

Titre: Stérilisation des systèmes de délivrance de phages à base de polymères biodégradables
Title: polymères biodégradables

Auteur: Ikram Lamara
Author:

Date: 2019

Type: Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

Référence: Lamara, I. (2019). Stérilisation des systèmes de délivrance de phages à base de polymères biodégradables [Mémoire de maîtrise, Polytechnique Montréal].
Citation: PolyPublie. <https://publications.polymtl.ca/4093/>

Document en libre accès dans PolyPublie

Open Access document in PolyPublie

URL de PolyPublie: <https://publications.polymtl.ca/4093/>
PolyPublie URL:

Directeurs de recherche: L'Hocine Yahia, & Nancy Tawil
Advisors:

Programme: Génie biomédical
Program:

POLYTECHNIQUE MONTRÉAL

affiliée à l'Université de Montréal

**Stérilisation des systèmes de délivrance de phages à base
de polymères biodégradables**

IKRAM LAMARA

Institut de génie biomédical

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de *Maîtrise ès sciences appliquées*

Génie biomédical

Décembre 2019

POLYTECHNIQUE MONTRÉAL

affiliée à l'Université de Montréal

Ce mémoire intitulé :

**Stérilisation des systèmes de délivrance de phages à base
de polymères biodégradables**

présenté par **Ikram LAMARA**

en vue de l'obtention du diplôme de *Maîtrise ès sciences appliquées*

a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de :

Delphine PÉRIÉ-CURNIER, présidente

L'Hocine YAHIA, membre et directeur de recherche

Nancy TAWIL, membre et codirectrice de recherche

George SZATMARI, membre

DÉDICACE

À ma mère, mon père et Imad

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à remercier infiniment Monsieur Abdulla Al Ghurair et « Alghurair foundation for education » de m'avoir donné la chance pour réaliser mon rêve et étudier à Polytechnique Montréal.

Merci à mon directeur de recherche, professeur L'Hocine Yahia de m'avoir donné l'opportunité d'étudier en génie biomédical, et pour son encadrement, son soutien et son apport scientifique durant ma maîtrise de recherche.

Merci à ma co-directrice madame Nancy Tawil de m'avoir accueillie dans l'entreprise Phagelux durant ces deux années, pour son encadrement, son soutien et ses conseils qui m'ont tellement aidé à améliorer la qualité scientifique de mon projet.

J'aimerai remercier particulièrement, Iness Hammami, Eric Habib, Cyndia charfi et toute l'équipe Phagelux, pour leur aide précieux tout au long de mon projet et pour leurs conseils professionnels.

Merci aux membres de jury, Madame Delphine Périé-Curnier (Polytechnique Montréal) et Monsieur George Szatmari (Université de Montréal), de me faire l'honneur d'être membres de jury de ma présentation et corriger mon mémoire.

J'adresse mes remerciements les plus sincères, À Madame Guylaine Larocque, conseillère senior à l'école Polytechnique de Montréal, pour ses conseils, sa gentillesse et son soutien moral.

Je remercie aussi Madame Amal Bennani, agente aux dossiers étudiants, pour son encouragement et ses conseils professionnels.

Merci à ma famille, ma mère, mon père, mes frères et ma sœur qui m'ont toujours encouragé d'aller au bout de mes rêves.

Je souhaite remercier tous mes amis et mes collègues, merci à Hadjer, Faiza, Imen, Sara et Hanane. Merci de m'avoir encouragée et motivée durant mes situations difficiles. Merci pour tous les bons moments que j'ai passés avec vous et votre enthousiasme à toujours m'aider. Je vous aime beaucoup, vous êtes ma deuxième famille.

RÉSUMÉ

Dans le contexte de la résistance bactérienne aux antibiotiques et de la prise de conscience accrue de l'importance du microbiote humain, on assiste à un regain d'intérêt pour l'utilisation potentielle d'une classe de virus appelée bactériophage qui lyse une gamme spécifique de bactéries et qui est non sujette à la résistance bactérienne. Cependant, vu la stabilité limitée des phages dans le corps humain, plusieurs formulations ont été développées afin de surmonter ce problème. Des phages ont été intégrés dans des systèmes polymériques afin d'assurer leur libération contrôlée au site d'infection.

Néanmoins, pour le traitement des infections bactériennes aux sites chirurgicaux ou blessures, la stérilisation de cette classe de biomatériaux est primordiale. Cependant la stérilisation des systèmes polymériques à base des bactériophages reste un défi à cause de la sensibilité des phages aux méthodes de stérilisation conventionnelles (chaleur, rayonnements et agents chimiques) ainsi que leurs effets négatifs sur les polymères.

C'est pourquoi on a évalué dans ce projet trois méthodes de stérilisation : le dioxyde de carbone supercritique (SC-CO₂), les rayons gamma et l'ultraviolet (UV), afin de vérifier la méthode de stérilisation la plus appropriée pour les phages intégrés dans des patchs de PEAU, qui stérilise efficacement les patchs sans altérer l'activité des phages.

Nos résultats ont montré que toutes les méthodes choisies ont bien stérilisé les formulations. Le SC-CO₂ s'est avéré la méthode de stérilisation la plus appropriée pour les patchs, car les phages étaient actifs et stables pendant 18 mois de stockage à 4 °C et aucun changement significatif n'a été observé dans la cinétique de relargage des phages intégrés dans les patchs. Tandis que, les patchs stockés à 26 °C étaient instables et une réduction jusqu'à 2.19 log₁₀ a été notée dans le titre des phages avec un changement dans le profil de libération, en raison de la forte humidité relative et la température élevée pendant le stockage.

Cependant les rayons gamma et l'ultraviolet étaient compromettants pour les phages et ils ont causé des réductions significatives dans le titre des phages, ce qui est non acceptable en termes de dosage des formulations des phages.

ABSTRACT

In the context of bacterial resistance to antibiotics and increased awareness of the importance of the human microbiota, there is renewed interest in the potential use of a class of viruses called bacteriophages that lyse a specific range of bacteria and are not susceptible to bacterial resistance. However, given the limited stability of phages in the human body, several formulations have been developed to overcome this problem. Phages have been integrated into polymeric systems to ensure their sustained release into the infection site.

Nevertheless, for the treatment of bacterial infections at surgical sites or wounds, sterilization of this class of biomaterials is essential. However, the sterilization of polymeric systems based on bacteriophages remains a challenge due to the sensitivity of phages to conventional sterilization methods (heat, radiation and chemical agents) and their negative effects on polymers.

For this reason, three sterilization methods were evaluated in this project: supercritical carbon dioxide (SC-CO₂), gamma rays and ultraviolet light (UV), in order to verify the most appropriate sterilization method for patches loaded with phages, which effectively sterilizes the patches without modifying the activity of the phages.

Our results showed that all the methods used in our study have sterilized the formulations. SC-CO₂ was the most appropriate sterilization method for patches, as the phages were active and stable for 18 months of storage at 4°C and no significant changes were obtained in the release kinetics of the phages embedded in the patches. Although patches stored at 26°C were unstable and a reduction of up to 2.19 log₁₀ was noted in the phage titer with a change in the release profile due to high relative humidity and temperature during storage.

However, gamma and ultraviolet rays have been compromising for phages and have caused significant reductions in phage titer, which is not acceptable in terms of the dosage of phage formulations.

TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACE	III
REMERCIEMENTS	IV
RÉSUMÉ	V
ABSTRACT	VI
TABLE DES MATIÈRES	VII
LISTE DES TABLEAUX	IX
LISTE DES FIGURES	X
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	XI
CHAPITRE 1 INTRODUCTION.....	1
1.1 Contexte de recherche	1
1.2 Objectifs	5
1.2.1 Objectif principal	5
1.2.2 Objectifs secondaires.....	5
1.3 Organisation du présent mémoire	5
CHAPITRE 2 REVUE CRITIQUE DE LA LITTÉRATURE	6
2.1 Bactériophage	6
2.1.1 Contexte historique	6
2.1.2 Premières utilisations de bactériophages.....	7
2.1.3 Définition des bactériophages.....	8
2.1.4 Morphologie et classification des phages.....	9
2.1.5 Cycles de vie des phages et leurs mécanismes d'action.....	10
2.1.6 Avantage de la thérapie aux phages	12
2.1.7 Limitations des bactériophages en tant qu'agent thérapeutique	13
2.2 Stérilisation des formulations à base de bactériophages	15
2.2.1 Définition de la stérilisation.....	15
2.2.2 Méthodes de stérilisation	16
2.2.3 L'effet des méthodes de stérilisation sur les microorganismes	21
2.2.4 Stérilisation de formulations des polymères à base des bactériophages	26

2.3 Conclusion	50
CHAPITRE 3 MÉTHODOLOGIE	52
3.1 Matériels	52
3.2 Méthodes	52
3.2.1 Bactéries et bactériophages	52
3.2.2 Préparation des formulations de phages	53
3.2.3 Stérilisation	54
3.2.4 Caractérisation biologique	55
3.2.5 Test de stérilité	57
3.2.6 Analyses statistiques	58
CHAPITRE 4 RÉSULTATS	59
4.1 Stérilisation par le dioxyde de carbone supercritique	59
4.1.1 Effet de la température de stockage sur l'activité des phages	60
4.1.2 Effet de temps d'exposition au SC-CO ₂ sur la cinétique de relargage des phages	61
4.1.3 Effet de la température de stockage sur la stabilité des patchs	63
4.2 Stérilisation aux rayons gamma	67
4.3 Stérilisation à l'ultraviolet	67
4.4 Stérilisation à l'autoclave	68
CHAPITRE 5 DISCUSSION GÉNÉRALE	69
CHAPITRE 6 CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS	79
RÉFÉRENCES	81

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1 Effets des méthodes de stérilisation sur les microorganismes	22
Tableau 2.2 Effets des méthodes de stérilisation sur les phages	32
Tableau 2.3 Effets des méthodes de stérilisation sur les polymères.	41
Tableau 2.4 Effets des méthodes de stérilisation sur les systèmes polymériques de délivrance des molécules.....	48
Tableau 3.1 Les cycles de la stérilisation à l'autoclave.....	55
Tableau 4.1 Résultats de test de stérilité.....	66
Tableau 4.2 Log ₁₀ de réduction du titre des phages en fonction de la dose d'irradiation gamma. 67	
Tableau 4.3 Log ₁₀ de réduction du titre des phages en fonction de la durée d'exposition aux UV.	68

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 Bactériophage (https://en.wikipedia.org/wiki/Bacteriophage).....	2
Figure 2.1 Bactériophage sous le microscope [25].	7
Figure 2.2 Morphologie de phage [35].....	9
Figure 2.3 Les familles des phages [36].	10
Figure 2.4 Mécanisme d'action des phages lytiques et lysogéniques [37].....	11
Figure 2.5 Diagramme des phases de dioxyde de carbone [56].....	19
Figure 4.1 Effets de la température de stockage sur l'activité des phages piégés dans des patchs non stérilisés stockés à 4 °C (en bleu), stockés à 26 °C (en rouge) et stockés à 37 °C (en vert)..	60
Figure 4.2 Relargage cumulatif des phages à partir des patchs stérilisés et non stérilisés avant le stockage (a), après 18 mois de stockage à 4 °C (b), après 18 mois de stockage à 26 °C (c).	62
Figure 4.3 Effets de la température de stockage sur la stabilité des phages dans des patchs stérilisés pendant 30, 60, 90 et 120 min et non stérilisés (CTRL) stockés à 4 °C (a) et à 26 °C (b) pendant 18 mois.....	64

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

AcOH	Acide acétique
ADN	L'acide désoxyribonucléique
Ar	Argon
ARN	L'acide ribonucléique
C₄H₆O₃	Anhydride acétique
D₁₀	Valeur décimal
DCM	Dichlorométhane
EMEM	Eagle's minimum essential medium
EtO	Oxyde d'éthylène
FCV	Calicivirus félin
FTM	Difco™ Fluid Thioglycollate Medium
HA	Hydroxyapatite
HADV	Adénovirus humain
H₂CO₃	Acide carbonique
HIV	Virus de l'immunodéficience humaine
HNO₃	Acide nitrique
HR	Humidité relative

ISO	Organisation internationale de normalisation
KGy	KiloGray
LGC	Poly (L-lactide-co-glycolide-co- ϵ caprolactone)
LGT	Poly (L-lactide-co-glycolide-co-trimethylene carbonate)
Log₁₀	Logarithme décimal
M_n	Poids molaire en nombre
MNV	Norovirus Murin
MPa	MégaPascal
MRS	Man, Rogosa et Sharpe
M_w	Poids molaire en masse
PAA	Acide peracétique
PCL	Poly (ϵ -caprolactone)
PEAU	Poly ester amide urea
PEG	Polyéthylène glycol
PFU	Plaque forming unit
PLA	Poly lactic acid
PLDLLA	Poly (L,DL-lactide)
PLGA	Poly (lactic-co-glycolic acid)

PVA	Alcool polyvinyle
SAL	Sterility assurance level
SC-CO₂	Dioxyde de carbone supercritique
SPK	<i>Staphylococcus Pseudomonas Klebsiella</i>
T_f	Température de fusion
T_g	Température de transition vitreuse
TMG	Tris Magnesium Gelatin
TMN	Tris-MgCl ₂ -NaCl
TSB	Trypic Soy Broth
USP	Pharmacopée américaine
UV	Ultraviolet
V/V	Volume/volume
W	Watt
W/V	Poids/volume
λ	Longueur d'onde

CHAPITRE 1 INTRODUCTION

1.1 Contexte de recherche

La résistance bactérienne aux antibiotiques est une menace grave pour la santé humaine dans le monde entier. Le taux actuel de développement de la résistance dépasse de loin le niveau de découverte et de développement des antibiotiques et représente un défi de santé publique mondial [1,3].

Selon les estimations, plus de 10 millions de personnes pourraient mourir chaque année suite à des infections bactériennes d'ici 2050. Bien qu'il s'agisse d'un chiffre controversé, il souligne néanmoins le grave problème auquel nous sommes confrontés en ce qui concerne les options thérapeutiques pour les infections bactériennes multirésistantes [2].

La résistance bactérienne aux antibiotiques peut se produire selon plusieurs phénomènes ; dans les bactéries, les gènes peuvent être hérités ou peuvent être acquis à partir des éléments génétiques mobiles tels que les plasmides. Ce transfert de gène horizontal peut permettre le transfert de la résistance aux antibiotiques entre différentes espèces de bactéries [4].

La résistance peut également se produire par mutation génétique, qui est définie comme des changements soudains dans le matériel génétique susceptibles d'induire la synthèse d'une protéine présentant un défaut (structure et fonction biologique anormale), ces mutations sont transmissibles aux descendants (transmission verticale) et définitives et elles peuvent apparaître spontanément dans des conditions considérées comme normales (naturelles), ou bien suite à des agents mutagènes tels que les radiations ou agents chimiques nocifs (agents alkyles analogues aux bases azotées) [5].

Ces bactéries résistantes deviendront par la suite la population bactérienne la plus dominante, car les antibiotiques éliminent les bactéries sensibles aux médicaments, laissant les bactéries résistantes à se reproduire grâce à la sélection naturelle [4].

Plusieurs facteurs peuvent causer la résistance bactérienne aux antibiotiques, les plus importants sont l'utilisation excessive des antibiotiques à cause de l'absence de réglementation dans certains pays, à titre d'exemple l'utilisation des antibiotiques pour le traitement des infections virales. Cette

absence de réglementation se traduit par des antibiotiques facilement accessibles, abondants et peu coûteux, ce qui favorise la surconsommation. Ainsi, dans certains cas l'indication de traitement, le choix de l'agent ou la durée de l'antibiothérapie étaient incorrects [4, 6].

De plus, l'industrie pharmaceutique se retire de la recherche et du développement de nouveaux antibiotiques en raison du caractère non rentable de l'entreprise et des risques de développement de résistance chez les bactéries [7].

En raison de ce problème, le monde pourrait se diriger vers une époque post-antibiotique dans laquelle les infections courantes deviennent fatales et les interventions chirurgicales courantes deviennent impossibles. De nouvelles initiatives pour s'attaquer au problème de la résistance aux antibiotiques sont nécessaires en urgence, telles que les approches antibactériennes inspirées par les bactériophages [1, 8].

Les bactériophages (phages) sont des virus avec un génome d'ADN ou d'ARN encapsulé dans une capsid protéique qui est parfois complétée par une queue, capables d'infecter et de tuer les bactéries. Les phages sont les ennemis naturels des bactéries et sont présents dans tous les écosystèmes de la terre, ayant un impact énorme sur les communautés microbiennes. Les phages sont capables d'insérer leur propre ADN ou un ADN étranger dans les cellules bactériennes, ajoutant des gènes aux génomes bactériens [9].

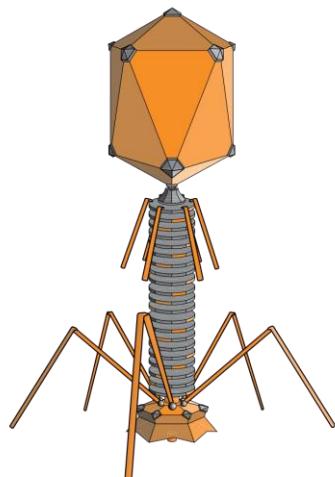


Figure 1.1 Bactériophage (<https://en.wikipedia.org/wiki/Bacteriophage>).

L'utilisation des bactériophages dans le traitement antimicrobien est basée sur leur capacité à reconnaître, s'adsorber et se multiplier seulement dans la cellule bactérienne et à provoquer sa lyse. La thérapie par les phages est définie comme l'utilisation de virus bactériens spécifiques pour combattre les bactéries pathogènes qui causent des infections. Les bactériophages sont habituellement très spécifiques et peuvent être actifs contre les bactéries Gram positif et Gram négatif résistantes aux antibiotiques [7].

Les avantages fondamentaux des systèmes bactériophages comprennent leur facilité d'utilisation et de développement, leur haute spécificité vis-à-vis l'hôte bactérienne qui leur permet l'infection ciblée des bactéries spécifiques avec des effets minimaux sur la flore microbienne bénéfique [10]. En plus de leur dosage automatique qui est avantageux pour les sites d'infection inaccessibles, par exemple les biofilms bactériens [11,13].

Cependant, les concentrations des phages peuvent se désintégrer de façon significative en raison de l'élimination des phages par le système immunitaire de l'hôte ou par d'autres mécanismes (par ex. réduction du temps de transit intestinal pendant la diarrhée). En outre, les phages sont incapables de s'amplifier et d'atteindre une concentration suffisamment élevée si la concentration de bactéries dans le site d'infection est faible. Ce qui permet à ces bactéries infectantes d'avoir le temps de se multiplier en grand nombre, surtout celles résistantes qui deviennent rapidement la population dominante. Cela entraîne par la suite des résultats médiocres pour la thérapie par les phages [14, 15].

D'où la nécessité d'une stratégie de libération contrôlée et fréquente des phages qui peut aider à s'assurer que la concentration des phages *in situ* demeure à un niveau thérapeutique efficace (sur une période de temps réaliste) permettant aux phages de s'amplifier une fois que la concentration bactérienne augmente à des niveaux suffisants pour une amplification *in situ* [15].

Pour cela, il existe plusieurs stratégies de délivrance de phages qui permettent une libération ciblée et contrôlée, telles que l'encapsulation des phages dans des polymères, des liposomes ou dans l'alginate, l'électrofilage dans des polymères biodégradables ou récemment le piégeage des phages dans des colles telles que la fibrine [16].

Cependant, les polymères biodégradables sont généralement les biomatériaux les plus utilisés pour l'administration ciblée des phages à condition qu'ils soient compatibles avec les systèmes de l'organisme. Une fois au site d'infection, le matériel d'administration doit être capable de résister

à la fois à la chimie normale de l'organisme et à la chimie de la réponse immunitaire déclenchée et ne soit pas altéré par le changement de la température et du pH de milieu [17].

De plus, ces polymères et leurs produits de dégradation doivent être inertes vis-à-vis du corps humain et ne provoquent pas de réaction inflammatoire ou de toxicité, leur vitesse de biodégradation doit être cohérente avec le processus de guérison, les propriétés mécaniques du polymère doivent être adaptées à l'application, ainsi que les changements en cas de dégradation, en plus d'avoir une durée de conservation acceptable et être facilement stérilisables [18].

Tous ces critères ont été bien pris en considération et appliqués par Phagelux afin de produire leur polymère biodégradable à base d'acides aminés qui, contrairement aux autres polymères largement utilisés, a un module de Young élevé et se dégrade facilement sans provoquer un environnement acide local qui cause par la suite une inflammation [19].

En plus de ces critères, la stérilisation des polymères pour leurs applications dans des sites d'infections chirurgicaux ou de blessures qui sont déjà colonisés par des bactéries est primordiale afin d'éviter la reproduction d'une nouvelle infection microbienne causée par un polymère non ou mal stérilisé.

Toutefois, puisque la stérilisation peut affecter les propriétés du polymère, il est essentiel de contrôler que la procédure de stérilisation choisie n'affecte pas la structure du polymère, les propriétés mécaniques ou la biodégradabilité. Les propriétés appropriées doivent être maintenues pendant le processus de biodégradabilité.

De plus, étant donné que les bactériophages sont des structures protéiques qui contiennent un matériel génétique très sensible aux méthodes de stérilisation que ce soit par radiations, chaleur ou agents chimiques ; il est très important de s'assurer que l'activité lytique et la stabilité des bactériophages dans le dispositif médical ne sont pas affectées par la stérilisation et qu'il reste suffisamment de concentration pour avoir l'activité phagique et l'effet thérapeutique antibactérien souhaité.

D'autre part, il faut s'assurer que la méthode de stérilisation a bien stérilisé non seulement la surface de polymère, mais le polymère au complet, afin que ce dernier et ses produits de dégradation soient bien stériles et ne causeront aucune infection bactérienne.

C'est alors, le choix de la meilleure méthode de stérilisation qui élimine la contamination dans ces biomatériaux sans affecter les phages reste un problème industriel non résolu.

1.2 Objectifs

1.2.1 Objectif principal

L'objectif principal de ce projet est de développer une technique de stérilisation des systèmes polymères-phages qui soit efficace et sécuritaire à long terme.

1.2.2 Objectifs secondaires

- Évaluer l'effet des rayons gamma, ultraviolet et dioxyde de carbone supercritique sur l'activité des phages.
- Étudier l'effet de dioxyde de carbone supercritique sur la cinétique de relargage des phages avant et après un an et demi de stockage.
- Étudier l'effet de la température de stockage sur la stabilité des films de bactériophages stérilisés et non stérilisés par le dioxyde de carbone supercritique.
- Évaluer l'effet des rayons gamma, l'ultraviolet et le dioxyde de carbone supercritique sur la stérilité des formulations des phages.

1.3 Organisation du présent mémoire

Ce mémoire est organisé en six chapitres, le premier chapitre est la présente introduction générale, le deuxième chapitre présente une introduction sur les bactériophages ainsi qu'une revue critique de littérature, où on a cité et discuté les travaux réalisés sur l'effet de différentes méthodes de stérilisation sur les bactéries (spores et végétatives), les champignons, les virus et les phages, en plus de leurs effets sur les polymères biodégradables incluant ceux utilisés comme système de délivrance des médicaments.

Le troisième chapitre présente les matériels utilisés et les méthodologies mises au point pour réaliser le projet, suivi par le chapitre quatre, où on a présenté les résultats obtenus sous forme des graphiques et tableaux, puis on les a interprétés dans le cinquième chapitre.

Finalement, on a clôturé par une conclusion qui englobe les points essentiels tirés de ce projet ainsi que les recommandations et les perspectives pour les prochains travaux.

CHAPITRE 2 REVUE CRITIQUE DE LA LITTÉRATURE

2.1 Bactériophage

2.1.1 Contexte historique

L'histoire de la découverte de bactériophages remonte à 1896, où le bactériologue britannique Ernest Hanbury Hankin démontre que les eaux des rivières indiennes contenaient un principe biologique qui détruisait les cultures bactériennes et que cette substance pouvait passer à travers des filtres millipores, connus pour pouvoir retenir des microorganismes plus gros tels que des bactéries [20].

Des années après et exactement en 1915, alors qu'il étudiait la croissance du virus de la vaccine sur des plaques de gélose sans cellules, le microbiologiste britannique Frederick Twort, nota que des cultures « pures » de bactéries pouvaient être associées à un matériau transparent filtrant, capable de détruire complètement les bactéries. Cet « agent filtrable » a été mis en évidence dans des cultures de microcoques isolés de la vaccine, le matériel de certaines colonies qui ne pouvait pas être sous-cultivé était capable d'infecter une nouvelle croissance de microcoque, et cette condition pouvait être transmise à des nouvelles cultures du microorganisme [8, 21].

Ce matériau transparent, qui s'est avéré incapable de se développer en l'absence de bactéries, a été décrit par Twort comme un ferment sécrété par le microorganisme, et il a proposé trois explications possibles à cet étrange phénomène : il peut s'agir d'une manifestation inhabituelle du cycle de vie bactérien, ou d'une enzyme produite par la bactérie elle-même ou plus radicalement, d'une sorte de « virus ultra-microscopique ». Incapable de confirmer ou de rejeter l'une de ces hypothèses avec les ressources à sa disposition et il a abandonné ces expériences [21, 22].

