

**MEMOIRE
POUR LE DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
DE PHARMACIE HOSPITALIERE ET DES COLLECTIVITES**

**Soutenu publiquement le 15 Septembre 2017
Par M. Justin COURTIN**

**Conformément aux dispositions du Décret du 10 septembre 1990
tient lieu de**

THESE EN VUE DU DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

**ETUDE DE FAISABILITE DES PREPARATIONS HOSPITALIERES INJECTABLES
DE 5-FLUORO-URACILE AU CENTRE HOSPITALIER REGIONAL ET
UNIVERSITAIRE DE LILLE : VALIDATION DE L'ESSAI DE STERILITE SELON LA
METHODE CLASSIQUE DE LA PHARMACOPEE EUROPEENNE ET
EVALUATION D'UNE METHODE ALTERNATIVE**

Membres du jury :

- Président :** **Monsieur le Professeur Pascal Odou**
Pharmacien, Professeur des Universités - Praticien Hospitalier
Faculté de pharmacie, Université de Lille 2
Centre Hospitalier Régional et Universitaire de Lille
- Asseseurs :** **Madame le Docteur Sophie Liabeuf**
Pharmacien, Maître de Conférences des Universités - Praticien Hospitalier
Faculté de pharmacie, Université d'Amiens
Centre Hospitalier Universitaire d'Amiens
- Madame le Docteur Stéphanie Genay**
Pharmacien, Maître de Conférences des Universités - Praticien Attaché
Faculté de pharmacie, Université de Lille 2
Centre Hospitalier Régional et Universitaire de Lille
- Madame le Docteur Michèle Vasseur**
Pharmacien, Praticien Hospitalier
Centre Hospitalier Régional et Universitaire de Lille

**MEMOIRE
POUR LE DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
DE PHARMACIE HOSPITALIERE ET DES COLLECTIVITES**

**Soutenu publiquement le 15 Septembre 2017
Par M. Justin COURTIN**

**Conformément aux dispositions du Décret du 10 septembre 1990
tient lieu de**

THESE EN VUE DU DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

**ETUDE DE FAISABILITE DES PREPARATIONS HOSPITALIERES INJECTABLES
DE 5-FLUORO-URACILE AU CENTRE HOSPITALIER REGIONAL ET
UNIVERSITAIRE DE LILLE : VALIDATION DE L'ESSAI DE STERILITE SELON LA
METHODE CLASSIQUE DE LA PHARMACOPEE EUROPEENNE ET
EVALUATION D'UNE METHODE ALTERNATIVE**

Membres du jury :

- Président :** **Monsieur le Professeur Pascal Odou**
Pharmacien, Professeur des Universités - Praticien Hospitalier
Faculté de pharmacie, Université de Lille 2
Centre Hospitalier Régional et Universitaire de Lille
- Asseseurs :** **Madame le Docteur Sophie Liabeuf**
Pharmacien, Maître de Conférences des Universités - Praticien Hospitalier
Faculté de pharmacie, Université d'Amiens
Centre Hospitalier Universitaire d'Amiens
- Madame le Docteur Stéphanie Genay**
Pharmacien, Maître de Conférences des Universités - Praticien Attaché
Faculté de pharmacie, Université de Lille 2
Centre Hospitalier Régional et Universitaire de Lille
- Madame le Docteur Michèle Vasseur**
Pharmacien, Praticien Hospitalier
Centre Hospitalier Régional et Universitaire de Lille



Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX
☎ 03.20.96.40.40 - 📠 : 03.20.96.43.64
<http://pharmacie.univ-lille2.fr>



Université Lille 2 – Droit et Santé

Président :	Professeur Xavier VANDENDRIESSCHE
Vice-présidents :	Professeur Alain DUROCHER Professeur Régis BORDET Professeur Eric BOULANGER Professeur Frédéric LOBEZ Professeur Murielle GARCIN Professeur Annabelle DERAM Professeur Muriel UBEDA SAILLARD Monsieur Ghislain CORNILLON Monsieur Pierre RAVAUX Monsieur Larbi AIT-HENNANI Madame Nathalie ETHUIN Madame Iлона LEMAITRE
Directeur Général des Services :	Monsieur Pierre-Marie ROBERT

Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Doyen :	Professeur Damien CUNY
Vice-Doyen, 1 ^{er} assesseur :	Professeur Bertrand DECAUDIN
Assesseur en charge de la pédagogie	Dr. Annie STANDAERT
Assesseur en charge de la recherche	Pr. Patricia MELNYK
Assesseur délégué à la scolarité	Dr. Christophe BOCHU
Assesseur délégué en charge des relations internationales	Pr. Philippe CHAVATTE
Assesseur délégué en charge de la vie étudiante	M. Thomas MORGENROTH
Chef des services administratifs :	Monsieur Cyrille PORTA

Liste des Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	ALLORGE	Delphine	Toxicologie
M.	BROUSSEAU	Thierry	Biochimie
M.	DECAUDIN	Bertrand	Pharmacie Galénique
M.	DEPREUX	Patrick	ICPAL
M.	DINE	Thierry	Pharmacie clinique
Mme	DUPONT-PRADO	Annabelle	Hématologie
M.	GRESSIER	Bernard	Pharmacologie
M.	LUYCKX	Michel	Pharmacie clinique
M.	ODOU	Pascal	Pharmacie Galénique
Mme	RENNEVILLE	Aline	Hématologie
M.	STAELS	Bart	Biologie Cellulaire

Liste des Professeurs des Universités

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	ALIOUAT	El Moukhtar	Parasitologie
Mme	AZAROUAL	Nathalie	Physique
M.	BERTHELOT	Pascal	Onco et Neurochimie
M.	CAZIN	Jean-Louis	Pharmacologie – Pharmacie clinique
M.	CHAVATTE	Philippe	ICPAL
M.	COURTECUISSÉ	Régis	Sciences végétales et fongiques
M.	CUNY	Damien	Sciences végétales et fongiques
Mme	DELBAERE	Stéphanie	Physique
M.	DEPREZ	Benoît	Laboratoire de Médicaments et Molécules
Mme	DEPREZ	Rebecca	Laboratoire de Médicaments et Molécules
M.	DUPONT	Frédéric	Sciences végétales et fongiques
M.	DURIEZ	Patrick	Physiologie
M.	FOLIGNE	Benoît	Bactériologie
M.	GARÇON	Guillaume	Toxicologie
Mme	GAYOT	Anne	Pharmacotechnie Industrielle
M.	GOOSSENS	Jean François	Chimie Analytique
M.	HENNEBELLE	Thierry	Pharmacognosie
M.	LEMDANI	Mohamed	Biomathématiques
Mme	LESTAVEL	Sophie	Biologie Cellulaire
M.	LUC	Gerald	Physiologie
Mme	MELNYK	Patricia	Onco et Neurochimie
M.	MILLET	Régis	ICPAL
Mme	MUHR – TAILLEUX	Anne	Biochimie
Mme	PAUMELLE-LESTRELIN	Réjane	Biologie Cellulaire
Mme	PERROY	Anne Catherine	Législation
Mme	ROMOND	Marie Bénédicte	Bactériologie
Mme	SAHPAZ	Sevser	Pharmacognosie
M.	SERGHÉRAERT	Eric	Législation
Mme	SIEPMANN	Florence	Pharmacotechnie Industrielle
M.	SIEPMANN	Juergen	Pharmacotechnie Industrielle
M	TARTAR	André	Laboratoire de Médicaments et Molécules
M.	WILLAND	Nicolas	Laboratoire de Médicaments et Molécules

Liste des Maîtres de Conférences - Praticiens Hospitaliers

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	BALDUYCK	Malika	Biochimie
Mme	GARAT	Anne	Toxicologie
Mme	GOFFARD	Anne	Bactériologie
M.	LANNON	Damien	Pharmacie Galénique
Mme	ODOU	Marie Françoise	Bactériologie
M.	SIMON	Nicolas	Pharmacie Galénique

Liste des Maîtres de Conférences

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	ALIOUAT	Cécile Marie	Parasitologie
M.	ANTHERIEU	Sébastien	Toxicologie
Mme	AUMERCIER	Pierrette	Biochimie
Mme	BANTUBUNGI	Kadiombo	Biologie cellulaire
Mme	BARTHELEMY	Christine	Pharmacie Galénique
Mme	BEHRA	Josette	Bactériologie
M	BELARBI	Karim	Pharmacologie
M.	BERTHET	Jérôme	Physique
M.	BERTIN	Benjamin	Immunologie
M.	BLANCHEMAIN	Nicolas	Pharmacotechnie industrielle
M.	BOCHU	Christophe	Physique
M.	BORDAGE	Simon	Pharmacognosie
M.	BOSC	Damien	Laboratoire de Médicaments et Molécules
M.	BRIAND	Olivier	Biochimie
Mme	CACHERA	Claude	Biochimie
M.	CARNOY	Christophe	Immunologie
Mme	CARON	Sandrine	Biologie cellulaire
Mme	CHABÉ	Magali	Parasitologie
Mme	CHARTON	Julie	Laboratoire de Médicaments et Molécules
M	CHEVALIER	Dany	Toxicologie
M.	COCHELARD	Dominique	Biomathématiques
Mme	DANEL	Cécile	Chimie Analytique
Mme	DEMANCHE	Christine	Parasitologie
Mme	DEMARQUILLY	Catherine	Biomathématiques
Mme	DUMONT	Julie	Biologie cellulaire
Mme	DUTOIT-AGOURIDAS	Laurence	Onco et Neurochimie
M.	EL BAKALI	Jamal	Onco et Neurochimie
M.	FARCE	Amaury	ICPAL
Mme	FLIPO	Marion	Laboratoire de Médicaments et Molécules
Mme	FOULON	Catherine	Chimie Analytique
M.	FURMAN	Christophe	ICPAL
M.	GELEZ	Philippe	Biomathématiques
Mme	GENAY	Stéphanie	Pharmacie Galénique
M.	GERVOIS	Philippe	Biochimie
Mme	GOOSSENS	Laurence	ICPAL
Mme	GRAVE	Béatrice	Toxicologie
Mme	GROSS	Barbara	Biochimie
M.	HAMONIER	Julien	Biomathématiques
Mme	HAMOUDI	Chérifa Mounira	Pharmacotechnie industrielle
Mme	HANNOTHIAUX	Marie-Hélène	Toxicologie
Mme	HELLEBOID	Audrey	Physiologie
M.	HERMANN	Emmanuel	Immunologie
M.	KAMBIA	Kpakpaga Nicolas	Pharmacologie
M.	KARROUT	Youness	Pharmacotechnie Industrielle
Mme	LALLOYER	Fanny	Biochimie
M.	LEBEGUE	Nicolas	Onco et Neurochimie
Mme	LECOEUR	Marie	Chimie Analytique
Mme	LEHMANN	Hélène	Législation
Mme	LELEU-CHAVAIN	Natascha	ICPAL
Mme	LIPKA	Emmanuelle	Chimie Analytique
Mme	MARTIN	Françoise	Physiologie
M.	MOREAU	Pierre Arthur	Sciences végétales et fongiques

Mme	MUSCHERT	Susanne	Pharmacotechnie industrielle
Mme	NIKASINOVIC	Lydia	Toxicologie
Mme	PINÇON	Claire	Biomathématiques
M.	PIVA	Frank	Biochimie
Mme	PLATEL	Anne	Toxicologie
M.	POURCET	Benoît	Biochimie
M.	RAVAUX	Pierre	Biomathématiques
Mme	RAVEZ	Séverine	Onco et Neurochimie
Mme	RIVIERE	Céline	Pharmacognosie
Mme	ROGER	Nadine	Immunologie
M.	ROUMY	Vincent	Pharmacognosie
Mme	SEBTI	Yasmine	Biochimie
Mme	SINGER	Elisabeth	Bactériologie
Mme	STANDAERT	Annie	Parasitologie (80%)
M.	TAGZIRT	Madjid	Hématologie
M.	VILLEMAGNE	Baptiste	Laboratoire de Médicaments et Molécules
M.	WELTI	Stéphane	Sciences végétales et fongiques
M.	YOUS	Saïd	Onco et Neurochimie
M.	ZITOUNI	Djamel	Biomathématiques

Professeurs Agrégés

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	MAYES	Martine	Anglais
M.	MORGENROTH	Thomas	Législation

Professeurs Certifiés

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	HUGES	Dominique	Anglais
Mlle	FAUQUANT	Soline	Anglais
M.	OSTYN	Gaël	Anglais

Professeur Associé - mi-temps

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	DHANANI	Alban	Droit et Economie Pharmaceutique

Maîtres de Conférences ASSOCIES - mi-temps

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	BRICOTEAU	Didier	Biomathématiques
Mme	CUCCHI	Malgorzata	Biomathématiques
M.	FRIMAT	Bruno	Pharmacie Clinique
M.	GILLOT	François	Droit et Economie pharmaceutique
M.	MASCAUT	Daniel	Pharmacie Clinique
M.	ZANETTI	Sébastien	Biomathématiques
M.	BRICOTEAU	Didier	Biomathématiques

AHU

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	DEKYNDT	Bérengère	Pharmacie Galénique
M.	PEREZ	Maxime	Pharmacie Galénique

Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX
Tel. : 03.20.96.40.40 - Télécopie : 03.20.96.43.64
<http://pharmacie.univ-lille2.fr>

L'Université n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses ; celles-ci sont propres à leurs auteurs.

Remerciements

A Monsieur le Professeur Pascal Odou,

Vous me faites l'honneur de présider la soutenance de cette thèse et de juger mon travail. Soyez assuré de ma reconnaissance et de mon profond respect.

A Madame le Docteur Sophie Liabeuf,

Vous me faites l'honneur de juger mon travail.
Soyez assurée de ma reconnaissance et de mon profond respect.

A Madame le Docteur Stéphanie Genay,

Je suis très honoré de te compter parmi mon jury. Merci pour ton expertise, tes précieux conseils et ta gentillesse.

A Michèle,

Merci pour ton encadrement, ton professionnalisme et ta gentillesse, lors de la réalisation de cette thèse et tout au long de cette année passée à tes côtés à l'UPCC. Sois assurée de l'envie et de la motivation que j'ai pour être digne de la confiance que tu m'accordes.

A Damien Lannoy et Nicolas Simon,

Merci pour votre expertise et vos conseils.

***A Marie Titecat, Emilie Fréalle, Séverine Loridant, Marie-Françoise Odou,
Patricia Pischedda et Rimed Ezzouaoui,***

Merci pour votre expertise et votre implication lors de ce travail.

A Marine et Carole,

Pour votre aide précieuse, merci.

A Pauline Conejero, aux équipes des laboratoires de galénique et de contrôle,

Merci pour votre aide et votre gentillesse.

A Monsieur Pont et son équipe,

Merci pour la confiance que vous m'avez accordée et l'envie que vous m'avez transmise.

A mes parents,

Vous avez toujours tout fait pour que je puisse suivre les études que je souhaitais.

J'espère pouvoir vous rendre fiers aujourd'hui. Je vous aime.

A mes frères, à ma belle-sœur, à mon neveu et mes nièces,

Merci d'avoir toujours été là pour moi. Je vous aime.

A mes grands-parents, à André, à Mamo, à Gérard et tous ceux que je n'oublierai jamais,

Je pense fort à vous. Je vous aime.

A Agathe,

Merci pour toutes les heures que tu as passées à m'aider sur ce travail, merci pour ton soutien. Merci simplement pour tout.

Je t'aime.

A toute ma famille,

Du Nord au Sud, de la Bretagne à la Suisse, merci.

A ma « belle-famille »,

Merci de m'avoir accueilli parmi vous. Merci pour votre gentillesse et votre générosité.

A la famille Delivyne,

Pour tous ces moments passés avec vous, pour toutes ces soirées « foot » et ces soirées « traite », merci. Adrien, à croire que toutes les bêtises que nous avons faites ensemble nous auront fait grandir.

A tous mes amis, de Bachant à Lille en passant par Valenciennes,

Comme dirait quelqu'un que je connais bien :

Merci pour tous ces moments de joie, et pour tous ceux à venir !

A tous les pharmaciens, préparateurs, agents, co-internes et médecins que j'ai eu le plaisir de rencontrer à l'EPSM d'Armentières, au CHV, à Cambrai, à Armentières, à l'UPCC du CHRU de Lille, à Lens,

Merci pour ce que vous m'avez enseigné et ce que l'on a partagé.

Table des matières

Table des tableaux	11
Table des figures	12
Table des annexes	12
Table des abréviations	13
Introduction	14
1. Généralités	15
1.1. Activités de pharmacotechnie et perspectives au CHRU de Lille	15
1.1.1. Description de la pharmacotechnie stérile au CHRU de Lille	15
1.1.2. Concept de standardisation des doses.....	15
1.2. De la préparation magistrale à la standardisation des doses	16
1.2.1. Les modes de standardisation	17
1.2.2. Le dose banding	17
1.2.3. Application du dose banding au CHRU de Lille.....	19
1.3. Du dose banding à la préparation hospitalière	22
1.3.1. Définition de la préparation hospitalière	22
1.3.2. Prérequis à la mise en place de préparations hospitalières	22
1.4. Essai de stérilité classique selon le chapitre 2.6.1 de la PE	24
1.4.1. Préalables à la réalisation de l'essai de stérilité	24
1.4.2. Réalisation de l'essai de stérilité.....	25
1.5. Méthodes alternatives à l'essai de stérilité classique de la PE.....	27
1.5.1. Informations données par la PE sur les méthodes alternatives.....	27
1.5.2. Méthodes alternatives et équipements sélectionnés pour un usage pharmaceutique	28
1.5.3. Choix de la méthode alternative	31
2. Matériels et méthodes	33
2.1. Détermination de l'activité antimicrobienne du 5-FU	33
2.1.1. Choix des micro-organismes de référence, des milieux de culture et des conditions d'incubation	33
2.1.2. Détermination des C_{min}	34
2.2. Validation de l'essai de stérilité classique du chapitre 2.6.1 de la PE	34
2.2.1. Production des suspensions microbiennes	34
2.2.2. Milieux de culture et diluant : production et essai de stérilité.....	36
2.2.3. Essai de fertilité des milieux de culture.....	37
2.2.4. Essai d'applicabilité de la méthode classique.....	38
2.3. Validation de l'essai de stérilité alternatif du chapitre 5.1.6 de la PE	41
2.3.1. Production des suspensions microbiennes	41
2.3.2. Milieux de culture : choix et essai de stérilité.....	41
2.3.3. Essai de fertilité des milieux de culture.....	42

2.3.4.	Essai d'applicabilité de la méthode alternative	43
3.	Résultats et discussion	44
3.1.	Détermination de l'activité antimicrobienne du 5-FU	44
3.2.	Validation de l'essai de stérilité classique de la PE	45
3.2.1.	Essais de stérilité des milieux de culture et diluant	45
3.2.2.	Essais de fertilité et d'applicabilité réalisés sur les milieux au TG et à l'HCS.....	45
3.2.3.	Etude des paramètres de l'essai de fertilité des milieux au TG et à l'HCS.....	47
3.2.4.	Essais de fertilité et d'applicabilité réalisés sur le milieu MH.....	48
3.2.5.	Etude des paramètres de l'essai de fertilité du milieu MH.....	51
3.3.	Validation de l'essai de stérilité alternatif de la PE	53
3.3.1.	Essai de stérilité des milieux de culture	53
3.3.2.	Essais de fertilité et d'applicabilité de la méthode alternative.....	53
4.	Perspectives	55
4.1.	Perspectives locales	55
4.1.1.	La standardisation des doses	55
4.1.2.	L'essai de stérilité classique	55
4.1.3.	L'essai de stérilité alternatif	56
4.2.	Perspectives nationales.....	57
4.3.	Automatisation	58
	Conclusion.....	60
	Annexes	61
	Références bibliographiques.....	65

Table des tableaux

Tableau I.	DS de bortézomib sous-cutané appliquées au CHRU de Lille.....	20
Tableau II.	DS des « bolus » de 5-FU validées au CHRU de Lille	21
Tableau III.	DS des « préparations pour pompes portables » validées au CHRU de Lille.....	22
Tableau IV.	Nombre minimal d'unités à examiner (2)	26
Tableau V.	Quantités minimales de préparation à utiliser pour chaque milieu (2)	26
Tableau VI.	Critères de validation applicables aux essais qualitatifs, aux essais quantitatifs et aux identifications (3)	28
Tableau VII.	Critères de sélection des MMR	29
Tableau VIII.	Souches microbiennes de référence utilisées.....	33
Tableau IX.	Températures d'incubation utilisées pour l'essai de stérilité des milieux de culture et du diluant.....	37
Tableau X.	Conditions de réalisation des essais de fertilité des milieux de culture utilisés pour la méthode classique	38
Tableau XI.	Choix des unités de filtration destinées à l'essai de stérilité classique de la PE..	38
Tableau XII.	Milieux de culture utilisés pour l'essai de stérilité alternatif.....	42
Tableau XIII.	Conditions de réalisation des essais de fertilité des milieux de culture utilisés pour la méthode alternative.....	43
Tableau XIV.	Résultats de la détermination de la C_{min} du 5-FU.....	44
Tableau XV.	Résultats des essais de fertilité et d'applicabilité réalisés sur les milieux au TG et à l'HCS	45
Tableau XVI.	Résultats de l'essai de fertilité réalisé sur les milieux au TG et à l'HCS avec variation des lieux d'incubation	47
Tableau XVII.	Résultats de l'essai de fertilité réalisé sur les milieux au TG et MH avec variation des micro-organismes et de l'inoculum.....	48
Tableau XVIII.	Contrôle de la concentration des suspensions microbiennes utilisées pour les essais de fertilité et d'applicabilité de la méthode classique sur le milieu MH	49
Tableau XIX.	Résultats des essais de fertilité et d'applicabilité réalisés sur le milieu MH.....	49
Tableau XX.	Résultats de l'essai de fertilité réalisé sur le milieu MH avec variation de la décontamination et de la provenance du milieu.....	52
Tableau XXI.	Résultats des mesures de pH sur les milieux MH provenant du CBP et de la faculté de pharmacie	52
Tableau XXII.	Contrôle de la concentration des suspensions microbiennes utilisées pour les essais de fertilité et d'applicabilité de la méthode alternative	53
Tableau XXIII.	Résultats des essais de fertilité et d'applicabilité de la méthode alternative.....	53

