; 2004; volume 40: 243-247

Bull M., Szabo E., Cole M., Stewart C. ; Toward validation of process criteria for high-pressure processing of orange juice with predictive models; Journal of food protection ; 2005; volume 68: 949-954

Dayan L. ; Les biomatériaux de substitution et de régénération osseuse d'origine non biologique ; Thèse pour le Diplôme d'Etat de Docteur en Chirurgie Dentaire ; Janvier 2005, Faculté de Chirurgie Dentaire de Paris 7.

Delacour H.; Intérêts des hautes pressions hydrostatiques dans l'inactivation des spores bactériennes ; Thèse pour le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie ; Septembre 2000, Faculté de Pharmacie de Lyon.

Delacour H., Clery C., Masson P., Vidal D.R. ; Inactivation des spores bactériennes par les hautes pressions hydrostatiques ; Annales Pharmaceutiques Françaises ; 2002 ; volume 60 : 38-43.

De Lamo-Castellvi S., Roig-Sagues A., Capellas M., Hernandez-Herrero M., Guamis B. ; Survival and growth of *Yersinia enterocolitica* strains inoculated in skimmed milk treated with high hydrostatic pressure; International Journal of Food Microbiology; 2005; volume 102: 337-342

Gautier H. ; Evaluation de deux procédés de granulation de la vancomycine associée à un substitut osseux : la compression isostatique et la compaction dynamique ; Thèse Doctorat de l'Université de Nantes, Janvier 2000.

Gautier H., Caillon J., Le Ray AM., Daculsi G., Merle C. ; Influence of isostatic compression on the stability of vancomycine loaded with a calcium phosphate implantable

drug delivery device ; Journal of Biomedical Material Research ; 2000 November ; volume 52(2) :308-14

Gautier H., El Kouri N., Miegerville A.F., Merle C., Bouler J.M., Caillon J. ; Influence of isostatic compression on the reduction of the bacterial load of a calcium phosphate biomaterial for osseous fill in, soumis, 2006

Gervilla R., Ferragut V., Guamis B.; High pressure inactivation of microorganisms inoculated into ovine milk of different fat contents; Journal Dairy of Science; 2000; volume 84: 674-682.

Jacqueline C., Caillon J., Le Mabecque V., Miègeville AF., Donnio PY., Bugnon D., Potel G. ; In vitro activity of linezolid alone and in combination with gentamicin, vancomycin or rifampicin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by time-kill curve methods ; Journal of Antimicrobial Chemotherapy ; 2003 ; volume 51 :857-864.

Koeneman S., Lemons S., Ducheyne P., Lacefield W., Magee F., Calahan T., Kay J. ; Workshop on characterization of calcium phosphate materials, Journal Application Biomaterial ; 1990; volume 1: 79-90

Lamo-Castellvi S., Capellas M., Lopez-Pedemonte T., Hernandez-Herrero M., Guamis B.; Behavior of *Yersinia enterocolitica* inoculated in model cheese treated with high hydrostatic pressure; Journal of food protection; 2005; volume 68: 528-533

Les Bonnes Pratiques de Fabrication, Bulletin officiel, 1998.

Ludwig H., Van Almisk G., Sojka B.; High pressure inactivation of microorganisms; High pressure Bioscience and Biotechnology; Elsevier Science B.V., Amsterdam, 1996, 237-244

Masson P. ; Action de la pression hydrostatique sur les protéines : émergence de la biotechnologie des hautes pressions, applications pharmaceutiques et médicales potentielles ; Annales Pharmaceutiques Françaises ; 1999 ; volume 57 :49-55.

Masson P., Tonello C. ; Potential Applications of high pressures in pharmaceutical science and medicine ; High pressure Research ; 2000 ; volume 19 :223-231.

Migné L. ; Modulation de la libération de vancomycine par adjonction d'agent liant dans des matériaux de comblement osseux préparés par compression isostatique ; Thèse pour le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie ; Septembre 2003, Faculté de Pharmacie de Nantes.

O'Reilly C., O'Connor P., Kelly A., Beresford T., Murphy P.; Use of hydrostatic pressure for inactivation of microbial contaminants in cheese, Appl. Environ. Microbiol.; 2000; volume 66: 4890-4896

O'Sullivan D., McHugh T., Gillespie S.; Analysis of rpoB and pncA mutations in the published literature: an insight into the role of oxidative stress in *Mycobacterium tuberculosis* evolution?; Journal of Antimicrobial Chemotherapy; 2005; volume 55: 674-679

Pharmacopée Européenne 5^{ème} édition. Conseil de l'Europe, Strasbourg 2006.

Rigaldie Y., Demazeau G. ; Apport des hautes pressions aux sciences pharmaceutiques et médicales ; Annales Pharmaceutiques Françaises ; 2004 ; volume 62 :116-127.

Rosseto Y., le φ41 : Pharmacotechnie industrielle, IMT éditions, 1998.

Sébert P., Arnaud P., Catteau D., Darbord J.C., Gallié J.C., Gominet M., Guichon A., Hénon Y., Le Huédé E., Mondoly N., Zerbib E.; Radiostérilisation des médicaments : de la matière première au produit fini; S.T.P. Pharma pratiques; 1998; volume 8 :214-232.

Slifko TR., Raghubeer E., Rose J-B. ; Effect oh high hydrostatic pressure on *Cryptosporidium parvum* infectivity ; Journal of food protection ; 2000; volume 63: 1262-1267

Solomon E.B., Hoover D.G. ; Inactivation of *Campylobacter jejuni* by high hydrostatic pressure ; Letters in Applied Microbiology ; 2004 ; volume 38 :505-509.

Suzuki K., Batarume K.; Inactivation of enzyme under high pressure. Studies on the kinetics of inactivation of α -amylase of *Bacillus subtilis* under high pressure; J.Bioch.; 1963; volume 53: 214-219

Thiveaud D. ; Stériliser à l'oxyde d'éthylène ; Hygiène en milieu hospitalier ; 1998 ; volume 9 : 21-28.

Thiveaud D. ; Stérilisation par gaz-plasma ; Hygiène en milieu hospitalier ; 1998 ; volume 7 : 19-23.

Van Opstal I., Vanmuysen S., Wuytack E., Masschalck B., Michiels C.; Inactivation of *Escherichia coli* by high hydrostatic pressure at different temperatures in buffer and carrot juice; International journal of food microbiology; 2005; volume 98: 179-191

www.geco-medical.org/geco2006 ; GECCO= Groupe d'Etude en Chirurgie Osseuse, D. Mainard, Service Orthopédie-Traumatologie, CHU de Nancy.

www.maitrise-orthop.com/gesto; GESTO = Association pour l'étude des greffes et substituts tissulaires de l'appareil locomoteur

Yoon K.S., Burnette C.N., Abou-zeid K.A., Whiting R.C. ; Control of growth and survival of *Listeria monocytogenes* on smoked salmon by combined potassium lactate and sodium diacetate and freezing stress during refrigeration and frozen storage; Journal of food protection; 2004; volume 67: 2465-2471