À cette époque, Twort ne pouvait pas imaginer à quel point son « matériau transparent » deviendrait important. Deux ans plus tard, le microbiologiste franco-canadien Felix d'Herelle a indépendamment décrit un résultat expérimental similaire, mais contrairement à Twort, plus prudent, d'Herelle fut immédiatement convaincu d'avoir découvert un nouveau type de virus infectant les bactéries, surnommé un bactériophage [8, 22, 23]. Il a isolé à partir des selles de patients atteints de shigellose en convalescence un soi-disant « microbe anti-Shiga » en filtrant les selles qui ont été incubées pendant 18 h, ce filtrat actif, ajouté à une culture ou à une émulsion de

bacilles de Shiga, était capable de provoquer l'arrêt de la culture, la mort et enfin la lyse des bacilles. D'Herelle a décrit sa découverte comme un microbe qui était un « véritable » microbe d'immunité et un bactériophage obligatoire. Il a également démontré l'activité de ce microbe anti-Shiga en inoculant des animaux de laboratoire à un traitement de la shigellose, semblant confirmer la signification clinique de sa découverte en satisfaisant au moins certains des postulats de Koch [8, 21, 24].

L'invention du microscope électronique a permis à Helmut Ruska, un médecin allemand, de décrire d'abord les particules rondes ainsi que les particules en forme de sperme d'une suspension de phage adhérant à une membrane bactérienne (figure 2.1) [21].



Figure 2.1 Bactériophage sous le microscope [25].

2.1.2 Premières utilisations de bactériophages

La recherche sur les bactériophages a été portée sur un certain nombre de phages modèles pour l'étude des virus et de leurs cycles de réplication. Ces études ont largement contribué aux progrès de la biologie moléculaire moderne, par exemple des phages ont été utilisés pour identifier les bases du matériel génétique, et que trois nucléotides codent pour un acide aminé. Ils ont également permis l'identification des enzymes de restriction [21, 26].

Les bactériophages ont également joué un rôle crucial dans le développement du génie génétique et de la biotechnologie. En fait, les premiers vecteurs de clonage étaient basés sur des

bactériophages et les systèmes couramment utilisés pour l'expression génique contrôlée et la recombinaison génétique contiennent des gènes et des séquences régulatrices dérivées des génomes de bactériophages. Il convient de souligner que deux découvertes décisives en biotechnologie ont permis l'identification des enzymes de restriction et de « courtes répétitions palindromiques groupées et régulièrement espacées » (CRISPR) sont strictement liées aux mécanismes d'interaction entre les bactériophages et leurs hôtes [27].

De plus, le premier génome séquencé était celui d'un phage d'*Escherichia coli* : Φ X174. Pendant quelques années, l'intérêt pour les phages s'est limité aux études écologiques et aux propositions concernant leur utilisation en tant qu'indicateurs de la pollution fécale [26].

En dépit de cette passion précoce pour les préparations de bactériophages, la découverte d'antibiotiques a entraîné le rejet des bactériophages en tant qu'agent thérapeutique aux États-Unis et en Europe, principalement en raison de la facilité relative par laquelle les antibiotiques pouvaient être administrés et le manque de fiabilité et les résultats incohérents de nombreux essais de traitement par phages [3, 21, 28].

Alors que la recherche sur les phages n'a jamais été abandonnée dans l'ex-URSS en Géorgie et dans d'autres pays tels que la Pologne (et son célèbre institut Hirsfeld à Wroclaw), la littérature anglaise a redécouvert la thérapie chez les animaux dans les années 1980 et les expériences sur l'homme ont commencé dans les années 2000, avec la publication du premier essai randomisé de phase I aux États-Unis en 2009 [21].

Mais aujourd'hui, il est admis que l'échec est principalement dû à une mauvaise compréhension de la biologie des phages et à d'autres problèmes tels que le contrôle de la qualité lors de la préparation des stocks thérapeutiques [28].

2.1.3 Définition des bactériophages

Les bactériophages (ou phages) sont les microorganismes les plus abondants et les plus diversifiés sur terre [29]. On estime que le nombre total de particules de phage est de l'ordre de 10^{31} , soit 10 fois plus que le nombre estimé de cellules bactériennes sur terre [30, 31].

Les phages peuvent être trouvés dans tous les réservoirs peuplés par des hôtes bactériens, par exemple, dans le sol, les océans et les eaux douces, la rhizosphère, les plantes et les aliments, dans

les fermentations industrielles, à l'extérieur et dans les cavités corporelles de l'homme et des animaux et même dans l'intestin humain [15, 32, 33].

Comme tous les virus, les phages sont des parasites intracellulaires obligatoires [29], ils doivent parasiter les cellules hôtes, dans ce cas les bactéries, pour se répliquer. Dans l'environnement extracellulaire, ils existent sous forme de structures supramoléculaires appelées virions. Celles-ci sont optimisées pour assurer la propagation virale en protégeant le génome du phage et en favorisant son administration efficace aux bactéries hôtes [31].

2.1.4 Morphologie et classification des phages

Les particules de bactériophage présentent une structure tridimensionnelle bien définie, la grande majorité présentant une capsidé protéique icosaédrique renfermant le matériel génétique (ADN/ARN) dans son noyau, une gaine contractile en spirale (entourant un tube central) et habituellement, six fibres de queue connectées à une plaque de base contenant les protéines de liaison au récepteur responsables de la reconnaissance de molécules spécifiques à la surface de la membrane bactérienne (figure 2.2) [9, 29, 34].

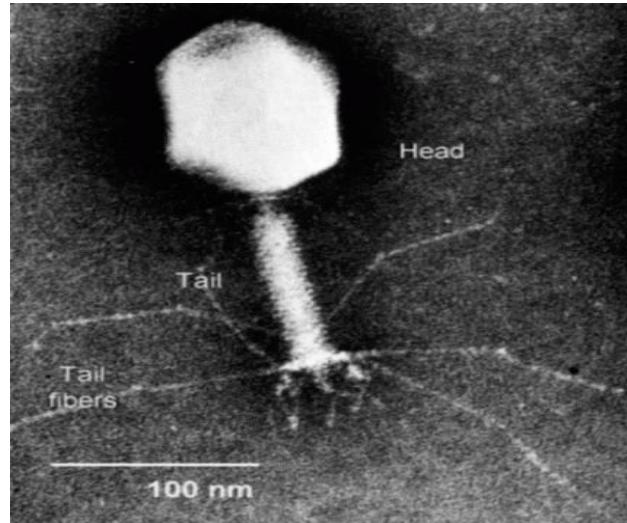


Figure 2.2 Morphologie de phage [35].

Selon la classification de <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>, en 2017, il existait 19 familles de phages qui infectent les bactéries. Plus de 90 % des quelque 6200 phages examinés par microscopie électronique sont des phages à queue dans l'ordre de *Caudovirales* (c.-à-d. Siphophages,

myophages et podophages) (figure 2.3). Cependant, le nombre de famille de phages peut augmenter dans le futur puisque le séquençage des nouveaux ADN est en train de croître [33].

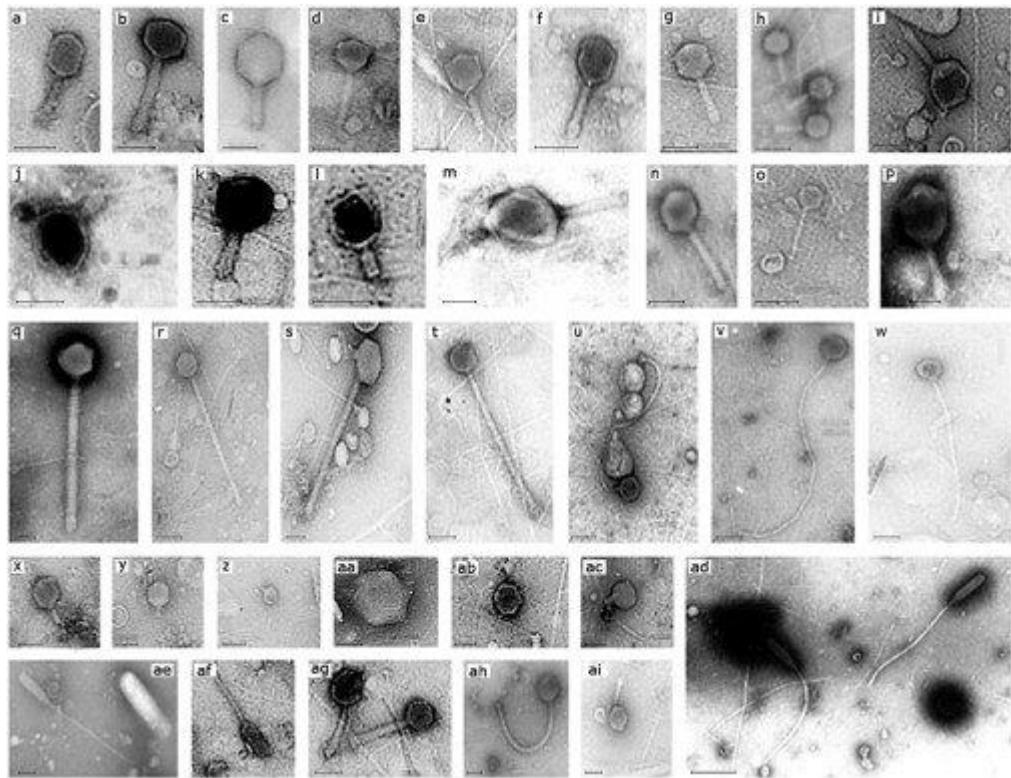


Figure 2.3 Les familles des phages [36].

2.1.5 Cycles de vie des phages et leurs mécanismes d'action

Afin de comprendre le rôle des phages dans la nature, il est nécessaire de comprendre leurs interactions possibles avec leurs hôtes. Les phages ont plusieurs cycles de vie possibles qui sont combinés à une interaction avec leur environnement physique, dictent leur rôle dans la biologie bactérienne [3].

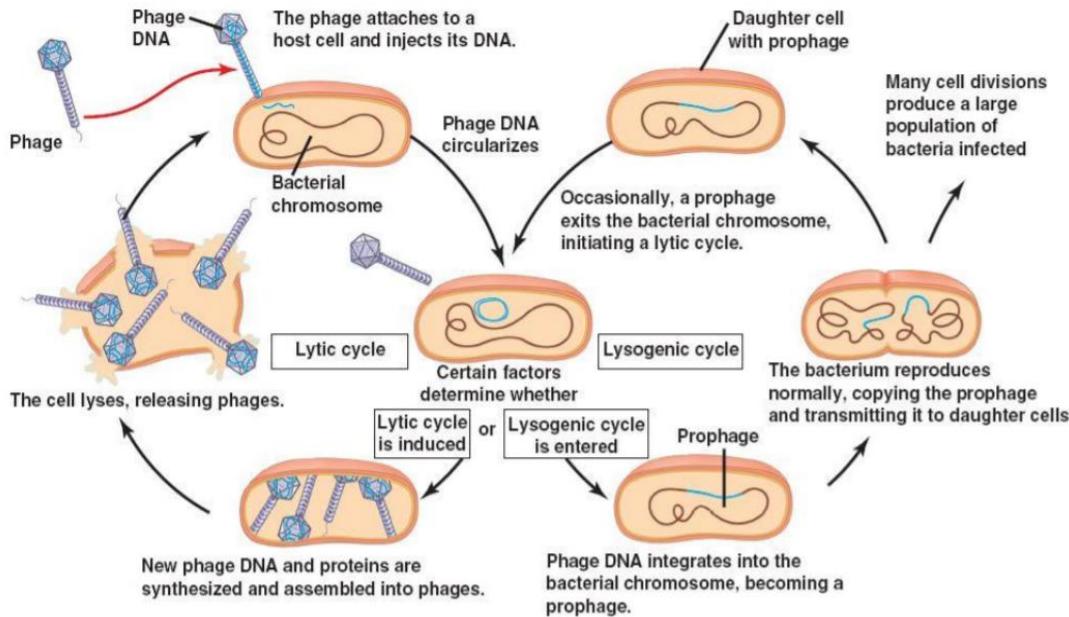


Figure 2.4 Mécanisme d'action des phages lytiques et lysogéniques [37].

Le mécanisme d'action des phages lytiques en tant que prédateurs bactériens (cycle lytique) comprend plusieurs étapes cruciales permettant de déterminer une capacité spécifique de destruction des bactéries (figure 2.4) [3, 9, 38].

Le processus d'attachement d'un bactériophage à sa cellule hôte est une combinaison de diffusion physique, des interactions biochimiques de surface, et de la réaction induite par des changements conformationnels dans des protéines de récepteur. Les variations locales des propriétés physico-chimiques du milieu, du mode d'action du phage et de la physiologie de la cellule hôte ont également une influence sur la cinétique d'adsorption. Ces caractéristiques peuvent affecter les capacités de liaison d'un phage spécifique et la susceptibilité de la cellule hôte à une attaque par le phage [39].

- **Adsorption à un récepteur spécifique :** La fixation des phages à une cellule hôte est un processus très spécifique impliquant des récepteurs complémentaires à la surface d'une cellule hôte susceptible et d'un phage infectant. Il existe plusieurs types de récepteurs distingués certains se trouvent sur la surface de la cellule bactérienne, notamment le lipopolysaccharide (LPS), le peptidoglycane, les acides teichoïques ou les protéines de la membrane externe, les oligosaccharides, les capsules.. etc [32].

- **Injection de l'acide nucléique (ADN/ARN)** : Pour initier une infection, les phages doivent perforer chirurgicalement les différentes structures bactériennes afin de ne délivrer que le matériel génétique, et éventuellement quelques protéines dans la cellule hôte [29]. L'acide nucléique des phages lytiques est transféré dans la cellule après dégradation du peptidoglycane (activité du lysozyme du phage) et formation de pores dans la paroi de la cellule bactérienne.
- **Réorientation du métabolisme de l'hôte vers la réPLICATION de l'ADN/ARN du phage et la synthèse de ses protéines** : Après la pénétration de l'acide nucléique dans le cytoplasme, l'expression des gènes précoceS du phage redirige le mécanisme de synthèse de l'hôte bactérienne vers la reproduction de l'acide nucléique viral et des protéines.
- **Maturation des phages** : Assemblage et emballage des particules de phage.
- **Lyse de cellules bactériennes et libération de descendants de phages** : Les protéines de phage tardives, notamment les lysines, les holines ou les inhibiteurs de la synthèse de la muréine, sont responsables de la lyse massive des cellules hôtes afin d'évacuer les particules virales nouvellement formées à la fin de l'infection [29].

En revanche, le cycle de vie lysogène des phages consiste à insérer leur ADN dans la cellule hôte (maintenant appelé « prophage »), sous forme de plasmide libre ou intégré au chromosome, similaire aux rétrovirus humains, tels que le VIH (figure 2.4). Ce cycle de vie lysogène peut être stable pendant des milliers de générations et le bactériophage peut modifier le phénotype de la bactérie en exprimant des gènes qui ne sont pas exprimés au cours de l'infection dans un processus connu sous le nom de conversion lysogène [3, 9, 21].

Il existe d'autres cycles de vie, comme le cycle pseudo-lipogénique ; où le phage ne s'intègre pas de manière stable avec la bactérie, mais reste dans ce « mode » jusqu'à ce que les conditions qui le poussent à entrer dans le cycle de vie lytique ou lysogène se produisent. L'autre cycle s'appelle le cycle chronique, où les phages sont lentement éliminés de la cellule bactérienne sur une longue période sans mort cellulaire évidente [3].

2.1.6 Avantage de la thérapie aux phages

Les phages ont été recommandés comme de bons candidats pour le traitement antibactérien parce qu'ils possèdent plusieurs avantages. L'infection des phages est irréversible contrairement à

certains antibiotiques, et les bactéries seront incapables de retrouver leur viabilité par la suite [12]. De plus, le dosage des phages est autorégulé car au cours de processus d'infection des bactéries, les phages s'autoamplifient *in situ*, augmentant ainsi leur dose à chaque contact avec leurs bactéries spécifique (hôte). Cette amplification de dose est cependant fortement dépendante sur la concentration à la fois du phage et des bactéries en croissance active, rend par la suite le traitement par les phages très avantageux pour les sites d'infection difficile d'accès, par exemple les biofilms bactériens [12, 13, 15].

D'autre part, les phages sont très spécifiques ; toutes les bactéries ne sont pas infectées par tous les phages et la plupart des phages ne peuvent infecter qu'un sous-ensemble d'espèces bactériennes. Cette haute spécificité vis-à-vis l'hôte contrairement aux antibiotiques à large spectre, permet aux phages d'induire un impact minimal sur le microbiote naturel bénéfique [10, 12, 13].

L'affinité des phages est souvent élevée, produisant une adsorption rapide sur leur hôte (au moins dans des conditions de laboratoire). De plus, les phages étant omniprésents, les humains y sont constamment exposés. À ce jour, cette exposition n'a pas été corrélée à des préoccupations en matière de sécurité, comme le confirment plusieurs études de sécurité [40].

Néanmoins, les phages possèdent certains inconvénients et limitations tels que leur stabilité partielle, la réduction de leur dosage à cause du système immunitaire et la clairance et d'autres limitations bien détaillées dans la prochaine section.

2.1.7 Limitations des bactériophages en tant qu'agent thérapeutique

L'utilisation clinique des phages présente certaines limitations. Les bactériophages ne sont comme la plupart des autres structures protéiques, que partiellement stables en solution. Le stockage à long terme de bactériophages reste un défi. En raison de l'instabilité structurelle du virion, les préparations de phages ne peuvent souvent pas être stockées sans refroidissement, cela limite les possibilités d'application et de transport du traitement par bactériophage, ainsi que la durée de conservation des traitements développés à base de phages [40].

L'apparition de la résistance bactérienne contre les phages est potentiellement possible, car les bactéries possèdent ou peuvent développer plusieurs mécanismes pour prévenir les infections par les phages. Parmi ces mécanismes figurent la dissimulation, le changement ou la perte des récepteurs, la sécrétion des substances qui empêchent l'adhésion des phages à la surface des

bactéries, l'activation des mesures pour bloquer l'injection de l'acide nucléique de phage dans la cellule et l'inhibition de la réPLICATION et de la libération des phages [14].

Cependant, ce problème peut être surmonté par l'utilisation d'un certain nombre de souches de phages qui se lient à différents récepteurs, tuant ainsi les bactéries mutantes plutôt que des préparations monophages. L'utilisation d'un cocktail de différentes souches de phages avec des titres élevés ou l'association des antibiotiques nécessite une formulation soignée des phages afin de conserver leur stabilité, de tel sorte que des phages viables à une concentration suffisamment élevée soient présents au moment de l'utilisation. Pour éviter ce problème, on a utilisé un cocktail de phages dans notre projet avec un titre initial élevé (10^9 PFU/ml) [14, 15].

Cependant, même si la concentration des phages *in vivo* est élevée, elle peut être réduite à cause de plusieurs facteurs. Les bactériophages et leurs produits peuvent être reconnus comme des auto-antigènes par le système immunitaire ou dans certains cas une réduction de titre peut avoir lieu à cause des mécanismes de clairance. De plus, le pH acide de tractus gastrique peut aussi affecter la viabilité des phages s'ils sont administrés par voie orale [14, 41]

Pour ce fait et afin d'éviter l'administration des doses répétées de phages pour garder une dose suffisante qui assure l'effet thérapeutique, certaines approches de la libération prolongée des phages ont été mises en place afin de garantir le succès du traitement par les phages. Par exemple, les véhicules de délivrance qui peuvent piéger les phages sous forme viable et les libérer de manière contrôlée, telle que l'encapsulation dans des systèmes de chitosane-alginate- CaCl_2 [41], dans des polymères de PLGA[42], dans des liposomes [43], l'électrofilage des phages dans l'oxyde de polyéthylène, ou plus récemment le piégeage des phages dans des colles de fibrine [16], pour délivrer les phages aux sites d'infection inaccessibles comme les implants et les blessures profondes.

Dans notre projet, un polymère de Poly (ester amide urea) est obtenu par une réaction de polycondensation d'un monomère diester composé de L-phénylalanine et de 1,6 hexanediol. Ce monomère est ensuite combiné avec un diacide, un activateur (et éventuellement un autre diol), pour obtenir un poly (ester amide urea) ou un poly (ester amide urethane), selon la présence du diol.

Ce polymère possède plusieurs caractéristiques ; d'abord la polycondensation se fait sans l'ajout d'aucun catalyseur毒ique et le polymère produit présente une hydrophilicité élevée, ce qui améliore la compatibilité de polymère avec les cellules et les tissus. De plus, le poly (ester amide urea) a un équilibre hydrophobicité/hydrophilicité variable convenable pour les systèmes d'administration de médicaments et la libération contrôlée.

En outre, ce polymère a un module de Young (module d'élasticité) allant jusqu'à $6,1 \pm 1,1$ GPa, ce qui est considérablement plus élevé que les modules d'autres polyesters commerciaux largement utilisés, et une élasticité souhaitable pour le pansement des blessures. La biodégradation des polymères à base d'acides aminés ne provoque pas d'environnement acide local et ne cause pas une l'inflammation par la suite [19].

2.2 Stérilisation des formulations à base de bactériophages

2.2.1 Définition de la stérilisation

La stérilisation est l'élimination complète ou la destruction de toutes les formes de vie microbienne, y compris les endospores bactériennes très résistantes. Dans le domaine médical, la stérilisation des dispositifs médicaux est réalisée par l'utilisation des procédés physiques ou chimiques qui détruit toutes les formes de vie microbienne [44, 45].

L'efficacité d'un procédé de stérilisation est mesurée par la probabilité de stérilité de chaque produit stérilisé (le niveau d'assurance de stérilité ou SAL) [45]. SAL décrit la probabilité qu'une seule unité de produit ne soit pas stérile. Généralement les procédés de stérilisation utilisés par les fabricants d'instruments médicaux sont conçus pour obtenir un SAL de 10^6 (une dose non stérile parmi 10^6) et en même temps, pour maintenir la sécurité et la fonction essentielle des instruments médicaux pour les applications prévues. Cependant, pour certains instruments médicaux biologiques, la FDA considère un SAL de 10^3 comme un niveau de stérilité adéquat car les procédés de stérilisation rigoureux peuvent nuire au fonctionnement des instruments biomédicaux (par exemple, les tissus biologiques à mailles et les tissus fabriqués) [45, 46].

2.2.2 Méthodes de stérilisation

Il existe de nombreuses méthodes de stérilisation selon le but de la stérilisation et le matériel qui sera stérilisé. Le choix de la méthode de stérilisation change en fonction des matériaux et des dispositifs afin de ne pas nuire à leurs caractéristiques. Ces méthodes de stérilisation se divisent en deux catégories selon le type de stérilisant utilisé.

Les méthodes physiques comprennent : la stérilisation à la chaleur sèche, la stérilisation à la vapeur sous pression, la filtration et les radiations telles que les rayons gamma, l'ultraviolet et le faisceau d'électrons. Les méthodes chimiques comprennent : la stérilisation à l'oxyde d'éthylène (EtO), la stérilisation au formaldéhyde, la stérilisation au glutaraldéhyde, la stérilisation à l'acide peracétique, la stérilisation au plasma gazeux et plus récemment la stérilisation par le dioxyde de carbone supercritique [45, 47].

Cependant, dans la prochaine section, on va citer les méthodes de stérilisation les plus communes dans le domaine des biomatériaux.

2.2.2.1 Stérilisation par la chaleur

- **Chaleur humide (autoclave)**

La chaleur humide sous forme de vapeur saturée sous pression est la méthode la plus ancienne et la plus utilisée pour stériliser les solutions et les instruments chirurgicaux. L'inactivation de microorganismes se fait par la destruction des composants métaboliques et structuraux essentiels à la réplication à travers des événements mortels tels que la coagulation, la dénaturation irréversible des enzymes et la destruction des protéines structurales et des complexes lipidiques et des endotoxines bactériennes.

Les deux températures courantes de stérilisation à la vapeur sont 121 et 132 °C. À température constante, les temps de stérilisation peuvent varier selon la nature (par ex., porosité) du matériau, le matériau d'emballage et le type de stérilisateur utilisé, mais généralement, le processus dure de 15 à 30 minutes après que toutes les surfaces du produit ont atteint une température d'au moins 121 °C [45, 48].

La chaleur humide est couramment utilisée pour la stérilisation des matériaux stables à la chaleur et à l'humidité par lesquels la vapeur peut pénétrer, comme les implants en acier inoxydable et les instruments chirurgicaux. Cependant, elle ne convient pas aux biomatériaux thermosensibles à

l'humidité, tels que les polymères dégradables et la matrice de collagène biologique, puisque l'humidité peut provoquer la dégradation et l'hydrolyse de nombreux polymères de ces biomatériaux [45, 48, 49].

- **Chaleur sèche**

La chaleur sèche est une ancienne forme de conservation ou d'inactivation des microorganismes. Elle n'est utilisée que pour les matériaux qui ne peuvent pas être stérilisés à la vapeur ou, dans le cas de certains récipients en verre, lorsqu'il n'est pas souhaitable d'utiliser la vapeur. Elle a été utilisée dans l'industrie pharmaceutique dans le cadre du traitement aseptique, les hôpitaux et la technologie spatiale [50].

La stérilisation par chaleur sèche nécessite des temps d'exposition plus longs que la stérilisation à la vapeur à la même température. Pour tuer les spores résistantes par la chaleur sèche, il faut habituellement une température d'environ 160 °C pendant 2 h. En général, les relations température-temps sont 170 °C pour 60 min, 160 °C pour 120 min, 150 °C pour 150 min [48].

L'oxydation et la déshydratation des constituants cellulaires sont considérées comme les principaux processus d'inactivation des microorganismes, lors de la stérilisation à la chaleur sèche. La destruction des endotoxines bactériennes est également considérée comme un facteur létal important [48].

La stérilisation par la chaleur sèche convient aux matériaux thermorésistants, comme les implants métalliques qui pourraient être endommagés ou corrodés par la chaleur humide, ou pour ceux qui sont impénétrables à la chaleur humide [45, 49, 50].