Table des figures

Figure 1.	Standardisation des doses vue par J.P. Baker et S.E. Jones (11)	18
Figure 2.	Standardisation des doses vue par R. Plumridge et J. Sewell (12)	19
Figure 3.	Standardisation des doses vue par B. Zavery et G. Marsh (13)	19
Figure 4.	Réaction de bioluminescence impliquant le complexe luciférine/luciférase	31
Figure 5.	Réaction d'amplification impliquant l'adénylate kinase	31
Figure 6.	Gamme des concentrations de 5-FU testées	34
Figure 7.	Réalisation des suspensions bactériennes par densitométrie et dilution en cascade	35
Figure 8.	Réalisation des suspensions de <i>Candida albicans</i> et <i>Aspergillus brasiliensis</i> par comptage en citurine et dilution	36
Figure 9.	Montage de filtration utilisé pour l'essai d'applicabilité de la méthode classique	39
Figure 10.	Flux du matériel nécessaire à l'essai d'applicabilité de la méthode classique	40

Table des annexes

Annexe 1.	Détermination de l'activité antimicrobienne du 5-FU sur <i>Bacillus subtilis</i> (2 ^{ème} série)	61
Annexe 2.	Essai de fertilité sur milieu TG et HCS (J3 pour les bactéries, J5 pour les levures et moisissures)	61
Annexe 3.	Essai d'applicabilité sur milieu TG et HCS (témoin négatif et 1 ^{ers} répliques)	62
Annexe 4.	Essai de fertilité du milieu MH (J3 pour les bactéries, J5 pour les levures et moisissures)	62
Annexe 5.	Essai d'applicabilité sur le milieu MH	63
Annexe 6.	Certificats de conformité des milieux FA Plus, FN Plus et Mycosis IC/F	63

Table des abréviations

<i>5-FU</i>	5-Fluoro-Uracile
<i>A</i>	Aérobie
<i>ADP</i>	Adénosine Di-Phosphate
<i>AMM</i>	Autorisation de Mise sur le Marché
<i>AMP</i>	Adénosine Mono-Phosphate
<i>ANA</i>	Anaérobie
<i>ATCC</i>	American Type Culture Collection
<i>ATP</i>	Adénosine Tri-Phosphate
<i>CBP</i>	Centre de Biologie Pathologie
<i>CHRU</i>	Centre Hospitalier Régional et Universitaire
<i>C_{min}</i>	Concentration minimale sans activité antimicrobienne
<i>DB</i>	Dose banding
<i>DS</i>	Dose standard
<i>HCS</i>	Hydrolysate de caséine et soja
<i>MH</i>	Mueller Hinton
<i>MMR</i>	Méthode Microbiologique Rapide
<i>PE</i>	Pharmacopée Européenne
<i>PPH</i>	Préparateur en Pharmacie Hospitalière
<i>PUI</i>	Pharmacie à Usage Intérieur
<i>RPMI</i>	Roswell Park Memorial Institute
<i>SC</i>	Surface Corporelle
<i>TG</i>	Thioglycolate
<i>TMS</i>	Trouble Musculo-Squelettique
<i>UFC</i>	Unité Formant Colonie
<i>UPCC</i>	Unité de Préparation Centralisée des Cytotoxiques

Introduction

La Pharmacie à Usage Intérieur (PUI) du Centre Hospitalier Régional et Universitaire (CHRU) de Lille dispose d'un plateau de pharmacotechnie et des autorisations permettant de réaliser des préparations hospitalières et magistrales, stériles et non stériles, y compris des préparations pour la recherche biomédicale. Quel que soit le type de préparations stériles (cytotoxiques ou non cytotoxiques), l'activité est en constante augmentation et nous amène à initier une réflexion permettant d'optimiser et de sécuriser le processus de fabrication. Le passage d'un certain nombre de préparations magistrales en **préparations hospitalières** apparaît comme un axe d'amélioration de la qualité des préparations réalisées, au service des patients, ainsi que de l'organisation de notre activité. En effet, il permettrait un lissage de l'activité et une future robotisation pour certaines d'entre elles. Cette évolution d'une partie de notre activité en préparations hospitalières nécessite des **données de stabilité plus longues**, une **méthode de contrôle physicochimique validée** et une **stérilité garantie**.

D'après le chapitre 5.1.1 de la Pharmacopée Européenne (PE) (1), les préparations hospitalières stériles préparées dans des conditions aseptiques doivent satisfaire à l'**essai de stérilité classique**, décrit dans le chapitre 2.6.1 (2), après un minimum de **14 jours d'incubation**. Depuis sa version 5.5, la PE autorise le remplacement de cet essai de stérilité, par un essai utilisant l'une des **Méthodes Microbiologiques Rapides** (MMR), décrites dans son chapitre 5.1.6 (3). Pour cela, cette méthode doit avoir prouvé son équivalence à l'essai classique de la pharmacopée. Ces nouvelles technologies permettent la **détection**, l'**énumération** et/ou l'**identification rapide des micro-organismes**.

Dans l'objectif de mettre en place des préparations hospitalières stériles de **doses standards** (DS) de 5-Fluoro-Uracile (5-FU), l'Unité de Préparation Centralisée des Cytotoxiques (UPCC) du CHRU de Lille a mené une réflexion spécifique pour la validation de l'**essai de stérilité classique** de la PE et l'utilisation potentielle des **MMR**. Si l'essai de stérilité reste une pratique courante pour un certain nombre de préparations hospitalières dans les PUI, il présente des difficultés dans sa mise en œuvre pour un produit cytotoxique, en raison de sa potentielle activité antimicrobienne et des risques chimiques liés à sa manipulation.

1. Généralités

1.1. Activités de pharmacotechnie et perspectives au CHRU de Lille

1.1.1. Description de la pharmacotechnie stérile au CHRU de Lille

Au sein du processus pharmacotechnie de la PUI du CHRU de Lille, deux secteurs sont amenés à réaliser des préparations stériles : le préparatoire stérile et l'UPCC.

Le **préparatoire stérile** réalise des préparations hospitalières (seringues de cefuroxime pour injection intracaméculaire, collyres de voriconazole, etc.) et des préparations magistrales (bains de bouche, collyres, préparations d'allergologie, etc.). Des préparations magistrales et hospitalières sont également réalisées dans le cadre d'essais cliniques. Chaque année, l'activité est en augmentation. Ainsi en 2016, 5722 unités de préparations hospitalières stériles et 6417 unités de préparations magistrales stériles ont été réalisées.

L'**UPCC** assure la préparation de produits cytotoxiques. Son activité est orientée essentiellement autour de la prise en charge des patients traités par chimiothérapie anticancéreuse. Les préparations injectables produites regroupent des molécules cytotoxiques, des immunothérapies, des antiviraux et des médicaments expérimentaux. Elle est également amenée à préparer des médicaments soumis à autorisation temporaire d'utilisation. En 2016, l'activité a représenté une production de 42 163 préparations. Toutes les préparations réalisées au sein de l'UPCC sont produites sur prescription nominative selon un mode de préparation magistral. Une augmentation d'activité de + 42% a été observée entre 2007 et 2016 et de + 11% entre 2015 et 2016. Une majorité de ces préparations sont réalisées pour des patients pris en charge en hospitalisation de journée, avec une contrainte de temps importante pour les préparer et les dispenser. Le mode de préparation magistral actuellement en place ne semble plus suffisamment efficient pour faire face à cette augmentation d'activité constante. Un passage à un mode de préparation hospitalier pour certaines molécules doit être envisagé.

1.1.2. Concept de standardisation des doses

L'uniformisation des doses prescrites est une réflexion indispensable à explorer en amont de la mise en place d'une production de préparations hospitalières. **La standardisation des doses est une procédure de plus en plus appliquée aujourd'hui en cancérologie.** Une analyse fine des habitudes de prescription et de

préparation peut permettre, grâce à une collaboration médecin/pharmacien, de sélectionner les molécules « standardisables » et les DS à appliquer. Le **choix de la molécule** passe par l'**étude de 5 critères primordiaux** : fréquence de prescription, durée de stabilité de la molécule en solution, coût de la préparation, temps nécessaire à la préparation, souhait d'automatisation. La sélection des doses devra permettre de couvrir le maximum des doses prescrites tout en ayant un faible pourcentage d'écart entre la DS et la dose initialement demandée.

Sur le **plan réglementaire**, le statut de ces préparations n'est **pas clairement défini**. Selon les définitions du code de la santé publique des préparations (article L5121-1), les DS peuvent être considérées comme des préparations magistrales ou hospitalières puisqu'elles peuvent être préparées à l'avance avec constitution d'un stock, à l'avance sur prescription nominative ou extemporanément. D'après la littérature, plusieurs interprétations de la réglementation sont réalisées au sein des pharmacies hospitalières françaises (4). Certains établissements considèrent les DS préparées à l'avance comme des préparations magistrales puisqu'ils attribuent à chacune un numéro d'ordonnancier unique bien qu'elles ne possèdent pas de nom de patient. A l'inverse d'autres établissements considèrent les DS comme des préparations hospitalières (5). Ils justifient leur choix en raison de la production des préparations par lot de manière non nominative. Dans ce cas, l'attribution de la préparation se fait au moment de la dispensation pour un patient donné.

1.2. De la préparation magistrale à la standardisation des doses

Historiquement réalisée par les services de soins, la standardisation des doses d'injectables avait été globalement abandonnée par les pharmacies hospitalières lors de la centralisation de la production des cytotoxiques. Cependant, depuis les années 90, l'utilisation de la Surface Corporelle (SC), selon la formule de Dubois et Dubois, comme paramètre de calcul des doses de cytotoxiques est remis en cause puisqu'issue d'une étude de faible puissance méthodologique (6). Ce paramètre ne permettrait pas de réduire les variabilités pharmacocinétiques interindividuelles (7–9).

En l'absence d'alternative à ce mode de calcul, la notion de standardisation des doses renaît au sein des pharmacies hospitalières et ce, malgré l'absence de validation clinique du concept.

1.2.1. Les modes de standardisation

Deux modes de standardisation sont décrits à ce jour :

➤ *Les doses fixes (7,8,10)* : opposé au principe de l'individualisation des doses appliqué à l'essentiel des cytotoxiques, le concept des doses fixes gagne aujourd'hui du terrain et semble devenir un standard pour quelques médicaments anticancéreux injectables. Les doses fixes semblent être applicables aux médicaments à marge thérapeutique large et/ou pour lesquels peu de variabilités interindividuelles sont observées et/ou présentant un faible profil de toxicité. Les anticorps monoclonaux répondent à ces critères.

➤ *Les DS ou dose-banding (DB)* : ce concept a été décrit pour la première fois dans les années 1990 par J. P. Baker et S. E. Jones (11) au Royaume Uni. Initialement, l'objectif était de ne produire qu'une seule dose par intervalle de SC. Quelques années plus tard, après une revue de la littérature, R. Plumridge et J. Sewell (12) ont proposé la définition suivante du concept de DB : « Le « Dose-Banding » est un système dans lequel, lorsqu'un accord entre les prescripteurs et les pharmacies est établi, les doses de cytotoxiques intraveineux calculées de façon individuelle, qui constituent des rangs ou bandes prédéfinis, sont **arrondies** à une dose standard prédéterminée. Le maximum de variation de l'ajustement entre la dose standard et chacune des doses constituant la bande est de **5%**. Une gamme de seringues pré-remplies ou de préparations parentérales peuvent être utilisées de façon à administrer la dose standard ».

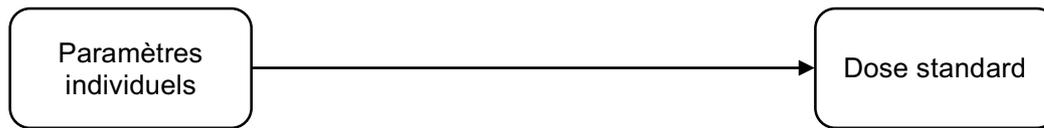
1.2.2. Le dose banding

Une phase préliminaire à la mise en place du DB est indispensable. Elle consiste en la détermination du **modèle de standardisation** des doses puis du **mode de calcul** des DS.

La standardisation des doses peut être réalisée selon 2 modèles : anglais ou français. Selon le *modèle anglais*, les doses préparées sont fixées de telle manière qu'un patient peut recevoir plusieurs préparations parentérales pour atteindre la DS. Dans le *modèle français* le patient ne peut en recevoir qu'une, l'administration de plusieurs unités ayant été jugée trop risquée (notamment en raison du risque d'erreur d'administration).

Quant au mode de calcul, plusieurs méthodes existent. En effet, les bandes (ou fourchettes de doses) peuvent être déterminées :

- Directement à partir des paramètres individuels du patient.



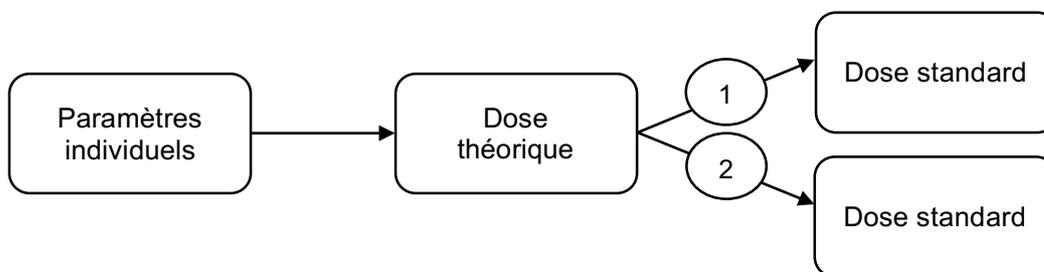
Le but de cette méthode est de déterminer, par exemple, une DS pour un intervalle de SC défini. Ce mode de calcul a notamment été décrit pour le méthotrexate par J. P. Baker et S. E. Jones (11) (Figure 1).

Surface Area (m ²)	Methotrexate Dose (mg)	Syringe Combination
1.4–1.58	60	1 × 60 mg
1.59–1.69	65	1 × 50 mg, 1 × 15 mg
1.7–1.83	70	1 × 60 mg, 1 × 10 mg
1.84–1.94	75	1 × 60 mg, 1 × 15 mg
1.95–2.00	80	1 × 80 mg

Figure 1. Standardisation des doses vue par J.P. Baker et S.E. Jones (11)

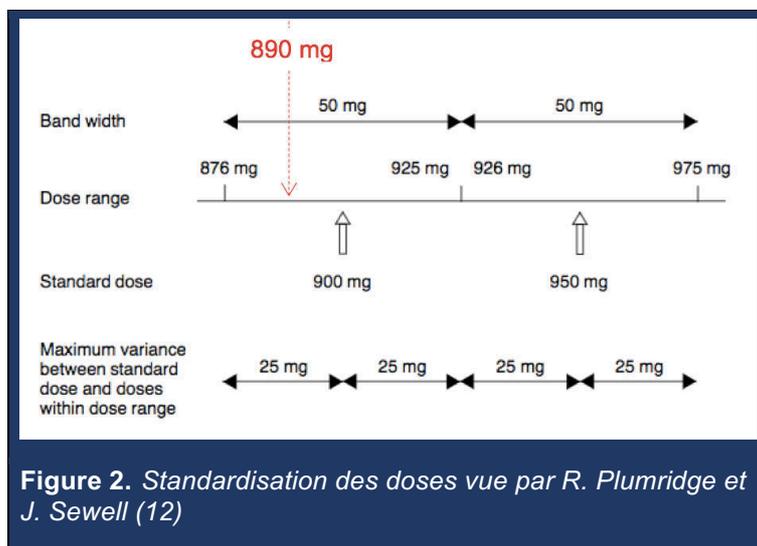
- Via la dose calculée selon les paramètres individuels du patient.

Ce calcul de la DS nécessite de passer par la dose théorique du patient. Il peut être notamment réalisé selon 2 méthodes, décrites ci-dessous.



1 - Largeur fixe, déterminée après accord médecin/pharmacien, avec pourcentage d'écart variable sur l'intervalle de dose

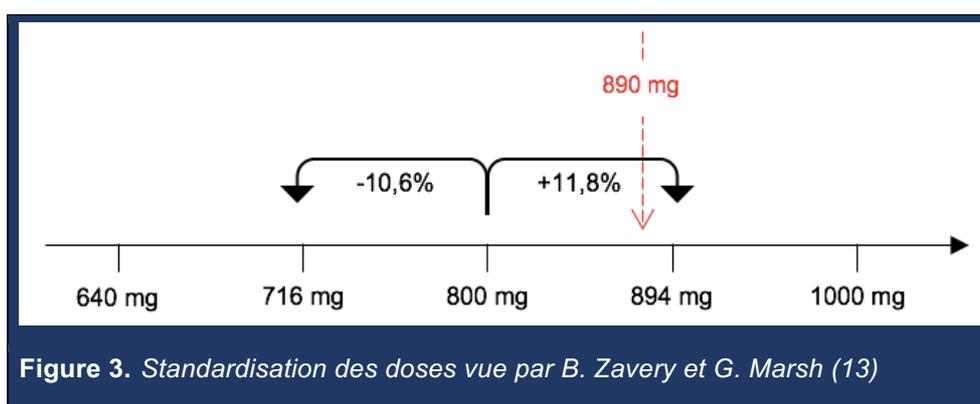
Ce mode de détermination des bandes a été utilisé par R. Plumridge et J. Sewell (12) (Figure 2). Dans l'exemple ci-dessous, la largeur de bande choisie est de 50 mg, la DS correspond au centre de la bande. Ainsi, pour une molécule prescrite à 500 mg/m², un patient de SC = 1,78 m² aura une dose théorique de 890 mg et donc une DS administrée de 900 mg.



2 - Largeur variable déterminée selon une échelle « logarithmique » avec pourcentage d'écart constant sur l'intervalle de dose

Décrite par B. Zavery et G. Marsh (13), cette méthode est basée sur une échelle « logarithmique » et détermine un pourcentage d'écart fixe. Dans leur exemple, pour un écart maximum de 6% entre la dose théorique calculée et la DS, la DS inférieure s'écarte de maximum -10,6% de la DS considérée tandis que la DS supérieure s'en écarte de maximum +11,8%. Elle s'utilise donc pour toutes les molécules.

Ainsi, dans l'exemple ci-dessous (Figure 3), pour une molécule prescrite à 500 mg/m², un patient de SC = 1,78 m² aura une dose théorique de 890 mg et donc une DS administrée de 894 mg (dans le cas où 800 mg aura été choisie comme dose de départ pour le calcul des autres DS).



1.2.3. Application du dose banding au CHRU de Lille

Un travail de standardisation des doses de chimiothérapie avec préparation extemporanée a été initié par l'équipe de l'UPCC en 2016. Une validation médicale du

concept de standardisation des doses et des pourcentages maximums d'écart a été obtenue pour le bortézomib sous-cutané.

Cette standardisation des doses est appliquée quotidiennement pour les préparations de bortézomib sous-cutané en dehors des protocoles de recherche biomédicale. Grâce à l'acquisition d'un module spécifique dans le logiciel, lors de la prescription médicale informatique, la dose prescrite (calculée en fonction de la SC) est automatiquement arrondie à la DS la plus proche.

Les DS de bortézomib sous-cutané produites par l'UPCC sont reprises dans le Tableau I.

Tableau I. DS de bortézomib sous-cutané appliquées au CHRU de Lille				
DS (volume)	2,0 mg (0,8 mL)	2,2 mg (0,88 mL)	2,4 mg (0,96 mL)	2,6 mg (1,04 mL)
Bornes inférieures et supérieures	1,9 mg – 2,1 mg	2,11 mg – 2,30 mg	2,31 mg – 2,50 mg	2,51 mg – 2,73 mg

Ces 4 DS représentent 100% des doses de bortézomib sous-cutané produites, hors recherche biomédicale. La standardisation des doses de bortézomib a permis de mettre en accord les doses prescrites et la précision des seringues lors du prélèvement.