- **Ultraviolet (UV)**

L'irradiation (UV) est utilisée pour contrôler les microorganismes en suspension dans l'air et la décontamination des surfaces pour l'environnement de production et de traitement des biomatériaux. Une application de cette méthode, est le contrôle partiel de la contamination dans les enceintes de sécurité biologique par des sources UV avec une longueur d'onde de 260 nm et un système de flux d'air forcé/filtration [45, 51].

L'activité sporicide et virucide intensive de l'irradiation ultraviolette (UV) le rend applicable pour la stérilisation. Les acides nucléiques présents dans les microbes absorbent le rayonnement UV, ceci provoque la formation de dimères de type cyclobutane entre les résidus Thymine de l'ADN et

les dimères similaires entre les résidus cytosines et thymine-cytosine. Ces dimères stables et irréversiblement liés empêchent les processus de réplication et de transcription, entraînant ainsi la mort des microorganismes [48].

- **Rayons gamma**

L'irradiation gamma est la méthode de stérilisation standard à basse température depuis plus d'un demi-siècle [45, 47]. Il s'agit d'une stérilisation sûre et économique pour une large gamme de produits médicaux (par ex. tissus pour transplantation, produits pharmaceutiques, dispositifs médicaux, équipements médicaux jetables) et les substances actives ainsi que pour les systèmes d'administration de médicaments [52].

Les rayons gamma sont des photons à haute énergie émis par une source de cobalt 60 (^{60}Co) et n'ont ni masse ni charge. Les longueurs d'onde des rayons gamma sont inférieures à 10^{-10} m, avec des fréquences supérieures à 10^{18} Hz et des énergies au niveau de 100 kV [45].

Pendant la stérilisation, les rayons gamma éliminent efficacement les microorganismes des dispositifs médicaux et des allogreffes de tissus, en attaquant la molécule d'ADN par des mécanismes directs et indirects [45, 47].

La stérilisation par les rayons gamma offre plusieurs avantages, elle ne présente aucun des problèmes toxicologiques et écologiques que posent la stérilisation à l'oxyde d'éthylène en raison des résidus de solvants, et ne transmet aucune radioactivité [45, 47, 53].

2.2.2.2 Stérilisation chimique

- **Oxyde d'éthylène (EtO)**

L'oxyde d'éthylène (EtO) est une méthode de stérilisation chimique conventionnelle qui produit des effets bactéricides, sporicides et virucides à des concentrations appropriées. Il a été largement utilisé comme stérilisant à basse température depuis les années 1950, surtout pour les produits de soins de santé [45, 48, 53].

L'oxyde d'éthylène est un gaz incolore, inflammable et explosif, en plus il est毒ique et cancérogène, du coup il influe sur la réponse cellulaire et peut provoquer une inflammation synoviale [45, 48, 53].

L'activité microbicide de l'EtO est le résultat de l'alkylation des protéines, de l'ADN et de l'ARN dans les microorganismes suite à la réaction des radicaux carboxyle, amino, acide, sulphydryle, hydroxyle, phénolique (présents dans les protéines et les acides nucléiques des microbes) entrent en contact avec l'EtO, ce qui empêche le métabolisme cellulaire normal et la réPLICATION et rend ainsi non viables les microbes affectés [6, 45, 48].

- **Dioxyde de carbone supercritique (SC-CO₂)**

L'état supercritique du dioxyde de carbone est un état physique unique qui est atteint à une combinaison spécifique de température et de pression définie comme le « point critique », où sa température et sa pression sont égales ou supérieures au point critique (31,1 °C, 74 atm) (figure 2.5), la basse température (31,1 °C) rend le SC-CO₂ la technique idéale pour les matériaux sensibles à la température ou réactifs avec d'autres formes de stérilisation [45, 54, 55].

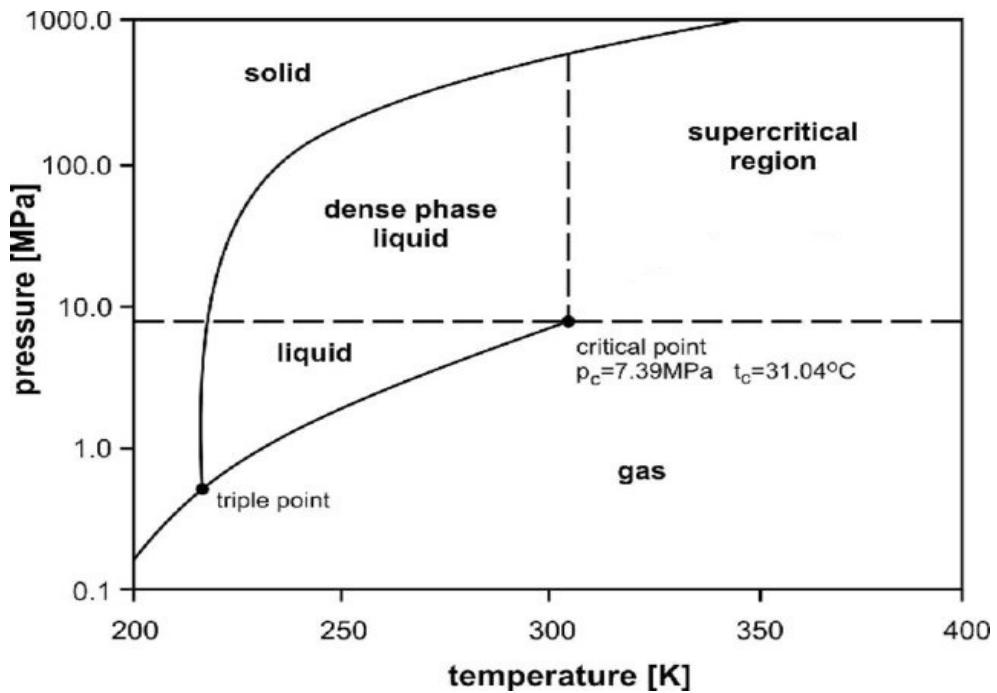


Figure 2.5 Diagramme des phases de dioxyde de carbone [56].

Le dioxyde de carbone supercritique (SC-CO₂) présente les propriétés des états physiques gazeux et liquides. Il a la viscosité d'un liquide et l'efficacité de transport d'un gaz qui permet une distribution efficace avec des propriétés de pénétration élevées. Les propriétés uniques du SC-CO₂ en font un milieu attrayant pour la stérilisation, car elles lui permettent une pénétration en profondeur dans les matériaux biologiques, y compris les os et la matrice dermique acellulaire [45, 55, 57].

L'efficacité du SC-CO₂ en tant qu'agent de stérilisation sur les microorganismes est liée à divers paramètres de traitement, dont la température, la pression, la durée du traitement et l'utilisation d'additifs. Cependant, plusieurs mécanismes d'inactivation des microorganismes par le SC-CO₂ ont été proposés, tels que la perturbation de la membrane cellulaire ou l'acidification cytoplasmique. En effet, lors de la solubilisation du SC-CO₂ dans la phase liquide externe, l'acide carbonique (H₂CO₃) se forme et pénètre dans la cellule. L'accumulation de l'acide carbonique (H₂CO₃) dans le cytoplasme diminue le pH intracellulaire, ce qui peut contribuer à la mort cellulaire car le pH joue un rôle important dans l'activité enzymatique, la transcription des gènes et la synthèse des protéines[58].

Toutefois, Le SC-CO₂ seul ne suffit pas pour atteindre un niveau industriel de stérilisation élevé (SAL 10⁶) de certains microbes, dont les endospores bactériennes et les virus. Pour augmenter son efficacité contre les microbes, certains des additifs stérilisants peuvent être ajoutés tels que : l'acide peracétique [45], le peroxyde d'hydrogène[59], l'eau [55]...etc.

De plus, le SC-CO₂ est non toxique, non réactif et peut facilement être éliminé par dépressurisation et dégazage et a un faible impact sur l'environnement [45, 55, 57].

- **Plasma**

Le plasma est souvent considéré comme le quatrième état de la matière car, bien que le plasma ne soit ni un gaz ni un liquide, ses propriétés sont similaires à celles des gaz et des liquides [60].

Cet état de matière est créé en introduisant le gaz atmosphérique dans une chambre à vide qui est généralement évacuée en dessous de 0,1 Torr. Ces basses pressions permettent un passage relativement long des électrons et des ions accélérés à l'intérieur de la chambre, qui produisent par la suite des espèces chimiquement réactives par excitation, dissociation et ionisation d'électrons. [61].

Étant donné que ces ions et particules neutres se trouvent à la température ambiante ou près de celle-ci, et que le long trajet libre des électrons à haute énergie a relativement peu de collisions avec les molécules à cette pression, les conditions d'exposition globales demeurent à une basse température [60]. Ce type de plasma à basse température a récemment trouvé des applications dans le nettoyage, la décontamination et la stérilisation de certains biomatériaux telles que les échafaudages biodégradables [61], ou même pour la modification des surfaces des polymères avec

de plasma contenant des espèces réactives y compris les radicaux libres et les ions, améliorant par la suite l'interaction des biomatériaux avec les cellules [60, 62].

L'efficacité de la stérilisation au plasma peut être améliorée en utilisant un mélange de gaz notamment ceux à plus forte teneur en oxygène tel que l' H_2O_2 [61].

2.2.3 L'effet des méthodes de stérilisation sur les microorganismes

Plusieurs travaux ont évalué l'efficacité de ces méthodes de stérilisation sur différents microorganismes tels que, les bactéries végétatives et spores, les virus et les champignons.

Le degré d'inactivation causé par ces méthodes sur les microorganismes varie d'un type de microorganisme à un autre ; généralement les spores bactériennes sont plus résistantes que les virus. De plus, la sensibilité de la même classe de microorganismes varie selon la morphologie et la taille de génome ; les microorganismes à grands virions sont plus sensibles à la stérilisation que ceux avec de petits virions. Cette sensibilité augmente lorsque les microorganismes se trouvent dans une matrice moins dense.

Les paramètres de stérilisation, telle que la dose d'irradiation, la durée d'exposition aux radiations, dans le cas des méthodes de stérilisations par radiations ont un effet significatif sur le taux d'inactivation des microorganismes. Cependant, pour les méthodes chimiques telles que le SC-CO₂ et le plasma, l'ajout des additifs riches en oxygène comme l' H_2O et l' H_2O_2 améliore efficacement l'inactivation des microorganismes.

Le tableau 2.1 récapitule les effets de différentes méthodes de stérilisation sur différents microorganismes.

Tableau 2.1 Effets des méthodes de stérilisation sur les microorganismes

Méthode	Conditions	Microorganismes	Résultats	Références
SC-CO ₂	T : 40.0 °C, P : 27.6 MPa, temps : 30 min, additif : 30 % H ₂ O ₂	Bactérie : <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i>	Inactivation bactérienne complète	[59]
	T : 38 °C, P : ~ 8.5 MPa, temps : 45 min, additif : 0.25 % H ₂ O, 0.15 % H ₂ O ₂ et 0.5 % C ₄ H ₆ O ₃	Spores bactériennes : <i>B. cereus</i> , <i>B. atrophaeus</i> , <i>B. stearothermophilus</i>	6 log ₁₀ de réduction	[55]
		Spore bactérienne : <i>B. pumilus</i>	~ 4 log ₁₀ de réduction	
	T : 50 °C, P : 25 MPa, temps : 10 min.	Virus : HIV-1	4.07 log ₁₀ de réduction	[63]
		Virus : Sindbis	4.31 log ₁₀ de réduction	
		Virus : Poliovirus	6.58 log ₁₀ de réduction	
	T : 35 - 41 °C, P : 9.4 - 10.3 MPa, temps : 15 min, additif : PAA	Virus : Encephalomyocarditis (EMC)	6 log ₁₀ de réduction	[64]
	T : 40 °C, P : 15 MPa, temps : 60 min, additif : Éthanol	Champignons (spores) : <i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus flavus</i> , et <i>Eurotium amstelodami</i>	Fréquence relative des champignons dans le papier : 1.9 % pour 4 % et 8 % v/v éthanol	[65]

Tableau 2.1 Effets des méthodes de stérilisation sur les microorganismes (suite).

UV	$\lambda : 255 \text{ nm, dose : } 9 \text{ mJ/cm}^2$	Bactérie : <i>E. coli</i>	$3.8 \log_{10}$ de réduction	[66]
	$\lambda : 260 \text{ nm, dose : } 10 \text{ mJ/cm}^2$	Bactérie : <i>E. coli</i> K12 (ATCC 29425)	$3 \log_{10}$ de réduction	
	$\lambda : 260 \text{ nm, dose : } 122 \text{ mJ/cm}^2$	Virus : Adénovirus humain type 2 (HADV2)	$4 \log_{10}$ de réduction	
	$\lambda : 254 \text{ nm, dose : } 30.4 \text{ J/cm}^2$, temps : 45 min	Champignons (levures) : <i>C. krusei</i> ATCC 14243, <i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019, <i>C. tropicalis</i> ATCC 13803, <i>C. glabrata</i> ATCC 66032	Inactivation complète	[68]
Rayons gamma	Dose : 5, 10, 20 et 25 kGy	Champignons (mycélium) : <i>Cryptococcus laurentii</i> , <i>Hansenula holstii</i> , <i>Absidia spp.</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> .	Inactivation complète à une dose $> 10 \text{ kGy}$	[69]
		Champignons (mycélium) : <i>C. sake</i> .	Aucun effet à une dose $> 25 \text{ KGy}$	
	Dose : 0.9 -10.8 kGy	Virus : HADV type 5	$4 \log_{10}$ de réduction dans une matrice en faible charge organique $1 \log_{10}$ de réduction dans une matrice en forte charge organique	[70]

Tableau 2.1 Effets des méthodes de stérilisation sur les microorganismes (suite).

Plasma	D ₁₀ : 2.9 kGy, matrice : tampon de phosphate	Spore bactérienne : <i>Clostridium botulinum</i>	Inactivation de 1 log ₁₀	[71]
	D ₁₀ : 4.6 kGy, matrice : Viande			
	D ₁₀ : 0.60 kGy, matrice : Eau gazeuse	Champignon (spore) : <i>Aspergillus flavus</i>	Inactivation de 1 log ₁₀	
	D ₁₀ : 7 kGy, matrice : Viande	Virus : Coxsackievirus B-2	Inactivation de 1 log ₁₀	[73]
	Gaz : HNO ₃ : N ₂ (0.5 w/w)	Bactérie : <i>E. coli</i>	Inactivation de 5 log ₁₀	[74]
	Gaz : N ₂		Inactivation de 2 log ₁₀	
	Gaz : N ₂ +vapeur d'H ₂ O		Inactivation de 4 log ₁₀	
	Plasma de pression atmosphérique froid Puissance : 300 W	Bactérie : <i>L. monocytogenes</i> <i>S. aureus</i>	Inactivation de 8.8 log ₁₀ après 10 min	[75]
		Bactérie : <i>E. coli</i>	Inactivation de 5.2 log ₁₀ après 3 min	
		Spore bactérienne : <i>Geobacillus stearothermophilus</i>	Inactivation entre 1 et 2 log ₁₀ après 5 min	
		Bactérie : <i>Salmonella enteritidis</i> PT30	>5 log ₁₀ de réduction après 15 min	

Tableau 2.1 Effets des méthodes de stérilisation sur les microorganismes (suite).

		Champignon (spore) : <i>Aspergillus niger</i>	1.6 \log_{10} de réduction	
		Champignon (spore): <i>Penicillium decumbens</i>	3.1 \log_{10} de réduction	
Gaz : Argon (Ar) Puissance : 2.5 w		Virus : Calicivirus félin (FCV)	5.55 \log_{10} de réduction après 120 secondes	[76]
			6 \log_{10} de réduction après 15 secondes	
Gaz : Ar + 0.1 % O ₂ Puissance : 2.5 w		Virus : FCV-F9	2.34 \log_{10} de réduction après 1 min 3.55 \log_{10} de réduction après 2 min Inactivation complète après 5 min	[77]
		Virus : MNV-1	0.56, 1.61, 1.95 et 3.16 \log_{10} de réduction après 1, 2, 5 et 10 min respectivement.	

2.2.4 Stérilisation de formulations des polymères à base des bactériophages

Jusqu'à ce jour, il n'y a pas des travaux publiés sur la stérilisation des systèmes de délivrance de bactériophages ou sur des formulations à base de bactériophages. Cependant, quelques travaux ont étudié l'effet de certaines méthodes de stérilisation sur l'activité des phages et d'autres ont étudié l'effet des radiations, de la chaleur et des agents chimiques sur les polymères biodégradables. Une revue de littérature sur chaque cas permet d'avoir une idée globale sur l'effet des techniques de stérilisation sur les polymères biodégradables à base de bactériophages.

2.2.4.1 L'effet des méthodes de stérilisation sur les bactériophages

Dans cette section, on va présenter les travaux qui ont pour objectif l'étude des effets des méthodes de stérilisation sur des bactériophages considérés dans la majorité des cas comme des agents infectants.

- **Méthodes de stérilisation par radiations**

L'étude faite par Jebri *et al.* [78] a pour but d'examiner la sensibilité aux rayons gamma d'une formulation de phages contaminée avec des bactéries. Des coliphages somatiques naturels (MS-2), des coliphages spécifiques Φ X174 et des bactéries *E. coli* ont été exposés aux rayonnements gamma dans des matrices différentes : l'eau distillée, le peptone 1 % autoclavé et les eaux d'égout brutes autoclavées [78].

Ils ont trouvé que la résistance au rayonnement dépendait à la fois du microorganisme modèle et de la matrice. Cette étude montre que les bactériophages sont plus sensibles aux radiations gamma que les bactéries *E. coli*. De plus, l'inactivation des phages dans l'eau distillée nécessitait une dose d'irradiation plus faible que dans les eaux usées brutes autoclavées ou dans une solution de peptone à 1 %. Cela est dû aux matrices qui contiennent des matières organiques dissoutes et des solides en suspension qui ont probablement causé le piégeage des radicaux libres générés par les rayons gamma et par la suite l'effet de ces rayons était moins létal [78].

La même conclusion a été obtenue par Gehringer *et al.* [79], où ils ont trouvé que les phages (MS-2) sont plus sensibles qu'*E. coli* aux rayons gamma dans l'eau de robinet à température ambiante [79].

D'autre part, la sensibilité des phages aux rayons gamma diffère d'un phage à un autre ; le phage MS-2 s'est avéré plus sensible aux rayons gamma que le phage Φ X 174. Une dose de 140 Gy était suffisante pour causer 4 unités logarithmiques de réduction pour le phage MS-2, tandis qu'une dose plus élevée (900 Gy) était suffisante pour inactiver le phage Φ X 174 pour obtenir la même réduction [80].

Dans d'autres travaux, l'ultraviolet a été utilisé pour éliminer les phages des eaux usées et identifier les indicateurs bactériophages les plus fiables pour la désinfection des eaux usées [81]. Différents bactériophages représentant diverses familles ont été irradiés à différentes technologies ultraviolettes (UV) avec plusieurs doses d'irradiation à basse pression (BP) et moyenne pression (MP) par des appareils collimatés aux UV à l'échelle du laboratoire. Le taux d'inactivation de phage Φ X 174 par les UV (BP) et (MP) a été rapide et a atteint $\sim 4 \log_{10}$ avec une dose UV de 20 mJ/cm². Cependant, les taux d'inactivation des phages PRD1 et MS-2 étaient beaucoup plus lents que ceux de Φ X 174 et seule une inactivation d'environ 1 \log_{10} a été obtenue avec la même dose UV de 20 mJ/cm² [81]. Ceci a été aussi obtenu par Sommer *et al.* [80], où pour causer une inactivation de 4 unités logarithmiques, des doses UV de 100, 290 et 750 J/m² étaient nécessaires ou estimées nécessaires (pour la dose 750 J/m²) pour avoir cette réduction dans les phages Φ X 174, B40-8 et MS-2 [80], et aussi par Bowker *et al.* [66], où une exposition des phages T4 et MS-2 aux UV (λ : 255 nm, dose : 9 mJ/cm²) a donné 4.7 et 2.2 unités logarithmiques de réduction pour T4 et MS-2 respectivement [66]. Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent que la sensibilité des phages aux rayons ultraviolets change d'un groupe de phage à un autre.

- **Méthodes de stérilisation chimiques**

Il a été établi que la relation entre la famille et la sensibilité des phages ne se limite pas seulement aux méthodes de stérilisation par radiations, mais aussi aux autres méthodes de stérilisation telles que le SC-CO₂. Vo *et al.* [82] ont essayé d'inactiver les bactériophages Q β et Φ X174 avec une concentration initiale de 10^7 - 10^9 PFU/ml en utilisant le SC-CO₂ sous une pression de 0.3-0.9 MPa, et une température de 17.8 °C-27.2 °C. Les conditions optimales étaient une pression de 0.7 MPa

et un temps d'exposition de 25 minutes. Dans des conditions de traitement identiques, une réduction de plus de 3.3 unités logarithmiques du bactériophage Q β a été obtenue, tandis qu'une réduction de près de 3.0 unités logarithmiques a été observée pour le phage Φ X174. Ces résultats montrent que la sensibilité des phages au dioxyde de carbone supercritique dépend aussi de la famille de phages [82]. Cela a été aussi confirmé par Cheng *et al.* [83], qui ont traité les bactériophages MS-2, Q β et Φ X174 par le SC-CO₂, où ils ont constaté un effet d'inactivation relativement faible sur MS-2 et Q β à différentes concentrations initiales de CO₂ dissous à 0.3 MPa pendant 20 à 30 minutes. Lorsque la pression a été augmentée à 0.6 MPa, l'inactivation de MS-2 et de Q β a été améliorée de façon différentielle. Cependant, ce système était moins efficace pour l'inactivation du Φ X174. Ils ont justifié cette différence de sensibilité au SC-CO₂ par la différence dans les propriétés de surface de la capsid des trois phages [83]. Une comparaison entre les résultats de l'amplification en chaîne par polymérase en temps réel et de l'analyse de la plaque a montré qu'une partie de l'ARN s'échappait de la capsid après le traitement. Les dommages causés à la capsid par l'expansion du CO₂ étaient le mécanisme probable d'inactivation de cette méthode [83].

Tel qu'il est déjà mentionné, le plasma à pression atmosphérique froide inactive efficacement les bactéries pathogènes, cependant le mécanisme d'inactivation des virus par le plasma n'est pas entièrement compris. Guo *et al.* [84] ont utilisé deux types de plasma, le plasma de surface constitué d'un mélange d'argon avec 1 % d'air artificiel et de l'eau activée par le plasma pour inactiver les bactériophages T4, Φ X174 et MS-2. Les deux méthodes ont efficacement inactivé ces bactériophages en fonction du temps [84].

Le traitement direct de phage T4 avec le plasma d'argon pendant 40 s a réduit le titre de 8.7×10^{10} à 3.7×10^5 PFU/ml, et une durée de 100 secondes a complètement éliminé l'infectivité de la suspension de bactériophages T4. Alors que, pour les phages Φ X174 et MS-2, une réduction de 4.2 et 4.6 unités logarithmiques a été obtenue respectivement après un traitement au plasma pendant 30 s et les deux phages ont été complètement inactivés après 60 s de traitement [84].

Cependant, le traitement de bactériophage par l'eau activée par plasma qui a été déjà prétraité avec le plasma pendant 60 secondes a réduit le titre de ~ 5 unités logarithmiques pour le phage T4 et ~7 unités logarithmiques pour les phages Φ X174 et MS-2, et ils ont été complètement inactivés après une période de traitement de 120 s (pour T4) et 80 s (pour Φ X174 et MS-2) [84].

Ces résultats montrent que les phages Φ X174 et MS-2 sont plus sensibles aux espèces réactives d'oxygène (ROS) et espèces réactives d'azote (RNS) générées par le plasma que le phage T4. De plus, l'incubation des trois phages dans l'eau traitée au plasma, montre qu'après une durée d'incubation de 4 et 8 h, le phage T4 a été réduit approximativement de 7.2 et 8.8 ordres de grandeur respectivement, tandis que les phages Φ X174 et MS-2 ont été réduits à 124 et 21 PFU/ml après une incubation de 6 h et 4 h respectivement. Ceci montre que l'inactivation des bactériophages avec l'eau activée par le plasma dépend de temps, et que les espèces réactives restent stables à court terme dans l'eau traitée avec le plasma, mais leur concentration diminue légèrement après 10 jours. Cela est probablement dû à la désintégration des espèces réactives pendant le stockage [84].

L'examen morphologique montre que le traitement au plasma a causé l'agrégation des bactériophages qui correspond à l'analyse de l'ADN et des protéines qui ont été endommagés à cause des espèces réactives d'oxygène générées par le plasma [84]. Ceci montre l'effet important de l'oxygène dans l'inactivation des phages. C'est pourquoi, Alshraiedeh *et al.* [85] ont évalué l'effet de la variation du pourcentage de concentration en oxygène dans le gaz vecteur d'hélium (He) qui s'est avéré positivement corrélé au taux d'inactivation de phage MS-2. La constante de vitesse d'inactivation augmentait avec l'augmentation des concentrations en oxygène jusqu'à 0.75 % d' O_2 . Une réduction de $3 \log_{10}$ de la viabilité de MS-2 a été obtenue après 3 min d'exposition à la source de plasma exploitée dans un mélange gazeux hélium/oxygène (99.25 % : 0.75 %), avec une réduction plus que $7 \log_{10}$ après une exposition de 9 min. Tandis que l'hélium pur a montré une réduction de 4.98 dans la même période (9 min) [85].

Néanmoins, d'autres travaux ont étudié les mécanismes responsables de l'inactivation des phages étant donné que ces microorganismes ne sont pas enveloppés par une membrane bicoche lipidique et le plasma réagira directement avec les phages dès le stade initial de traitement de décharge [86]. Yasuda *et al.* [86] ont exposé le phage λ au plasma atmosphérique et ils ont obtenu 6 unités logarithmiques de réduction après 20 min de traitement avec une valeur D_{10} de 3 s (valeur décimale (D_{10}) : temps pour une réduction d'une unité logarithmique). Tandis que la transfection de l'ADN phagique traité au plasma et reconditionné dans l'hôte bactérienne *in vitro* a montré une amélioration de la valeur D (25 s), ce qui montre que les dommages en protéines précèdent les

dommages en ADN et l'inactivation de phage λ a été attribué principalement aux dommages des protéines de l'enveloppe [86].

- **Méthodes de stérilisation par chaleur**

La chaleur est reconnue comme l'un des traitements les plus létaux pour les phages, une grande diversité de sensibilité à la chaleur a été reportée dans la littérature. Zottola *et al.* [87] ont constaté qu'un traitement à la chaleur d'une suspension des phages contre les bactéries *Lactococcus lactis* dans le lait stérile pendant 60 min à une température de 70 °C, a causé une inactivation de $\sim 4.5 \log_{10}$ dans le titre du phage 144 F. Tandis que, ces conditions ont induit une inactivation de $\sim 6.5 \log_{10}$ dans le titre du phage 240 [87]. Des résultats similaires ont été obtenus par Müller-Merbach *et al.* [88] ; une suspension des phages P001 et P008 dans un bouillon M17 enrichi en calcium spécifiques aux mêmes bactéries a été traitée avec la chaleur. Les résultats de cette étude ont montré différentes sensibilités entre ces deux phages ; le phage P008 a perdu $\sim 7 \log_{10}$ de son titre initial après un traitement de 60 min à une température de 70 °C, tandis que ces conditions ont causé une inactivation complète du phage P001 [88].

De plus, il a été démontré que l'augmentation de la température de traitement entraîne une augmentation dans la cinétique d'inactivation des phages, et que la matrice a aussi une influence sur la sensibilité des phages. L'inactivation des phages était plus rapide dans le cas des phages avec une matrice complexe qu'une matrice simple [89]. D'autre part, la sensibilité thermique des phages peut différer selon le milieu de suspension utilisé. Par exemple, les matrices contenant des protéines protègent les phages contre la chaleur contrairement aux graisses qui n'ont aucune influence sur la protection des phages [90].

Cependant, les traitements thermiques peuvent produire des changements morphologiques sur les particules de phages. Les effets de ces traitements ont été surveillés par microscopie électronique à transmission sur un phage spécifique aux bactéries *Lactococcus lactis* thermosensible et résistant à la chaleur [90]. La libération d'ADN phagique par les chavirés viraux, la décomposition du phage en structures de tête et de queue et l'agrégation des queues de phage étaient les phénomènes les plus fréquemment observés, principalement pour le phage thermosensible étudié. Par contre, les phages résistants à la chaleur ont montré des changements moins évidents dans la morphologie des phages [89].

Selon les résultats reportés dans la littérature, on peut constater que la sensibilité des phages aux méthodes des stérilisations physiques et chimiques dépend de plusieurs facteurs. La famille et la morphologie ont un grand impact sur la résistance des phages à la stérilisation, généralement les phages avec un grand virions ou capsid sont plus sensibles. De plus, les phages qui se trouvent dans une matrice plus dense nécessitent plus d'énergie pour les éliminer (tableau 2.2).

L'optimisation des paramètres de stérilisation (température, pression, dose...) et le pourcentage des additifs stérilisants semble être l'élément le plus important à prendre en considération pour avoir des effets moins létaux sur les phages.

Tableau 2.2 Effets des méthodes de stérilisation sur les phages.

Méthode	Phage (Bactérie(s) cible(s))	Conditions	Résultats	Références
Chaleur	144F (<i>Streptococcus lactis</i>)	T : 70 °C, temps : 60 min. Matrice : lait stérile	4.5 \log_{10} de réduction	[87]
	240 (<i>Streptococcus lactis</i>)	T : 70 °C, temps : 60 min. Matrice : lait stérile	6.5 \log_{10} de réduction	
	P001 (<i>Lactococcus lactis</i>)	T : 70 °C, temps : 60 min. Matrice : bouillon M17 enrichi en calcium	Inactivation complète	[88]
	P008 (<i>Lactococcus lactis</i>)	T : 70 °C, temps : 60 min. Matrice : bouillon M17 enrichi en calcium	7 \log_{10} de réduction	
	MLC-A (<i>L. paracasei</i> , <i>Lactobacillus casei</i>)	T : 60 °C, temps : 30 min. Matrice : bouillon MRS	< 4 \log_{10} de réduction	[91]
		T : 60 °C, temps : 30 min. Matrice : tampon TMG	~ 2 \log_{10} de réduction	
		T : 60 °C, temps : 30 min. Matrice : lait écrémé	< 0.5 \log_{10} de réduction	

Tableau 2.2 Effets des méthodes de stérilisation sur les phages (suite).

Rayons gamma	MS-2 (<i>Salmonella typhimurium</i> WG 49) ΦX 174 (<i>E. coli</i> WG 5)	Matrice : eau distillée	$D_{10}(\Phi X 174) : 0.6 \text{ kGy}$ $D_{10}(\text{MS-2}) : 0.5 \text{ kGy}$	[78]
		Matrice : Peptone 1 % autoclavé	$D_{10}(\Phi X 174) : 1.7 \text{ kGy}$ $D_{10}(\text{MS-2}) : 1.2 \text{ kGy}$	
		Matrice : eaux d'égout brutes autoclavées.	$D_{10}(\Phi X 174) : 1.5 \text{ kGy}$ $D_{10}(\text{MS-2}) : 1.0 \text{ kGy}$	
UV	MS-2 (<i>Salmonella typhimurium</i> WG 49)	Dose : 140 Gy Matrice : Eau	4 \log_{10} de reduction	[80]
	ΦX 174 (<i>E. coli</i> WG 5)	Dose : 900 Gy Matrice : Eau	4 \log_{10} de reduction	
UV	ΦX 174 (<i>E. coli</i> CN13)	Dose : 20 mJ/cm ²	ΦX 1744 : 4 \log_{10} de réduction	[81]
	MS-2 (<i>Salmonella typhimurium</i> F _{amp})		MS-2 : 1 \log_{10} de réduction	
	PRD-1 (<i>Salmonella typhi</i> LT2)		PRD-1 : 1 \log_{10} de réduction	

Tableau 2.2 Effets des méthodes de stérilisation sur les phages (suite).

	ΦX 174 (<i>E. coli</i> WG 5)	Dose : 100 J/cm ²	4 log ₁₀ de réduction	[80]
	MS-2 (<i>Salmonella typhimurium</i> WG 49)	Dose : 290 J/cm ²		
	B40-8 (<i>Bacteroides fragilis</i>)	Dose : 750 J/cm ²		
	MS-2 (<i>E. coli</i> ATCC 15597)	Dose : 9 m J/cm ² λ : 255 nm	MS-2 : 2.2 log ₁₀ de réduction	[66]
	T ₇ (<i>E. coli</i> ATCC 11303)		T ₇ : 4.7 log ₁₀ de réduction	
Plasma	T ₄ (<i>E. coli</i> JM109)	Gaz : Argon +1 % air artificiel	T ₄ : 5 log ₁₀ de réduction après 40 secondes	[84]
	ΦX 174 (<i>E. coli</i> JM109)		ΦX 174 : 4.2 log ₁₀ de réduction après 30 secondes	
	MS-2 (<i>E. coli</i> JM109)		MS-2 : 4.6 log ₁₀ de réduction après 30 secondes	
	T ₄ (<i>E. coli</i> JM109)	Eau activée par le plasma	T ₄ : 5 log ₁₀ de réduction après 40 secondes	
	ΦX 174 (<i>E. coli</i> JM109)		ΦX 174 : ~7 log ₁₀ de réduction après 30 secondes	
	MS-2 (<i>E. coli</i> JM109)		MS-2 : ~7 log ₁₀ de réduction après 30 secondes	

Tableau 2.2 Effets des méthodes de stérilisation sur les phages (suite).

	MS-2 (<i>E. coli</i> ATCC 15597)	Gaz : He : O ₂ (99.25 % : 0.75 %), temps : 9 min	7 log ₁₀ de réduction	[85]
		Gaz : He pur, temps : 9 min	4.98 log ₁₀ de réduction	
SC-CO ₂	ΦX 174 (<i>E. coli</i> ATCC 13706)	P : 0.7 MPa, T : 17.8-27.2 °C Temps : 25 min	ΦX 174 : 3.0 log ₁₀ de réduction	[82]
	Qβ (<i>E. coli</i> ATCC 23631)		Qβ : 3.3 log ₁₀ de réduction	
	MS-2 (<i>E. coli</i> ATCC 15597)	P : 0.3 MPa, Température ambiante. Temps : 20 min	MS-2 : 3.0 log ₁₀ de réduction	[83]
	Qβ (<i>E. coli</i> ATCC 13706)		Qβ : 5.1 log ₁₀ de réduction	
	ΦX 174 (<i>E. coli</i> ATCC 23631)		ΦX 174 : 2 log ₁₀ de réduction	

2.2.4.2 Effets des méthodes de stérilisation sur les polymères

Les méthodes de stérilisation par haute énergie de chaleur et radiations sont connues pour être néfaste sur les polymères, en causant des changements dans leurs caractéristiques physico-chimiques et mécaniques. Le choix d'une méthode de stérilisation efficace qui stérilise non seulement la surface, mais tout le polymère puisque ce dernier doit se dégrader dans le corps humain, et qui n'affecte pas les propriétés du polymère, est primordiale.

Dans le prochain paragraphe, on va citer les principaux travaux qui ont étudié l'effet de différentes méthodes de stérilisation sur les caractéristiques des polymères.

- **Méthodes de stérilisation par radiations**

Plusieurs intervalles de dose gamma ont été testés dans la littérature pour la stérilisation des polymères. Des échafaudages de poly (lactide-co-glycolide) (PLGA) ont été stérilisés avec une dose gamma (Césium) de 3 kGy, qui a entraîné une modification de la résistance à la traction ultime et du module de Young. Cependant, l'irradiation à une dose de 8 kGy (Cobalt 60) a causé une diminution dans la température de transition vitreuse du polymère et de son poids moléculaire en raison de la dégradation radiolytique [92]. De plus, les polymères irradiés ont présenté une porosité élevée [93].

Des résultats similaires ont été obtenus par Rychter *et al.* [94]. Des doses gamma allant de 10 à 25 kGy ont entraîné une baisse considérable dans la température de transition vitreuse (T_g) et du poids moléculaire moyen en nombre (M_n) dans des échafaudages poreux à mémoire de forme obtenus à partir de terpolymères biodégradables : poly (L-lactide-co-glycolide-co-triméthylène carbonate) et poly (L-lactide-co-glycolide-co- ϵ -caprolactone) [94]. Ceci a été aussi obtenu par Holy *et al.* [95], où une diminution de 50 % a été notée dans le poids moléculaire (M_w) de PLGA après une irradiation à 25 kGy. En revanche, cette dose (25 kGy) n'a entraîné aucune modification notable dans la surface des pores [95].

Néanmoins, la nature des effets causés par les rayons gamma sur les biomatériaux semble être différente d'un polymère à un autre en fonction de la quantité de radiation émise [96]. Ceci a été confirmé par l'étude de Foggia *et al.* [97], où des doses gamma très élevées (10 à 50 kGy) n'ont pas

induit des grands effets sur des composites de poly-e-caprolactone (un polymère biodégradable)/hydroxyapatite carbonatée (un matériau bioactif). Les rayons gamma ont entraîné des changements structuraux et des effets nuisibles acceptables : seuls une très légère fragmentation des chaînes de polymères et quelques défauts dans le composant inorganique ont été observés. De plus, la cristallinité du polymère et la composition relative des échantillons n'ont pas été significativement affectées par le traitement à haute énergie [97].

L'effet des rayons UV sur le PLGA a été évalué par Braghieri *et al.* [98], les résultats ont montré que les échafaudages étaient bien stériles sans aucun changement dans la morphologie ou les dimensions critiques mesurées des échafaudages. Cependant, une réduction plus importante du poids moléculaire des polymères (M_n) a été notée immédiatement après la stérilisation, qui a augmenté proportionnellement avec le temps d'exposition à une lampe UV de 30 watts (30, 60 et 120 min) [98]. Ces résultats sont en contradiction avec ceux de Umeki *et al.* [99], qui ont démontré que les UV n'affectent ni la masse molaire en nombre (M_n) ni la masse molaire en poids (M_w) du PLGA, et ils ont obtenu aussi le même résultat avec des microsphères de poly (lactic acid) PLA/Poly (lactic co-glycolic acid) PLGA. Cela peut être dû aux courtes expositions aux UV (30 min) dans ces études qui ont généré moins d'effets sur les caractéristiques des polymères [99].

- **Méthodes de stérilisation chimiques**

L'effet d'oxyde d'éthylène varie d'un polymère à un autre, les structures fragiles telles que celles trouvées dans les nattes électrofilées et les échafaudages poreux peuvent être endommagées dans des conditions de stérilisation à l'EtO considérées comme « douces ».

Dans le cas de poly (ethylene glycol) (PEG) contenant des polycarbonates dérivés de la tyrosine, la stérilisation à l'EtO à différentes conditions : température entre 35-65 °C, humidité relative entre 35-75 %, temps d'exposition entre 1-6 h et concentration d'EtO entre 0-1000 mg/L ; a induit des effets nuisibles tels qu'une diminution du poids moléculaire et de la température de transition vitreuse (T_g), qui ont augmenté en fonction de l'augmentation des paramètres précédents [100].

En revanche, l'EtO peut réagir avec certains groupes fonctionnels des polymères, tel que le cas avec le poly (ethylene glycol) (PEG). L'EtO a causé une estérification du groupe carboxyle (COOH) présent dans les groupes desaminotyrosyl-tyrosine. De plus, d'autres changements

morphologiques et physiques ont été notés dans les surfaces des films et des pores des échafaudages qui sont devenues plus lisses, ou même dans le volume des échafaudages qui a été diminué de 60 % après une exposition de 2h à 100 % oxyde d'éthylène à 57 °C [101]. Par conséquent, la présence des groupes sensibles à l'EtO, l'architecture de l'échantillon (présence de pores dans les échafaudages et de filaments fins dans les tapis électrofilés) et la morphologie de surface, doivent être prises en considération lors du choix des paramètres de stérilisation [101].

Contrairement à l'oxyde d'éthylène, le dioxyde de carbone supercritique a montré peu/pas d'effets nuisibles sur les polymères biodégradables, cela a été démontré par Jiménez *et al.*[59]. La stérilisation de poly (acide acrylique-coacrylamide) avec du CO₂ plus 30 % de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) à une température et une pression de 40 °C, 27.6 MPa respectivement, n'a induit aucun changement dans les propriétés physiques du gel. De plus, les courbes de séchage n'ont montré aucun changement significatif entre les échantillons traités (CO₂ pur et CO₂ plus 30 % H₂O₂) et les échantillons non traités. Les ratios moyens de gonflement à l'équilibre étaient également très similaires [59]. Même en présence d'autres additifs tels que 0.25 % d'eau, 0.15 % de peroxyde d'hydrogène et 0.5 % d'anhydride acétique, le SC-CO₂ n'a pas affecté les propriétés mécaniques des hydrogels à base de polysaccharides et des échafaudages à base de collagène. La procédure s'est avérée moins compromettante sur les propriétés mécaniques et rhéologiques que les méthodes de stérilisation à basse température comme l'irradiation gamma et l'exposition à l'oxyde d'éthylène ainsi que la stérilisation à la vapeur classique [55].

La stérilisation au plasma a causé des effets variables sur les polymères biodégradables selon le gaz et la puissance utilisés. Un long traitement au plasma d'argon a induit des dommages significatifs dans le PLGA même à une puissance faible de 33 watts. Les espèces réactives d'oxygène présentes dans le plasma ont causé la réticulation du polymère et ont changé le comportement de la dégradation. Alors que le traitement au plasma à une puissance élevée de 100 watts pendant 4 min n'a pas affecté la morphologie de polymère, ce qui montre que la durée de traitement est plus significative que la puissance [95].

Cependant, le plasma de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) n'a pas affecté significativement le M_w et M_n de PLLA [102], contrairement aux polymères de poly (oxyde d'éthylène) et poly (E-caprolactone) [103], mais il a causé un vieillissement de polymère PLLA et une modification de la

surface des polymères poly (oxyde d'éthylène) et poly (E-caprolactone) diol hydrophobe en augmentant la rugosité jusqu'à 100-200 %.

En plus de ses effets sur les propriétés mécaniques, la stérilisation par plasma peut causer des changements chimiques dans les polymères ou des modifications de surface qui peuvent être souhaitables dans certains cas pour la fonctionnalisation des surfaces et l'amélioration de l'adhésion des cellules [61].

- **Méthodes de stérilisation par chaleur**

L'effet létal de la chaleur sur les polymères biodégradables est déjà connu et bien compris, cela justifie le manque des études récentes sur ce sujet.

Le traitement par la chaleur sèche des implants de poly (L/D lactide) ou de poly (L/DL-lactide) à 135 °C pendant 2 h sous gaz inerte (argon) et atmosphère à faible humidité a donné de bons résultats en termes de stérilité. De plus, il n'y avait ni déformation plastique ni changement dimensionnel des implants ni de la résistance au cisaillement [104].

Cependant, une augmentation du module de flexion et une réduction de 50 % de la résistance à la flexion principalement due à la dégradation du polymère qui a été causée par la diminution dans le poids moléculaire ont été observées.

La stérilisation de poly (L-lactide) (PLLA) par sept différents programmes de stérilisation par l'autoclave a montré que dans tous les cas le poids moléculaire a été diminué ; un temps de stérilisation court avec une température élevée diminue plus le poids moléculaire qu'un long cycle de stérilisation avec une baisse température. De plus, une diminution de 35 % de la résistance à la traction a été notée [105].

En revanche, la stérilisation à l'autoclave pendant 40 min à une température de 121 °C de polyuréthane a causé d'autres changements significatifs dans ses caractéristiques, où une résistance à la traction accrue avec une augmentation dans la densité de réticulation des polymères ont été constatées [96].

• Conclusion

L'analyse de ces travaux a montré que les méthodes de stérilisation par radiations comme les rayons gamma ont plus d'effets néfastes sur les polymères que les autres méthodes. Même avec de petites doses, les rayons gamma peuvent entraîner une modification de la résistance à la traction ultime et du module de Young, ainsi que la T_g et le poids moléculaire de polymère.

Avec des rayons moins ou non ionisants tel que les UV, une réduction dans le poids moléculaire en nombre et en poids (M_n) et (M_w) peuvent avoir lieu. Cette réduction est proportionnelle avec la durée d'exposition et la puissance de la lampe UV.

Cependant, les méthodes chimiques telles que l'oxyde d'éthylène et Le SC-CO₂ semblent être moins compromettantes sur les polymères par rapport aux autres méthodes, surtout le SC-CO₂ qui semble être la meilleure méthode de stérilisation pour les polymères, puisqu'aucun changement significatif dans les propriétés mécaniques n'a été noté en plus de son excellent pouvoir pour l'élimination des contaminations bactériennes surtout avec l'addition d'H₂O₂, H₂O et/ou l'anhydride acétique. Contrairement à l'oxyde d'éthylène et le plasma qui ont montré des modifications de poids moléculaire, de taux de dégradation et des modifications chimiques des polymères.

De plus, les polymères stérilisés au SC-CO₂ ont montré une bonne cytocompatibilité par rapport à ceux stérilisés à l'EtO. Ce dernier peut laisser des résidus toxiques qui nécessitent un long protocole de dégazage pour les éliminer et qui peuvent être difficiles pour les matériaux très poreux ou avec une géométrie complexe [61, 96]. Ceci est le cas aussi pour le plasma à base des gaz qui contient des espèces réactives qui laissent des résidus d'oxygènes même après la stérilisation [61, 102]

Les principaux effets néfastes causés par les méthodes de stérilisation sur différents polymères ont été résumés dans le tableau 2.3.

Tableau 2.3 Effets des méthodes de stérilisation sur les polymères.

Méthode	Polymères	Conditions	Résultats	Référence
Rayons gamma	PLGA	Dose : 3 kGy	Modification de la résistance à la traction Modification de module de Young	[92]
		Dose : 8 kGy	Diminution de la température de transition vitreuse (T_g) Diminution du poids moléculaire Porosité élevée	[93]
	PLA-PEG	Dose : 10 kGy	Diminution du poids moléculaire moyen en nombre et en masse (M_n et M_w)	[99]
	LGT et LGC	Dose : 10-25 kGy	Réduction de la température de transition vitreuse (T_g) Diminution du poids moléculaire moyen en nombre (M_n) Aucune modification notable dans la surface des pores	[94]
UV	PLGA	Puissance : 30 w Temps : 30, 90, 120 min	Très légère fragmentation des chaînes de polymère Aucun effet significatif sur la cristallinité du polymère	[97]
			Réduction plus importante du poids moléculaire (M_n) Aucun changement dans la morphologie ou les dimensions critiques	[98]

Tableau 2.3 Effets des méthodes de stérilisation sur les polymères (suite).

	PLGA	λ : 253 nm Temps : 30 min	Aucun effet sur la masse molaire en nombre (M_n) et en poids (M_w) sur les deux polymères	[99]
Chaleur	PLA	Type : chaleur humide T : 129 °C	Diminution de 35 % de la résistance à la traction Diminution du poids moléculaire	[105]
	Polyuréthane	Type : chaleur humide Temps : 40 min T : 121 °C	Augmentation de la densité de réticulation Résistance à la traction accrue	[96]
SC-CO ₂	Hydrogels à base de polysaccharides Échafaudages à base de collagène	Additifs : 0,25 % H ₂ O, 0,15 % H ₂ O ₂ et 0,5 % AcOH	Moins compromettante sur les propriétés mécaniques et rhéologiques que les rayons gamma et l'UV	[55]
	PLGA et PLA	T : 25-40 °C P : 205 bar Temps : 0.6-4 h	Aucun effet significatif	[98]

Tableau 2.3 Effets des méthodes de stérilisation sur les polymères (suite).

	PLGA	T : 57 °C Temps : 2h	Rétrécissement des dimensions du polymère Diminution du poids moléculaire Affecte la fragilité et la rigidité	[101]
EtO	PLDLLA	T : 32-45 °C H : 45 %-70 % Temps:18-96h	Retarde la dégradation	[106]
	PEG	T : 35-65 °C H : 35 % - 75 % Temps:1- 6h	Diminution du poids moléculaire Diminution de la température de transition vitreuse	[100]
Plasma	PLGA	Gaz : Argon inerte Temps ₁ :2-10 min Puissance ₁ : 33 w Temps ₂ : 2- 40 min Puissance ₂ : 100 w	Affecte la structure chimique Change le comportement de dégradation Augmentation du poids moléculaire	[95]

Tableau 2.3 Effets des méthodes de stérilisation sur les polymères (suite).

Polyuréthane	Gaz : O ₂ , CO ₂ et NH ₃ Puissance : 200 w Temps : 30 min	Diminution du poids moléculaire Augmentation dans les propriétés mécaniques	[103]
	Gaz : H ₂ O ₂ Puissance : 200 w Temps : 30 min	Diminution du poids moléculaire Diminution de la force de traction Augmentation du taux de dégradation	
PLLA	Gaz : H ₂ O ₂ , T : 43 °C Temps : 1 h et 39 min	Vieillissement physique Augmentation de T _f Augmentation de T _g Augmentation de la cristallinité et de la fragilité	[102]
Polyuréthane	Gaz : H ₂ O ₂ Temps : 55 min T : 45 °C–55 °C	Augmentation de taux de dégradation	[107]

2.2.4.3 Les effets des méthodes de stérilisation sur la cinétique de relargage des principes actifs

Dans les études présentées ci-dessus, les chercheurs ont généralement évalué l'effet des méthodes de stérilisation sur des polymères utilisés comme des échafaudages, mais pas pour l'encapsulation et la délivrance des principes actifs à leurs cibles d'action.

Les méthodes chimiques et physiques de stérilisation peuvent modifier la masse molaire des polymères, causer des scissions dans leurs chaînes, ce qui va entraîner un changement dans la cinétique de relargage prédéfinie des principes actifs encapsulés.

Dans la prochaine section, on va présenter les travaux effectués sur les effets des méthodes de stérilisation sur le profil de relargage de différents principes actifs.

Moioli *et al.* [108] ont comparé l'effet de la stérilisation par l'ultraviolet pendant 30 min sur des microsphères d'acide poly-d-lactique-co-glycolique (PLGA) encapsulant des facteurs de croissance TGF β 3. Les résultats ont montré que l'ultraviolet a considérablement atténué la libération des molécules TGF β 3 par rapport aux microsphères non stérilisées. De plus, cette atténuation a été liée avec la diminution de la quantité des molécules encapsulées à cause de la présence d'une dégradation dans la surface des microsphères ainsi que la diminution de la masse des polymères [108]. Des résultats similaires ont été obtenus par Umeki *et al.* [99], où une exposition des microsphères de poly (lactic acid) PLA/Poly (lactic co-glycolic acid) PLGA encapsulant des molécules de BFB0261 aux UV pendant 30 min a entraîné une libération de 45 % sur une semaine. Cependant, un taux de libération plus important (70 %) a été noté pour les microsphères exposées aux rayons gamma (10 kGy) dans la même période, ceci est dû à la réduction de la masse molaire en nombre (M_n) du PLGA [99].