D'autre part, un autre médicament semble répondre aux critères cités précédemment pour la standardisation des doses : fréquence de prescription, durée de stabilité, coût de la préparation, temps nécessaire à la préparation, souhait d'automatisation. En moyenne, 15 préparations à base de 5-FU sont réalisées par jour. Dans le cadre de ce travail ayant pour objectif d'étudier la faisabilité de préparations hospitalières en validant l'essai de stérilité classique de la PE, le 5-FU apparaît comme un candidat évident à ce mode de préparation. Par conséquent, une réflexion sur la standardisation des doses de 5-FU a été menée. Deux types de préparations de 5-FU ont été étudiés :

- Les « bolus » : ces préparations sont conditionnées en poche contenant du 5-FU dosé à 400 mg/m² et un volume complémentaire de chlorure de sodium 0,9% pour atteindre un volume final de 100 mL. La SC étant plafonnée à 2 m², la concentration maximale des « bolus » est de 8 mg/mL. Ces préparations sont destinées à être administrées en 30 minutes. Entre janvier 2015 et octobre 2016, 3248 préparations de ce type (représentant 128 doses différentes) ont été réalisées par l'UPCC du CHRU

de Lille, hors préparations pour la recherche biomédicale. Sur cette période, 80% des prescriptions réalisées concernaient des doses entre **550 et 800 mg**.

- Les « préparations pour pompes portables » : ces préparations sont conditionnées en poche contenant du 5-FU dosé à 2400 mg/m² et un volume complémentaire de chlorure de sodium 0,9% pour atteindre un volume final de 110 mL. La SC étant plafonnée à 2 m², la concentration maximale des « préparations pour pompes portables » est de 43,63 mg/mL. Ces préparations sont destinées à être administrées au domicile durant 46 heures. De janvier 2015 à octobre 2016, 3445 « préparations pour pompes portables » (représentant 197 doses différentes) ont été fabriquées, hors préparations pour la recherche biomédicale. Sur cette période, 88,2% de ces préparations concernaient des doses comprises entre **3200 et 4800 mg**.

Au regard de ces éléments, après discussion médecin/pharmacien, la standardisation des doses de 5-FU a été réalisée selon le modèle français et le mode de calcul par bande de largeur fixe (excepté pour les bornes extrêmes). La concentration de la matière première de 5-FU étant de 50 mg/mL, les largeurs de bande choisies correspondent à des multiples de 50 mg pour faciliter la préparation. Pour les « bolus », 6 DS ont été choisies, permettant de couvrir les prescriptions de 525 mg à 840 mg et représentant 84,3% de recouvrement des prescriptions sur la période étudiée (Tableau II). Pour les « préparations pour pompes portables », 5 DS ont été déterminées, s'étalant de 3040 mg à 5040 mg (Tableau III).

Intervalle de dose (mg)	DS (mg)	Matière première de 5-FU (mL)	Ecart par rapport à la DS (%)		Prescriptions couvertes (01/15 – 10/16)
			Borne basse	Borne haute	
525 – 575	550	11	+4,76%	-4,35%	251
576 – 625	600	12	+4,17%	-4,00%	310
626 – 675	650	13	+3,83%	-3,70%	348
676 – 725	700	14	+3,55%	-3,45%	432
726 – 775	750	15	+3,31%	-3,23%	698
776 – 840	800	16	+3,09%	-4,76%	699
Total (%)					2738 (84,3 %)

Tableau III. DS des « préparations pour pompes portables » validées au CHRU de Lille

Intervalle de dose (mg)	DS (mg)	Matière première de 5-FU (mL)	Ecart par rapport à la DS (%)		Prescriptions couvertes (01/15 – 10/16)
			Borne basse	Borne haute	
3040 – 3400	3200	64	+5,26%	-5,88%	301
3401 – 3800	3600	72	+5,85%	-5,26%	547
3801 – 4200	4000	80	+5,24%	-4,76%	547
4201 – 4600	4400	88	+4,74%	-4,35%	899
4601 – 5040	4800	96	+4,33%	-4,76%	839
Total (%)					3133 (90,9 %)

1.3. Du dose banding à la préparation hospitalière

1.3.1. Définition de la préparation hospitalière

Selon l'article L.5121-1 du code de la santé publique, les préparations hospitalières sont définies comme « *tout médicament, à l'exception des produits de thérapies génique ou cellulaire, préparé selon les indications de la pharmacopée et en conformité avec les bonnes pratiques, en raison de l'absence de spécialité pharmaceutique disponible ou adaptée disposant d'une autorisation de mise sur le marché, de l'une des autorisations mentionnées aux articles L.5121-9-1 et L.5121-12, d'une autorisation d'importation parallèle ou d'une autorisation d'importation délivrée à un établissement pharmaceutique dans le cadre d'une rupture de stock d'un médicament, par une pharmacie à usage intérieur d'un établissement de santé, ou dans l'établissement pharmaceutique de cet établissement de santé autorisé en application de l'article L.5124-9.* ».

Cette définition précise que les préparations hospitalières sont dispensées sur prescription médicale à un ou plusieurs patients par une PUI dudit établissement. Elles font l'objet d'une déclaration auprès de l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé, dans des conditions définies par un arrêté du ministre chargé de la santé, fixant le contenu du dossier de déclaration des préparations hospitalières.

1.3.2. Prérequis à la mise en place de préparations hospitalières

Selon le chapitre II des bonnes pratiques de préparation, la mise en place de préparations hospitalières stériles implique la réalisation : de **contrôles physico-chimiques**, de tout contrôle rendu nécessaire par la préparation terminée notamment la teneur en principe actif et de **contrôles microbiologiques** mentionnés par la pharmacopée pour les formes stériles (14).

Les **études de stabilité physico-chimique** sont habituellement réalisées par les laboratoires pharmaceutiques dans le cadre de la demande d'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM). Réglementairement lors du dépôt du dossier de demande d'AMM, le résumé des caractéristiques du produit doit comprendre les incompatibilités, la durée de conservation et les précautions particulières de conservation. Cependant, les laboratoires fournissent parfois des durées de stabilité très courtes et/ou inadaptées à la pratique quotidienne. Les travaux d'équipes de recherche, publiés dans des revues, ouvrages ou sur sites internet spécialisés (exemple : Stabilis[®]), représentent ainsi une source précieuse et largement utilisée à condition de prendre en compte leur robustesse méthodologique (15).

En ce qui concerne le contrôle de la teneur en principe actif, des automates de **contrôle analytique** sont de plus en plus utilisés dans les pharmacies hospitalières, au sein des secteurs de préparation (chimiothérapies, nutrition parentérale, etc.). Ainsi en 2013, Hergli et al. (16) montre qu'auprès de 36 centres hospitaliers français réalisant des préparations de chimiothérapie, 28% contrôlent leurs préparations finies par un dosage analytique. Dans cette même étude, les méthodes les plus retrouvées sont le Multispec Microdom[®] (46%), l'analyse par injection en flux continu (27%), l'association spectrométrie d'absorption UV et spectrométrie d'émission Raman (18%) et la chromatographie liquide haute performance (9%). Au décours des contrôles analytiques, les paramètres les plus souvent étudiés sont l'identité du principe actif (et du solvant de dilution lorsqu'il est présent) et sa concentration, permettant ainsi un contrôle qualitatif et quantitatif des préparations.

Microbiologiquement, les préparations stériles, qu'elles soient magistrales ou hospitalières, doivent être exemptes de micro-organismes. La libération des préparations magistrales, produites spécifiquement pour un patient et généralement utilisées rapidement après leur fabrication, ne permet pas d'attendre la réalisation d'un contrôle microbiologique effectif. Dans ce cas, le contrôle microbiologique est substitué par une libération paramétrique pouvant être basée de manière non exhaustive sur : l'assurance de l'utilisation de matières premières stériles, l'utilisation d'équipements qualifiés ou encore le suivi régulier des paramètres microbiologiques et environnementaux de l'enceinte et de la zone de préparation. Les préparations hospitalières, produites en lot, sont quant à elles plus adaptées à la réalisation d'un contrôle microbiologique en accord avec le chapitre 2.6.1 de la PE. En complément de l'essai de stérilité réalisé pour libérer le lot de préparation hospitalière, un essai de

stérilité peut également être réalisé dans le cadre du dossier de faisabilité à la fin de la durée de stabilité physicochimique, donnée par le fournisseur, puisqu'elle-même conditionnée par la stabilité microbiologique.

1.4. Essai de stérilité classique selon le chapitre 2.6.1 de la PE

1.4.1. Préalables à la réalisation de l'essai de stérilité

La mise en place de l'essai de stérilité classique de la PE nécessite au préalable la validation des essais de stérilité et de fertilité des milieux de culture et du diluant, et de l'essai d'applicabilité.

❖ Essai de stérilité des milieux de culture et du diluant

Afin de prouver la stérilité des milieux de culture et du diluant utilisés, un essai de stérilité doit être réalisé sur chaque lot de production, avant son utilisation. Pour cela, à chaque fin de production des milieux et diluant, un flacon est mis à incuber à la (aux) température(s) d'incubation recommandée(s) pendant 14 jours. Aucune croissance microbienne ne doit être observée. Dans le cas de produit prêt à l'emploi, un certificat de stérilité est généralement fourni par le fabricant.

❖ Essai de fertilité des milieux de culture

Pour s'assurer que les milieux de culture permettent la pousse des micro-organismes d'intérêt, la réalisation d'un essai de fertilité par micro-organisme de référence est rendue obligatoire par la PE sur chaque lot de production de milieux de culture. Après une incubation maximum de 3 jours pour les bactéries et de 5 jours pour les moisissures et levures, une croissance doit être clairement observable.

❖ Essai d'applicabilité

Quant à l'essai d'applicabilité, il a pour objectif de mettre au point un mode opératoire permettant la détection des micro-organismes s'ils sont présents dans la préparation. Il consiste en la contamination volontaire de l'échantillon à étudier par les micro-organismes de référence décrits dans le chapitre 2.6.1 de la PE. Il peut être réalisé selon deux méthodes, dans des conditions aseptiques : **par filtration** de l'échantillon au travers d'une membrane de porosité inférieure ou égale à 0,45 micromètres ou, en cas d'impossibilité (non filtrable), **par ensemencement direct** de l'échantillon dans un milieu de culture.

Pour une préparation possédant une activité antimicrobienne intrinsèque, le point critique de cette étape de validation est la recherche d'une technique permettant l'inhibition de cette activité.

Des équipes ont étudié l'activité antimicrobienne des chimiothérapies anticancéreuses (17–19). En effet, leur effet toxique, non spécifique, sur les cellules humaines, doit faire supposer un effet similaire sur la cellule microbienne. L'équipe d'Adrien Bodet (17) a travaillé sur l'activité antibactérienne *in vitro* de 14 antinéoplasiques sur 101 bactéries (flore humaine et espèces opportunistes sélectionnées). Au cours de ces essais, il a été démontré que le 5-FU avait une activité antibactérienne, avec par exemple une concentration minimale inhibitrice de 10-50 µg/mL sur *Pseudomonas aeruginosa* et de 0,5-5 µg/mL sur *Staphylococcus aureus*. Cette activité devra être appréhendée et inhibée lors de la réalisation de l'essai d'applicabilité.

Les milieux utilisés dans le cadre de cet essai peuvent être de différents types. La PE propose l'utilisation simultanée de deux milieux de culture : le milieu au thioglycolate (TG) et le milieu à l'hydrolysate de caséine et de soja (HCS). A eux deux, ils permettent la pousse des bactéries aérobies et anaérobies, des levures et des moisissures, s'ils sont incubés respectivement à 30-35°C et à 20-25°C pendant un maximum de 5 jours. Outre ces deux milieux, des milieux équivalents peuvent également être utilisés à condition qu'ils satisfassent à l'essai de fertilité décrit dans le chapitre 2.6.1 de la PE.

Durant ces 5 jours d'incubation, les milieux de culture sont lus par mirage, un trouble étant assimilé à la présence d'une croissance microbienne. L'essai d'applicabilité est validé si une croissance microbienne est clairement observable et comparable au témoin positif pour chaque micro-organisme de référence.

1.4.2. Réalisation de l'essai de stérilité

L'essai de stérilité figurant au chapitre 2.6.1 (2) est la **méthode classique** proposée par la PE pour le contrôle de la stérilité des substances, préparations et produits devant être stériles. Le nombre de préparations stériles à échantillonner parmi le lot de production et le volume de produit à analyser par préparation sont des données décrites dans ce même chapitre (Tableau IV et Tableau V).

Tableau IV. Nombre minimal d'unités à examiner (2)	
Nombre d'unités dans le lot*	Nombre minimal d'unités à examiner par milieu, sauf exception justifiée et autorisée**
Préparations parentérales	
Nombre de récipients ≤ 100	10 pour cent des récipients, avec un minimum de 4
$100 < \text{nombre de récipients} \leq 500$	10 récipients
Nombre de récipients > 500	2 pour cent des récipients, avec un maximum de 20 (10 pour les préparations parentérales de grand volume)
Préparations ophtalmiques et autres préparations non injectables	
Nombre de récipients ≤ 200	5 pour cent des récipients, avec un minimum de 2
Nombre de récipients > 200	10 récipients
Nb : si le produit est conditionné en récipients unidoses, appliquez le plan indiqué ci-dessus pour les préparations injectables	
Produits solides en vrac	
Nombre de récipients ≤ 4	Tous les récipients
$4 < \text{nombre de récipients} \leq 50$	20 pour cent des récipients, avec un minimum de 4
Nombre de récipients > 50	2 pour cent des récipients, avec un minimum de 10
* Si la taille des lots n'est pas connue, utilisez le nombre maximal d'unités spécifié.	
** Si le contenu d'un seul récipient suffit à ensemercer les 2 milieux, cette colonne indique le nombre de récipient à utiliser pour l'ensemble des 2 milieux.	

Tableau V. Quantités minimales de préparation à utiliser pour chaque milieu (2)	
Liquides	
$< 1 \text{ mL}$	Contenu total de chaque récipient
$1-40 \text{ mL}$	La moitié du contenu de chaque récipient, mais pas moins de 1 mL
$> 40 \text{ mL mais} \leq 100 \text{ mL}$	20 mL
$> 100 \text{ mL}$	10 pour cent du contenu du récipient, mais pas moins de 20 mL
Liquides antibiotiques	1 mL
Préparations insolubles, crèmes et pommades à mettre en suspension ou en émulsion	
Utiliser le contenu de chaque récipient de façon à obtenir au moins 200 mg	
Solides	
$< 50 \text{ mg}$	Contenu total de chaque récipient
$\geq 50 \text{ mg mais} < 300 \text{ mg}$	La moitié du contenu de chaque récipient, mais pas moins de 50 mg
$300 \text{ mg à} 5 \text{ g}$	150 mg
$> 5 \text{ g}$	500 mg

L'essai de stérilité doit être effectué selon la méthodologie validée pour l'essai d'applicabilité sans modification. La durée d'incubation est de 14 jours minimum. En effet, si aucun trouble n'est observé dans les 2 milieux de culture au bout des 14 jours, les produits testés **satisfont** à l'essai de stérilité. Si un trouble est observé dans au moins l'un des 2 milieux, le produit **ne satisfait pas** à l'essai de stérilité et le lot d'où est issu l'échantillon est refusé. Néanmoins, dans le cas d'une suspicion de

contamination durant la manipulation des échantillons, l'essai peut être déclaré **non valable**. Dans ce cas, l'essai de stérilité est répété et le lot peut être libéré si celui-ci satisfait à ce deuxième essai.

1.5. Méthodes alternatives à l'essai de stérilité classique de la PE

1.5.1. Informations données par la PE sur les méthodes alternatives

Dans sa version 5.5, la PE intègre en 2006, à titre d'information, le chapitre 5.1.6 (3) consacré aux « *méthodes alternatives destinées au contrôle de la qualité microbiologique des produits* » (révisé en 2015 et dernièrement en 2017 dans sa version 9.2). Dans ce chapitre, la PE autorise l'utilisation des MMR pour le contrôle des préparations hospitalières stériles en remplacement ou en complément des méthodes conventionnelles si leur équivalence a été démontrée.

Dans ce chapitre 5.1.6 de la version 9.2 de la PE, 17 techniques sont présentées et sont réparties en 3 classes selon leur principe.

On distingue les techniques **basées sur la croissance bactérienne**. Selon la technique, la croissance bactérienne peut être suivie par :

- les modifications des propriétés électriques du milieu de culture soumis au métabolisme microbien (« méthodes électrochimiques »),
- les modifications de l'opacité du milieu de culture engendrées par la multiplication microbienne (« turbidimétrie »),
- les variations de concentration des gaz suivies par un capteur et corrélées à une pousse microbienne (« mesure de la consommation ou production d'un gaz »).

D'autres méthodes, indépendantes de la croissance bactérienne, sont **basées sur la mesure directe** de la présence de micro-organismes. Parmi celles-ci on peut observer :

- la cytométrie en phase solide fondée sur la détection d'un fluorochrome issu de la métabolisation par les micro-organismes d'un substrat non fluorescent,
- la technique de filtration et épifluorescence directe utilisant après filtration, une coloration et une visualisation des micro-organismes sous un microscope à épifluorescence.

Enfin il est décrit des méthodes **analysant des composants cellulaires génotypiques ou phénotypiques microbiens**. On peut citer :

- les techniques immunologiques basées sur des réactions antigènes-anticorps,

- les techniques de dosages biochimiques mettant à profit certaines propriétés biochimiques spécifiques de micro-organismes,
- les techniques d'amplification génique utilisant la réaction en chaîne par polymérase ou le typage de l'acide ribonucléique ribosomique.

Ce chapitre 5.1.6 représente une aide à la mise en œuvre des méthodes alternatives. En effet, après une description des méthodes ci-dessus (présentation succincte, avantages, inconvénients et exemples d'application), le processus de validation d'une MMR est détaillé de manière générale puis plus spécifiquement, par type d'essai microbiologique : essais qualitatifs, essais quantitatifs, essais d'identification. Le processus de validation diffère selon le type d'essai. Les paramètres à étudier sont détaillés dans le Tableau VI.

Tableau VI. Critères de validation applicables aux essais qualitatifs, aux essais quantitatifs et aux identifications (3)			
Critères	Essais qualitatifs	Essais quantitatif	Identification
Exactitude	+	+	+
Fidélité	-	+	-
Spécificité	+	+	+
Limite de détection	+	-	-
Limite de quantification	-	+	-
Linéarité	-	+	-
Intervalle de mesure	-	+	-
Robustesse	+	+	+
Applicabilité	+	+	-
Equivalence	+	+	-

1.5.2. Méthodes alternatives et équipements sélectionnés pour un usage pharmaceutique

Suite à une revue de la littérature concernant l'utilisation des MMR et selon les critères de sélection du Tableau VII, 3 types de méthode, et au total 4 équipements ont été sélectionnés :

- Mesure de la consommation ou production d'un gaz : BacT/ALERT[®],
- Bioluminescence : AMPiScreen[®], Milliflex Rapid[®],
- Cytométrie en phase solide : ChemScan RDI[®].

Tableau VII. Critères de sélection des MMR

Spécificité	Faible, permettant la détection d'un large spectre de micro-organismes
Sensibilité	Haute, permettant de conclure à la stérilité de l'échantillon testé
Automatisation	Totale ou partielle de l'analyse
Enregistrement des données	Permettant un archivage et une consultation des résultats <i>a posteriori</i>
Investissement	Moindre, dans le but de cibler le meilleur rapport coût/efficacité
Encombrement	Moindre, permettant si besoin une manipulation en enceinte de classe A
Rapidité	Obtention des résultats de l'essai de stérilité en moins de 7 jours
Protocole d'utilisation	Simple à mettre en œuvre
Applicabilité	Produits cytotoxiques

1.5.2.1. BacT/ALERT® (Biomérieux)

La société Biomérieux commercialise le système BacT/ALERT®, largement répandu dans le domaine de l'analyse microbiologique des hémocultures. Il s'agit d'un système **basé sur la croissance microbienne** mesurant la consommation ou production d'un gaz. La présence microbienne est détectée de **façon qualitative par virage colorimétrique**. Chaque milieu de culture conditionné en flacon, captif de l'équipement, possède dans sa partie basse une pastille. En cas de croissance microbienne, la production de dioxyde de carbone provoque une modification de pH du milieu engendrant un changement de couleur de la pastille. L'équipement réalise une lecture automatique toutes les 10 minutes du culot des flacons et repère ainsi au plus tôt ce changement de couleur (la pastille vire du bleu au jaune-orangé).

Plusieurs équipements BacT/ALERT® existent. Ils diffèrent selon leur capacité de chargement, les températures d'incubation disponibles (20-25°C et/ou 30-35°C) ou encore leur degré d'automatisation (enregistrement et placement manuels ou automatiques des flacons). Différents types de milieux de culture sont commercialisés : aérobie ou anaérobie, avec ou sans billes neutralisantes, pédiatrique avec billes neutralisantes etc.

Le protocole opératoire est simple puisqu'il consiste en l'ensemencement direct de la solution à analyser dans les milieux de culture. En cas de croissance, des données peuvent être extraites, telles que le délai de positivité. Cette méthode non destructrice permet une identification ultérieure des micro-organismes en cas de pousse.