En revanche, le taux de libération des molécules à partir des polymères irradiés aux rayons gamma semble être directement proportionnel à la dose d'irradiation. Des doses de (5, 15, 25 kGy) ont entraînés une lente augmentation dans la libération d'une molécule anti-inflammatoire à partir de PLGA, sans aucun changement dans la charge de la molécule [109]. De plus, le taux de libération des molécules à partir des PLGA irradiés aux rayons gamma peut être plus grand à ceux non

irradiés. Shapourgan *et al.* [93] ont démontré que la libération d'acétate de leuprolide après 33 jours a été 1.6 plus dans le cas des PLGA irradiés par rapport à ceux non irradiés [93].

Cependant, des doses supérieures à 25 kGy (30 et 35 kGy) n'ont pas donné des résultats acceptables de point de vue libération des médicaments à partir de PLGA. Des doses inférieures à 25 kGy ont permis une libération de très fortes concentrations de l'antibiotique (vancomycine) bien au-dessus de sa concentration minimale inhibitrice *in vitro* jusqu'à 28 jours [110].

Contrairement aux méthodes de stérilisation par radiations, les méthodes chimiques telles que l'EtO n'ont pas montré une augmentation dans le taux de libération de molécules encapsulées. Le taux de libération de la Vancomycine à partir du PLGA dans le cas de l'EtO était faible par rapport à celui de rayons gamma [110].

La stérilisation par chaleur a été comparée avec les deux méthodes (rayons gamma et UV) [96], pour la stérilisation d'un polymère de polyuréthane réticulé au diisocyanate de cyclodextrine-hexaméthyle qui contient trois médicaments : l'érythromycine, la vancomycine et la rifampicine.

Les résultats de cette étude ont montré que les rayons gamma et l'EtO ont entraîné une légère augmentation du gonflement du polymère après la stérilisation, mais aucun changement significatif n'a été observé dans le taux de libération des molécules. Par contre, les polymères stérilisés à l'autoclave ont montré une réduction significative de la quantité totale de drogue chargée et libérée, présumée être due à l'augmentation de la densité de réticulation. Cependant, cela n'a affecté que le taux de libération initial de l'antibiotique [96].

En conclusion, les rayons gamma peuvent causer une dégradation radiolytique des polymères, qui entraîne par la suite la diminution de leur poids moléculaire et l'augmentation de la quantité de médicaments libérée en fonction de l'augmentation de la dose. Ceci est le cas aussi pour la stérilisation à l'UV, mais avec un taux de libération moins que celui des rayons gamma vu que les UV sont moins ionisants et causent moins de dégradation de polymères.

Cependant, la stérilisation à l'autoclave peut entraîner une réduction significative de médicaments chargés et libérés à cause de l'augmentation de la densité de réticulation. C'est pour cette raison, cette technique peut être utilisée pour augmenter la densité de réticulation, lorsqu'une libération prolongée est désirée plutôt qu'une libération initiale ou une charge de médicaments plus importante.

Néanmoins, les méthodes chimiques telles que le SC-CO₂ et l'EtO semblent être les méthodes de stérilisation les moins susceptibles de modifier la cinétique d'administration des médicaments [96].

La majorité des effets des méthodes de stérilisations sur les systèmes de délivrances des médicaments à base de polymères ont été regroupés dans le tableau 2.4.

Tableau 2.4 Effets des méthodes de stérilisation sur les systèmes polymériques de délivrance des molécules.

Méthode	Système	Conditions	Résultats	Référence
Rayons gamma	Microsphères de PLA/PLGA Molécule : BFB0261	Dose : 10 kGy	Libération de 70 % des molécules pendant 1 semaine Diminution de M_n	[99]
	Microsphères de PLGA Molécule : Anti-inflammatoire	Dose : 5, 15, 25 kGy	Lente augmentation dans la libération des molécules Pas de changement dans la charge des molécules	[109]
	Microsphère de PLGA Molécule : Acétate de Leuprolide	Dose : 8 kGy	Taux de libération 1.6 plus que les microsphères non irradiées Libération jusqu'à 33 jours	[93]
UV	Microsphères de PLGA Molécule : TGF β 3	Temps : 30 min	Atténuation de la libération des molécules Diminution de la charge initiale des molécules Degradiation de la surface des microsphères Diminution de la masse de polymère	[108]
	Microsphère de PLA/PLGA Molécule : BFB0261	λ : 253 nm Temps : 30 min	Libération de 70 % des molécules pendant 1 semaine	[99]

Tableau 2.2 Effets des méthodes de stérilisation sur les systèmes polymériques de délivrance des molécules (suite).

Chaleur	Microsphères de Polyuréthane Molécules : érythromycine, vancomycine et rifampicine	T : 170 °C Temps : 30 min	Réduction significative de la charge initiale et libérée des molécules Augmentation de la densité de réticulation	[96]
---------	---	------------------------------	--	------

2.3 Conclusion

Après avoir évalué les résultats présentés dans la littérature sur l'effet des méthodes de stérilisation sur les phages et les polymères biodégradables, on a pu tirer les conclusions suivantes :

1. Les méthodes de stérilisation par radiations telles que les rayons gamma ont montré des effets nuisibles sur les caractéristiques physico-chimiques et mécaniques des polymères biodégradables telles que le changement de la masse molaire et le taux de dégradation, qui affectent par la suite la cinétique de relargage des principes actifs. Cependant, ces effets sont contrôlables par les doses et les durées d'exposition aux radiations et aussi ils varient d'un polymère à un autre.
2. La sensibilité des phages aux rayonnements gamma et UV change d'un phage à un autre, et elle dépend de la matrice où ils se trouvent, qui peut augmenter la résistance des phages aux radiations. On suppose que dans notre cas le polymère va minimiser leur effet nuisible sur les phages. De plus, les travaux précédents ont évalué les effets des méthodes de stérilisation sur un seul phage. Cependant, dans notre cas on va tester ces méthodes sur un cocktail de phages de différentes familles. Les résultats de la revue de littérature montrent que la sensibilité des phages aux méthodes de stérilisation change d'un phage à un autre selon la structure et la morphologie. Par conséquent on ne peut pas prévoir l'effet de la stérilisation sur un cocktail de phages de différentes familles, ce qui nécessite de tester ces méthodes sur notre cocktail de phages pour avoir une idée claire et sûre.
3. Bien que l'EtO n'a pas montré des changements dans la cinétique de relargage des molécules, mais pour notre projet qui a comme objectif initial de traiter les infections bactériennes, l'utilisation de l'oxyde d'éthylène pour la stérilisation des systèmes de délivrances des phages est strictement déconseillée, car ce dernier peut générer des résidus toxiques qui peuvent causer une inflammation.
4. La chaleur sèche et humide ne convient pas avec les polymères biodégradables et qui ont une basse température de transition vitreuse, et elles peuvent causer des changements dans

les caractéristiques physico-chimiques de polymères, en plus de leur effet létal sur les phages.

5. Malgré que le plasma peut causer une réticulation ou une dégradation des matériaux qui compromet leurs propriétés mécaniques, l'optimisation de la puissance et le temps de génération du plasma aident à améliorer l'attachement cellulaire au biomatériau, par la fonctionnalisation des surfaces. De plus son effet létal sur les phages peut avoir lieu dans des périodes de l'ordre de secondes et change d'un phage à un autre.
6. Le dioxyde de carbone supercritique semble être la méthode de stérilisation la moins compromettante pour les polymères et les phages. Les résultats montrent qu'aucun changement significatif n'a été causé par le SC-CO₂ sur les polymères biodégradables. Cependant, une légère réduction dans le titre des phages a été notée, sachant que cette sensibilité des phages au SC-CO₂ change d'un phage à un autre et que la stérilisation a été testée sur des phages dans un milieu liquide, et dans notre étude on suppose que le polymère va protéger encore mieux les phages contre la stérilisation par le SC-CO₂.

Sur la base de ces conclusions, on a opté pour la première fois pour la stérilisation au SC-CO₂ des polymères biodégradables chargés d'un cocktail de phages (patchs), de plus on a évalué notre hypothèse sur le fait que le polymère protégera les phages contre les méthodes de stérilisation par radiations (gamma et UV), afin de choisir la meilleure méthode qui va éliminer toute sorte de contamination dans les formulations sans altérer les phages.

CHAPITRE 3 MÉTHODOLOGIE

Dans ce chapitre, on va présenter les matériels utilisés et les méthodes suivies pour réaliser ce projet, allant de la préparation de différentes formulations des phages encapsulés et piégés dans des patchs jusqu'aux méthodes effectuées pour la stérilisation de ces formulations, et on clôture par les caractérisations effectuées pour évaluer l'activité et la stérilité des phages après la stérilisation.

3.1 Matériels

Le cocktail de 14 phages (SPK cocktail) a été préparé et purifié à Phagelux et ses bactéries cibles *Staphylococcus*, *Pseudomonas* et *Klebsiella* ont été fournies généreusement par l'institut national de santé publique du Québec (INSPQ).

Les milieux de croissance Trypic Soy Broth (TSB), Difco™ Fluid Thioglycollate Medium (FTM) et l'Agar, ont été achetés respectivement chez Millipore Sigma, BD et Sigma-Aldrich.

Le tampon TMN (Tris-MgCl₂-NaCl) et le polymère PEAU (Poly ester amide urea) ont été préparés à Phagelux. Le sucre, le Dichlorométhane (DCM) et l'alcool polyvinyle (PVA) (87-89 %) ont été achetés chez Sigma-Aldrich.

Le milieu de relargage a été préparé à Phagelux en mélangeant l'EMEM supplémenté avec L-Glutamine acheté chez ATCC et le sérum de cheval acheté chez Cedarlane.

Pour le conditionnement final des patchs, des poches achetées chez Beacon Converters Inc ont été utilisées.

3.2 Méthodes

3.2.1 Bactéries et bactériophages

3.2.1.1 Culture des bactéries

La culture des bactéries a été effectuée sous la hotte biologique, en utilisant des milieux et des matériels stériles.

Un volume de 200 µl des bactéries cibles *Staphylococcus* (Sax, SaA1, SaA4, SaA12 et saA29), *Pseudomonas* (PsA23, PsA37 et PsA159) et *Klebsiella* (Kp27), a été inoculé dans 4 ml de milieu TSB puis incubé pendant 2-3 heures à 37 °C, afin d'obtenir une suspension bactérienne dans sa phase exponentielle.

3.2.1.2 Préparation des bactériophages

Un cocktail de phages spécifiques aux bactéries *Staphylococcus*, *Pseudomonas* et *Klebsiella*, propriétaire à Phagelux a été utilisé pour ce projet avec un titre initial de 10⁹ PFU/ml.

3.2.2 Préparation des formulations de phages

3.2.2.1 Lyophilisation de phages

Le cocktail de phages a été lyophilisé dans le sucre afin d'obtenir une formulation phages-sucrose à 0.1 mol/l. Le cycle P₃ de lyophilisateur LABCONCO a été utilisé pour lyophiliser le cocktail de phages.

3.2.2.2 Mélange de polymères et de phages

Le polymère de Poly (ester amide urea) (PEAU) a été utilisé comme un système de délivrance de cocktail de phages lyophilisés.

D'abord, le PEAU a été dissous directement dans le solvant organique le Dichlorométhane pour obtenir une solution de polymère PEAU. Dans un premier lieu, les bactériophages lyophilisés dans le sucre, et le TMN ont été mélangés directement avec cette solution et bien homogénéisés pendant 20 secondes.

Ensuite, la formulation a été coulée dans des moules en téflon et laissée sécher sous vide pour minimum 4 jours, jusqu'à que le DCM s'évapore totalement et le poids de la formulation soit stable. À la fin, un film de polymère sec chargé en bactériophages a été obtenu (patch principal), ce film (patch) a été coupé en morceaux de 4 cm* 4 cm puis emballés dans des poches qui ont été bien scellées afin de minimiser l'humidification des patchs.

3.2.2.3 Encapsulation des phages

Le cocktail des phages a été encapsulé en utilisant une émulsion eau/huile/eau. Un mélange de 0.4 ml de cocktail de phages avec 0.4 ml du PVA (2 %) a été préparé, puis il a été homogénéisé avec un volume de 8 ml de la solution de PEAU dans le DCM (13 % w/v) pour obtenir l'émulsion primaire.

Ensuite, l'émulsion primaire a été placée dans un entonnoir à robinet, puis versée goutte par goutte sur l'émulsion secondaire constituée d'une solution de 20 ml de PVA 2 %, afin d'obtenir des phages microencapsulés.

3.2.3 Stérilisation

3.2.3.1 Stérilisation aux rayons gamma

Des échantillons des phages liquides, des phages microencapsulés, des patchs chargés en bactériophages et d'indicateur biologique (*Bacillus pumilus*) ont été envoyés à NORDIAN (Laval, Canada) afin de les stériliser.

Pour ce fait un irradiateur de Cobalt 60 (^{60}Co) a été utilisé et quatre doses de rayons gamma ont été testées : 5, 10, 15 et 25 kGy selon les exigences de l'ISO 11137 : stérilisation des produits de santé afin d'obtenir un SAL de 10^6 .

3.2.3.2 Stérilisation à l'ultraviolet

Des échantillons des phages liquides, microencapsulés et des patchs chargés en bactériophages ont été exposés aux ultraviolets.

Une lampe germicide avec un rendement de 2*15 watts a été utilisée pour irradier les échantillons. D'abord, on a laissé la lampe brûler pendant un certain temps avant de l'utiliser afin de stabiliser la production d'énergie rayonnante.

Pour irradier les échantillons, la lampe UV a été placée à une distance de 40 cm des échantillons, puis ils ont été exposés aux UV pendant 15, 30, 60 et 90 minutes.

3.2.3.3 Stérilisation au dioxyde de carbone supercritique

Les patchs chargés en phages ont été stérilisés avec le dioxyde de carbone supercritique à NovaSterilis (Lansing, New York) en utilisant l'équipement NOVA2200.

Les patchs dans leurs emballages finaux, ont été exposés au SC-CO₂ pendant quatre durées de traitement afin d'optimiser la durée de stérilisation la plus appropriée pour les patchs parmi 30, 60, 90 et 120 min à une température et une pression de 35 °C et 97.71 atm respectivement. Aucun additif n'a été ajouté avec le carbone dioxyde.

3.2.3.4 Stérilisation à l'autoclave

La stérilisation à l'autoclave des patchs et des formulations liquides des phages a été effectuée sous les conditions suivantes :

Tableau 3.1 Les cycles de la stérilisation à l'autoclave

Type	Purge	Temps de stérilisation	Température de stérilisation	Séchage sous vide	Temps de séchage
Auto1 20X10	Gravité	1.00	20 min	121.0 °C	0.34 bar
Auto2 30X10	Gravité	1.00	30 min	121.0 °C	0.34 bar

3.2.4 Caractérisation biologique

3.2.4.1 Efficacité et stabilité à long terme

Étant donné que le poly ester amide Urea (PEAU) est un polymère hygroscopique (il absorbe l'humidité) [111], et que les phages sont des microorganismes sensibles à la température ; les patchs chargés en bactériophages stérilisés et non stérilisés ont été stockés à différentes températures 4, 26, 37 et 55 °C pendant 18 mois. Un test de stabilité a été effectué avant le stockage (temps 0) et après des périodes de stockages bien définies : 2 semaines, 3 mois, 6 mois, 12 mois et 18 mois.

3.2.4.2 Évaluation biologique *in vitro* : libération contrôlée des bactériophages actifs

Afin d'estimer le titre de phages libérés de patchs après chaque période de stockage, on a utilisé un milieu de relargage constitué d'une solution d'EMEM (composée d'acides aminés, des sels inorganiques et des vitamines) et de sérum de cheval (10 %, v/v).

Pour chaque patch stérilisé et non stérilisé, trois morceaux ont été prélevés de chaque échantillon (triplicata dépendants), puis mis dans des tubes Eppendorf contenant un volume de 1 ml de solution d'EMEM et de sérum de cheval (10 %, v/v).

Les patchs ont été incubés dans ce milieu pendant 30 min à 37 °C, ensuite ils ont été transférés à d'autres tubes contenant un nouveau milieu de relargage à des moments prédéterminés (1, 2, 3, 4, 24, 48, 72 h et 1 semaine).

Chaque échantillon obtenu après le test de relargage a ensuite subi le test de titrage afin de déterminer le nombre de phages libéré dans chaque 1 ml de milieu de relargage.

3.2.4.3 Titrage de phages

Le titrage de phages a été effectué sous la hotte biologique, les matériels et les milieux utilisés pour cette expérience ont été bien stériles.

Une dilution en série de l'échantillon de phages a été effectuée, en utilisant une pipette de 20 µl. Un volume de 11.1 µl de chaque tube a été prélevé puis mélangé dans un tube Eppendorf contenant un volume de 100 µl de milieu TSB afin d'obtenir une solution de phages diluée à 10^{-1} .

La même procédure a été répétée afin d'obtenir une dilution en série de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} .

Un volume de 100 µl de chaque bactérie *Staphylococcus*, *Pseudomonas* et *Klebsiella* a été mélangé avec 3 ml de Top Agar, puis homogénéisé et coulé sur la plaque pétrie afin d'obtenir une couche gélifiée d'une suspension de bactérie dans le Top Agar.

Ensuite, on a pris un volume de 10 µl de chaque tube de dilution et du tube de contrôle (l'échantillon non dilué) et on l'a déposé sous forme d'une goutte sur la plaque pétrie.

Une fois que les plaques pétries sont bien sèches, elles ont été incubées à 37 °C pendant 16-18 heures. Après cette période, des plages de lyse de phages sont apparues sur la plaque pétrie, par la suite le titre de phages libéré dans 1 ml de milieu de relargage a été calculé en utilisant la formule suivante :

$$\text{Nombre de phages par ml (PFU/ml)} = \frac{\text{nombre de plaques dans une goutte de 10 microlitres}}{\text{le facteur de dilution}} * 100$$

Afin d'obtenir le titre des phages dans les patchs en PFU/mg, on a normalisé le titre de phages par ml en le divisant par la masse en mg de patch utilisé pour le test de relargage.

3.2.5 Test de stérilité

Les échantillons stérilisés et non stérilisés ont subi le test de stérilité afin de détecter tout type de contamination aérobie ou anaérobie dans les patchs.

Le test a été effectué selon la Pharmacopée américaine (USP 71), sous la hotte biologique et tout le matériel utilisé pour ce test a été bien stérilisé avec de l'éthanol (70 %), pour éviter toute contamination qui peut avoir lieu à cause d'une mauvaise manipulation.

Deux milieux différents ont été utilisés, le milieu TSB pour détecter les bactéries anaérobies et le milieu FTM pour détecter les bactéries aérobies, et avant de commencer le test de stérilité, un test de stimulation de croissance « Growth promotion test » a été effectué selon la Pharmacopée américaine (USP 71) pour s'assurer que ces deux milieux sont bien stériles et non contaminés.

Pour effectuer le test de stérilité sur les formulations stérilisées et non stérilisées, deux morceaux de patchs ont été prélevés de chaque échantillon. Cependant, dans le cas des échantillons liquides deux prélèvements de 1 ml ont été pris de chaque échantillon. Chaque morceau prélevé des patchs ou chaque 1 ml prélevé de formulation liquide a été placé dans des tubes remplis avec 3 ml de milieu FTM et 3 ml de milieu TSB, puis ces tubes ont été incubés à 26 °C et 37 °C pour le TSB et le FTM respectivement pendant 14 jours.

Les tubes de test ont été inspectés chaque jour pendant 14 jours pour vérifier la présence de la croissance bactérienne visible.

3.2.6 Analyses statistiques

L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel SPSS-PC 23.0 (SAS, Cary, NC, USA), afin d'établir toute différence significative dans les titres des phages entre les échantillons stérilisés et non stérilisés. Les différences dans les titres de phage, exprimées en moyenne et écart-type des triplicatas dans tous les tests, ont été déterminées par les fonctions d'Excel. Le test de t-student a été utilisé pour comparer les moyennes à un niveau de signification de $P < 0,05$.

CHAPITRE 4 RÉSULTATS

Dans ce chapitre on va présenter les résultats de la stérilisation de formulations des phages liquides, encapsulés et piégés dans des patchs par le SC-CO₂, les rayons gamma et l'ultraviolet.

La première partie, concerne les résultats de la stérilisation par le SC-CO₂, où on va présenter d'abord, l'effet de la température de stockage sur l'activité des phages piégés dans des patchs non stérilisés, puis l'effet de stockage à long terme à différentes températures sur la cinétique de relargage des phages, ensuite on va présenter les résultats montrant l'effet de stockage à long terme à 4 °C et 26 °C sur l'activité des phages piégés dans des patchs stérilisés.

La deuxième et la troisième partie concernent la stérilisation aux rayons gamma et à l'ultraviolet respectivement de différentes formulations de phages : liquides, microencapsulés et piégés dans des patchs, où on va présenter les résultats de l'activité des phages après la stérilisation.

Les résultats de test de stérilité effectués sur les échantillons stérilisés et non stérilisés seront présentés à la fin de chaque partie de ce chapitre.

4.1 Stérilisation par le dioxyde de carbone supercritique

Dans cette partie, on va présenter les résultats de la stérilisation par le SC-CO₂ des phages piégés dans des patchs de PEAU. Dans la première section, on va parler d'abord sur l'effet de la température de stockage sur les patchs non stérilisés afin d'évaluer les températures idéales pour le stockage à long terme, puis on va discuter l'effet de la stérilisation au SC-CO₂ sur la cinétique de relargage des phages à partir des patchs et aussi sur la stabilité des phages à long terme (18 mois) et on clôture par les résultats de test de stérilité effectué sur des patchs stérilisés et non stérilisés au SC-CO₂.

4.1.1 Effet de la température de stockage sur l'activité des phages

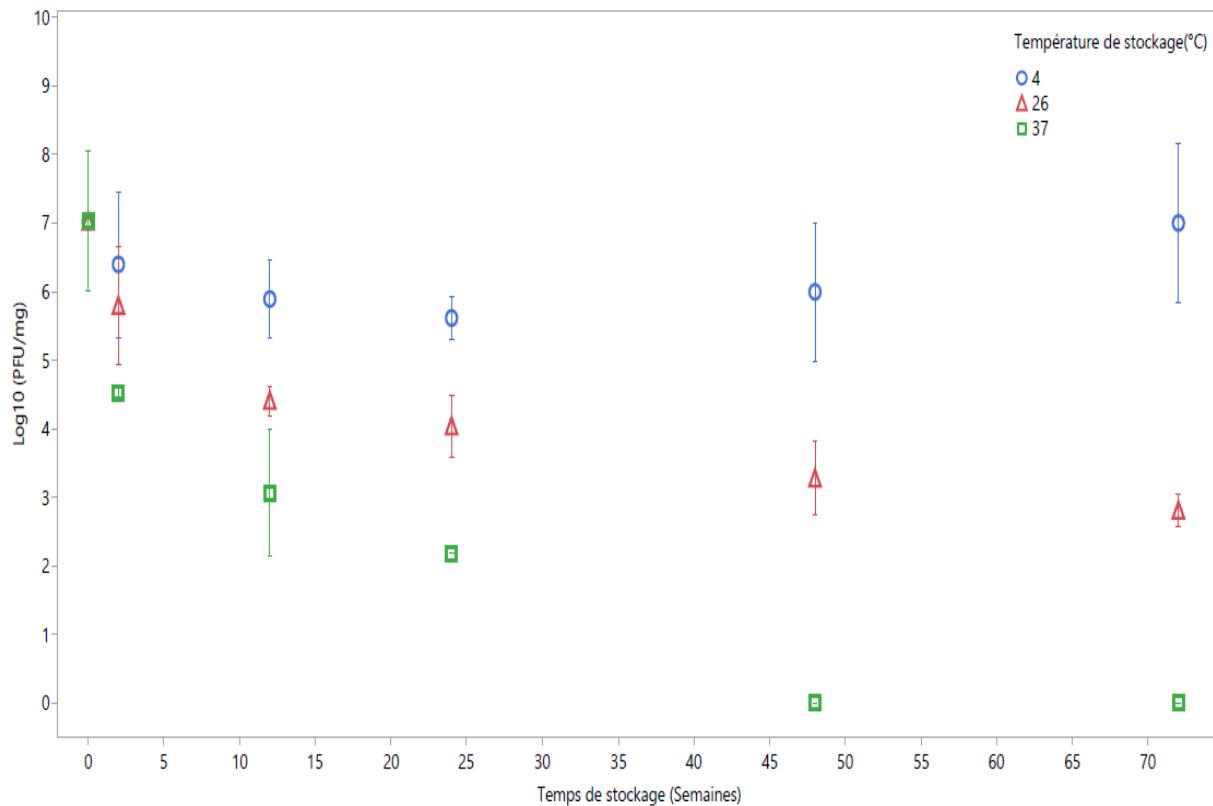


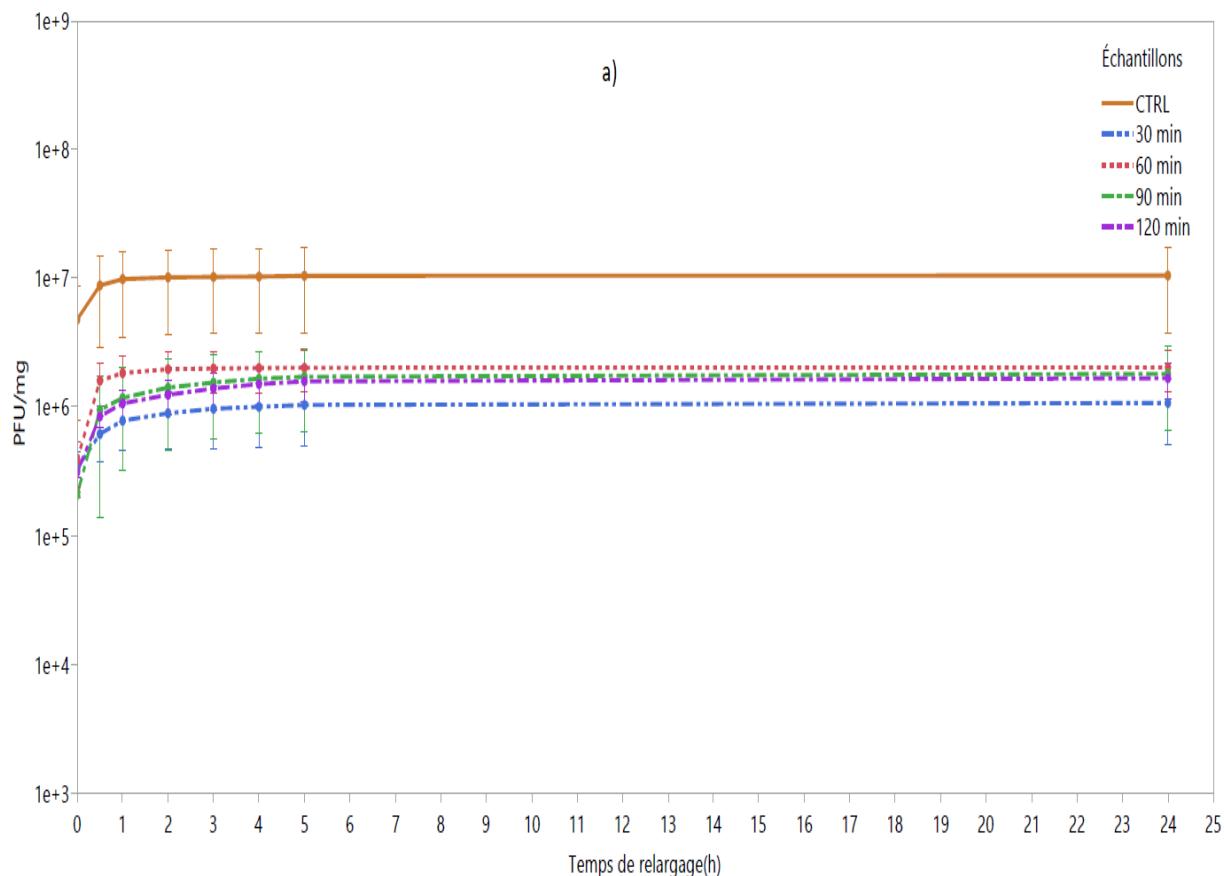
Figure 4.1 Effets de la température de stockage sur l'activité des phages piégés dans des patchs non stérilisés stockés à 4 °C (en bleu), stockés à 26 °C (en rouge) et stockés à 37 °C (en vert).

Avant d'évaluer l'effet de la stérilisation au SC-CO₂ sur la stabilité des phages piégés dans des patchs de PEAU, on a voulu d'abord connaître les températures idéales pour le stockage des patchs non stérilisés à long terme.

La figure 4.1 représente l'effet de différentes températures de stockage (4, 26 et 37 °C) sur la stabilité des phages piégés dans des patchs. Les résultats montrent que les phages stockés à 4 °C sont les plus stables pendant 18 mois et aucune réduction significative n'a été observée dans le titre des phages entre le point 0 et 18 mois de stockage, suivis par les patchs stockés à 26 °C qui ont montré une réduction significative de ~ 4 log₁₀ dans le titre phagique avant et après un stockage de 18 mois. Tandis que les phages stockés à 37 °C représentent une mauvaise stabilité, où une inactivation complète des phages a été notée après 48 semaines de stockage.

4.1.2 Effet de temps d'exposition au SC-CO₂ sur la cinétique de relargage des phages

L'effet de la stérilisation au SC-CO₂ sur la cinétique de relargage des phages à partir des patchs de PEAU a été aussi évalué dans ce projet. Dans la figure 4.2 on a comparé la cinétique de libération des phages à partir des patchs stérilisés et non stérilisés avant le stockage (figure 4.2.a) et après 18 mois de stockage à 4 °C et 26 °C (figure 4.2.b et figure 4.2.c), afin de vérifier si le profil de libération des phages change après un traitement au CO₂ supercritique et après un stockage pendant 18 mois à deux températures différentes (4 °C et 26 °C).



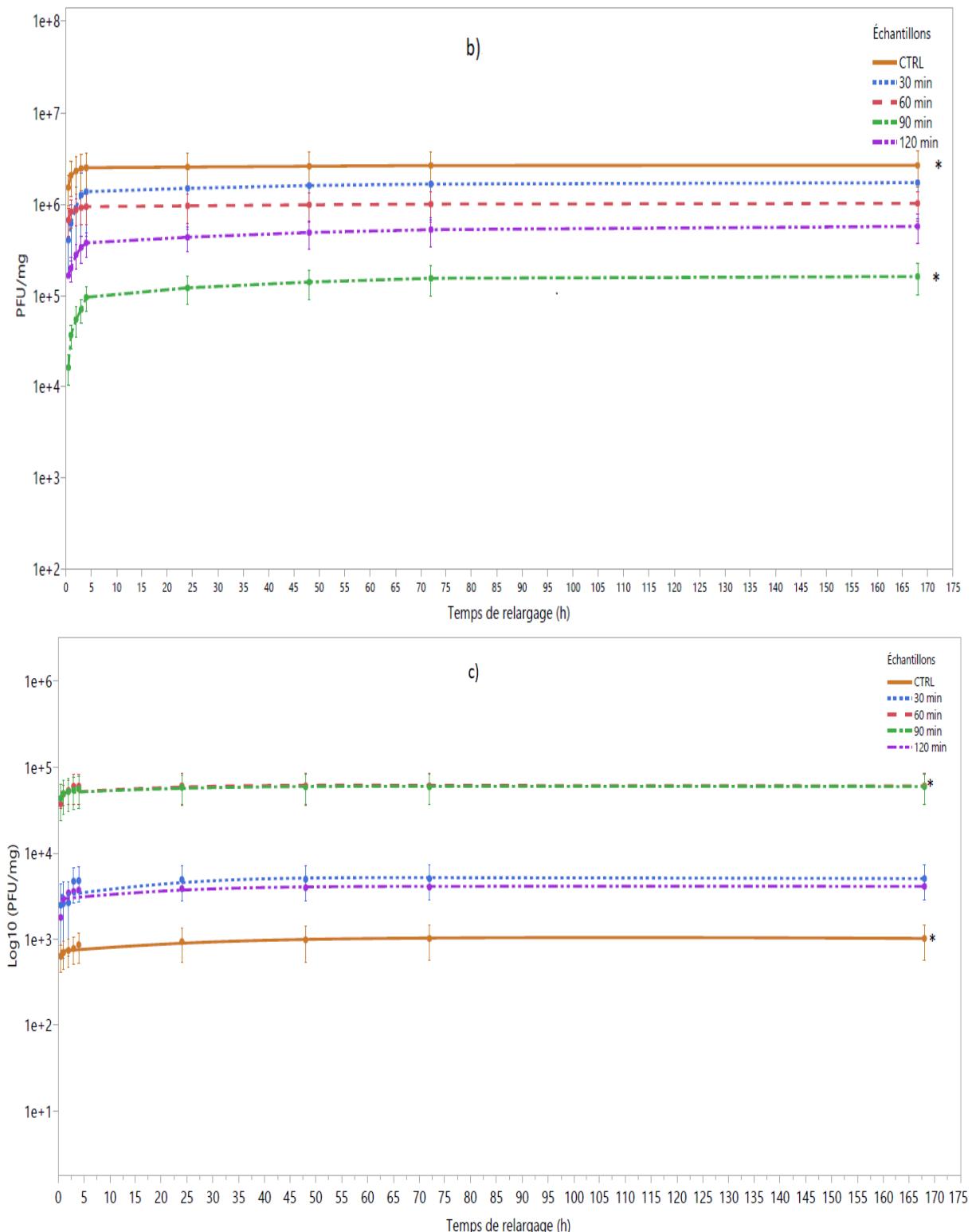


Figure 4.2 Relargage cumulatif des phages à partir des patchs stérilisés et non stérilisés avant le stockage (a), après 18 mois de stockage à 4 °C (b), après 18 mois de stockage à 26 °C (c).

La figure 4.2.a montre que les profils de relargage des phages à partir des patchs stérilisés et non stérilisés sont presque similaires et ne présentent aucune différence significative que ce soit entre les différents échantillons stérilisés ou les échantillons stérilisés et non stérilisés. De plus, on observe une libération rapide des phages dans les deux premières heures d'incubation *in vitro* dans le milieu EMEM mélangé avec 10 % de sérum de cheval, avec des taux de libération élevés : 96.7 %, 83.1 %, 97.0 %, 78.3 % et 74.3 % à partir des échantillons CTRL, 30, 60, 90, 120 min respectivement. Alors que, après cette période la libération devient plus lente et commence à se stabiliser à partir de la troisième heure d'incubation.

En outre, le stockage des patchs pendant 18 mois à 4 °C (figure 4.2.b) n'a pas montré un changement dans la cinétique de relargage de chaque échantillon, et la comparaison des profils de relargage de chaque échantillon traité au SC-CO₂ avant le stockage (figure 4.2.a) et après le stockage (figure 4.2.b) ne montre aucune différence significative entre eux. De plus, le relargage était plus rapide dans les trois premières heures d'incubation et les patchs continuent à libérer les phages graduellement même après 1 semaine (168 heures) d'incubation *in vitro*.

Cependant, pour les patchs stockés à 26 °C (figure 4.2.c), un changement complet a été noté dans les profils de relargage de tous les échantillons par rapport aux figures 4.2.a et 4.2.b. Le titre des phages total libéré après 168 jours d'incubation montre une diminution significative de presque 4 unités logarithmiques après 18 mois de stockage à 26 °C par rapport à la figure 4.2.a (avant le stockage). De plus, une différence significative a été notée entre la cinétique de relargage des patchs stérilisés et stockés à 26 °C par rapport à ceux non stockés et stockés à 4 °C.

4.1.3 Effet de la température de stockage sur la stabilité des patchs

L'effet de la stérilisation des patchs sur la stabilité des phages à long terme a été aussi évalué dans ce projet, la figure 4.3 montre l'effet de la température de stockage sur la stabilité des phages piégés dans des patchs stérilisés et non stérilisés.

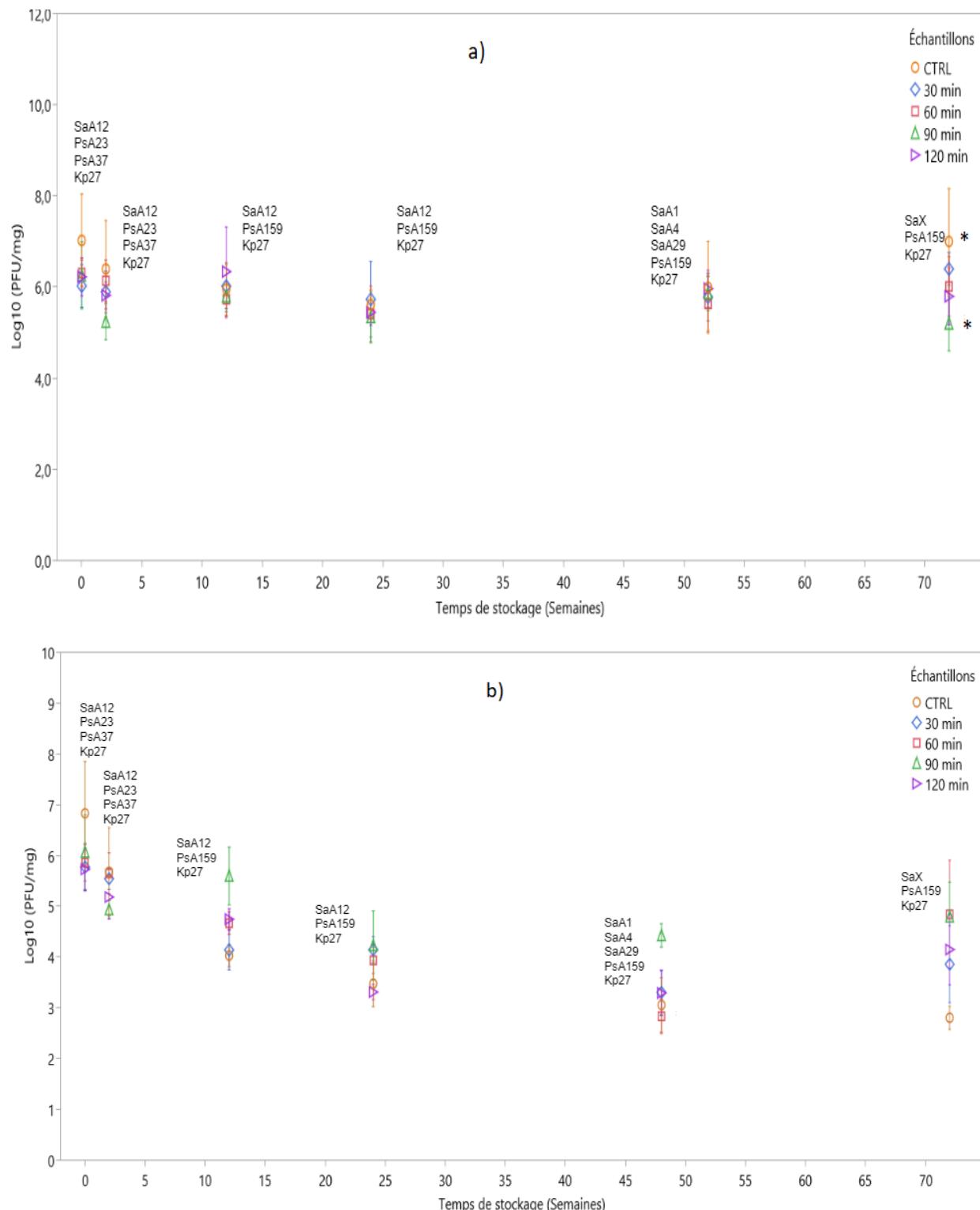


Figure 4.3 Effets de la température de stockage sur la stabilité des phages dans des patchs stérilisés pendant 30, 60, 90 et 120 min et non stérilisés (CTRL) stockés à 4 °C (a) et à 26 °C (b) pendant 18 mois.

La figure 4.3.a montre que les patchs stérilisés pendant (30, 60, 90 et 120 min) restent stables même après un stockage de 18 mois à 4 °C et aucune différence significative n'a été observée dans le titre des phages par rapport aux échantillons stérilisés à chaque point de stabilité. Cependant, la figure 4.3.b montre que les phages piégés dans des patchs stérilisés et stockés à 26 °C n'étaient pas stables pendant 18 mois de stockage et une réduction significative a été obtenue dans le titre des phages avant le stockage (temps 0) et après 18 mois de stockage pour les échantillons stérilisés et non stérilisés.

4.1.1 Test de stérilité

Les résultats de test de stérilité des patchs après différentes périodes d'exposition au SC-CO₂ (30, 60, 90 et 120 min) sont présentés dans le tableau 4.1.

Les résultats effectués sur des triplicatas dépendants de patchs stérilisés et stockés pendant 18 mois à 4 °C et 26 °C, indiquent que seulement 1/3 des échantillons stockés à 26 °C : (30 min (3) et 60 min (2)) montrent la présence d'une contamination anaérobiose. Cependant, le reste des échantillons étaient bien stériles et aucune contamination aérobiose ou anaérobiose n'a été détectée.

Tableau 4.1 Résultats de test de stérilité

Température (°C)	4		26	
Échantillon	TSB	FTM	TSB	FTM
CTRL positif	(-)	(-)	(-)	(-)
CTRL (1)	(-)	(-)	(-)	(-)
CTRL (2)	(-)	(-)	(-)	(-)
CTRL (3)	(-)	(+)	(-)	(-)
30 min (1)	(-)	(-)	(-)	(-)
30 min (2)	(-)	(-)	(-)	(-)
30 min (3)	(-)	(-)	(+)	(-)
60 min (1)	(-)	(-)	(-)	(-)
60 min (2)	(-)	(-)	(+)	(-)
60 min (3)	(-)	(-)	(-)	(-)
90 min (1)	(-)	(-)	(-)	(-)
90 min (2)	(-)	(-)	(-)	(-)
90 min (3)	(-)	(-)	(-)	(-)
120 min (1)	(-)	(-)	(-)	(-)
120 min (2)	(-)	(-)	(-)	(-)
120 min (3)	(-)	(-)	(-)	(-)

(-) : stérile/(+) : contaminé

4.2 Stérilisation aux rayons gamma

La deuxième méthode de stérilisation testée dans ce projet était les rayons gamma. L'activité des phages dans des formulations liquides, encapsulés et piégés dans des patchs a été évaluée après une irradiation à des doses gamma de 5, 10, 15 et 25 kGy et présentée dans le tableau 4.2 sous forme d'unités logarithmiques de réduction dans le titre phagique. De plus, les résultats de test de stérilité ont été présentés sous forme de signe « + » et « - » ; où le signe « + » signifie que l'échantillon est contaminé, tandis que le signe « - » signifie que l'échantillon est stérile.

Tableau 4.2 \log_{10} de réduction du titre des phages en fonction de la dose d'irradiation gamma.

Formulation	Dose d'irradiation gamma (kGy)			
	5	10	15	25
Phages non encapsulés	8.7 (-)	8.7 (-)	8.7 (-)	8.7 (-)
Phages encapsulés	3.9 (-)	4.8 (-)	7.1 (-)	7.1 (-)
Patchs	2.9 (-)	3.9 (-)	5.2 (-)	5.2 (-)

Les résultats montrent que les phages liquides présentent une réduction rapide de leur titre et une inactivation complète des phages a été observée après une irradiation de 5 kGy. Cependant, les phages encapsulés et piégés dans des patchs de PEAU montrent une réduction de $3.9 \log_{10}$ et $2.9 \log_{10}$ respectivement après une irradiation à la même dose et une inactivation complète des phages à une dose de 15 kGy.

D'autre part, les résultats de test de stérilité ont révélé l'absence de contamination aérobie et anaérobie dans les formulations des phages liquides, encapsulés et piégés dans des patchs de PEAU.

4.3 Stérilisation à l'ultraviolet

La stérilisation UV a été effectuée sur des formulations des phages liquides et piégés dans des patchs de PEAU. Les résultats de l'activité des phages après différentes périodes d'exposition aux

rayons UV (15, 30, 60 et 90 min) sont présentés dans le tableau 4.3 sous forme d'unités logarithmiques de réduction dans le titre des phages.

De plus, les résultats de test de stérilité sont présentés dans le même tableau sous forme de signe « + » et « - » ; où le signe « + » signifie que l'échantillon est contaminé, tandis que le signe « - » signifie que l'échantillon est stérile.

Tableau 4.3 \log_{10} de réduction du titre des phages en fonction de la durée d'exposition aux UV.

Formulation	Durée d'exposition (min)			
	15	30	60	90
Phages liquides	2.15 ⁽⁻⁾	2.29 ⁽⁻⁾	2.80 ⁽⁻⁾	3.28 ⁽⁻⁾
Patchs	2.11 ⁽⁻⁾	2.07 ⁽⁻⁾	1.83 ⁽⁻⁾	1.99 ⁽⁻⁾

Les résultats ne montrent pas une différence significative dans le \log_{10} de réduction dans le titre phagique entre les phages liquides et piégés dans des patchs de PEAU après une exposition aux UV pendant 15, 30 et 60 min. Cependant, cette différence devient significative après une exposition de 90 min, et les phages liquides montrent une réduction de $3,28 \log_{10}$ vs $1,99 \log_{10}$ pour les phages piégés dans les patchs de PEAU.

L'exposition des phages liquides et piégés dans des patchs aux rayons UV ne montre aucune contamination aérobie ou anaérobie selon les résultats obtenus par le test de stérilité.

4.4 Stérilisation à l'autoclave

La chaleur sèche a été aussi testée dans ce projet pour la stérilisation des formulations des phages. Les résultats de la stérilisation à l'autoclave montrent une inactivation complète des phages sous les deux conditions de stérilisation « grav20 » et « grav 30 ». Cependant le test de stérilité a montré l'absence de contamination aérobie et anaérobie dans les formulations des phages après ces deux cycles d'autoclavage, ce qui montre que les patchs et les formulations liquides étaient bien stériles, mais les températures élevées de la stérilisation par l'autoclave étaient très compromettantes pour les phages.

CHAPITRE 5 DICSUSSION GÉNÉRALE

L'utilisation des phages en tant qu'agents antibactériens est devenue une application thérapeutique très attrayante pour surmonter le problème de la résistance bactérienne aux antibiotiques. Cependant, vu que les phages sont des structures protéiques qui renferment un matériel génétique, leur stabilité dans des formulations liquides est limitée. De plus, leur activité *in vivo* peut être diminuée à cause des conditions physiologiques défavorables ou suite aux réponses immunitaires déclenchées par le corps humain. Cela nécessite le développement et l'optimisation des formulations des phages qui maintiennent leur stabilité à long terme et assurent la présence d'une dose phagique suffisante pour traiter les infections bactériennes.

Néanmoins, cette classe de biomatériaux doit avoir un niveau de stérilité très élevé, afin de ne pas causer une nouvelle infection bactérienne. Cependant, la nature protéique des phages et la présence d'un matériel génétique rendent le choix de la méthode de stérilisation appropriée pour ces formulations biologiques très problématique, en raison de la sensibilité élevée des protéines et de matériel génétique à la stérilisation.

C'est pour cela, on a développé une formulation des phages intégrés dans des patchs de PEAU et on a testé trois méthodes de stérilisations : SC-CO₂, rayons gamma et UV, afin de choisir la méthode la plus appropriée pour stériliser ces formulations sans diminuer l'activité des phages et aussi qui assure la stabilité et la stérilité des patchs chargés en phages à long terme.

Dans ce projet, on a commencé par évaluer les conditions de stockage les plus appropriées pour assurer une longue stabilité des patchs. C'est pour cette raison qu'on a d'abord stocké les patchs non stérilisés (CTRL) à différentes températures (4, 26, 37 et 55 °C) et on a montré par la suite une relation claire entre la température de stockage et la stabilité des phages.

Les résultats montrent que le stockage des patchs à 4 °C présente un excellent résultat en terme de stabilité des phages à long terme (figure 4.1), malgré que le titre des phages mesuré entre le point 0 et 18 mois montre quelques fluctuations dues aux changements de bactéries hôtes lors de titrage des phages, aux erreurs des équipements de laboratoires et essentiellement à la non-homogénéité de patch... etc. Cependant, cette différence est considérée comme non significative et après 18 mois de stockage les patchs contiennent toujours $\sim 7 \log_{10}$ de phages.

Néanmoins, puisque les patchs chargés en phages sont généralement utilisés dans des conditions ambiantes, et que le stockage et le transport à froid pourrait être difficile à réaliser dans les pays en développement, la stabilité adéquate des patchs à température ambiante est essentielle pour éviter la dégradation du produit avant son utilisation par le patient. C'est pourquoi on a aussi stocké nos patchs à 26 °C [112].

Selon la figure 4.1, une augmentation de la température de stockage a causé une diminution de la stabilité des phages, telle que le cas pour les patchs stockés à 26 °C ; où après deux semaines de stockage, une réduction de presque $1,25 \log_{10}$ dans le titre de phages a été obtenue. Cette réduction continue à augmenter au cours du temps jusqu'à l'obtention de presque $4 \log_{10}$ de réduction après 18 mois de stockage.

Cette inactivation dans le titre des phages est de $4 \log_{10}$ plus que celle obtenue pour les patchs stockés à 4 °C ($0,13 \log_{10}$) après 18 mois. Cela peut être dû à la forte humidité relative (40 %) dans les incubateurs et à la température d'incubation (26 °C).

L'humidité relative élevée (40 %) dans les incubateurs de 26 °C a provoqué probablement la cristallisation de la matrice amorphe du sucre, la formation des cristaux et par conséquent la destruction des phages, malgré que les patchs ont été conditionnés sous vide et en utilisant des poches résistantes à l'humidité [113]. Cela veut dire que le conditionnement des patchs dans ces poches n'était pas suffisant pour protéger les phages contre l'humidité. Par conséquent, un contrôle de l'humidité relative (<20 %) devrait être mis en place dans les incubateurs afin de la minimiser en utilisant des systèmes d'absorption de l'humidité.

D'autre part, le stockage à une température de 26 °C pendant 18 mois a provoqué une instabilité thermique des phages, car ces derniers sont des structures protéiques, et une température élevée provoque la dénaturation de leur manteau composé de protéines [113].

Tous ces facteurs ont causé l'inactivation des phages à divers degrés, car d'après [40] les effets de la formation de cristaux sur la viabilité des phages semblent être spécifiques aux phages. Les virions de phage plus gros sont plus susceptibles d'être inactivés que les plus petits virions de phage et même pour la température, certains phages sont plus sensibles aux températures élevées que d'autres [40].

Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par Gonzalez-Menendez *et al.* [114], où le stockage de phage phiIPLA-RODI lyophilisé dans 15 % de lait écrémé et dans 15 % de tréhalose pendant 6 mois à 26 °C a causé une réduction de 4 unités logarithmiques, tandis que le stockage pendant 12 mois a causé une inactivation complète des phages [114].

L'effet négatif de l'humidité et les températures élevées sur les phages étaient aussi bien clair dans les résultats de la stabilité des patchs stockés à 37 °C. Une réduction de presque $2,5 \log_{10}$ a été obtenue seulement après deux semaines de stockage, la réduction continue d'augmenter jusqu'à ce que l'on dépasse la limite de détection (phages totalement inactivés). Ainsi que pour les résultats de stockage des patchs à 55 °C (résultats non montrés), où une inactivation complète des phages a été notée après seulement deux semaines de stockage. Ces résultats ont été aussi obtenus par Jończyk-Matysiak *et al.* [113], où le phage ZF-40 actif contre *Pectobacterium carotovorum* s'est révélé sensible aux températures élevées et une réduction de 99.4 % a été obtenue suite à une incubation à 57 °C pendant 5 minutes. L'inactivation est probablement due à l'effet de changements dans la conformation de la plaque basale, ou à la suite de l'effondrement de la tête du phage d'après les auteurs [113].