1.5.2.2. ChemScan RDI® (Biomérieux)

Le ChemScan RDI® est une méthode de **mesure directe** fondée sur le principe de la **cytométrie en phase solide applicable aux produits filtrables**. Elle peut être qualitative ou quantitative. L'utilisation du ChemScan RDI® se déroule en 3 étapes :

- 1) *La filtration* : la solution analysée est filtrée sur une membrane de porosité 0,4 µm.
- 2) *Le marquage* : la membrane comportant potentiellement à sa surface des micro-organismes est marquée à l'aide d'un fluorophore. En cas de présence de micro-organismes viables, ayant une activité enzymatique et une membrane cytoplasmique intacte, le fluorophore est internalisé dans la cellule et clivé par des estérases cytoplasmiques.
- 3) *La lecture* : la membrane marquée est scannée durant 3 minutes. Lors de cette étape, elle est excitée par une lumière incidente bleue de 488 nm. En cas de présence du produit de clivage enzymatique concentré au sein d'un micro-organisme, un signal fluorescent vert de 515 nm est émis en réponse. Le nombre total de cellules vivantes sur la membrane est immédiatement affiché. Une étape de contrôle microscopique par un opérateur à l'aide du microscope connecté à l'équipement est réalisée pour confirmer le résultat rendu par le ChemScan RDI®.

Cette méthode permet d'obtenir un résultat sous la forme d'un nombre de cellules pouvant être détectées en moins de 4 heures avec une sensibilité d'une cellule par unité filtrable.

1.5.2.3. Milliflex Rapid® (Merck Millipore)

Le Milliflex Rapid® est un équipement **basé sur la détection de la croissance microbienne** et utilise le principe de la **bioluminescence**. Il implique le complexe luciférine/luciférase et permet ainsi la **détection de l'Adénosine Tri-Phosphate (ATP) produit par le micro-organisme**. Quatre étapes sont nécessaires pour l'analyse d'un échantillon :

- 1) *La filtration* : la solution à analyser est filtrée sur une membrane de porosité 0,45 µm à l'aide d'un banc de filtration.
- 2) *L'ajout des réactifs* : les réactifs nécessaires à la réaction sont pulvérisés automatiquement pendant 90 secondes sur la membrane à l'aide du module Station AutoSpray Milliflex Rapid®.

3) *L'incubation* : la membrane est mise à incuber dans un milieu de culture pendant une durée moyenne de 5 à 7 jours. Au cours de cette incubation, en cas de présence de micro-organismes, la réaction de bioluminescence survient (Figure 4).

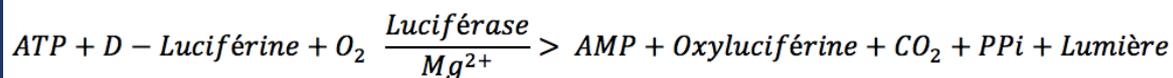


Figure 4. Réaction de bioluminescence impliquant le complexe luciférine/luciférase

4) *La lecture* : après une analyse de 2 minutes par une caméra CCD (Charged Coupled Device), les résultats sont rendus sous la forme d'un nombre de cellules et d'une image tridimensionnelle (représentation de la membrane avec localisation par pics de la présence microbienne) avec une sensibilité d'une Unité Formant Colonie (UFC) par échantillon.

1.5.2.4. AMPiScreen® (Charles River)

L'AMPiScreen®, basé sur la détection de la croissance microbienne, utilise le principe de **bioluminescence amplifiée**. En plus de la bioluminescence classique, cette méthode utilise l'adénylate kinase. En effet le micro-organisme produit également de l'Adénosine Di-Phosphate (ADP), en plus de l'ATP.

L'adénylate kinase permet de générer de l'Adénosine Mono-Phosphate (AMP) et de l'ATP à partir d'unités d'ADP et amplifie ainsi la quantité d'ATP détectée (Figure 5).

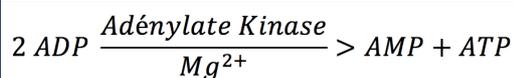


Figure 5. Réaction d'amplification impliquant l'adénylate kinase

L'ATP générée entre ensuite dans la réaction classique de bioluminescence (Figure 4). L'ajout de cette réaction en amont de la réaction classique permet, selon le fournisseur, d'amplifier le signal détecté d'un facteur 1000 en 25 minutes. L'utilisation de l'équipement AMPiScreen® nécessite une préparation des échantillons à analyser ainsi qu'une incubation dont la durée peut aller de 24 heures à 7 jours. Finalement, un dosage à l'aide d'un luminomètre est réalisé durant 45 minutes à 1 heure. Les résultats rendus en unité de lumière relative sont corrélés à la quantité de micro-organismes présents dans l'échantillon analysé.

1.5.3. Choix de la méthode alternative

Après contact avec les différents laboratoires, la solution proposée par Charles River (AMPiScreen®) apparaissait comme une méthode intéressante pour une

application hospitalière. Cependant nous n'avons pas eu la possibilité d'être accompagnés par la société pour cette validation durant la période de notre étude. Notre choix s'est donc porté vers l'équipement déjà utilisé par le CHRU de Lille pour la réalisation de l'essai de stérilité des greffes des îlots de Langerhans : le BacT/ALERT® 3D 60.

La préparation à l'avance de doses standardisées semble être un levier à l'amélioration de la qualité des soins, à l'optimisation de la production et à son automatisation. Dans ce contexte, nous souhaitons réaliser au CHRU de Lille des préparations hospitalières de 5-FU. Cette préparation selon un mode hospitalier nécessite la validation de l'essai de stérilité décrit dans la PE.

Dans ce contexte, les propriétés cytotoxiques posent deux problématiques principales à prendre en compte pour la réalisation de cet essai. D'une part, le confinement de ces produits par rapport au manipulateur et son environnement doit être assuré. D'autre part, par leur toxicité cellulaire, une potentielle activité antimicrobienne doit être envisagée et inhibée.

Bien que cet essai de stérilité soit décrit dans la pharmacopée, celle-ci ouvre désormais la voie à l'utilisation de techniques novatrices et plus rapides, dont la mise en place mérite d'être explorée.

2. Matériels et méthodes

La mise en œuvre des essais a nécessité une collaboration pluridisciplinaire, impliquant :

- le processus pharmacotechnie du CHRU de Lille et plus spécifiquement l'UPCC,
- l'unité de microbiologie du Centre de Biologie Pathologie (CBP) du CHRU de Lille,
- les équipes de recherche de la faculté de pharmacie de Lille 2 (pharmacie galénique hospitalière et microbiologie).

2.1. Détermination de l'activité antimicrobienne du 5-FU

Notre objectif étant de déterminer la concentration minimale sans activité antimicrobienne (C_{min}), nous nous sommes inspirés du principe de réalisation des antibiogrammes et antifongigrammes. En effet, des solutions de 5-FU, de concentrations décroissantes, ont été déposées sur des disques neutres absorbants et mis au contact de géloses ensemencées par des suspensions calibrées de micro-organismes comme préconisé par l'European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST).

2.1.1. Choix des micro-organismes de référence, des milieux de culture et des conditions d'incubation

Des **souches microbiennes de référence** sont imposées par le chapitre 2.6.1 de la PE pour la réalisation de l'essai de fertilité des milieux de culture et de l'essai d'applicabilité. Celles-ci ont ainsi été fournies par le CBP et utilisées pour réaliser les essais préalables de détermination de l'activité antimicrobienne du 5-FU (Tableau VIII).

Tableau VIII. Souches microbiennes de référence utilisées			
Bactéries aérobies		Bactérie anaérobie	
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	<i>Clostridium sporogenes</i>	ATCC 19404
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633	Moisissures et levures	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027	<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231
		<i>Aspergillus brasiliensis</i>	ATCC 16404

ATCC : American Type Culture Collection

Les milieux de culture choisis pour ces essais ont été recommandés et fournis par le CBP du CHRU de Lille et incubés à 20-25°C et/ou à 30-35°C. Pour *Candida albicans* et *Aspergillus brasiliensis*, plusieurs milieux de culture ont été utilisés.

2.1.2. Détermination des C_{min}

L'essai a été réalisé en quatre temps :

1) Réalisation de la gamme de concentration de 5-FU

Pour considérer les concentrations de 5-FU utilisées en thérapeutique, une gamme de concentration a été réalisée dans un isolateur par dilution en cascade d'une solution de matière première dosée à 50 mg/mL dans du chlorure de sodium 0,9% (Figure 6). Une première série a été réalisée sur 8 concentrations pour définir l'intervalle des dilutions à étudier (dilutions de 1/1 à 1/64 et dilution à 1/640). Une seconde série, pour préciser nos résultats, a été réalisée sur au total 11 concentrations de 5-FU (dilution de 1/1 à 1/640).

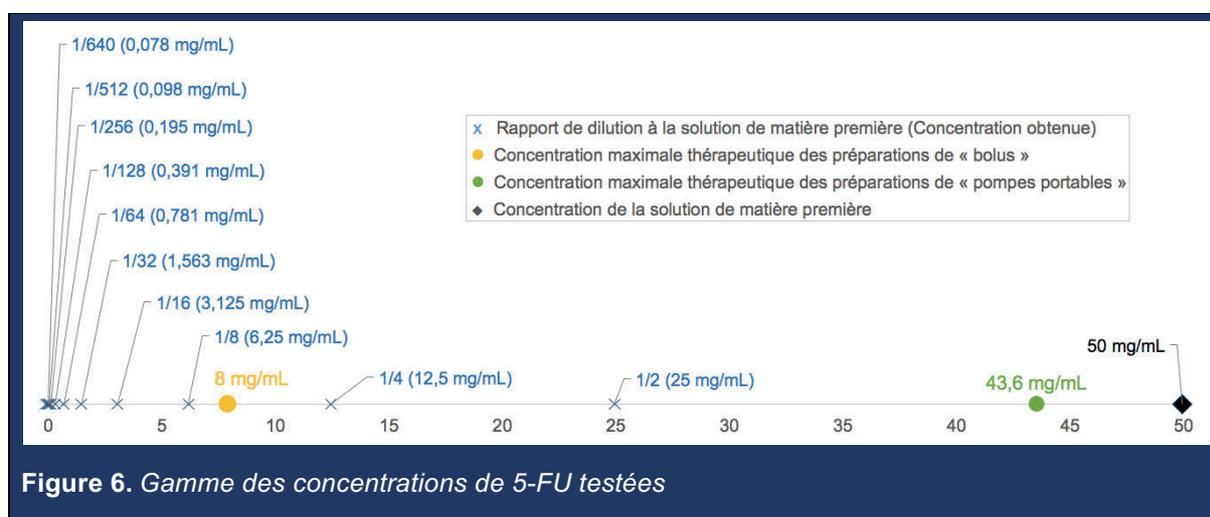


Figure 6. Gamme des concentrations de 5-FU testées

2) Ensemencement des géloses par les micro-organismes d'intérêt

3) Mise en contact des disques neutres sur les géloses et dépôts de 20 μ L des solutions de 5-FU de concentration décroissante

4) Incubation des géloses

Un disque de témoin négatif était systématiquement réalisé et consistait en un dépôt de 20 μ L de solution de chlorure de sodium 0,9%.

La présence ou l'absence d'un diamètre d'inhibition était régulièrement relevée pendant un maximum de 7 jours.

2.2. Validation de l'essai de stérilité classique du chapitre 2.6.1 de la PE

2.2.1. Production des suspensions microbiennes

La PE impose un **inoculum microbien maximum de 100 UFC** par milieu pour les essais de fertilité des milieux de culture et d'applicabilité. Ainsi, une suspension de

concentration théorique de 10^3 UFC/mL a été produite pour que l'inoculation d'un volume de 100 μ L par milieu comptabilise 100 UFC.

❖ Suspensions bactériennes

Les souches bactériennes décrites au paragraphe 2.1.1 et conservées à -20°C étaient repiquées sur un milieu gélosé adapté 24 heures avant l'expérience. Les suspensions bactériennes étaient réalisées sous poste de sécurité microbiologique de type 2 au sein de l'institut de microbiologie du CBP selon la procédure décrite dans la Figure 7. Chaque étape était précédée et suivie d'une étape d'homogénéisation de la suspension par agitation au vortex. La procédure de manipulation était identique pour l'ensemble des souches bactériennes.

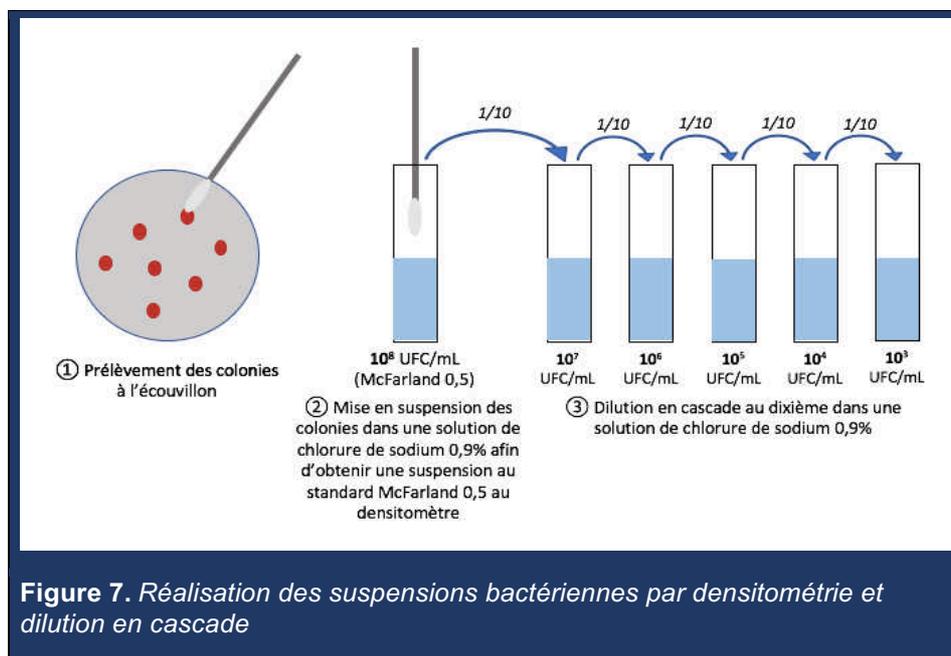


Figure 7. Réalisation des suspensions bactériennes par densitométrie et dilution en cascade

Un volume de 100 μ L de la dernière dilution (10^3 UFC/mL théorique) était étalé sur gélose puis incubé 24 heures à 37°C . Au terme de l'incubation, les colonies étaient dénombrées et l'inoculum quantifié pour chaque espèce bactérienne.

❖ Suspensions de levures et moisissures

Les suspensions de *Candida albicans* et d'*Aspergillus brasiliensis* étaient réalisées sur pailleasse à moins de 10 cm de la flamme d'un bec benzène selon la procédure décrite dans la Figure 8. Chaque étape était précédée et suivie d'une étape d'homogénéisation de la suspension par agitation au vortex.

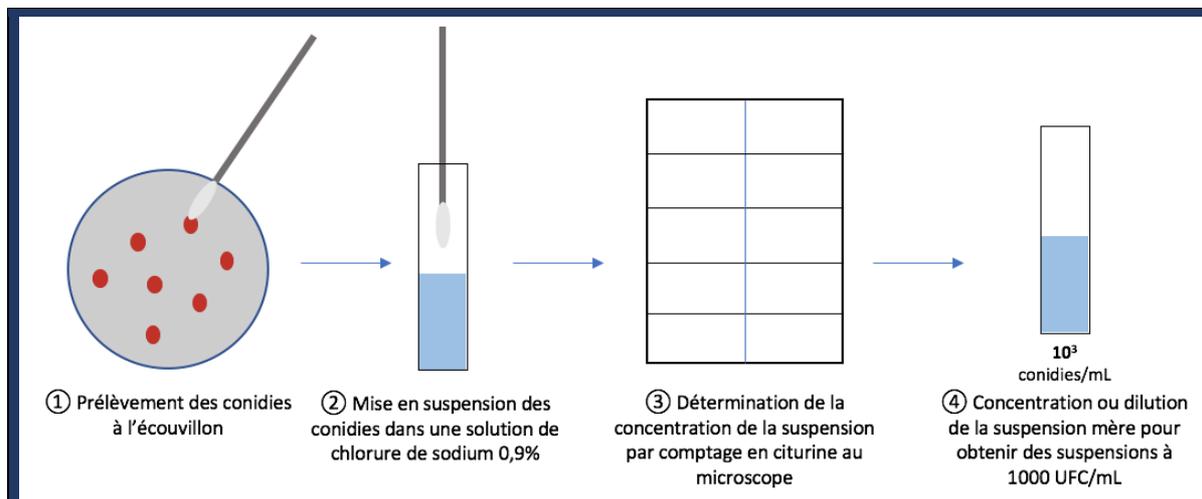


Figure 8. Réalisation des suspensions de *Candida albicans* et *Aspergillus brasiliensis* par comptage en citurine et dilution

Lors de la dernière expérience (paragraphe 3.2.4 et 3.3.2), la suspension de *Candida albicans* a été préparée selon le mode opératoire de production des suspensions bactériennes (Figure 7). Afin de contrôler la concentration de l'inoculum présent dans cette suspension, un étalement sur gélose, une incubation à 37°C pendant 5 jours puis un dénombrement des colonies étaient réalisés.

La production de la suspension d'*Aspergillus brasiliensis* ayant été réalisée par comptage des spores au microscope, le dénombrement n'a pas été réalisé pour ce micro-organisme.

2.2.2. Milieux de culture et diluant : production et essai de stérilité

❖ Production

Autorisés par la PE, les milieux de culture ont été produits à partir d'un mélange de poudres prêt à l'emploi. Trois milieux de culture liquide ont été produits selon les protocoles décrits par les fabricants : le milieu au TG (laboratoire BIO-RAD ; référence 356-4084), le milieu à l'HCS (laboratoire BIO-RAD ; référence 356-4144) et le milieu Mueller Hinton (MH) (laboratoire BIO-RAD ; référence 69444). Les milieux ont été conditionnés en flacon à large col rempli à environ 40 mL pour faciliter l'introduction du filtre et permettre une immersion totale de celui-ci.

Un bouillon peptone sel a été réalisé pour la dilution du 5-FU afin d'inhiber son activité antimicrobienne. La référence CM0733 du laboratoire OXOID a été utilisée.

La production des milieux de culture et du diluant a été réalisée à la faculté de pharmacie de Lille. Après contrôle du pH si nécessaire et mise en flacon, les milieux

de culture et le diluant ont été stérilisés par autoclavage selon un cycle de 121°C pendant 15 minutes.

❖ Essai de stérilité

A chaque fin de production, un flacon était échantillonné sur le lot et mis à incuber à la (aux) température(s) d'incubation recommandée(s) (Tableau IX) pendant 14 jours.

Tableau IX. Températures d'incubation utilisées pour l'essai de stérilité des milieux de culture et du diluant	
Milieux	Températures d'incubation
Milieu au TG	30-35°C
Milieu à l'HCS	20-25°C
Milieu MH	30-35°C
Diluant	20-25°C et 30-35°C*

* ne disposant pas de recommandation pour le diluant, celui-ci a été incubé aux deux températures utilisées dans l'essai de stérilité classique de la PE

2.2.3. Essai de fertilité des milieux de culture

Cet essai étant réalisé en même temps que l'essai d'applicabilité de la méthode, ces flacons servent également de témoins positifs. Afin de suivre le même circuit que les flacons de l'essai d'applicabilité, les milieux subissent deux décontaminations de surface au peroxyde d'hydrogène et sont ensuite contaminés en dehors de la zone de préparation.

Sur chaque lot de production, l'essai de fertilité a consisté en l'inoculation d'un maximum de 100 UFC (100 µL d'une suspension de concentration théorique 10³ UFC/mL, préalablement agitée) de chacun des 6 micro-organismes de référence dans les milieux de culture produits, selon les recommandations du chapitre 2.6.1 de la PE. Ces milieux ont été incubés pendant 3 jours maximum pour les bactéries et 5 jours maximum pour les levures et moisissures. Au terme de l'incubation, une lecture par mirage des flacons était réalisée. L'essai satisfaisait à l'essai de fertilité si un trouble était observé. Ainsi, le Tableau X reprend les micro-organismes, le milieu de culture, les conditions et la durée d'incubation.

Tableau X. Conditions de réalisation des essais de fertilité des milieux de culture utilisés pour la méthode classique

Micro-organismes	Milieux de culture	Conditions d'incubation	Durées d'incubation
<i>Staphylococcus aureus</i>	TG et MH	30-35°C / A	3 jours
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	TG et MH	30-35°C / A	3 jours
<i>Clostridium sporogenes</i>	TG et MH	30-35°C / ANA	3 jours
<i>Bacillus subtilis</i>	HCS	20-25°C / A	3 jours
	MH	30-35°C / A	
<i>Candida albicans</i>	HCS	20-25°C / A	5 jours
	MH	30-35°C / A	
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	HCS	20-25°C / A	5 jours
	MH	30-35°C / A	

A : Aérobie ; ANA : Anaérobie

2.2.4. Essai d'applicabilité de la méthode classique

❖ Montage de filtration

En accord avec la PE, les préparations de 5-FU analysées étant aqueuses et filtrables (filtration stérilisante utilisée par le fabricant pour stériliser la solution de matière première) (19), la méthode de filtration sur membrane a été privilégiée.

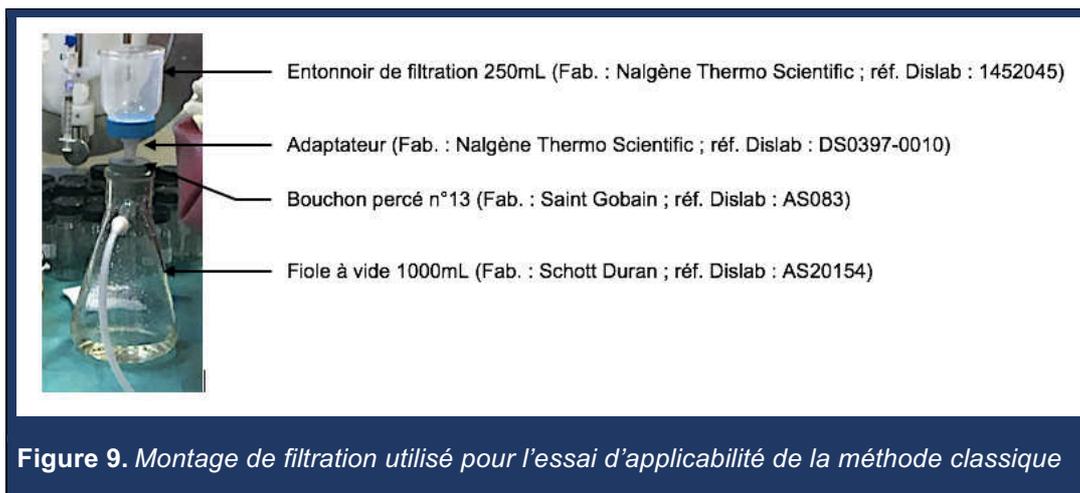
Afin de pouvoir réaliser l'essai, une étude de marché des unités de filtration a été réalisée. Deux grands types d'unités sont commercialisés : les unités réutilisables et les unités à usage unique. Afin de faciliter notre choix, une liste des avantages et inconvénients, adaptée à l'usage prévu, a été élaborée (Tableau XI).

Tableau XI. Choix des unités de filtration destinées à l'essai de stérilité classique de la PE

Type d'unité	Avantages	Inconvénients
Usage unique	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Unité monobloc contenant l'entonnoir, la membrane et le bidon à déchets ✓ Emballée stérilement ✓ Usage unique, pas de décontamination chimique nécessaire 	<ul style="list-style-type: none"> ✗ Production de déchets ✗ Coût ✗ Commande ✗ Lieu de stockage à prévoir
Réutilisable	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Achat unique 	<ul style="list-style-type: none"> ✗ Investissement ✗ Validation d'une procédure de décontamination et de stérilisation ✗ Intégration de la procédure de décontamination/stérilisation au planning de réalisation de l'essai de stérilité ✗ Achat de membranes de filtration

Devant l'impossibilité de réaliser dans un délai bref une étude des méthodes de décontamination chimique, de décontamination microbiologique et de stérilisation d'un dispositif réutilisable exposé à un cytotoxique, notre choix s'est porté vers les unités de filtration à usage unique.

Aucune unité de filtration prête à l'emploi et à usage unique remplissant tous nos critères de sélection n'a été trouvée. Néanmoins, un compromis composé d'une partie à usage unique et d'une partie réutilisable a été étudié et retenu. Le montage final est repris dans la Figure 9.

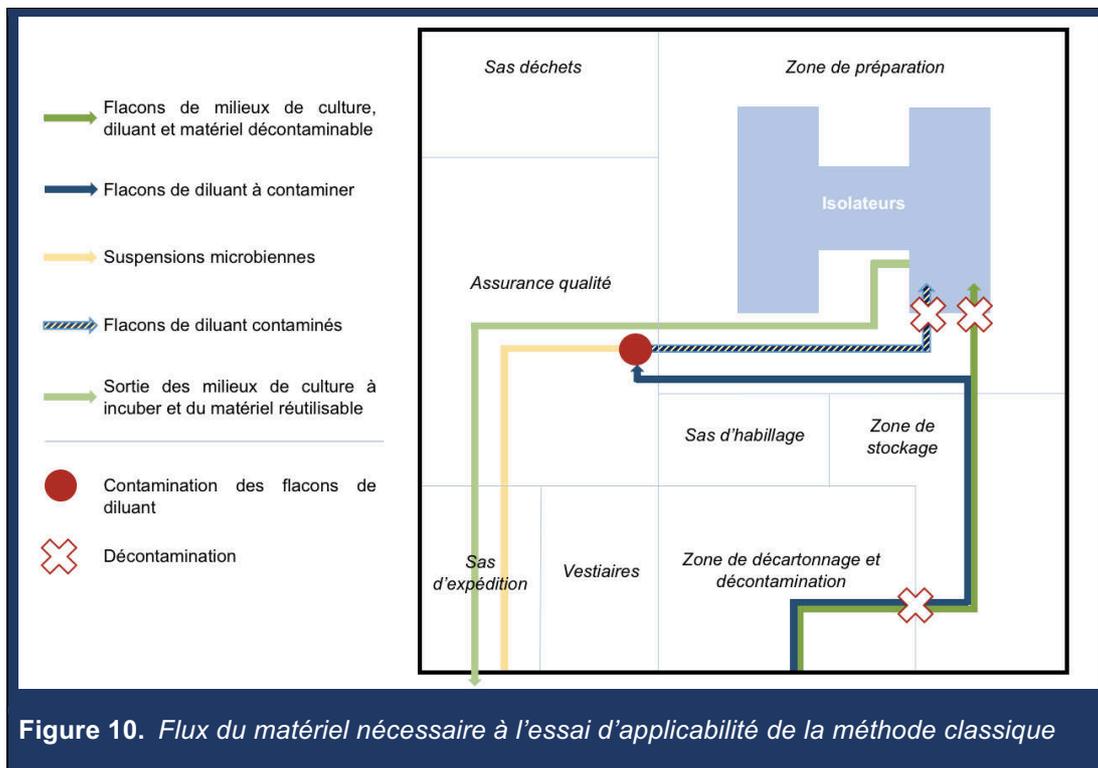


❖ Neutralisation de l'activité antimicrobienne

La neutralisation de l'activité antimicrobienne de la préparation peut être réalisée de deux façons selon la PE : par dilution ou par dégradation/neutralisation de la substance à activité antimicrobienne. Après revue de la littérature et contact du fabricant de la matière première, aucun moyen de dégradation/neutralisation du 5-FU n'a été identifié, la méthode par **dilution** a donc été adoptée.

❖ Manipulations pour l'essai d'applicabilité

Les préparations analysées étant cytotoxiques et la manipulation devant être réalisée dans des conditions aseptiques pour éviter toute contamination microbienne (20), les étapes de manipulation ont été réalisées en isolateur en dépression dans une zone à atmosphère contrôlée en dehors de toute autre activité de production. Le parcours du matériel nécessaire à la manipulation est repris dans la Figure 10.



L'équipement final utilisé est composé du montage de filtration (Figure 9) placé dans l'enceinte de l'isolateur, d'une pompe à vide placée à l'extérieur de l'isolateur et d'un tuyau permettant la liaison entre la pompe à vide et la fiole à vide. L'étanchéité de l'isolateur a été vérifiée par un test de fuite une fois le montage en place.

L'essai a été réalisé 3 fois pour chaque micro-organisme. Il se déroule en 3 étapes :

1) Contamination volontaire des diluants en dehors de la zone de préparation : après agitation, 100 μL de suspension microbienne de concentration théorique 10^3 UFC/mL étaient inoculés dans 100 mL de diluant,

2) Réalisation de la filtration sur membrane dans l'isolateur : en raison de l'activité antibactérienne du 5-FU décrit au paragraphe 1.4.1, nous avons considéré le 5-FU comme un « liquide antibiotique » selon la PE (Tableau V). Dans le cadre de la validation de l'essai d'applicabilité, nous avons souhaité nous placer dans le cas le plus critique d'une solution de 5-FU de concentration 8 mg/mL (concentration la plus élevée pouvant être produite pour les « bolus »). Un volume de 2 mL, supérieur au 1 mL recommandé par la PE, a été choisi pour un mouillage homogène de la membrane filtrante. Pour chaque micro-organisme et selon les recommandations de la PE, ces 2 mL de solution de 5-FU à 8 mg/mL étaient déposés sur la membrane. Cent millilitres de diluant contaminés lors de l'étape 1 et 150 mL de diluant non contaminés (ce

volume de bouillon de 250 mL correspond au volume nécessaire pour atteindre la C_{\min} du micro-organisme le plus sensible au 5-FU, déterminée au paragraphe 3.1) étaient ajoutés. La pompe à vide était activée lors de l'ajout du diluant. Une fois la filtration terminée, le filtre était récupéré à l'aide d'une pince stérile et déposé dans un flacon de milieu de culture selon le Tableau X. Le matériel et les pinces ont été changés entre chaque micro-organisme.

3) Incubation des flacons de milieux de culture contenant une membrane de filtration aux températures appropriées pendant 5 jours maximum.

Un témoin négatif par type de milieu de culture est systématiquement réalisé. Il consiste en la filtration de 2 mL de solution de 5-FU à 8 mg/mL et de 250 mL de diluant non contaminé. La membrane est ensuite récupérée et déposée dans un milieu de culture puis mise à incuber à la température appropriée pendant 5 jours.

Un mirage des flacons est réalisé quotidiennement. Si un trouble comparable au témoin positif (= essai de fertilité) était observé, le produit analysé ne possède pas d'activité antimicrobienne, l'essai d'applicabilité était validé. L'essai de stérilité pouvait alors être réalisé sans modification. Aucun trouble ne devait être observé dans le témoin négatif.

2.3. Validation de l'essai de stérilité alternatif du chapitre 5.1.6 de la PE

2.3.1. Production des suspensions microbiennes

La production des suspensions a été réalisée selon les protocoles de production des suspensions utilisées pour l'essai de stérilité classique (paragraphe 2.2.1). Cependant, une dilution supplémentaire de 10^3 à 10^2 UFC/mL a été rajoutée. En effet, les flacons de milieu de culture nécessitent l'injection de la suspension à l'aiguille au travers d'un septum. Une concentration de 10^2 UFC/mL a donc été choisie et utilisée pour faciliter la mesure et l'injection à la seringue.

2.3.2. Milieux de culture : choix et essai de stérilité

❖ Choix des milieux de culture

En raison de l'activité antimicrobienne du 5-FU, les milieux de culture « FA Plus » et « FN Plus », respectivement aérobies et anaérobies, supplémentés en billes polymériques absorbantes, ont été utilisés pour l'incubation dans l'automate BacT/ALERT® 3D 60. Les précédents travaux de la plateforme de thérapie cellulaire avec la greffe des cellules des îlots de Langerhans du CHRU de Lille, avaient mis en

évidence des difficultés pour la culture d'*Aspergillus brasiliensis* lors de la validation de l'essai de stérilité sur l'automate BacT/ALERT® 3D 60. De ce constat, des milieux BD BACTEC® Mycosis IC/F ont été utilisés spécifiquement pour *Aspergillus brasiliensis*, en complément des milieux « FA Plus », pour une incubation dans l'automate BD BACTEC® FX. Ces derniers flacons ne possèdent pas de dispositif d'absorption des molécules thérapeutiques. L'ensemble des milieux de culture utilisés est repris dans le Tableau XII.

Tableau XII. Milieux de culture utilisés pour l'essai de stérilité alternatif			
Automate	BacT/ALERT® 3D 60		BD BACTEC® FX
Milieu de culture	BacT/ALERT® FA Plus	BacT/ALERT® FN Plus	BD BACTEC® Mycosis IC/F
Composition	40 mL de milieu complexe supplémenté en billes polymériques absorbantes 	40 mL de milieu complexe supplémenté en billes polymériques absorbantes 	40 mL de bouillon Trypticase soja enrichi avec agents lytiques 
Micro-organismes détectés	Aérobies	Anaérobies	Levures et moisissures
Volume de liquide à inoculer	8 à 10 mL	8 à 10 mL	3 à 10 mL (idéalement 8 à 10 mL)

❖ Essai de stérilité des milieux de culture

La stérilité des flacons de milieu de culture est une donnée assurée par le fabricant. Un certificat par numéro de lot est disponible sur les sites internet des laboratoires Becton Dickinson et Biomérieux.

2.3.3. Essai de fertilité des milieux de culture

Cet essai étant réalisé en même temps que l'essai d'applicabilité de la méthode, ces flacons servent également de témoin positif. Afin de suivre le circuit emprunté par les flacons de l'essai d'applicabilité, les milieux utilisés subissent deux décontaminations de surface au peroxyde d'hydrogène et sont ensuite contaminés en dehors de la zone de préparation.

Sur chaque lot de production, l'essai de fertilité a consisté en l'inoculation d'un maximum de 100 UFC (1 mL d'une suspension de concentration théorique 10²

UFC/mL, préalablement agitée) de chacun des 6 micro-organismes de référence dans les milieux de culture. Ces flacons ont été incubés jusqu'à l'obtention d'un signal de positivité (détection d'une croissance microbienne par l'automate). L'essai satisfait à l'essai de fertilité si une croissance microbienne est détectée par l'automate. Le Tableau XIII reprend les micro-organismes, le milieu de culture utilisé ainsi que la température et la durée d'incubation.

Tableau XIII. Conditions de réalisation des essais de fertilité des milieux de culture utilisés pour la méthode alternative			
Micro-organismes	Milieux de culture	Températures d'incubation	Durées d'incubation
<i>Staphylococcus aureus</i>	Bact/ALERT [®] FA Plus	35°C	Jusqu'à positivité
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bact/ALERT [®] FA Plus	35°C	Jusqu'à positivité
<i>Clostridium sporogenes</i>	Bact/ALERT [®] FN Plus	35°C	Jusqu'à positivité
<i>Bacillus subtilis</i>	Bact/ALERT [®] FA Plus	35°C	Jusqu'à positivité
<i>Candida albicans</i>	Bact/ALERT [®] FA Plus	35°C	Jusqu'à positivité
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	Bact/ALERT [®] FA Plus BD BACTEC [®] Mycosis IC/F	35°C Température ambiante	Jusqu'à positivité

2.3.4. Essai d'applicabilité de la méthode alternative

Cet essai a été réalisé en 3 exemplaires soit 3 flacons par micro-organisme (6 flacons pour *Aspergillus brasiliensis*).

Afin d'éviter tout risque de contamination microbiologique de la zone de préparation, la manipulation a été réalisée en deux temps :

- 1) Injection de 9 mL de solution de 5-FU à 8 mg/mL dans les flacons à l'intérieur de l'isolateur,
- 2) Inoculation des micro-organismes en dehors de la zone de préparation : après agitation de la suspension, une quantité théorique de 100 UFC (1 mL d'une suspension de concentration théorique de 10² UFC/mL) a été inoculée.

Un témoin négatif par type de milieu de culture a été réalisé. Il consiste en l'inoculation, dans l'isolateur, de 10 mL de solution de 5-FU dosée à 8 mg/mL.

Les flacons sont ensuite incubés dans les automates BacT/ALERT[®] 3D 60 à 35°C et BD BACTEC[®] FX à température ambiante jusqu'à positivité. Une consultation régulière des automates était réalisée afin de relever les flacons positifs. En cas de non positivité après 14 jours pour le BacT/ALERT[®] 3D 60 et 10 jours pour le BD BACTEC[®] FX, les flacons sont considérés comme négatifs.

3. Résultats et discussion

3.1. Détermination de l'activité antimicrobienne du 5-FU

Selon le mode opératoire décrit dans le paragraphe 2.1.2, la C_{\min} , correspondant à la première concentration de 5-FU ne possédant pas d'activité antimicrobienne, a été déterminée pour chaque micro-organisme. Pour cela, des dilutions de la solution de matière première de 5-FU dosée à 50 mg/mL (Figure 6) ont été déposées sur des géloses ensemencées par chacun des micro-organismes. Les résultats obtenus par lecture des diamètres d'inhibition sont repris dans le Tableau XIV. L'exemple du *Bacillus subtilis* (2^{ème} série) est présenté dans l'Annexe 1.

Micro-organismes	C_{\min} 1 ^{ère} série	C_{\min} 2 ^{ème} série	
<i>Staphylococcus aureus</i>	1/640 (0,078 mg/mL)	1/512 (0,097 mg/mL)	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1/32 (1,56 mg/mL)	Non mesurable	
<i>Clostridium sporogenes</i>	1/64 (0,78 mg/mL)	1/64 (0,78 mg/mL)	
<i>Bacillus subtilis</i>	1/16 (3,12 mg/mL)	1/32 (1,56 mg/mL)	
<i>Candida albicans</i>	RPMI à 20-25°C	Non mesurable	Non réalisé
	RPMI à 30-35°C	1/16 (3,12 mg/mL)	1/16 (3,12 mg/mL)
	MH à 30-35°C	Non mesurable	1/8 (6,25 mg/mL)
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	RPMI à 20-25°C	Non mesurable	Non réalisé
	RPMI à 30-35°C	1/8 (6,25 mg/mL)	1/4 (12,5 mg/mL)
	MH à 30-35°C	Non mesurable	1/8 (6,25 mg/mL)

RPMI : Roswell Park Memorial Institute

Lors de la première série, la lecture des diamètres d'inhibition s'est révélée difficile pour *Candida albicans* et *Aspergillus brasiliensis* et n'a pas permis la détermination d'une C_{\min} pour le milieu RPMI incubé à 20-25°C et le milieu MH à 30-35°C. Il en a été de même lors de la deuxième série pour *Pseudomonas aeruginosa*.

Staphylococcus aureus semble être le **micro-organisme le plus sensible** avec une C_{\min} retenue à 0,097 mg/mL. Il fixera la dilution à adopter lors de l'essai d'applicabilité au cours duquel il faudra **inhiber l'activité antimicrobienne du 5-FU sur tous les micro-organismes**. Il faut ainsi diluer 2 mL de solution de 5-FU à 8 mg/mL (« bolus ») dans un minimum de 165 mL de diluant, et 2 mL de solution de 5-FU à 43,63 mg/mL (« préparation pour pompes portables ») dans un minimum de 900 mL de diluant pour obtenir une concentration de 5-FU inférieure à la C_{\min} du *Staphylococcus aureus*. En raison de ce deuxième volume, nécessitant presque 1 L

de diluant par micro-organisme, soit 19 L par série d'essai d'applicabilité (6 micro-organismes en 3 exemplaires + 1 témoin négatif), il a été choisi de valider dans un premier temps l'essai d'applicabilité pour les « bolus » de 5-FU.

L'activité antimicrobienne du 5-FU, décrite dans la littérature, a ainsi été mise en évidence. On peut remarquer de grandes disparités dans la sensibilité des micro-organismes au 5-FU. Aux concentrations des préparations réalisées à l'UPCC (de 3,05 à 43,63 mg/mL en 2016), le 5-FU possède une activité antimicrobienne qu'il faudra systématiquement inhiber pour l'essai de stérilité.

3.2. Validation de l'essai de stérilité classique de la PE

3.2.1. Essais de stérilité des milieux de culture et diluant

Lors des multiples productions des milieux de culture (TG, HCS, MH) et diluant, **l'ensemble des flacons** incubés à 20-25°C et/ou à 30-35°C **s'est révélé conforme** (aucun trouble observé) après 14 jours d'incubation. Ces résultats autorisent leur utilisation pour les manipulations ultérieures.

3.2.2. Essais de fertilité et d'applicabilité réalisés sur les milieux au TG et à l'HCS

Des essais de fertilité et d'applicabilité ont été réalisés en parallèle, sur les milieux au TG et à l'HCS. Afin de pouvoir utiliser l'essai de fertilité comme témoin positif de l'essai d'applicabilité, les milieux de culture utilisés pour ces deux essais ont suivi le même parcours comprenant notamment 2 décontaminations de surface au peroxyde d'hydrogène. Les milieux ont été incubés à la PUI du CHRU de Lille à 20-25°C (température ambiante de la zone à atmosphère contrôlée) et à 30-35°C (étuve). Les résultats sont présentés dans le Tableau XV, l'Annexe 2 et l'Annexe 3.

Tableau XV. Résultats des essais de fertilité et d'applicabilité réalisés sur les milieux au TG et à l'HCS					
Micro-organismes	Milieux de culture / Conditions d'incubation	Fertilité	Applicabilité		
			Réplica n°1	Réplica n°2	Réplica n°3
<i>Staphylococcus aureus</i>	TG / 30-35°C / A	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	TG / 30-35°C / A	+	+	+	+
<i>Clostridium sporogenes</i>	TG / 30-35°C / ANA	-	+	-	+
<i>Bacillus subtilis</i>	HCS / 20-25°C / A	-	+	-	-
<i>Candida albicans</i>	HCS / 20-25°C / A	+	+	+	+
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	HCS / 20-25°C / A	-	+	+	+
Témoins négatifs	TG / 30-35°C / A	∅	-		
	HCS / 20-25°C / A	∅	-		

L'essai de fertilité est uniquement positif pour *Pseudomonas aeruginosa* et *Candida albicans*, soit 2 micro-organismes parmi les 6 testés. Concernant l'essai d'applicabilité, parmi les 4 bactéries, *Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridium sporogenes* et *Bacillus subtilis* présentent au moins un réplica positif. L'ensemble des réplicas de *Staphylococcus aureus* sont négatifs. Pour *Candida albicans* et *Aspergillus brasiliensis*, les 3 réplicas sont positifs au terme des 5 jours d'incubation.