Basés sur ces résultats montrés par la figure 4.1, on a décidé de poursuivre le travail avec les deux températures : 4 °C et 26 °C.

Certaines méthodes de stérilisation sont connues pour modifier les caractéristiques physico-chimiques et mécaniques des polymères utilisés comme des systèmes de délivrance des médicaments, telles que la scission des chaînes polymériques ou la diminution de la masse moléculaire, qui vont provoquer par la suite un changement dans la cinétique de relargage des molécules [96, 99].

Cependant, on estime que ces modifications n'ont pas été obtenues dans les patchs stérilisés par le SC-CO₂, car aucune différence significative n'a été notée dans les profils de relargage des phages libérés à partir des patchs stérilisés par rapport à ceux non stérilisés (figure 4.2.a). Les profils de tous les échantillons montrent une libération rapide dans les deux premières heures, suivie par une libération graduelle jusqu'à 24 h d'incubation *in vitro*.

D'autre part, le titre des phages libérés à chaque instant à partir des patchs non stérilisés (CTRL) était plus grand que celui des patchs stérilisés (vitesse de libération plus grande). De plus, le nombre total des phages libérés après 24 h d'incubation était plus grand dans les patchs non stérilisés (CTRL) que ceux stérilisés.

Cette réduction obtenue dans la vitesse de libération et le taux total des phages libérés dans les échantillons stérilisés est due au fait que la charge initiale des patchs non stérilisés en phages actifs était plus grande que celle des patchs stérilisés. Cela remonte à l'effet létal de la température élevée et la dépressurisation durant le processus de stérilisation. Cependant, cette différence dans la vitesse de relargage et le titre total des phages libéré entre les échantillons non stérilisés et stérilisés ainsi que les échantillons stérilisés entre eux est non significative.

Après les bons résultats obtenus selon lesquels les patchs de PEAU non stockés représentent un excellent système de libération prolongée des phages, et que le SC-CO₂ n'a pas affecté significativement leur cinétique de relargage. C'est pour cette raison, on a voulu savoir si un stockage à long terme à une température de 4 °C et 26 °C allait modifier la cinétique de relargage des phages à partir des patchs stérilisés et non stérilisés.

La comparaison des profils de libération des phages à partir des patchs stérilisés et non stérilisés avant le stockage (figure 4.2.a) et après 18 mois de stockage à 4 °C (figure 4.2.b) ne montre aucune différence significative dans la cinétique de relargage et le titre total des phages libérés. Cela n'était pas le cas pour l'échantillon 90 min, où on a obtenu une différence significative (*p<0.05) probablement due à la diminution de la charge initiale des patchs en phages actifs à cause du pressurisation et dépressurisation durant le processus de stérilisation.

Cependant, pour les patchs stockés à 26 °C, une réduction significative (*p<0.05) dans la cinétique de relargage a été obtenue pour tous les échantillons stérilisés par rapport à ceux stérilisés mais non stockés (figure 4.2.a) entre 1.5 et 4.05 log₁₀/h. Cette réduction est due principalement à l'effet négatif de la température et l'humidité relative de stockage à 26 °C à long terme. En effet, cette température a causé une instabilité thermique de la structure protéique des phages, tandis que la forte humidité relative dans les incubateurs a provoqué la cristallisation de la matrice de sucre et la formation des aiguilles de cristaux qui ont causé la destruction des phages et la diminution de leurs charges dans les patchs.

Étonnamment, la différence de la cinétique de relargage était plus grande dans le cas des échantillons non stérilisés (CTRL) ; où une réduction de $5.74 \log_{10}/h$ a été obtenue. Ce résultat inattendu confirme encore que la cause principale de cette réduction est bien l'effet létal de la température et l'humidité relative de stockage à long terme et non pas la pressurisation et la dépressurisation durant le processus de la stérilisation.

D'autre part, les échantillons stérilisés et stockés à 26 °C ont montré une réduction entre 0.68 et 2.28 unités logarithmiques dans le titre total des phages libérés après 1 semaine d'incubation par rapport à ceux stérilisés et non stockés (la figure 4.2.a). Cependant, pour les échantillons non stérilisés (CTRL) une réduction inattendue de l'ordre de 4 unités logarithmiques a été observée. Cette réduction significative dans le titre total des phages libérés à partir des patchs stérilisés et non stérilisés, n'était pas causé par l'inactivation des phages par le SC-CO₂, mais plutôt par leur inactivation suite à la destruction de la structure protéique des phages à cause de la cristallisation de la matrice de sucre.

Ces résultats montrent que le PEAU est un polymère très prometteur en tant que système de délivrance des phages qui assure une libération contrôlée avec une cinétique de l'ordre zéro. De plus, la stérilisation au SC-CO₂ n'altère pas cette cinétique ni à court ni à long terme si les patchs sont stockés à 4 °C. Ceci est avantageux pour notre projet, car une libération prolongée des phages est souhaitable afin de garder la dose de phages nécessaire pour avoir l'effet antibactérien désiré. Cependant, une libération des phages *in vivo* est recommandée dans ce cas, afin de voir l'effet du milieu morphologique (pH, présence des protéines ...etc.) sur la libération des phages.

L'étude de la stabilité des patchs stérilisés et stockés à 4 °C pendant 18 mois (figure 4.3.a) montre qu'à chaque point de stabilité, aucune différence significative n'a été observée entre les échantillons 30, 60, 90 et 120 min. Cependant à la 72^{ème} semaine, une différence significative a été observée entre les échantillons CTRL et les échantillons 90 min (*p<0.05).

Cette différence significative est due principalement à l'utilisation des triplicatas indépendants en plus des triplicatas dépendants des échantillons pris du patch principal. En effet, l'augmentation de nombre d'échantillons pris du patch principal nous a permis d'évaluer le titre phagique dans plusieurs zones de ce dernier, ce qui a permis de surmonter le problème de la non-homogénéité du patch principal et d'obtenir des résultats plus exacts. Contrairement aux points de stabilités

précédents (avant la 72^{ème} semaine), où seulement des triplicatas dépendants ont été pris de même échantillon.

De plus, à la 72^{ème}, toutes les bactéries cibles utilisées étaient des bactéries pathogènes (SaX, PSA159 et KP27), qui ont donné un titre élevé par rapport à celles non pathogènes (d'après des résultats précédents obtenus et non montrés ici), c'est pourquoi une réaugmentation dans le titre phagique des échantillons CTRL, 30 et 60 min a été notée.

D'autre part, les fluctuations résultantes avant la 72^{ème} sont dues principalement aux changements de bactéries, où durant cette période de stabilité (entre le temps 0 et 48 semaines), certaines bactéries pathogènes ont été remplacées par d'autres non pathogènes et vice versa. De plus les erreurs dans le matériel de laboratoire, les erreurs de titrage et la non-homogénéité de patch ont aussi causé ces fluctuations.

Pour clarification, la non-homogénéité du patch principal est principalement liée au temps court d'homogénéisation de la formulation PEAU-phages (20 secondes), afin d'éviter l'évaporation rapide de Dichlorométhane qui entraîne l'augmentation de la viscosité de la formulation et aussi pour éviter la destruction de la structure protéique des phages.

Néanmoins, si on compare le titre total des phages au temps 0 et après 72 semaines de stockage (résultats plus exacts et fiables), on ne remarque aucune réduction significative dans le titre des phages de tous les échantillons et surtout l'échantillon 30 min qui a montré une excellente stabilité par rapport à l'échantillon CTRL ($2.50e^{+6}$ PFU/mg vs $7.74e^{+6}$ PFU/mg). Cela nous confirme que le SC-CO₂ n'affecte pas la stabilité des patchs chargés en phages même après 18 mois de stockage à 4 °C. Ce résultat est très acceptable de point de vue dosage des formulations à base des phages.

La stabilité des patchs stérilisés et stockés à 26 °C (figure 4.3.b) montre une réduction graduelle dans le titre des phages avec l'augmentation de temps de stockage. De plus la différence dans le titre des phages des échantillons stérilisés à chaque instant de stabilité est non significative, ce qui montre que la durée de stérilisation au SC-CO₂ n'a pas un effet significatif sur le titre des phages.

La figure 4.3.b montre la présence de quelques fluctuations dans le titre phagique de chaque échantillon au cours du temps. Ces dernières sont dues principalement à la non-homogénéité des patchs et aux changements des bactéries hôtes. Cependant, si on compare le titre des phages dans

les échantillons (30, 60, 90 et 120 min) au temps 0 et après 72 semaines de stockage, on constate une réduction dans le titre des phages entre 1.50 et 2.19 unités logarithmiques avec une stabilité maximale pour les échantillons 60 et 90 min, tandis que l'échantillon CTRL présente une réduction de 4,16 unités logarithmiques, ce qui confirme encore que les principales causes de l'inactivation des phages étaient la forte humidité (40 %) et la température (26 °C) et non pas le SC-CO₂.

Basés sur ces résultats, nous concluons que la stabilité des patchs chargés en phages à long terme dépend de la température et l'humidité relative de stockage, et non pas du SC-CO₂. Une optimisation des conditions de stockage des patchs stérilisés pour limiter la cristallisation du sucre et éviter la dégradation des phages pourra être la meilleure solution pour augmenter la stabilité des patchs à 26 °C. De plus, le choix de cryoprotecteur semble être aussi important ; car des cryoprotecteurs avec des températures de transition vitreuse (T_g) faibles ou moyennes, en présence d'une humidité relative élevée et même à des températures inférieures à leurs T_g, seront facilement cristallisables et causeront par la suite la destruction des phages surtout ceux avec de grands virions. Donc, l'utilisation d'un autre cryoprotecteur tel que le tréhalose qui a une T_g élevée (115 °C) est préférable afin de prévenir l'inactivation des phages.

Le test de stérilité, montre que 2/3 des échantillons non stérilisés (contrôle) ont été non contaminés, ce qui montre que le procédé de fabrication des patchs a été effectué dans des conditions bien stériles. En plus l'effet bactéricide de solvant organique le dichlorométhane a aidé à éliminer la contamination présente dans les patchs.

La contamination observée dans le 1/3 des échantillons stockés à 26 °C : (30 min (3) et 60 min (2)) dans le milieu TSB est probablement due à une manipulation non stérile lors de la réalisation du test de stérilité, ou à cause d'un matériel utilisé non stérile (tubes non stériles, pince non stérile, gant non stérile).

La manipulation stérile lors de fabrication des patchs, en plus de la forme lyophilisée des phages dans des patchs solides, ont joué un grand rôle dans le maintien de la stérilité des patchs. Cependant, pour une application médicale, un niveau de stérilité élevé est exigé, d'où la nécessité d'effectuer un test de stérilité sur le produit final « post sterilization » afin d'assurer la stérilité et l'innocuité du produit dans ce son conditionnement final.

Néanmoins, ces résultats montrent que les patchs restent stériles même après une longue période de stockage (18 mois) et ne présentent aucune contamination aérobie ou anaérobie qui peut provoquer des effets négatifs après une utilisation clinique.

La stérilisation des formulations des phages par des méthodes de radiations telles que les rayons gamma a montré des résultats différents par rapport à ceux de SC-CO₂. Les résultats du tableau 4.2 montrent que comme prévu, les phages non encapsulés (formulation liquide) ont été complètement inactivés après une irradiation de 5 kGy, tandis que les phages encapsulés ont perdu 3,9 unités logarithmiques à la même dose, et ils ont été complètement inactivés à une dose de 15 kGy. D'autre part, les phages lyophilisés et piégés dans le PEAU (patchs) ont perdu 2,9 et 3,9 unités logarithmiques suite à une irradiation de 5 et 10 kGy respectivement, et ils ont été complètement inactivés après une irradiation de 15 kGy.

Ces résultats montrent que la cinétique d'inactivation des phages était plus petite dans le cas des phages encapsulés dans du PVA ou piégés dans des patchs de PEAU par rapport aux phages dans des formulations liquides. Ceci est justifié par l'effet protecteur de la matrice de polymère sur la viabilité des phages.

Les polymères utilisés pour l'encapsulation des phages ou leur piégeage dans des patchs, ont protégé les phages contre le mécanisme direct des rayons gamma et le mécanisme indirect qui peut avoir lieu suite à l'hydrolyse de la molécules d'eau et la formation de radicaux libres tels que l'OH, les atomes H⁺ et les électrons solvatés e_{aq}. Ces deux mécanismes directs et indirects des rayons gamma peuvent endommager le matériel génétique ou la structure protéique et par la suite inactiver les phages.

De plus, il a été démontré que la diffusion de ces radicaux libres diminue en présence d'une matière organique, et dans certains cas cette matière organique peut absorber les rayons gamma. Cela était le cas pour les microcapsules de PVA qui ont absorbé certains rayons gamma et par la suite ils ont minimisé l'inactivation des phages. D'autre part, les phages sont plus résistants aux rayons gamma lorsqu'ils sont irradiés dans des conditions sèches comme les patchs qui sont des formulations sèches et qui contiennent de plus des phages lyophilisés. Par contre, la sensibilité des phages dans les formulations liquides était plus grande, car leur matrice n'était pas dense et la diffusion des radicaux libres était facile, cela justifie la grande vitesse d'inactivation des phages [78, 115].

En revanche, la famille et la morphologie des phages ont aussi un effet sur la sensibilité des phages aux rayons gamma [78]. Dans notre étude, on a utilisé un cocktail des phages avec différentes familles et morphologies, qui ont une sensibilité différente aux rayons gamma (les phages *Klebsiella* sont plus résistants que les phages *Pseudomonas* qui sont plus résistants que les phages *Staphylococcus*). Les phages les plus sensibles aux radiations causent une grande réduction dans le titre total du cocktail de phages.

Les doses établies pour la stérilisation de nos formulations (≤ 25 kGy) selon les exigences de l'ISO 11137 : stérilisation des produits de santé afin d'obtenir un SAL de 10^6 , ont bien stérilisé ces formulations. Par contre, elles ont causé des réductions significatives dans le titre des phages, même la plus faible dose (5 kGy), qui a induit une réduction de $2.9 \log_{10}$ dans le titre des phages piégés dans des patchs. Cependant, cette dose (5 kGy) a assuré la stérilité des patchs d'après les résultats de test de stérilité. Malgré que l'exposition d'indicateur biologique *B. Pumilus* a montré une présence de contamination après une irradiation de 5 kGy, ce qui montre que probablement les patchs étaient déjà stériles à cause de l'effet bactéricide de Dichlorométhane.

Les résultats de la stérilisation des formulations des phages liquides et piégés dans des patchs par les rayons UV ont montré que contrairement aux rayons gamma, la matrice n'a pas une grande influence sur la viabilité des phages à moins à des courtes durées de stérilisation. Le taux de réduction logarithmique dans le titre des phages liquides et piégés dans des polymères est presque similaire (pas de différence significative entre eux) après 15 et 30 min de stérilisation, avec une réduction de $\sim 2 \log_{10}$. Cependant cette réduction augmente après 60 et 90 min d'exposition aux UV pour les formulations des phages liquides, mais pour les phages intégrés dans des patchs on n'a pas noté une différence significative dans le titre après 60 et 90 min de stérilisation.

Si on compare ces résultats avec ceux de rayons gamma, on observe qu'à de courtes durées d'exposition aux UV, la matrice n'a pas un effet significatif sur la viabilité des phages. Cependant, une différence significative dans la sensibilité des phages liquides et piégés dans des patchs a été notée après une durée de stérilisation de 90 min, où on a obtenu $3,28$ et $1,99 \log_{10}$ de réduction dans le titre des phages liquides et piégés dans des patchs respectivement. Cela est probablement dû à l'absorption élevée des rayons UV par les formulations liquides que les formulations solides. D'autre part, le \log_{10} de réduction obtenu par les UV après de longues durées d'exposition (90 min) est plus petit que celui des rayons gamma à des doses élevées (15 et 25 kGy).

Ceci peut être justifié par le fait que l'ultraviolet est moins ionisant que les rayons gamma et dans notre projet on a utilisé une lampe UV germicide à faible intensité (2*15 watts), qui a causé des effets moins létaux sur les phages que les rayons gamma.

Le test de stérilité montre que les formulations de phages liquides et piégés dans des patchs de PEAU étaient bien stériles après des durées de stérilisation de 15, 30, 60 et 90 min, mais le taux de réduction causé dans le titre des phages ($\sim 2 \log_{10}$) est inacceptable de point de vue dosage des formulations des phages.

CHAPITRE 6 CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

Dans ce projet, on a présenté pour la première fois l'effet de la stérilisation au dioxyde de carbone supercritique, aux rayons gamma et à l'ultraviolet sur l'activité, la stabilité et la stérilité des patchs de PEAU chargés en phages.

Notre système de délivrance des phages à base de polymère PEAU a montré un profil de libération contrôlée pendant une semaine, idéal pour la délivrance et le maintien de l'activité des phages dans les sites des infections bactériennes. La stérilisation de ce système de libération des phages par le SC-CO₂ a montré que ce dernier n'a aucun effet significatif sur la cinétique de relargage des phages à court et à long terme de stockage. Une température de stockage de 4 °C était optimale pour conserver la cinétique de relargage des phages à partir des patchs. Cependant, le stockage à une température de 26 °C a montré des changements significatifs dans la cinétique de relargage dus à la diminution de la charge initiale des phages actifs et non pas à l'effet de SC-CO₂. Néanmoins, afin de confirmer l'exactitude de cette hypothèse, une caractérisation physico-chimique des patchs de PEAU est nécessaire afin de mesurer sa masse molaire et son taux de réticulation après une exposition au SC-CO₂.

Les patchs stérilisés au SC-CO₂ ont montré une excellente stabilité pendant 18 mois de stockage. Cette stabilité était meilleure dans le cas d'un stockage à 4 °C, tandis que le stockage à 26 °C a induit une réduction dans le titre des phages à cause de l'effet létal de la température et la forte humidité à long terme, d'où la nécessité de l'optimisation des conditions de stockage.

De plus, la durée de stérilisation n'a pas montré une corrélation significative avec la stabilité et la stérilité des phages, ce qui ne nous permettra pas de choisir la durée de stérilisation optimale pour stériliser les patchs. L'absence de cette corrélation remonte probablement à la non-homogénéité des patchs ; les phages n'étaient pas bien repartis sur la surface des patchs, d'où la nécessité d'optimiser la répartition des phages dans les patchs.

Contrairement au SC-CO₂, la stérilisation par les rayons gamma a montré une corrélation entre la dose et le taux d'inactivation des phages. De plus, on a confirmé notre hypothèse sur l'effet protecteur des polymères sur les phages, car la cinétique d'inactivation était plus rapide dans le cas des formulations solides (patchs) que liquides. Cependant, la stérilisation aux UV n'a pas montré

de corrélation entre la durée de stérilisation et le taux d'inactivation des phages en raison de la faible puissance de la lampe UV.

Les réductions logarithmiques obtenues après la stérilisation gamma et UV sont inacceptables de point de vue dosage des phages ; car une réduction de titre des phages supérieure à $1 \log_{10}$ est considérée comme significative et on risque de ne pas avoir une dose thérapeutique efficace pour éradiquer les bactéries infectantes. Donc ces méthodes de stérilisations ne sont pas recommandées pour stériliser les formulations à base des phages.

À la fin de ce projet, on a pu développer une méthode de stérilisation par le SC-CO₂ très prometteuse et efficace pour la stérilisation finale des formulations à bases des phages sans altérer l'activité des phages même à long terme. Cependant, pour assurer la stabilité des phages à 26 °C, un contrôle de l'humidité relative (HR<20 %) semble être nécessaire afin de prévenir la cristallisation de cryoprotecteur, et/ou le choix d'un cryoprotecteur avec une température de transition vitreuse élevée (T_g) tel que le tréhalose.

La stérilisation au SC-CO₂ est fortement recommandée pour les biomatériaux sensibles aux méthodes de stérilisation conventionnelles tels que les valves cardiaques et les tissus biologiques, ou les formulations biologiques à base des protéines ou celles qui contiennent des matériaux génétiques. De plus, cette méthode semble être efficace pour la stérilisation des systèmes polymériques de délivrance des principes actifs biologiques sans altérer la performance des polymères.

Cependant, pour la stérilisation des biomatériaux à base d'acide nucléique, le choix des méthodes de stérilisation qui ont un mécanisme d'action similaire à celui de SC-CO₂ est recommandé. Tel que le cas pour le Protoxyde d'azote (N₂O), qui a des caractéristiques similaires au SC-CO₂ et comme mode d'action la perturbation des membranes phospholipidiques des bactéries et par la suite son effet sur les phages sera moins létal [82].

Néanmoins, pour ce type des biomatériaux sensibles aux méthodes de stérilisation conventionnelles, leurs procédés de préparation doivent être effectués dans des conditions hautement stériles (salles blanches, air stérile, matériaux et produits stériles), afin d'assurer un niveau de stérilité élevé.

RÉFÉRENCES

- [1] J.-P. Pirnay *et al.*, "Quality and safety requirements for sustainable phage therapy products," *Pharmaceutical Research*, vol. 32, no. 7, pp. 2173-2179, 2015, doi: 10.1007/s11095-014-1617-7.
- [2] L. L. Furfaro, M. S. Payne, and B. J. Chang, "Bacteriophage Therapy: Clinical Trials and Regulatory Hurdles," *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, vol. 8, pp. 376-376, 2018, doi: 10.3389/fcimb.2018.00376.
- [3] M. R. Clokie, A. D. Millard, A. V. Letarov, and S. Heaphy, "Phages in nature," *Bacteriophage*, vol. 1, no. 1, pp. 31-45, Jan-Feb 2011, doi: 10.4161/bact.1.1.14942.
- [4] C. L. Ventola, "The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats," *Pharmacy and Therapeutics*, vol. 40, no. 4, pp. 277-283, 2015. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25859123>
- [5] B.-I. Coculescu, "Antimicrobial resistance induced by genetic changes," *Journal of Medicine and Life*, vol. 2, no. 2, p. 114, 2009.
- [6] K. L. Schwartz *et al.*, "Regional variability in outpatient antibiotic use in Ontario, Canada: a retrospective cross-sectional study," *CMAJ Open*, vol. 6, no. 4, pp. E445-E452, Oct. 2018 2018, doi: 10.9778/cmajo.20180017.
- [7] B. Weber-Dąbrowska, E. Jończyk-Matysiak, M. Żaczek, M. Łobocka, M. Łusiak-Szelachowska, and A. Górska, "Bacteriophage Procurement for Therapeutic Purposes," *Frontiers in Microbiology*, vol. 7, pp. 1177-1177, 2016, doi: 10.3389/fmicb.2016.01177.
- [8] G. P. C. Salmond and P. C. Fineran, "A century of the phage: past, present and future," *Nature Reviews Microbiology*, vol. 13, no. 12, p. 777, 2015, doi: 10.1038/nrmicro3564.
- [9] C. Torres-Barceló, "The disparate effects of bacteriophages on antibiotic-resistant bacteria," *Emerging Microbes & Infections*, vol. 7, no. 1, p. 168, 2018, doi: 10.1038/s41426-018-0169-z.
- [10] T. K. Lu and M. S. Koeris, "The next generation of bacteriophage therapy," *Current Opinion in Microbiology*, vol. 14, no. 5, pp. 524-531, 2011, doi: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.07.028>.