Au total, les premiers essais de fertilité et d'applicabilité sur ***Pseudomonas aeruginosa*** et ***Candida albicans***, réalisés selon les paramètres de la PE, ont été **positifs**. Le mode opératoire utilisé pour réaliser l'essai de stérilité pourrait être considéré comme **validé pour ces 2 micro-organismes**. D'autre part, les résultats de l'essai d'applicabilité réalisé sur *Bacillus subtilis*, *Clostridium sporogenes* et *Aspergillus brasiliensis* sont positifs sur au moins l'un des 3 réplicas. Ainsi, pour ces 3 micro-organismes, la validation de l'essai de stérilité est conditionnée par celle de l'essai de fertilité de leur milieu, négatif selon les modalités d'incubation de la PE.

Il est à noter que la positivité des milieux de l'essai d'applicabilité citée ci-dessus a été considérée par visualisation d'un trouble. L'aspect visuel macroscopique des troubles observés semble cohérent avec le micro-organisme inoculé (verdâtre pour *Pseudomonas aeruginosa*, avec surnageant foncé duveteux pour *Aspergillus brasiliensis*). Cependant qu'ils soient positifs ou négatifs, l'utilisation de la spectrométrie de masse aurait permis de confirmer les résultats macroscopiques obtenus et éliminer la présence d'une contamination durant la manipulation. Nous n'avons cependant pas souhaité réaliser ce contrôle risquant de contaminer chimiquement l'environnement et le manipulateur.

Ainsi, les résultats inattendus, notamment pour l'essai de fertilité, mettent en avant plusieurs hypothèses :

- ❖ défaut concernant les suspensions microbiennes (remise en suspension, souches utilisées, inoculum théorique),
- ❖ défaut concernant les milieux de culture (choix des milieux, production des milieux),
- ❖ défaut concernant l'incubation (température d'incubation, enceinte d'incubation).

Afin d'identifier les raisons de l'infertilité de nos milieux, des essais de fertilité ont été reconduits indépendamment de l'essai d'applicabilité avec variation de certains paramètres.

3.2.3. Etude des paramètres de l'essai de fertilité des milieux au TG et à l'HCS

Un défaut dans la remise en suspension des micro-organismes (par agitation manuelle) avant inoculation a été évoqué. Pour la suite des manipulations, il a été décidé de remplacer cette agitation manuelle par une agitation au vortex, plus efficace et plus reproductible.

Afin d'éliminer un problème de température d'incubation lors du premier essai de fertilité (Tableau XV), un nouvel essai a été réalisé en double. Tous les micro-organismes ont été incubés aux deux températures dans deux étuves différentes. Les résultats sont présentés dans le Tableau XVI et sont majoritairement comparables aux résultats précédents. Les hypothèses concernant un problème de température et d'enceinte d'incubation ont été réfutées.

Tableau XVI. Résultats de l'essai de fertilité réalisé sur les milieux au TG et à l'HCS avec variation des lieux d'incubation							
Micro-organismes	Milieux utilisés	Conditions d'incubation	Incubation à 20-25°C		Incubation à 30-35°C		
			Etuve 1	Etuve 2	Etuve 1	Etuve 2	
<i>Staphylococcus aureus</i>	TG	A	-	-	-	-	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	TG	A	+	+	+	+	
<i>Clostridium sporogenes</i>	TG	ANA	-	-	-	-	
<i>Bacillus subtilis</i>	HCS	A	-	-	-	-	
<i>Candida albicans</i>	HCS	A	+	-	+	-	
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	HCS	A	-	-	-	+	

Par conséquent, pour poursuivre nos recherches et identifier les raisons de l'infertilité de nos milieux, nous avons fait varier d'autres paramètres. Pour un micro-organisme de référence (*Staphylococcus aureus*), les paramètres « espèce », « milieu de culture » et « quantité inoculée » ont été modifiés et comparés parallèlement aux paramètres de la PE.

Les manipulations ont été réalisées sous hotte, en 3 exemplaires, dans des milieux de culture au TG en flacon de 40 mL et dans des milieux MH en tube de 10 mL (fournis par le CBP ; matière première du laboratoire OXOID, référence : CM0405). Une foisensemencés, les milieux ont été incubés à 30-35°C pendant 3 jours. Les combinaisons micro-organisme/milieu/quantité inoculée et les résultats de cet essai sont décrits ci-dessous (Tableau XVII).

Tableau XVII. Résultats de l'essai de fertilité réalisé sur les milieux au TG et MH avec variation des micro-organismes et de l'inoculum

Micro-organismes	Milieux de culture liquides et conditions d'incubation	Quantités théoriques inoculées	Résultats à J3		
			Réplica n°1	Réplica n°2	Réplica n°3
<i>Staphylococcus aureus</i>	MH / 30-35°C / A	100 UFC	+	+	+
		1000 UFC	+	+	+
	TG / 30-35°C / A	100 UFC	-	-	-
		1000 UFC	-	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	MH / 30-35°C / A	100 UFC	+	+	+
		1000 UFC	+	+	+
	TG / 30-35°C / A	100 UFC	-	-	-
		1000 UFC	-	-	-

Quel que soit les paramètres (micro-organisme/milieu/quantité inoculée), les résultats font apparaître une fertilité entièrement positive sur le milieu MH et totalement négative sur le milieu au TG. Les hypothèses concernant un défaut de la souche utilisée et un inoculum théorique trop faible ont été réfutées. Celle évoquant un défaut du milieu de culture utilisé a été retenue.

Le milieu MH a donc été choisi en remplacement des milieux au TG et à l'HCS, pour l'ensemble des micro-organismes de référence, dans le cadre de nouveaux **essais de fertilité et d'applicabilité selon la méthode classique** de la PE.

3.2.4. Essais de fertilité et d'applicabilité réalisés sur le milieu MH

Au regard de ces résultats, des essais de fertilité et d'applicabilité ont été réalisés sur le milieu MH (produits à la faculté de pharmacie) pour tous les micro-organismes.

Afin de contrôler notre inoculum, la concentration des suspensions microbiennes utilisées pour cet essai, hors *Aspergillus*, a été déterminée par dénombrement à deux reprises sur des géloses appropriées (dépôt sur gélose de 100 µL de suspension concentrée théoriquement à 10³ UFC/mL et incubation à 37°C pendant maximum 5 jours). Les résultats sont décrits ci-après dans le Tableau XVIII.

Tableau XVIII. Contrôle de la concentration des suspensions microbiennes utilisées pour les essais de fertilité et d'applicabilité de la méthode classique sur le milieu MH

Micro-organismes	Dénombrement attendu (UFC/100 µL)	Dénombrement 1 / Dénombrement 2 (UFC/100 µL)	Moyennes retenues pour 100 µL (UFC)
<i>Staphylococcus aureus</i>	100	64/83	73
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100	117/108	112
<i>Clostridium sporogenes</i>	100	6/6	6
<i>Bacillus subtilis</i>	100	9/7	8
<i>Candida albicans</i>	100	2/3	2

Ces résultats, doivent faire nuancer notre conclusion quant à la validation de l'essai de stérilité pour *Pseudomonas aeruginosa* et *Candida albicans* sur les milieux au TG et à l'HCS. En effet, l'inoculum de *Pseudomonas aeruginosa*, utilisé pour les essais de fertilité et d'applicabilité sur milieu MH, est supérieur à 100 UFC. Cet inoculum est donc hors recommandations de la PE. De la même manière, l'inoculum utilisé lors des essais de fertilité et d'applicabilité sur milieu au TG et à l'HCS aurait pu être supérieur au maximum exigé de 100 UFC.

Ainsi, qu'ils soient supérieurs ou nettement inférieurs à 100 UFC, les résultats des dénombrements des suspensions microbiennes réalisés lors des essais de fertilité et d'applicabilité sur MH (Tableau XVIII) remettent en question leur mode de production et de contrôle.

Les résultats de l'essai de fertilité et d'applicabilité sont présentés dans le Tableau XIX, l'Annexe 4 et l'Annexe 5.

Tableau XIX. Résultats des essais de fertilité et d'applicabilité réalisés sur le milieu MH

Micro-organismes	Conditions d'incubation	Moyennes retenues (UFC)	Fertilité	Applicabilité		
				Réplica n°1	Réplica n°2	Réplica n°3
<i>Staphylococcus aureus</i>	30-35°C / A	73	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	30-35°C / A	112	+	+	+	+
<i>Clostridium sporogenes</i>	30-35°C / ANA	6	-	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	30-35°C / A	8	-	-	-	-
<i>Candida albicans</i>	30-35°C / A	2	-	+	+	+
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	30-35°C / A	Ø	-	+	+	+
Témoin négatif	30-35°C / A	Ø	Ø	-	-	-

Des résultats négatifs ont été obtenus au décours de l'essai de fertilité, exceptés pour *Pseudomonas aeruginosa* dont la pousse est aisée à la fois sur le milieu au TG

et sur le milieu MH. Pour l'essai d'applicabilité, 3 des 6 micro-organismes donnent des résultats positifs sur leurs 3 répliques : *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* et *Aspergillus brasiliensis*.

Le passage au milieu MH sur l'essai d'applicabilité pour l'ensemble des micro-organismes de référence, sans avoir validé préalablement l'essai de fertilité, peut être jugé précoce. En effet, les essais de fertilité et d'applicabilité sur milieu MH présentent de plus mauvais résultats que sur les milieux au TG et à l'HCS (Tableau XV, Tableau XIX). La réalisation simultanée des essais de fertilité et d'applicabilité avait été choisie par praticité (notamment production unique des suspensions microbiennes et journée unique de manipulation). Force est de constater que la réalisation antérieure d'essais de fertilité nous aurait permis d'optimiser les modalités d'incubation, sur milieu au TG, à l'HCS ou MH.

Afin d'identifier les axes d'optimisation à emprunter, plusieurs hypothèses justifiant ces résultats peuvent être émises :

❖ Défaut de neutralisation de l'activité antimicrobienne du 5-FU

Parmi les micro-organismes de référence, tous ont poussés sur au moins un réplique au cours des essais d'applicabilité, excepté le *Staphylococcus aureus* (Tableau XV et Tableau XIX), micro-organisme le plus sensible au 5-FU (Tableau XIV). Ces données mises en parallèle nous motivent à évoquer un défaut d'inhibition de l'activité antimicrobienne du 5-FU lors de l'essai d'applicabilité. En effet, nous avons choisi, conformément à la pharmacopée (2) de rincer le filtre contaminé en 5-FU, à l'aide d'un volume de diluant permettant théoriquement d'atteindre la C_{\min} du *Staphylococcus aureus* au niveau du filtre. Cependant, la mise en contact des micro-organismes avec l'échantillon à analyser est ainsi réalisée sur une solution de 5-FU à une concentration de 8 mg/mL, supérieure à la C_{\min} .

Suite aux résultats inconstants des essais de fertilité de *Staphylococcus aureus* sur le milieu MH (Tableau XVII, Tableau XIX), nous avons étudié les différences dans les modalités de réalisation de ces essais.

❖ Impact de l'enceinte utilisée pour la réalisation des essais

La première différence réside dans le type d'enceinte utilisée : hotte pour le premier essai sur le milieu MH avec variations des paramètres (paragraphe 3.2.3), isolateur pour l'essai de fertilité témoin positif de l'essai d'applicabilité (paragraphe 3.2.4). Les flacons de ce dernier essai ont subi deux décontaminations de surface

successives à la vapeur de peroxyde d'hydrogène (Figure 10). Ces décontaminations pourraient avoir un impact sur l'intégrité des milieux de culture (par porosité des bouchons et pénétration du peroxyde d'hydrogène dans les flacons).

Suite à cette réflexion, la manipulation sous isolateur pourrait avoir un impact sur les résultats de l'essai de fertilité et par extension sur ceux de l'essai d'applicabilité. En effet, l'enceinte d'un isolateur stérile, bien qu'ayant subi un cycle de rinçage après stérilisation, peut contenir des résidus de peroxyde d'hydrogène sous forme de vapeur. Au cours de l'essai d'applicabilité, le peroxyde d'hydrogène peut s'impacter sur la membrane filtrante particulièrement lors de l'aspiration sous vide.

Ces hypothèses sont à nuancer en raison des résultats positifs obtenus en fertilité et en applicabilité sur les autres micro-organismes, bien que réalisés en isolateur.

❖ Défaut de production du milieu MH

La deuxième différence réside quant à elle dans la provenance des milieux MH utilisés : CBP pour le premier essai sur le milieu MH avec variations des paramètres (paragraphe 3.2.3), faculté de pharmacie pour l'essai de fertilité témoin positif de l'essai d'applicabilité (paragraphe 3.2.4). Un défaut de production du milieu réalisé à la faculté de pharmacie peut être évoqué.

Au regard de ces hypothèses et pour identifier nos axes d'optimisation, un essai de fertilité réalisé indépendamment de l'essai d'applicabilité a été effectué.

3.2.5. Etude des paramètres de l'essai de fertilité du milieu MH

Cet essai a pour objectif de vérifier les hypothèses concernant la décontamination de surface et la production du milieu MH. Pour cela, 3 « sous-types » de milieu MH ont été utilisés : un milieu MH conditionné en flacon produit à la faculté de pharmacie n'ayant jamais subi de décontamination à la vapeur de peroxyde d'hydrogène, un milieu MH conditionné en flacon produit à la faculté de pharmacie ayant subi deux décontaminations à la vapeur de peroxyde d'hydrogène (simulant une entrée en zone de préparation puis en isolateur) et un milieu MH conditionné en Falcon® produit par le CBP n'ayant jamais subi de décontamination à la vapeur de peroxyde d'hydrogène. Cette manipulation a été réalisée sous hotte en 3 exemplaires. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau XX.

Tableau XX. Résultats de l'essai de fertilité réalisé sur le milieu MH avec variation de la décontamination et de la provenance du milieu

Micro-organisme	Paramètres variables		Résultats à J3		
	Provenance	Double décontamination	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
<i>Staphylococcus aureus</i>	Faculté de pharmacie	Non	-	-	-
	Faculté de pharmacie	Oui	-	-	-
	CBP	Non	+	+	+

Les répliquas sur le milieu produit à la faculté de pharmacie sont négatifs, qu'il y ait eu ou non décontamination, tandis que ceux sur le milieu provenant du CBP sont positifs. On peut ainsi retenir l'hypothèse d'un défaut de production du milieu. Plusieurs éléments peuvent en être responsables, tels qu'une erreur lors de la production ou un pH final du milieu incompatible avec la croissance de certains micro-organismes (notamment *Staphylococcus aureus*).

Le pH des milieux MH produits à la faculté de pharmacie et au CBP issus des mêmes lots de production que ceux utilisés ci-dessus a été mesuré. Ils ne diffèrent pas des indications des fabricants et est théoriquement compatible avec la croissance microbienne. Les résultats des mesures de pH sont présentés dans le Tableau XXI.

Tableau XXI. Résultats des mesures de pH sur les milieux MH provenant du CBP et de la faculté de pharmacie

Milieu	Provenances	Références (fabricants)	Indications du fabricant	pH mesurés
MH	Faculté de pharmacie	69444 (BIO-RAD)	7,3 +/- 0,1	7,3
	CBP	CM0405 (OXOID)	7,4 +/- 0,2	7,4

L'hypothèse d'un défaut de pH a été réfutée. Le milieu MH du laboratoire BIO-RAD étant anciennement utilisé par le CBP, nous avons consulté leur unité de production des milieux de culture. Pour optimiser la pousse microbienne, les modalités de production avaient été modifiées par l'ajout d'ions calcium et magnésium au milieu. Cette donnée nous était inconnue lors de nos essais.

Nous pouvons par conséquent présumer que ce déséquilibre ionique est à l'origine des résultats négatifs obtenus sur le milieu MH produit à la faculté de pharmacie.

3.3. Validation de l'essai de stérilité alternatif de la PE

3.3.1. Essai de stérilité des milieux de culture

Les certificats de stérilité fournis par les fabricants confirment la stérilité des flacons utilisés (Annexe 6).

3.3.2. Essais de fertilité et d'applicabilité de la méthode alternative

La concentration des suspensions microbiennes utilisées pour cet essai, hors *Aspergillus*, a été déterminée par dénombrement à deux reprises (dépôt de 100 µL de suspension à théoriquement 10² UFC/mL sur gélose et incubation à 37°C pendant maximum 5 jours). Les résultats sont décrits dans le Tableau XXII.

Tableau XXII. Contrôle de la concentration des suspensions microbiennes utilisées pour les essais de fertilité et d'applicabilité de la méthode alternative			
Micro-organismes	Dénombrement attendu (UFC/100 µL)	Dénombrement 1 / Dénombrement 2 (UFC/100 µL)	Moyennes retenues pour 1 mL (UFC)
<i>Staphylococcus aureus</i>	10	5 / 8	65
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10	9 / 13	110
<i>Clostridium sporogenes</i>	10	0 / 1	5
<i>Bacillus subtilis</i>	10	1 / 1	10
<i>Candida albicans</i>	10	0 / 1	5

Les résultats des essais de fertilité et d'applicabilité sont repris dans le Tableau XXIII.

Tableau XXIII. Résultats des essais de fertilité et d'applicabilité de la méthode alternative				
Micro-organismes	Milieux utilisés	Moyennes retenues (UFC)	Fertilité / Délais de positivité en jour (j)	Applicabilité / Délais de positivité
<i>Staphylococcus aureus</i>	FA Plus	65	+ / 0,6j	- / Ø
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	FA Plus	110	+ / 0,7j	- / Ø
<i>Clostridium sporogenes</i>	FN Plus	5	+ / 1j	- / Ø
<i>Bacillus subtilis</i>	FA Plus	10	+ / 0,6j	- / Ø
<i>Candida albicans</i>	FA Plus	5	+ / 8,3j	- / Ø
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	FA Plus	Ø	+ / 3,5j	- / Ø
	Mycosis IC/F	Ø	+ / 1,8j	- / Ø
Témoins négatifs	FA Plus	Ø	Ø	- / Ø
	FN Plus	Ø	Ø	- / Ø
	Mycosis IC/F	Ø	Ø	- / Ø

Les résultats de l'essai de fertilité réalisé sur les équipements Bact/ALERT® 3D 60 et BD BACTEC® FX (pour l'*Aspergillus brasiliensis*) se sont révélés positifs dans un délai de 0,6 à 8,3 jours (Tableau XXIII). Les différences observées dans les délais de positivité pourraient s'expliquer par les vitesses de croissance des micro-organismes, la quantité inoculée pour les micro-organismes ayant été dénombrés et la sensibilité de la méthode de détection.

En ce qui concerne l'essai d'applicabilité de la méthode alternative, réalisé sans inhibition préalable du 5-FU, tous les flacons apparaissent négatifs au terme de la période d'incubation.

Dans l'attente d'informations de la part du laboratoire Biomérieux concernant le mécanisme d'absorption des billes polymériques contenues dans les milieux BacT/ALERT®, nous avons émis l'hypothèse d'un défaut d'inhibition de l'activité antimicrobienne du 5-FU par ces billes. Deux sous-hypothèses se distinguent :

- ❖ *Absence totale d'absorption* du 5-FU par les billes polymériques absorbantes,
- ❖ *Quantité trop importante* de 5-FU injectée dans les milieux de culture.

Puisque le volume maximal à injecter par flacon de type BacT/ALERT® est de 10 mL, nous avons fait le choix d'introduire directement notre solution de 5-FU à 8 mg/mL et de ne pas la diluer selon les modalités décrites dans la méthode classique pour atteindre la C_{min} . En effet, en cas de neutralisation préalable du 5-FU par dilution (2 mL de solution de 5-FU à 8 mg/mL dans 250 mL de diluant), 10 mL de cette solution diluée à injecter ne contiendrait que l'équivalent de 80 µL de notre échantillon initial. De plus, l'augmentation des manipulations augmente le risque de contamination involontaire et de faux positifs.

Les résultats de l'essai de fertilité de la méthode alternative sont prometteurs. Ainsi, la validation de l'essai de stérilité est conditionnée par celle de l'essai d'applicabilité. Les informations attendues de la part du laboratoire, ainsi qu'une réflexion sur l'inhibition du 5-FU, permettront d'y accéder.

4. Perspectives

4.1. Perspectives locales

4.1.1. La standardisation des doses

L'utilisation de DS, à présent validée pour le bortézomib et le 5-FU, est en cours de validation pour l'irinotécan et l'oxaliplatine. Elles seront appliquées quel que soit le mode de préparation, magistral ou hospitalier. Le principe des DS et leur application tendent ainsi à se développer au CHRU de Lille.

Dans ce même objectif, le centre hospitalier de Metz-Thionville a développé un outil Excel[®] d'aide à la mise en place de DS (21). A partir des données de production, il permet d'identifier les doses fréquemment prescrites pour une molécule déterminée et oriente ainsi sur les DS à définir. A partir des DS et des bandes alors choisies, l'outil permet d'estimer le pourcentage de prescriptions couvertes. Il propose par la suite une aide à la planification de la production (taille des lots, fréquence de production, etc.).

4.1.2. L'essai de stérilité classique

Les écarts entre l'inoculum théorique et l'inoculum réel, obtenus lors des dénombrements des suspensions microbiennes utilisées lors des essais sur le milieu MH et selon la méthode alternative, justifient d'adapter notre mode de production lors des futures manipulations. Pour cela, avant utilisation des suspensions, nous souhaiterions réaliser un dénombrement, dont les résultats permettront la libération des suspensions produites pour que la quantité inoculée soit conforme à la PE.

Quant aux milieux de culture, les résultats des dernières manipulations sur le milieu MH semblent identifier un défaut dans sa production. Lors de futurs essais, l'ajout d'ions calcium et magnésium au milieu BIO-RAD ou l'utilisation du milieu OXOID devront être opérés. Bien que l'utilisation du milieu MH permet d'avoir un milieu unique facilitant les modes opératoires, les meilleurs résultats obtenus sur les milieux au TG et à l'HCS lors de l'essai d'applicabilité nous motivent à réaliser de nouveaux essais sur ces deux milieux.

Désormais les essais de fertilité seront réalisés indépendamment des essais d'applicabilité et jusqu'à l'obtention de résultats positifs sur tous les micro-organismes.

Au regard des hypothèses évoquées quant à un défaut d'inhibition du 5-FU, nous souhaiterions réaliser en amont de la filtration une dilution de la solution afin de l'amener à une concentration inférieure à la C_{min} . Cependant la PE indique dans son

chapitre 2.6.1 qu' « après transfert sur la membrane du contenu du (des) récipient(s) à examiner » il faut ajouter « un inoculum contenant un petit nombre de micro-organismes viables (au maximum 100 UFC) au volume final du diluant stérile utilisé pour rincer le filtre ». Il est ainsi légitime de s'interroger sur la conformité de cette méthode de dilution aux recommandations de la PE, si « la solution à examiner » doit être interprétée comme correspondant strictement à la préparation échantillonnée.

4.1.3. L'essai de stérilité alternatif

Les résultats des essais de fertilité nous encouragent à poursuivre en priorité les travaux entrepris pour la validation de l'essai de stérilité sur l'automate BacT/ALERT®. Les informations attendues de la part du laboratoire Biomérieux concernant le mécanisme d'absorption des billes polymériques permettra de nous orienter vers l'une des hypothèses citées préalablement. A ce jour les deux hypothèses demeurent et seront prochainement étudiées, notamment dans l'objectif de trouver un mode opératoire permettant l'inhibition efficace de l'activité antimicrobienne du 5-FU.

La première étape sera de déterminer si les billes polymériques absorbantes sont capables d'absorber le 5-FU et en quelle quantité, puisqu'initialement prévu pour l'absorption d'anti-infectieux à concentration sérique. Pour cela nous pouvons évoquer deux modes opératoires.

D'une part, il pourrait être envisagé d'injecter une quantité de 5-FU connue dans un milieu de culture contenant des billes polymériques (FA Plus ou FN Plus). La réalisation d'un dosage du 5-FU dans un échantillon du milieu de culture permettrait de déterminer la quantité de 5-FU résiduelle dans le milieu et *a fortiori* la quantité de 5-FU absorbée par les billes. Cependant, le bouillon, qui est un milieu complexe, ne pourra être analysé par l'équipement QC Prep®, actuellement en place pour le contrôle analytique des préparations de chimiothérapie réalisées à l'UPCC du CHRU de Lille. Une réflexion complémentaire devra être engagée pour trouver la meilleure méthode de dosage.

D'autre part, un essai d'applicabilité sur un micro-organisme avec variation de la concentration des solutions de 5-FU injectées dans le milieu de culture pourrait être réalisé. Si le micro-organisme croît avec une concentration en 5-FU supérieure à la C_{min} , le pouvoir absorbant des billes pourra être présumé et estimé.

Lors de futurs essais, une diminution du volume de 5-FU injecté pourrait être envisagée en injectant un plus faible volume de 5-FU, avec un minimum de 1 mL,

recommandé par la PE pour les liquides antibiotiques, et complété par un volume de chlorure de sodium 0,9% pour atteindre un volume optimal de 8 à 10 mL.

L'utilisation de cette méthode alternative permettrait de faciliter la réalisation en routine de l'essai de stérilité en isolateur, d'autant plus si l'injection de la solution à analyser est réalisée à l'aide d'un système clos, permettant un confinement chimique et microbiologique. Une réflexion pour la sécurisation de l'injection de la solution à analyser a été initiée et doit être poursuivie. En effet, dans cet objectif, les systèmes PhaSeal[®] et Tevadaptor[®] ont été testés mais empêchent la fermeture de l'étuve. Le recours à des systèmes moins encombrants pourrait résoudre cette problématique.

4.2. Perspectives nationales

❖ Essai de stérilité des préparations stériles

L'Unité Préparation et Contrôle du Médicament de l'Hôpital Edouard Herriot de Lyon a étudié l'équipement ChemScan[®] RDI (décrit dans le paragraphe 1.5.2.2) pour le contrôle microbiologique de préparations hospitalières de collyres antibiotiques et de bévacizumab intracaméculaire (22). Suite à l'inoculation d'environ 50 UFC de chacun des 6 micro-organismes de référence de la PE, le ChemScan[®] RDI a détecté la présence d'environ 50 UFC après 48 heures d'incubation. Ces résultats apparaissent encourageants pour son application au contrôle rapide de stérilité des préparations hospitalières.

❖ Poches de cytotoxiques prêtes à l'emploi

Des poches de cytotoxiques prêtes à l'emploi, déjà commercialisées dans d'autres pays de l'Union Européenne (Royaume-Uni, Allemagne, Pays-Bas etc.), arrivent sur le marché français. Ces solutions semblent être une issue intéressante, à la fois simple et sécuritaire pour les patients et les professionnels de santé, et au-delà des avantages que présente la mise en place de DS et la réalisation de préparations hospitalières (optimisation du planning de production, réduction du risque d'erreur, économies des reliquats etc.).

Le laboratoire SUN PHARMA a obtenu une AMM pour sa spécialité Gemcitabine SUN 10 mg/mL, en poche suremballée de 1200 mg, 1400 mg, 1600 mg, 1800 mg, 2000 mg, et 2200 mg.

Cette présentation prête à l'emploi nécessite cependant la pose d'une tubulure, étape à risque de contamination chimique, pouvant être réduit par le passage de la

poche en unité de préparation. En effet, en service de soins, la purge de la tubulure sera réalisée avec la solution cytotoxique tandis qu'en unité de préparation, cette purge peut être faite avec un solvant de dilution. Cependant, cette étape est un travail de faible valeur ajoutée pour le personnel de l'unité.

La mise en place de ces poches prêtes à l'emploi apparaît comme une option séduisante, permettant de dispenser des cytotoxiques produits et contrôlés selon les bonnes pratiques de fabrication et possédant de longues durées de stabilité. Elle nécessitera toutefois une étude financière préalable indispensable.

4.3. Automatisation

La mise en place de préparations hospitalières standardisées produites par campagne peut apparaître pour les Préparateurs en Pharmacie Hospitalière (PPH) comme étant une charge lourde de travail. En effet, des facteurs de risque biomécaniques comme des efforts excessifs, une répétitivité des gestes ou encore un travail en position maintenue peuvent favoriser la survenue de **Troubles Musculo-Squelettiques** (TMS) (23)(24). La réalisation d'une activité longue et répétitive peut également augmenter la fatigue et donc le **risque d'erreur**. Une étude réalisée sur 3 items (préparation du matériel, TMS et fatigue) auprès des PPH de l'unité de production des anticancéreux de l'Hôpital Saint-Louis à Paris montre qu'une production semi-automatique (BAXA Repeat[®]) est préférée à une production manuelle, même pour les petits lots de production (25). De la même manière d'autres études menées au sein d'unités de préparation stérile montrent que les PPH voient un intérêt certain à l'arrivée de ces nouveaux équipements (26)(27). L'automatisation de la production peut permettre d'augmenter la productivité tout en diversifiant les activités attribuées aux PPH, de réduire le risque d'erreur et d'améliorer la sécurité et l'ergonomie de travail (24)(28)(29).

Au-delà d'un travail préalable avec étude de marché, étude de faisabilité, et maîtrise de nouveaux risques, l'implantation d'un automate de fabrication représente évidemment un lourd investissement financier. L'achat d'un automate est une dépense de plusieurs dizaines à centaines de milliers d'euros. Une étude comparative entre l'acquisition d'un isolateur et d'un automate de fabrication (Cytocare[®]) a été réalisée par le centre hospitalier d'Argenteuil. Financièrement, le coût total sur 5 ans engendré par l'utilisation de Cytocare[®] serait de 1 493 200 euros contre 1 182 600 euros pour l'isolateur (30).

Avec une moyenne journalière de 7 préparations « bolus » de 5-FU (tout dosage confondu) et une durée de stabilité de 112 jours de la solution, 560 préparations sont nécessaires pour couvrir cette période de stabilité et justifieraient le recours à un automate de préparation.

Après validation des DS, et une fois la mise en place effective des préparations hospitalières, l'installation d'un automate au CHRU de Lille apparaît comme l'étape suivante pour l'optimisation et la sécurisation du circuit de préparation des cytotoxiques injectables.

Conclusion

L'utilisation des DS au CHRU de Lille se développe et est désormais validée pour le bortézomib et le 5-FU. Pour le 5-FU, la réalisation de préparations hospitalières apparaît comme une perspective d'évolution évidente, nous permettant de sécuriser notre mode de production et d'optimiser notre organisation de travail en anticipant ces préparations lors d'une période de moindre activité. Cette évolution nécessite des données de stabilité plus longues, une méthode de contrôle physicochimique validée et une stérilité garantie conformément à l'essai de stérilité classique de la PE.

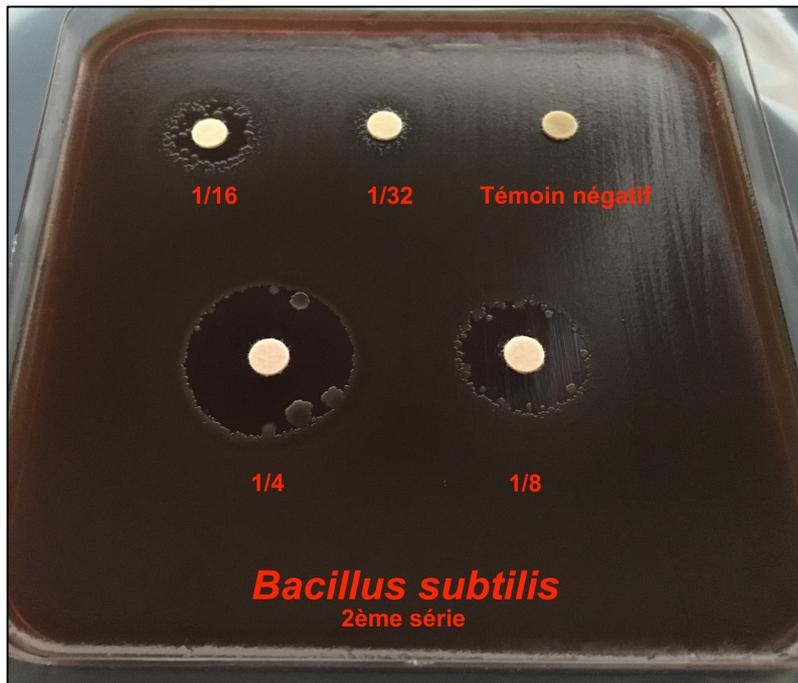
La littérature, peu riche en ce qui concerne la réalisation de cet essai sur des préparations cytotoxiques, ne nous a pas permis de nous orienter d'emblée vers des procédures efficaces. Les difficultés évoquées dans ce travail, telles que le risque chimique et l'activité antimicrobienne, se sont confirmées au regard des résultats décrits. En effet, les résultats obtenus pour les essais de fertilité et d'applicabilité n'ont été que partiellement positifs pour les micro-organismes de référence imposés par la PE et malgré de premiers ajustements des modes opératoires. Ainsi, encouragés par des résultats tout de même prometteurs, nous devons poursuivre l'optimisation de nos modes opératoires dans l'objectif de valider l'essai de stérilité classique.

Bien que les résultats préalables de l'essai d'applicabilité se soient révélés négatifs, l'utilisation d'une MMR s'impose toujours comme une alternative séduisante. Les avantages présentés par les MMR nous encouragent à poursuivre nos recherches et à nous investir dans une étude pharmaco-économique. Leur utilisation en routine reste cependant conditionnée à la validation de l'essai de stérilité classique de la PE afin d'en démontrer l'équivalence.

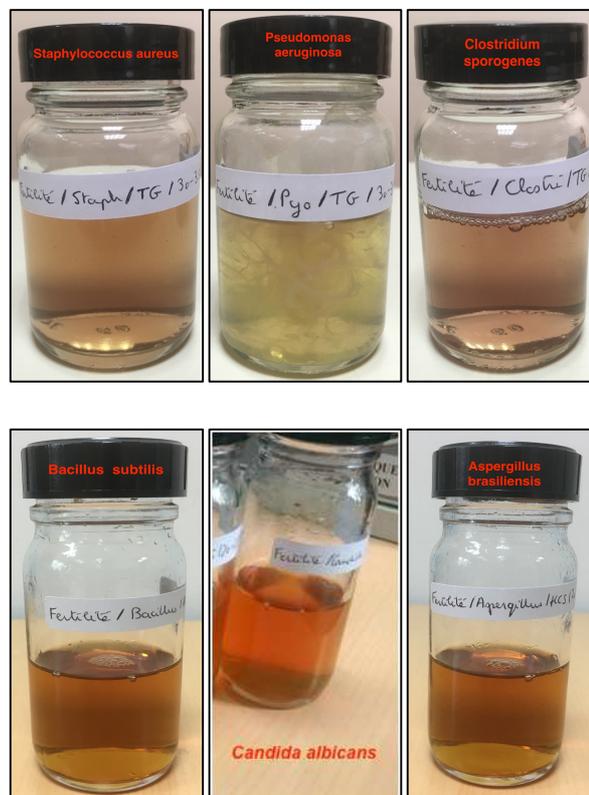
Une collaboration étroite entre pharmaciens, microbiologistes et chercheurs permettra de poursuivre ce travail et d'aboutir à des modes opératoires efficaces nous permettant de valider la méthode classique de la PE et de prouver son équivalence avec une MMR. Le passage à un mode de production hospitalier pour certains cytotoxiques apparaît comme un axe d'amélioration incontournable pour des structures ayant une activité interne importante à laquelle s'ajoute des activités de sous-traitance dans le cadre des groupements hospitaliers de territoire.

Annexes

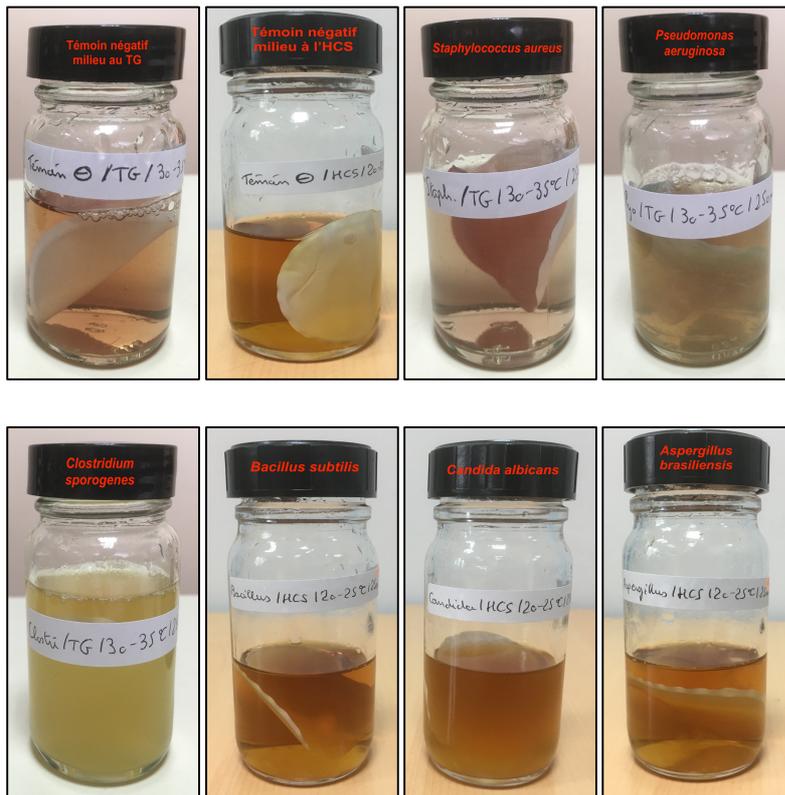
Annexe 1. Détermination de l'activité antimicrobienne du 5-FU sur *Bacillus subtilis* (2^{ème} série)



Annexe 2. Essai de fertilité sur milieu TG et HCS (J3 pour les bactéries, J5 pour les levures et moisissures)



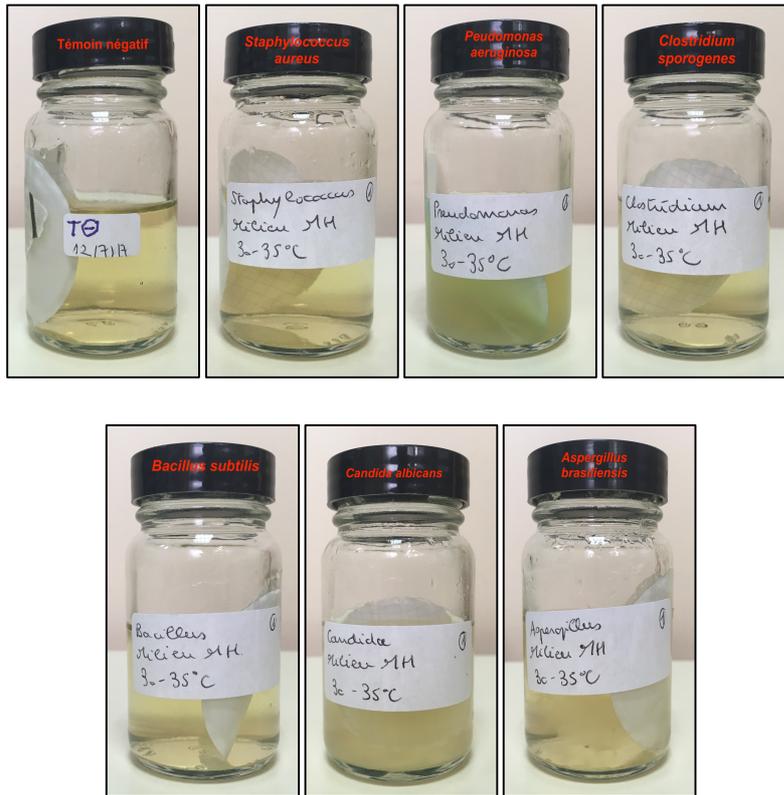
Annexe 3. Essai d'applicabilité sur milieu TG et HCS (témoin négatif et 1^{ers} réplikas)



Annexe 4. Essai de fertilité du milieu MH (J3 pour les bactéries, J5 pour les levures et moisissures)



Annexe 5. Essai d'applicabilité sur le milieu MH



Annexe 6. Certificats de conformité des milieux FA Plus, FN Plus et Mycosis IC/F

Certificate of Conformance
Certificat de Conformité

BacT/ALERT® FA Plus **IVD** **LOT** 3048018
REF 410851 **EXP** 2017-11-29

This is to certify that samples of this lot were tested by standard procedures which include the methods and control ATCC® cultures specified in "Quality Control for Commercially Prepared Microbiological Culture Media" (CLSI® Approved Standard) and met the following specifications: / Ceci certifie que les échantillons de ce lot ont été testés d'après les procédures standard, notamment les méthodes et cultures de contrôle ATCC® préconisées par le CLSI® dans la norme agréée « Quality Control for Commercially Prepared Microbiological Culture Media » (Contrôle qualité des milieux de culture microbiologiques préparés à des fins commerciales), et qu'ils sont conformes aux exigences suivantes:

pH	7.25 – 7.50 7.25 à 7.50												
Sterility Stérilité	No evidence of contamination. Absence de contamination.												
Growth Performance Croissance	Satisfactory growth was exhibited with the following test microorganisms: La croissance de micro-organismes suivants a été réalisée de façon satisfaisante:												
	<table style="width: 100%; font-size: small;"> <tr> <td><i>Candida albicans</i> ATCC® 14053™</td> <td><i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923™</td> </tr> <tr> <td><i>Enterococcus faecalis</i> ATCC® 29212™</td> <td><i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC® 12228™</td> </tr> <tr> <td><i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922™</td> <td><i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ATCC® 13637™</td> </tr> <tr> <td><i>Haemophilus influenzae</i> ATCC® 10211™</td> <td><i>Streptococcus agalactiae</i> ATCC® 13813™</td> </tr> <tr> <td><i>Neisseria meningitidis</i> ATCC® 13090™</td> <td><i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC® 6305™*</td> </tr> <tr> <td><i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 27853™</td> <td><i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC® 19615™</td> </tr> </table>	<i>Candida albicans</i> ATCC® 14053™	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923™	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC® 29212™	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC® 12228™	<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922™	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ATCC® 13637™	<i>Haemophilus influenzae</i> ATCC® 10211™	<i>Streptococcus agalactiae</i> ATCC® 13813™	<i>Neisseria meningitidis</i> ATCC® 13090™	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC® 6305™*	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 27853™	<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC® 19615™
<i>Candida albicans</i> ATCC® 14053™	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923™												
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC® 29212™	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC® 12228™												
<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922™	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ATCC® 13637™												
<i>Haemophilus influenzae</i> ATCC® 10211™	<i>Streptococcus agalactiae</i> ATCC® 13813™												
<i>Neisseria meningitidis</i> ATCC® 13090™	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC® 6305™*												
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 27853™	<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC® 19615™												

*CLSI recommended strain. / *Souche recommandée par le CLSI.