- [11] M. Karimi, H. Mirshekari, S. M. Moosavi Basri, S. Bahrami, M. Moghoofei, and M. R. Hamblin, "Bacteriophages and phage-inspired nanocarriers for targeted delivery of therapeutic cargos," (in eng), *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 106, no. Pt A, pp. 45-62, 2016, doi: 10.1016/j.addr.2016.03.003.
- [12] C. Loc-Carrillo and S. T. Abedon, "Pros and cons of phage therapy," *Bacteriophage*, vol. 1, no. 2, pp. 111-114, Mar-Apr 2011, doi: 10.4161/bact.1.2.14590.
- [13] G. K. Vinner, G. T. Vladisavljević, M. R. J. Clokie, and D. J. Malik, "Microencapsulation of Clostridium difficile specific bacteriophages using microfluidic glass capillary devices for colon delivery using pH triggered release," *PLoS One*, vol. 12, no. 10, p. e0186239, 2017, doi: 10.1371/journal.pone.0186239.
- [14] N. Principi, E. Silvestri, and S. Esposito, "Advantages and Limitations of Bacteriophages for the Treatment of Bacterial Infections," (in English), *Frontiers in Pharmacology*, vol. 10, no. 513, 2019, doi: 10.3389/fphar.2019.00513.
- [15] D. J. Malik *et al.*, "Formulation, stabilisation and encapsulation of bacteriophage for phage therapy," *Advances in Colloid and Interface Science*, vol. 249, pp. 100-133, 2017, doi: <https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.05.014>.
- [16] E. Rubalskii *et al.*, "Fibrin glue as a local drug-delivery system for bacteriophage PA5," *Scientific Reports*, vol. 9, no. 1, p. 2091, 2019, doi: 10.1038/s41598-018-38318-4.
- [17] A. M. Brown, "Polymer-based delivery systems for support and delivery of bacteriophages," master of science, Dep. of Materials Science and Engineering, Iowa State University, Ames, Iowa, 2014. [Online]. Available: <https://lib.dr.iastate.edu/etd/13859>
- [18] A. C. Fonseca, M. H. Gil, and P. N. Simoes, "Biodegradable poly (ester amide) s-A remarkable opportunity for the biomedical area: Review on the synthesis, characterization and applications," *Progress in Polymer Science*, vol. 39, no. 7, pp. 1291-1311, 2014.
- [19] R. Katsarava, D. Tugushi, V. Beridze, and N. Tawil, "Composition comprising a polymer and a bioactive agent and method of preparing thereof," Brevet WO 2016/207725 A1, 2016. [Online]. Available: <https://patents.google.com/patent/WO2016207725A1>

- [20] E. H. J. A. I. P. Hankin, "The bactericidal action of the waters of the Jamuna and Ganges rivers on Cholera microbes. Ann. Inst. Pasteur 10:511–523 (1896)," *Bacteriophages*, vol. 1, no. 3, pp. 117-126, 2011, doi: <https://doi.org/10.4161/bact.1.3.16736>.
- [21] X. Wittebole, S. De Roock, and S. M. Opal, "A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens," *Virulence*, vol. 5, no. 1, pp. 226-235, 2014, doi: 10.4161/viru.25991.
- [22] E. C. Keen, "A century of phage research: bacteriophages and the shaping of modern biology," *BioEssays : News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, vol. 37, no. 1, pp. 6-9, 2015, doi: 10.1002/bies.201400152.
- [23] S. T. Abedon, P. García, P. Mullany, and R. Aminov, "Editorial: Phage Therapy: Past, Present and Future," *Frontiers in Microbiology*, vol. 8, pp. 981-981, 2017, doi: 10.3389/fmicb.2017.00981.
- [24] S. Adhya, C. R. Merril, and B. Biswas, "Therapeutic and prophylactic applications of bacteriophage components in modern medicine," *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, vol. 4, no. 1, pp. a012518-a012518, 2014, doi: 10.1101/cshperspect.a012518.
- [25] D. G. Beards. (2008) Transmission electron micrograph of multiple bacteriophages attached to a bacterial cell wall. [Online]. Available <https://en.wikipedia.org/wiki/File:Phage.jpg>
- [26] F. Navarro and M. Muniesa, "Phages in the Human Body," *Frontiers in Microbiology*, vol. 8, pp. 566-566, 2017, doi: 10.3389/fmicb.2017.00566.
- [27] A. Jurczak-Kurek *et al.*, "Biodiversity of bacteriophages: morphological and biological properties of a large group of phages isolated from urban sewage," *Scientific Reports*, vol. 6, p. 34338, 2016, doi: <https://www.nature.com/articles/srep34338#supplementary-information>.
- [28] I. U. Haq, W. N. Chaudhry, M. N. Akhtar, S. Andleeb, and I. Qadri, "Bacteriophages and their implications on future biotechnology: a review," *Virology Journal*, vol. 9, no. 9, pp. 9, 2012, doi: 10.1186/1743-422X-9-9.
- [29] S. Fernandes and C. São-José, "Enzymes and Mechanisms Employed by Tailed Bacteriophages to Breach the Bacterial Cell Barriers," *Viruses*, vol. 10, no. 8, p. 396, 2018, doi: 10.3390/v10080396.

- [30] M. G. Rossmann, "Molecular architecture of tailed double-stranded DNA phages AU - Fokine, Andrei," *Bacteriophage*, vol. 4, no. 2, p. e28281, 2014, doi: 10.4161/bact.28281.
- [31] C. São-José, F. Gil, J. Moniz-Pereira, M. J. Catalão, and M. Pimentel, "Diversity in bacterial lysis systems: bacteriophages show the way," *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 37, no. 4, pp. 554-571, 2013, doi: 10.1111/1574-6976.12006.
- [32] S. Chaturongakul and P. Ounjai, "Phage-host interplay: examples from tailed phages and Gram-negative bacterial pathogens," *Frontiers in Microbiology*, vol. 5, pp. 442-442, 2014, doi: 10.3389/fmicb.2014.00442.
- [33] H. W. Ackermann and D. Prangishvili, "Prokaryote viruses studied by electron microscopy," *Archives of Virology*, vol. 157, no. 10, pp. 1843-1849, 2012, doi: 10.1007/s00705-012-1383-y.
- [34] L. K. Harada *et al.*, "Biotechnological applications of bacteriophages: State of the art," *Microbiological Research*, vol. 212-213, pp. 38-58, 2018, doi: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.04.007>.
- [35] S. Z. Chemate, A. Abdul Wahid and N. Inamdar, "Phage Therapy: Emergence of a Novel Therapy to Control Bacterial Pathogens," *Inventi*, vol. 2015, no. 2, p. 1, 2015.
- [36] S. Šulčius and J. Staniulis, "Morphology and distribution of phage-like particles in a eutrophic boreal lagoon," *OCEANOLOGIA*, vol. 53, no. 2, pp. 587-603, 2011, doi: 10.5697/oc.53-2.587.
- [37] S. Pal, "Phage Therapy an alternate disease control in Aquaculture: A review on recent advancements," *Journal of Agriculture and Veterinary Science*, vol. 8, no. 9, pp. 68-81, 2015.
- [38] Z. Drulis-Kawa, G. Majkowska-Skrobek, B. Maciejewska, A.-S. Delattre, and R. Lavigne, "Learning from bacteriophages - advantages and limitations of phage and phage-encoded protein applications," (in eng), *Current Protein & Peptide Science*, vol. 13, no. 8, pp. 699-722, 2012, doi: 10.2174/138920312804871193.
- [39] Z. J. Storms and D. Sauvageau, "Modeling tailed bacteriophage adsorption: Insight into mechanisms," *Virology*, vol. 485, pp. 355-362, 2015, doi: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.08.007>.

- [40] D. Vandenheuvel, J. Meeus, R. Lavigne, and G. Van den Mooter, "Instability of bacteriophages in spray-dried trehalose powders is caused by crystallization of the matrix," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 472, no. 1, pp. 202-205, 2014, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.06.026>.
- [41] Y. Ma *et al.*, "Microencapsulation of bacteriophage Felix O1 into chitosan-alginate microspheres for oral delivery," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 74, no. 15, pp. 4799-4805, 2008.
- [42] U. Puapermpoonsiri, J. Spencer, and C. F. van der Walle, "A freeze-dried formulation of bacteriophage encapsulated in biodegradable microspheres," *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 72, no. 1, pp. 26-33, 2009, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2008.12.001>.
- [43] J. Colom, M. Cano-Sarabia, J. Otero, P. Cortés, D. MasPOCH, and M. Llagostera, "Liposome-Encapsulated Bacteriophages for Enhanced Oral Phage Therapy against *Salmonella* spp," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 81, no. 14, pp. 4841-4849, 2015, doi: 10.1128/AEM.00812-15.
- [44] J. H. Yoo, "Review of Disinfection and Sterilization - Back to the Basics," (in eng), *Infection & Chemotherapy*, vol. 50, no. 2, pp. 101-109, 2018, doi: 10.3947/ic.2018.50.2.101.
- [45] Q. Q. Qiu, W. Sun, and J. Connor, "Sterilization of Biomaterials of Synthetic and Biological Origin," *Comprehensive Biomaterials*, vol. 4, pp. 127-144, 2011, doi: 10.1016/B978-0-08-055294-1.00248-8.
- [46] R. Kohli, "Chapter 11 - Applications of Gas-Phase Cleaning for Removal of Surface Contaminants," in *Developments in Surface Contamination and Cleaning: Applications of Cleaning Techniques*, R. Kohli and K. L. Mittal Eds.: Elsevier, 2019, pp. 423-477.
- [47] C. R. Harrell, V. Djonov, C. Fellabaum, and V. Volarevic, "Risks of Using Sterilization by Gamma Radiation: The Other Side of the Coin," (in eng), *International Journal of Medical Sciences*, vol. 15, no. 3, pp. 274-279, 2018, doi: 10.7150/ijms.22644.
- [48] S. Govindaraj and M. Muthuraman, "Systematic Review on Sterilization Methods of Implants and Medical Devices," *International Journal of ChemTech Research*, vol. 8, no. 2, pp. 974-4290, 2015.

- [49] F. Tessarolo and G. Nollo, "Sterilization of biomedical materials," in *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering*, Edition: II ed, Gary E. Wnek and Gary L. Bowlin, New York: Taylor & Francis Group, 2008, pp. 2501-2510.
- [50] W. J. Rogers, "2 - Steam and dry heat sterilization of biomaterials and medical devices," in *Sterilisation of Biomaterials and Medical Devices*, S. Lerouge and A. Simmons Eds.: Woodhead Publishing, 2012, pp. 20-55.
- [51] Y. Sultana, "Sterilization Methods and Principles," lecture notes, Dept. of pharmacy, Faculty of pharmacy, New Delhi, 2008.
- [52] G. Abuhanoğlu and A. Y. Ozer, "Radiation sterilization of new drug delivery systems," (in eng), *Interventional Medicine & Applied Science*, vol. 6, no. 2, pp. 51-60, 2014, doi: 10.1556/IMAS.6.2014.2.1.
- [53] R. Singh, D. Singh, and A. Singh, "Radiation sterilization of tissue allografts: A review," (in eng), *World Journal of Radiology*, vol. 8, no. 4, pp. 355-369, 2016, doi: 10.4329/wjr.v8.i4.355.
- [54] R. S. Hennessy *et al.*, "Supercritical carbon dioxide-based sterilization of decellularized heart valves," (in eng), *JACC: Basic to Translational Science*, vol. 2, no. 1, pp. 71-84, 2017, doi: 10.1016/j.jacbt.2016.08.009.
- [55] A. Bernhardt *et al.*, "Improved Sterilization of Sensitive Biomaterials with Supercritical Carbon Dioxide at Low Temperature," (in eng), *PLoS One*, vol. 10, no. 6, pp. e0129205-e0129205, 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0129205.
- [56] A. Witkowski, M. Majkut, and S. Rulik, "Analysis of pipeline transportation systems for carbon dioxide sequestration," *Archives of Thermodynamics*, vol. 35, no. 1, pp. 117-140, 2014, doi: 10.2478/aoter-2014-0008.
- [57] A. White, D. Burns, and T. W Christensen, "Effective Terminal Sterilization Using Supercritical Carbon Dioxide," *Journal of Biotechnology*, vol. 123, no. 4, pp. 504-515, 2006.
- [58] A. Efaq, N. N. N. A. Rahman, H. Nagao, A. Al-Gheethi, M. Shahadat, and M. A. Kadir, "Supercritical carbon dioxide as non-thermal alternative technology for safe handling of clinical wastes," *Environmental Processes*, vol. 2, no. 4, pp. 797-822, 2015.

- [59] A. Jiménez, J. Zhang, and M. A. Matthews, "Evaluation of CO₂-based cold sterilization of a model hydrogel," *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 101, no. 6, pp. 1344-1352, 2008, doi: 10.1002/bit.21983.
- [60] H. Shintani, A. Sakudo, P. Burke, and G. McDonnell, "Gas plasma sterilization of microorganisms and mechanisms of action," *Experimental and Therapeutic Medicine*, vol. 1, no. 5, pp. 731-738, 2010.
- [61] Z. Dai, J. Ronholm, Y. Tian, B. Sethi, and X. Cao, "Sterilization techniques for biodegradable scaffolds in tissue engineering applications," *Journal of Tissue Engineering*, vol. 7, pp. 1-13, 2016.
- [62] K. Fatyeyeva, A. Dahi, D. Langevin, J.-M. Valleton, F. Poncin, and S. Marais, "Effect of cold plasma treatment on surface properties and gas permeability of polyimide films," *RSC Advances*, vol. 4, p. 31036, 2014, doi: 10.1039/C4RA03741C.
- [63] J. Fages *et al.*, "Viral inactivation of human bone tissue using supercritical fluid extraction," *ASAIO journal (American Society for Artificial Internal Organs: 1992)*, vol. 44, no. 4, pp. 289-293, 1998.
- [64] Q. Q. Qiu, P. Leamy, J. Brittingham, J. Pomerleau, N. Kabaria, and J. Connor, "Inactivation of bacterial spores and viruses in biological material using supercritical carbon dioxide with sterilant," *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, vol. 91, no. 2, pp. 572-578, 2009.
- [65] F. S. Teixeira *et al.*, "Disinfection of ancient paper contaminated with fungi using supercritical carbon dioxide," *Journal of Cultural Heritage*, vol. 30, pp. 110-116, 2018.
- [66] C. Bowker, A. Sain, M. Shatalov, and J. Ducoste, "Microbial UV fluence-response assessment using a novel UV-LED collimated beam system," *Water Research*, vol. 45, no. 5, 2011.
- [67] S. E. Beck *et al.*, "Evaluating UV-C LED disinfection performance and investigating potential dual-wavelength synergy," *Water Research*, vol. 109, pp. 207-216, 2017.
- [68] B. Ozcelik, "Fungi/bactericidal and static effects of ultraviolet light in 254 and 354 nm wavelengths," *Research Journal of Microbiology*, vol. 2, no. 1, pp. 42-9, 2007.

- [69] M. Shathele, "Effects of gamma irradiation on fungal growth and associated pathogens," *Research Journal of Environmental Toxicology*, vol. 3, no. 2, pp. 94-100, 2009.
- [70] A. I. Pimenta, D. Guerreiro, J. Madureira, F. M. Margaça, and S. C. Verde, "Tracking Human Adenovirus Inactivation by Gamma Radiation under Different Environmental Conditions," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 82, no. 17, pp. 5166-5173, 2016.
- [71] N. Grecz, O. P. Snyder, A. A. Walker, and A. Anellis, "Effect of Temperature of Liquid Nitrogen on Radiation Resistance of Spores of Clostridium botulinum," *Applied Microbiology*, vol. 13, no. 4, pp. 527-536, 1965. [Online]. Available: <https://aem.asm.org/content/aem/13/4/527.full.pdf>.
- [72] Y. Saleh, M. Mayo, and D. Ahearn, "Resistance of some common fungi to gamma irradiation," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 54, no. 8, pp. 2134-2135, 1988.
- [73] R. L. Ward, "Inactivation of poliovirus in wastewater sludge with radiation and thermoradiation," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 33, no. 5, p. 1218, 1977.
- [74] P. Shaw *et al.*, "Bacterial inactivation by plasma treated water enhanced by reactive nitrogen species," *Scientific Reports*, vol. 8, no. 1, p. 11268, 2018.
- [75] A. Waskow *et al.*, "Characterization of Efficiency and Mechanisms of Cold Atmospheric Pressure Plasma Decontamination of Seeds for Sprout Production," *Frontiers in Microbiology*, vol. 9, p. 3164, 2018.
- [76] H. A. Aboubakr *et al.*, "Virucidal effect of cold atmospheric gaseous plasma on feline calicivirus, a surrogate for human norovirus," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 81, no. 11, pp. 3612-3622, 2015.
- [77] H. Bozkurt, D. H. D'SOUZA, and P. M. Davidson, "Determination of the thermal inactivation kinetics of the human norovirus surrogates, murine norovirus and feline calicivirus," *Journal of Food Protection*, vol. 76, no. 1, pp. 79-84, 2013.
- [78] S. Jebri *et al.*, "Effect of gamma irradiation on bacteriophages used as viral indicators," *Water Research*, vol. 47, no. 11, pp. 3673-3678, 2013, doi: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.04.036>.

- [79] P. Gehringer *et al.*, "Bacteriophages as viral indicators for radiation processing of water: a chemical approach," *Applied Radiation and Isotopes*, vol. 58, no. 6, pp. 651-656, 2003, doi: [https://doi.org/10.1016/S0969-8043\(03\)00089-7](https://doi.org/10.1016/S0969-8043(03)00089-7).
- [80] R. Sommer *et al.*, "Inactivation of bacteriophages in water by means of non-ionizing (UV-253.7nm) and ionizing (gamma) radiation: A comparative approach," *Water Research*, vol. 35, n. 13, pp. 3109-16, 2001, doi: 10.1016/S0043-1354(01)00030-6.
- [81] K.-S. Bae and G.-A. Shin, "Inactivation of various bacteriophages in wastewater by chlorination; Development of more reliable bacteriophage indicator systems for water reuse," *Journal of the Korean Society of Water and Wastewater*, vol. 30, no. 3, pp. 285-291, 2016, doi: 10.11001/jksw.2016.30.3.285.
- [82] H. Vo *et al.*, "Inactivation effect of pressurized carbon dioxide on bacteriophage Q β and Φ X174 as a novel disinfectant for water treatment," *Journal of Environmental Sciences*, vol. 26, no. 6, pp. 1301-1306, 2014, doi: 10.1016/S1001-0742(13)60603-8.
- [83] X. Cheng, T. Imai, J. Teeka, M. Hirose, T. Higuchi, and M. Sekine, "Inactivation of bacteriophages by high levels of dissolved CO₂," *Environmental Technology*, vol. 34, no. 4, pp. 539-544, 2013.
- [84] L. Guo *et al.*, "Mechanism of virus inactivation by cold atmospheric-pressure plasma and plasma-activated water," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 84, no. 17, pp. e00726-18, 2018.
- [85] N. Alshraiedeh, M. Alkawareek, S. Gorman, W. Graham, and B. Gilmore, "Atmospheric pressure, nonthermal plasma inactivation of MS 2 bacteriophage: effect of oxygen concentration on virucidal activity," *Journal of Applied Microbiology*, vol. 115, no. 6, pp. 1420-1426, 2013.
- [86] H. Yasuda, T. Miura, H. Kurita, K. Takashima, and A. Mizuno, "Biological evaluation of DNA damage in bacteriophages inactivated by atmospheric pressure cold plasma," *Plasma Processes and Polymers*, vol. 7, no. 3-4, pp. 301-308, 2010.
- [87] E. Zottola and E. Marth, "Thermal inactivation of bacteriophages active against lactic streptococci," *Journal of Dairy Science*, vol. 49, no. 11, pp. 1338-1342, 1966.

- [88] M. Müller-Merbach, T. Rauscher, and J. Hinrichs, "Inactivation of bacteriophages by thermal and high-pressure treatment," *International Dairy Journal*, vol. 15, no. 6-9, pp. 777-784, 2005.
- [89] I. Bertrand *et al.*, "The impact of temperature on the inactivation of enteric viruses in food and water: a review," *Journal of Applied Microbiology*, vol. 112, no. 6, pp. 1059-1074, 2012.
- [90] Z. Atamer, J. Dietrich, H. Neve, K. J. Heller, and J. Hinrichs, "Influence of the suspension media on the thermal treatment of mesophilic lactococcal bacteriophages," *International Dairy Journal*, vol. 20, no. 6, pp. 408-414, 2010.
- [91] M. Capra, A. d. L. Quiberoni, H.-W. Ackermann, S. Moineau, and J. Reinheimer, "Characterization of a new virulent phage (MLC-A) of *Lactobacillus paracasei*," *Journal of Dairy Science*, vol. 89, no. 7, pp. 2414-2423, 2006.
- [92] F. J. Bye, L. Wang, A. J. Bullock, K. A. Blackwood, A. J. Ryan, and S. MacNeil, "Postproduction processing of electrospun fibres for tissue engineering," *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, no. 66, p. e4172, 2012.
- [93] M. Shapourgan, H. Mobedi, N. Sheikh, A. Behnamghader, and A. J. C. d. d. Mashak, "Leuprolide Acetate Release Study from γ -Irradiated PLGA-based In Situ Forming System," *Current Drug Delivery*, vol. 14, no. 8, pp. 1170-1177, 2017.
- [94] P. Rychter *et al.*, "Influence of radiation sterilization on properties of biodegradable lactide/glycolide(trimethylene carbonate and lactide/glycolide/ ϵ -caprolactone porous scaffolds with shape memory behavior," *Materials*, vol. 9, no. 1, p. 64, 2016.
- [95] C. E. Holy, C. Cheng, J. E. Davies, and M. S. Shoichet, "Optimizing the sterilization of PLGA scaffolds for use in tissue engineering," *Biomaterials*, vol. 22, no. 1, pp. 25-31, 2000, doi: [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00136-8](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00136-8).
- [96] J. M. Halpern, C. A. Gormley, M. Keech, and H. A. von Recum, "Thermomechanical Properties, Antibiotic Release, and Bioactivity of a Sterilized Cyclodextrin Drug Delivery System," (in eng), *Journal of Materials Chemistry B*, vol. 2, no. 18, pp. 2764-2772, 2014, doi: 10.1039/C4TB00083H.
- [97] M. Foggia, U. Corda, E. Plescia, P. Taddei, and A. Torreggiani, "Effects of sterilisation by high-energy radiation on biomedical poly-(ϵ -caprolactone)/hydroxyapatite composites," *Journal of*

Materials Science. Materials in Medicine, vol. 21, no. 6, pp. 1789-97, 2010, doi: 10.1007/s10856-010-4046-0.

[98] D. I. Braghirilli *et al.*, "The effect of sterilization methods on electronspun poly(lactide-co-glycolide) and subsequent adhesion efficiency of mesenchymal stem cells," *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, vol. 102, no. 4, pp. 700-708, 2014, doi: 10.1002/jbm.b.33049.

[99] N. Umeki *et al.*, "Preparation and evaluation of biodegradable microspheres containing a new potent osteogenic compound and new synthetic polymers for sustained release," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 392, no. 1, pp. 42-50, 2010, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.03.020>.

[100] E. Phillip Jr *et al.*, "Ethylene oxide's role as a reactive agent during sterilization: effects of polymer composition and device architecture," *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 101, no. 4, pp. 532-540, 2013.

[101] C. E Holy, C. Cheng, J. Davies, and M. S Shoichet, "Optimizing the sterilization of PLGA scaffolds for use in tissue engineering," *Biomaterials*, vol. 22, no.1, pp. 25-31, 2001, doi: 10.1016/S0142-9612(00)00136-8.

[102] S. J. Peniston and S. J. Choi, "Effect of sterilization on the physicochemical properties of molded poly (l-lactic acid)," *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, vol. 80, no. 1, pp. 67-77, 2007.

[103] K. Gorna and S. Gogolewski, "Molecular stability, mechanical properties, surface characteristics and sterility of biodegradable polyurethanes treated with low-temperature plasma," *Polymer Degradation and Stability*, vol. 79, no. 3, pp. 475-485, 2003.

[104] S. Gogolewski and P. Mainil-Varlet, "Effect of thermal treatment on sterility, molecular and mechanical properties of various polylactides: 2. Poly(l/d-lactide) and poly(l/dl-lactide)," *Biomaterials*, vol. 18, no. 3, pp. 251-255, 1997, doi: [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(96\)00132-9](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(96)00132-9).

- [105] F. R. Rozema, R. R. M. Bos, G. Boering, J. A. A. M. van Asten, A. J. Nijenhuis, and A. J. Pennings, "The effects of different steam-sterilization programs on material properties of poly(L-lactide)," *Journal of Applied Biomaterials*, vol. 2, no. 1, pp. 23-28, 1991, doi: 10.1002/jab.770020104.
- [106] T. H. Smit, K. A. Thomas, R. J. Hoogendoorn, G. J. Strijkers, M. N. Helder, and P. I. J. S. Wuisman, "Sterilization and strength of 70/30 polylactide cages: e-beam versus ethylene oxide," *SPINE*, vol. 32, no. 7, pp. 742-747, 2007.
- [107] S. Bertoldi, S. Farè, H. J. Haugen, and M. C. Tanzi, "Exploiting novel sterilization techniques for porous polyurethane scaffolds," *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, vol. 26, no. 5, p. 182, 2015, doi: 10.1007/s10856-015-5509-0.
- [108] E. K. Moioli, L. Hong, J. Guardado, P. A. Clark, and J. J. Mao, "Sustained release of TGF β 3 from PLGA microspheres and its effect on early osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells," *Tissue Engineering*, vol. 12, no. 3, pp. 537-546, 2006.
- [109] S. Çalış, S. Bozdağ, H. S. Kaş, M. Tunçay, and A. A. Hıncal, "Influence of irradiation sterilization on poly(lactide-co-glycolide) microspheres containing anti-inflammatory drugs," *Il Farmaco*, vol. 57, no. 1, pp. 55-62, 2002, doi: [https://doi.org/10.1016/S0014-827X\(01\)01171-5](https://doi.org/10.1016/S0014-827X(01)01171-5).
- [110] C.-Y. Hsiao, S.-J. Liu, S. W.-N. Ueng, and E.-C. Chan, "The influence of γ irradiation and ethylene oxide treatment on the release characteristics of biodegradable poly (lactide-co-glycolide) composites," *Polymer Degradation and Stability*, vol. 97, no. 5, pp. 715-720, 2012.
- [111] H. C. Kim, Y. H. Choi, W. Bu, M. Meron, B. Lin, and Y.-Y. Won, "Increased humidity can soften glassy Langmuir polymer films by two mechanisms: plasticization of the polymer material, and suppression of the evaporation cooling effect," *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 19, no. 16, pp. 10663-10675, 2017.
- [112] V. Leung *et al.*, "Long-Term Preservation of Bacteriophage Antimicrobials Using Sugar Glasses," *ACS Biomaterials Science & Engineering*, vol. 4, no. 4, pp. 3802-3808, 2018, .
- [113] E. Jończyk-Matysiak *et al.*, "Factors determining phage stability/activity: challenges in practical phage application," *Expert Review of Anti-infective Therapy*, vol. 17, no. 8, pp. 583-606, 2019.

- [114] E. Gonzalez-Menendez, L. Fernandez, D. Gutierrez, A. Rodriguez, B. Martinez, and P. Garcia, "Comparative analysis of different preservation techniques for the storage of *Staphylococcus* phages aimed for the industrial development of phage-based antimicrobial products," *PLoS One*, vol. 13, no. 10, p. e0205728, 2018.
- [115] K. A. da Silva Aquino, "Sterilization by gamma irradiation," in *Gamma radiation*: IntechOpen, 2012, pp.171-206. [Online]. Available: <https://www.intechopen.com/books/gamma-radiation/sterilization-by-gamma-irradiation>