The manufacturing records for this lot have been reviewed and approved. The lot was formulated and processed within established requirements. / Les rapports de fabrication de ce lot ont été revus et approuvés. Le lot a été conçu et produit conformément aux normes actuelles.

Elizabeth Rohe
 Director, Quality

CLSI/NCCLS. Quality Control for Commercially Prepared Microbiological Culture Media, Approved Standard—Third Edition. CLSI/NCCLS document M22-A3. Wayne, PA. NCCLS, 2004.

For technical assistance in the USA, contact bioMérieux Customer Service at 1-800-682-2666. Outside the USA, contact your local bioMérieux Representative. / Pour toute assistance technique aux États-Unis, contacter le service client de bioMérieux au +1 800-682-2666. En dehors des États-Unis, contacter le représentant local de bioMérieux.

BIOMÉRIEUX, the blue logo, and BacT/ALERT are used, pending, and/or registered trademarks belonging to bioMérieux, or one of its subsidiaries, or one of its companies. / BIOMÉRIEUX, le logo bleu, et BacT/ALERT sont des marques utilisées, déposées et/ou enregistrées appartenant à bioMérieux, ou à l'une de ses filiales, ou à l'une de ses sociétés.

The ATCC trademark and trade name and any and all ATCC catalog numbers are trademarks of the American Type Culture Collection. / La marque ATCC, la dénomination ATCC et tous les numéros de catalogue ATCC sont des marques de American Type Culture Collection.

CLSI is a registered trademark of the Clinical and Laboratory Standards Institute. / CLSI est une marque déposée du Clinical and Laboratory Standards Institute.

bioMérieux, Inc.
 100 Rodolphe Street
 Durham, North Carolina 27712 USA
 www.biomerieux.com

bioMérieux SA
 378 Chemin de l'Orme
 69280 Marcy-l'Étoile - France
 RCS LYON 673 620 399
 Tel. 33 (0)4 78 87 20 00
 Fax 33 (0)4 78 87 20 90
 9306357 B

Certificate of Conformance
Certificat de Conformité

BacT/ALERT® FN Plus **IVD** **LOT** 3048124
REF 410852 **EXP** 2017-12-22

This is to certify that samples of this lot were tested by standard procedures which include the methods and control ATCC® cultures specified in "Quality Control for Commercially Prepared Microbiological Culture Media" (CLSI® Approved Standard) and met the following specifications: / Ceci certifie que les échantillons de ce lot ont été testés d'après les procédures standard, notamment les méthodes et cultures de contrôle ATCC® préconisées par le CLSI® dans la norme agréée « Quality Control for Commercially Prepared Microbiological Culture Media » (Contrôle qualité des milieux de culture microbiologiques préparés à des fins commerciales), et qu'ils sont conformes aux exigences suivantes:

pH	7.01 – 7.45 7.01 à 7.45						
Sterility Stérilité	No evidence of contamination. Absence de contamination.						
Growth Performance Croissance	Satisfactory growth was exhibited with the following test microorganisms: La croissance de micro-organismes suivants a été réalisée de façon satisfaisante:						
	<table border="0"> <tr> <td><i>Bacteroides fragilis</i> ATCC® 25285™*</td> <td><i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922™</td> </tr> <tr> <td><i>Bacteroides vulgatus</i> ATCC® 8482™</td> <td><i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923™</td> </tr> <tr> <td><i>Clostridium perfringens</i> ATCC® 13124™</td> <td><i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC® 6305™*</td> </tr> </table>	<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC® 25285™*	<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922™	<i>Bacteroides vulgatus</i> ATCC® 8482™	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923™	<i>Clostridium perfringens</i> ATCC® 13124™	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC® 6305™*
<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC® 25285™*	<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922™						
<i>Bacteroides vulgatus</i> ATCC® 8482™	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923™						
<i>Clostridium perfringens</i> ATCC® 13124™	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC® 6305™*						
*CLSI recommended strain. / *Souche recommandée par le CLSI.							
The manufacturing records for this lot have been reviewed and approved. The lot was formulated and processed within established requirements. / Les dossiers de fabrication de ce lot ont été examinés et approuvés. Le lot a été formulé et traité selon les critères établis.							

Elizabeth Rohe

Elizabeth Rohe
Director, Quality

CLSI/NCCLS. Quality Control for Commercially Prepared Microbiological Culture Media; Approved Standard—Third Edition. CLSI/NCCLS document M22-A3. Wayne, PA: NCCLS, 2004.

For technical assistance in the USA, contact bioMérieux Customer Service at 1-800-682-2666. Outside the USA, contact your local bioMérieux Representative. / Pour toute assistance technique aux États-Unis, contacter le service client de bioMérieux au +1 800-682-2666. En dehors des États-Unis, contacter le représentant local de bioMérieux.

BIO-MERIEUX, the blue logo, and BacT/ALERT are used, pending, and/or registered trademarks belonging to bioMérieux, or one of its subsidiaries, or one of its companies. / BIO-MERIEUX, le logo bleu, et BacT/ALERT sont des marques utilisées, déposées et/ou enregistrées appartenant à bioMérieux, ou à l'une de ses filiales, ou à une de ses sociétés.

The ATCC trademark and trade name and any and all ATCC catalog numbers are trademarks of the American Type Culture Collection. / La marque ATCC, la dénomination ATCC et tous les numéros de catalogue ATCC sont des marques de American Type Culture Collection. CLSI is a registered trademark of the Clinical and Laboratory Standards Institute. / CLSI est une marque déposée du Clinical and Laboratory Standards Institute.



Certificate of Analysis

Becton Dickinson Caribe LTD.
BD Diagnostics Systems
6 Vicks Drive, Lot # 6
Cayey PR 00737-2860 PR

Page: 1 of 2

Product Name : Mycosis I/Cbactec F 50/Pk F/G
Catalog Number : 442206 **Manufacture Date** : 2017/03/06
Batch Number : 7058621
Expiration Date : 2018/06/30

This is to certify that representative samples of BACTEC MYCOSIS-IC/F MEDIUM were tested in the Quality Control Laboratory by procedures conventionally utilized for this type of product and met the following test parameters:

pH: 6.8 ± 0.2

Autoclaving:
The product was exposed to a moist heat sterilization process (previously validated following an ISO Standard*).

Vacuum draw:
greater than or equal to 10 ml at time of manufacture.

Biological Performance:
Satisfactory growth:

CULTURE	ATCC No.
Candida albicans	10231
C. albicans	14053
C. tropicalis	750
C. parapsilosis	10232
C. krusei	34135
Torulopsis glabrata	15545
Cryptococcus neoformans	13690

Bacterial Inhibition:
No growth:
Escherichia coli 25922
Staphylococcus aureus 25923

ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection.

* ISO 11134, Sterilization of health care products - Requirements for validation and routine control - Industrial moist heat sterilization, 1994.

The Batch Number on this certificate is synonymous with the Lot Number shown on the product label. BD Diagnostic Systems is an ISO 13485:2003 and ISO 9001:2008 Registered facility. BD Diagnostics - Diagnostic Systems products are manufactured in facilities registered with the United States Food and Drug Administration (FDA), and are regulated by the FDA's Quality System Regulations (QSRs). This product met BD Diagnostics - Diagnostic Systems stringent quality standards at time of batch/lot release. Any

Creation Date: 2017/03/28 19:08:16

Références bibliographiques

1. Commission européenne de la Pharmacopée. Chapitre 5.1.1 Méthodes de préparation des produits stériles. In: Pharmacopée Européenne. VIIIème édition. p. 597-9.
2. Commission européenne de la Pharmacopée. Chapitre 2.6.1 Stérilité. In: Pharmacopée Européenne. VIIIème édition. p. 187-90.
3. Commission européenne de la Pharmacopée. Chapitre 5.1.6 Méthodes alternatives pour le contrôle de la qualité microbiologique. In: Pharmacopée Européenne. IXème édition. p. 4588-98.
4. Escalup L, Podilsky G, Jourdan N. Standardisation des doses de cytotoxiques [Internet]. Présentation en atelier GERPAC; 2013 [cité 17 août 2017]; Presqu'île de Giens, Hyères, France. Disponible sur: https://www.scribd.com/embeds/173364907/content?start_page=1&view_mode=slide_show&access_key=key-qls55mp4t7u92zcu22o&show_recommendations=true
5. Bardo P, Gauthier M, Bisseux L, Sankhare D, Benassaia L, Roux C, et al. Amélioration de la sécurisation du circuit de préparations hospitalières d'anticancéreux injectables suite aux remarques de l'A.R.S. Congrès du GERPAC; 2012 ; Presqu'île de Ponant, La Grande Motte, France.
6. Du Bois D, Du Bois EF. Clinical calorimetry: tenth paper a formula to estimate the approximate surface area if height and weight be known. *Arch Intern Med.* 1916;17(6_2):863-871.
7. Mathijssen RHJ, de Jong FA, Loos WJ, van der Bol JM, Verweij J, Sparreboom A. Flat-Fixed Dosing Versus Body Surface Area Based Dosing of Anticancer Drugs in Adults: Does It Make a Difference? *The Oncologist.* 1 août 2007;12(8):913-23.
8. Baker SD, Verweij J, Rowinsky EK, Donehower RC, Schellens JH, Grochow LB, et al. Role of body surface area in dosing of investigational anticancer agents in adults, 1991-2001. *J Natl Cancer Inst.* 2002;94(24):1883-1888.
9. Felici A, Verweij J, Sparreboom A. Dosing strategies for anticancer drugs: the good, the bad and body-surface area. *Eur J Cancer.* 2002;38(13):1677-1684.
10. Wang DD, Zhang S, Zhao H, Men AY, Parivar K. Fixed Dosing Versus Body Size-Based Dosing of Monoclonal Antibodies in Adult Clinical Trials. *J Clin Pharmacol.* sept 2009;49(9):1012-24.
11. Baker JP, Jones SE. Rationalisation of chemotherapy services in the University Hospital Birmingham National Health Science Trust. *J Oncol Pharm Pract.* 1998;4(1):10-14.
12. Plumridge RJ, Sewell GJ. Dose-banding of cytotoxic drugs: a new concept in cancer chemotherapy. *Am J Health-Syst Pharm.* 2001;58:1760-4.
13. Zavery B. Could logarithmic dosing change the way cytotoxics are prescribed? *Clin Pharm.* Avril 2011;3:116-8.
14. Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé. Chapitre 2 - Contrôles. In: Bonnes pratiques de préparations. 2007. p. 29-33.

15. Sautou V, Brossart D, Chedru-Legros V, Crauste-Manciet S, Fleury-Souverain S, Lagarce F, et al. Guide méthodologique des études de stabilité des préparations. Partie 1 : préparations liquides. 1ère édition. SFCP ; GERPAC; 2013.
16. Hergli M, Berge-Bouchara C, Olivier E. Contrôles des préparations hospitalières, chimiothérapies et nutriments parentéraux : quelles pratiques en 2013 dans les pharmacies à usage intérieur d'établissements de santé en France, Suisse et Belgique ? [Internet]. HOIPHARM; 2014 [cité 1 juill 2017]; La Rochelle. Disponible sur: http://www.synprefh.org/files/archives/hopi2014_poster-204.pdf
17. Bodet CA, Jorgensen JH, Drutz DJ. Antibacterial activities of antineoplastic agents. *Antimicrob Agents Chemother.* 1985;28(3):437–439.
18. Hamilton-Miller JM. Antimicrobial activity of 21 anti-neoplastic agents. *Br J Cancer.* 1984;49(3):367.
19. Lawrence A. Trissel. *Handbook on Injectable Drugs.* 11th edition. American Society of Health-System Pharmacists; 2000. 1432 p.
20. Commission européenne de la Pharmacopée. Chapitre 5.1.9 Indications sur l'application de l'essai de stérilité. In: *Pharmacopée Européenne.* VIIIème édition. p. 616.
21. Humbert M, Lang A-S, Camut A, Noirez V. Dose banding en unité centralisée de préparation des cytotoxiques : proposition d'outils d'aide à la mise en place [Internet]. Congrès du GERPAC; 2016 [cité 3 sept 2017]; Presqu'île de Giens, Hyères, France. Disponible sur: <http://www.gerpac.eu/dose-banding-en-unite-centralisee-de-preparation-des-cytotoxiques-proposition-d-outils-d-aide-a-la-mise-en-place>
22. De Bastiani C, Margain C, Clerc E, Neves P, Lebreton V, Pivot C, et al. Validation d'une méthode ultra-rapide de contrôle microbiologique de préparations hospitalières (PH) par cytométrie à balayage (CB) [Internet]. Congrès du GERPAC; 2016 [cité 11 août 2017]; Presqu'île de Giens, Hyères, France. Disponible sur: <http://www.gerpac.eu/validation-d-une-methode-ultra-rapide-de-contrôle-microbiologique-de-preparations-hospitalieres-ph-par-cytometrie-a-balayage-cb>
23. Aptel M, Gerling A, Cail F. Méthode de prévention. Généralités et principes. *Doc Pour Médecin Trav.* 2000;83:187–194.
24. Reisz F, Gairard-Dory A, Fonmartin K, Bourbon J, Gourieux B. Prévention des troubles musculo squelettiques en pharmacotechnie [Internet]. Congrès du GERPAC; 2016 [cité 16 juill 2017]; Presqu'île de Giens, Hyères, France. Disponible sur: <http://www.gerpac.eu/prevention-des-troubles-musculo-squelettiques-en-pharmacotechnie>
25. Moine M, Ménard C, Sankhare D, Ventroux G, Bretreau V, Faure P, et al. Préparation manuelle ou semi-automatisée de petits lots : quelle est la préférence du préparateur ? [Internet]. Congrès du GERPAC; 2015 [cité 15 juill 2017]; Presqu'île de Giens, Hyères, France. Disponible sur: <http://www.gerpac.eu/preparation-manuelle-ou-semi-automatisee-de-petits-lots-quelle-est-la-preference-du-preparateur>
26. Pichon F, Oubaïda R, Derai L, Chancelade V, Dleng S, Ahalli A, et al. Point de vue du préparateur/technicien à l'utilisation des robots pour la préparation des cytotoxiques [Internet]. Congrès du GERPAC; 2011 [cité 16 juill 2017]; Presqu'île de Giens, Hyères, France. Disponible sur: <http://www.gerpac.eu/point-de-vue-du-preparateur-technicien-a-l-utilisation-des-robots-pour-la->

27. Tavernier J, Thibert E, Van Hollebeke M, Jouannet M, Sautou V, Chopineau J. Perception de la pénibilité au travail en unité de pharmacotechnie évaluation de l'impact de l'automatisation de la préparation de poches de nutrition parentérale [Internet]. Congrès du GERPAC; 2013 [cité 16 juill 2017]; Presqu'île de Giens, Hyères, France. Disponible sur: <http://www.gerpac.eu/perception-de-la-penibilite-au-travail-en-unite-de-pharmacotechnie-evaluation-de-l-impact-de-l-automatisation-de-la-preparation-de-poches-de-nutrition-parenterale>
28. Verrey AS, Carrez L, Falaschi L, Bouchoud L, Bonnabry P. Evaluation des performances de l'automate PharmaHelp pour la production de poches injectables de cytotoxiques. Congrès HOIPHARM; 2015 ; Reims, France.
29. Roland I, Deprez M, Hébert B, Huon Y. Pompes pour la préparation aseptique de seringues de chimiothérapies anticancéreuses [Internet]. Congrès du GERPAC; 2011 [cité 16 juill 2017]; Presqu'île de Giens, Hyères, France. Disponible sur: <http://www.gerpac.eu/pompes-pour-la-preparation-aseptique-de-seringues-de-chimiotherapies-anticancereuses>
30. Tolla-Le Port C, Algalarrondo X, Pons JL, Descoutures JM. Préparation centralisée de chimiothérapies: comparaison entre l'acquisition d'un isolateur et d'un automate de fabrication [Internet]. Congrès du GERPAC; 2007 [cité 16 juill 2017]; Mol - Belgique. Disponible sur: <http://www.gerpac.eu/preparation-centralisee-de-chimiotherapies-comparaison-entre-l-acquisition-d-un-isolateur-et-d-un-automate-de-fabrication-516>



Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX
☎ 03.20.96.40.40 - Télécopie : 03.20.96.43.64
<http://pharmacie.univ-lille2.fr>



DEMANDE D'AUTORISATION DE SOUTENANCE

Nom et Prénom de l'étudiant : ...COURTIN JUSTIN.....

Date, heure et lieu de soutenance :

Le 15 10 2017 à 16 h..... Amphithéâtre ou salle : ...CURTÉ.....
 jour mois année

Avis du conseiller (directeur) de thèse

Nom : ...VASSEUR..... Prénom : ...MICHELE.....

- Favorable
 Défavorable

Motif de l'avis défavorable :

Date : 28/07/2017

Signature: [Signature]

Avis du Président de Jury

Nom : ...ODOU..... Prénom : ...PASCAL.....

- Favorable
 Défavorable

Motif de l'avis défavorable :

Date : 20/08/2017

Signature: [Signature]

Décision de Monsieur le Doyen

- Favorable
 Défavorable

Le Doyen
[Signature]
D. CUNY

NB : La faculté n'entend donner aucune approbation ou improbation aux opinions émises dans les thèses, qui doivent être regardées comme propres à leurs auteurs.

Université de Lille 2
FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES DE LILLE
MEMOIRE de DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
(tenant lieu de Thèse en vue du Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie)
Année Universitaire 2016/2017

Nom : COURTIN
Prénom : Justin

Titre du mémoire : ETUDE DE FAISABILITE DES PREPARATIONS HOSPITALIERES INJECTABLES DE 5-FLUORO-URACILE AU CENTRE HOSPITALIER REGIONAL ET UNIVERSITAIRE DE LILLE : VALIDATION DE L'ESSAI DE STERILITE SELON LA METHODE CLASSIQUE DE LA PHARMACOPEE EUROPEENNE ET EVALUATION D'UNE METHODE ALTERNATIVE

Mots-clés : Préparation de médicaments, Cytotoxique, 5-Fluoro-Uracile, Etudes de validation, Pharmacopée, Stérilité

Résumé :

L'activité de l'Unité de Préparation Centralisée des Cytotoxiques est en constante augmentation et nous amène à initier une réflexion de mise en place de préparations hospitalières permettant d'optimiser et de sécuriser le processus de fabrication. Après la validation de doses standards, l'étude de l'activité antimicrobienne du 5-FU, la validation de l'essai classique de stérilité de la pharmacopée européenne (PE) et l'évaluation d'une méthode microbiologique rapide (MMR) ont été entreprises.

Une détermination de l'activité antimicrobienne du 5-FU sur les 6 micro-organismes de référence du chapitre 2.6.1 de la PE a été réalisée par diffusion sur milieu gélosé. Des essais de fertilité (EF) et d'applicabilité (EA), en 3 réplicas, ont été effectués : selon les modalités de l'essai classique de stérilité décrit par la PE (milieux au thioglycolate (TG) et à l'hydrolysate de caséine et soja (HCS)), puis après variation du milieu de culture (milieu Mueller Hinton (MH)) et enfin, sur les milieux FA Plus et FN Plus de l'équipement BacT/ALERT® 3D 60 pour l'évaluation d'une MMR.

La première concentration de 5-FU sans activité antimicrobienne est de 0,097 mg/mL pour le micro-organisme le plus sensible (*S. aureus*). Sur milieux TG et HCS, l'EF est positif pour *P. aeruginosa* et *C. albicans*, l'EA est positif sur au moins un réplica pour l'ensemble des micro-organismes, excepté *S. aureus*. Sur milieu MH, l'EF est positif pour *P. aeruginosa* et l'EA est positif sur les 3 réplicas de *P. aeruginosa*, *C. albicans* et *A. brasiliensis*. Sur milieux FA Plus et FN Plus, l'EF est positif et l'EA est négatif pour tous les micro-organismes.

Si l'essai de stérilité reste une pratique courante pour un certain nombre de préparations hospitalières, cette étude montre qu'il présente des difficultés dans sa mise en œuvre pour un produit cytotoxique, en raison de son activité antimicrobienne potentielle et de sa dangerosité de manipulation. Face à ces résultats, des études complémentaires ont été initiées et concernent notamment le dénombrement des suspensions microbiennes, les conditions d'incubation et les modalités de décontamination des milieux de culture. Ces points, ainsi que les modes d'inhibition de l'activité antimicrobienne, constituent autant de pistes à explorer et de paramètres à optimiser pour la validation des essais de stérilité classique et alternatif.

Membres du jury :

Président : Monsieur le Professeur Pascal Odou
Assesseurs : Madame le Docteur Sophie Liabeuf
Madame le Docteur Stéphanie Genay
Madame le Docteur Michèle Vasseur