



**HAL**  
open science

# Mise au point et étude de stabilité physico-chimique et microbiologique d'une forme orale liquide de nicardipine à visée pédiatrique

Damien Fuss

## ► To cite this version:

Damien Fuss. Mise au point et étude de stabilité physico-chimique et microbiologique d'une forme orale liquide de nicardipine à visée pédiatrique. Sciences pharmaceutiques. 2016. dumas-01496131

**HAL Id: dumas-01496131**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01496131>**

Submitted on 27 Mar 2017

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

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

**UNIVERSITE DE ROUEN**

**UFR DE MEDECINE ET DE PHARMACIE**

---

**Année 2016**

**N°**

Mémoire du diplôme d'études spécialisées de pharmacie hospitalière et des  
collectivités tenant lieu de

**THESE pour le DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

Présentée et soutenue publiquement le 14 octobre 2016

par

*Damien FUSS*

Né le 01 avril 1988 à Poissy (78)

---

***Mise au point et étude de stabilité physico-chimique et  
microbiologique d'une forme orale liquide de  
nicardipine à visée pédiatrique***

---

*Président du jury :*

**Pr Rémi VARIN**, Pharmacien, PU-PH, CHU de Rouen

*Directeur de thèse :*

**Dr Charles HERVOUËT**, Pharmacien, Praticien Hospitalier, CHU de Rouen

*Membres du jury :*

**Dr Aude COQUARD**, Pharmacien, Praticien Hospitalier, CHU de Rouen

**Dr Mikael DAOUPHARS**, Pharmacien, Praticien Spécialiste, CRLCC Henri Becquerel, Rouen

**Dr Damien LANNOY**, Pharmacien, MCU-PH, CHU de Lille

# REMERCIEMENTS

---

**A Monsieur le Professeur Rémi Varin, Président du jury,**  
*Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de présider ce jury,  
Pour avoir coordonné mon internat de Pharmacie Hospitalière,  
Pour avoir su me prodiguer les bons conseils le long de ces quatre années d'internat,  
Veuillez trouver ici mon grand respect et mon entière reconnaissance.*

**A Monsieur le Docteur Charles Hervouët, Directeur de thèse,**  
*Pour avoir été à l'initiative de ce projet,  
Pour la confiance que tu m'as accordée en me proposant ce travail,  
Pour m'avoir fait découvrir ton engouement pour les études de stabilité,  
Pour ta gentillesse, tes conseils, tes encouragements et ta disponibilité,  
Reçois ici mon profond respect et toute mon amitié.*

**A Madame le Docteur Aude Coquard, Membre du jury,**  
*Pour l'intérêt que vous avez porté à mon travail et votre aide qui ont permis son aboutissement,  
Pour avoir accepté de prendre part au jury,  
Veuillez trouver ici mes vifs remerciements et ma profonde reconnaissance.*

**A Monsieur le Docteur Mikaël Daouphars, Membre du jury,**  
*Pour votre encadrement et le partage de vos connaissances durant mes semestres à Becquerel,  
Pour vous être rendu disponible afin de juger ce travail,  
Veuillez trouver ici l'expression de mon profond respect.*

**A Monsieur le Docteur Damien Lannoy, Membre du Jury,**  
*Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger ce travail,  
Veuillez trouver ici le témoignage de ma sincère reconnaissance.*

*Mes remerciements vont aussi,*

***A toute l'équipe de pharmacocinétique,***

*Et plus particulièrement à Tony,*

*Merci pour ton soutien, tes conseils, pour toute l'aide que tu as su m'apporter, pour ta disponibilité même quand tu n'avais pas le temps. Sans toi ce travail n'aurait pas été possible.*

*Merci à Fabien pour ta gentillesse et l'aide que tu as pu m'apporter pour ce travail. C'est toujours un plaisir de discuter avec toi. J'espère te recroiser bientôt.*

*Merci à Patricia Compagnon pour m'avoir accueilli dans votre service.*

*Merci également à Sophie, David, Nancy, Patricia et Caroline.*

***Aux différentes équipes pharmaceutiques avec qui j'ai pu travailler pendant ces quatre années :***

*A l'équipe de pharmacotechnie pour votre bonne humeur et votre gentillesse, à toute l'équipe de Becquerel pour l'année passée à vos côtés, à l'équipe de la pharmacie du CHU que je reverrai bientôt et à l'OMeDIT pour ce dernier semestre.*

*Merci à Jean avec qui j'ai eu la chance de travailler pendant 1 an. J'ai beaucoup appris à tes côtés.*

*Merci à Elise Morichon pour votre gentillesse. Dans l'attente d'une nouvelle collaboration à vos côtés, je me permets de vous exprimer à nouveau ma gratitude et mes sincères remerciements.*

***A mes amis de longue date et mes co-internes rencontrés pendant l'internat,***

*Un merci tout particulier à Marion, pour toute l'aide que tu m'as apportée. Je n'aurais pas pu finir ce travail sans toi. Un grand merci à Henri pour ta relecture et évidemment pour tous les bons moments. Je remercie également les internes rencontrés ces dernières années : Anne-Fleur et Alex, Marie et Antoine, Maxime, Clélia et Antoine, Marie-Olivia ; et les amis de longue date : Paul, Julien, Charles, Lionel, Victor, Simon, Alice ... et tous ceux que j'oublie, merci pour tous ces moments partagés depuis quelques années maintenant*

***A ma famille,***

*Je vous dédie ce travail,*

*A mes parents pour m'avoir toujours soutenu durant toutes ces années,*

*A Alex et Ismaël pour tous les moments heureux passés et à venir,*

*A mes grands parents, oncles et tantes, cousins et cousines.*

***A toute la famille Orsini,***

*Merci pour votre gentillesse et votre soutien,*

*Merci de m'avoir accueilli aussi chaleureusement.*

***A Charlotte,***

*Pour tout ce que tu m'apportes chaque jour,*

*Pour notre complicité sans faille,*

*Sache que les meilleurs moments sont à venir !*

**« L'Université de Rouen et l'UFR de Médecine et de Pharmacie de Rouen n'entendent donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans cette thèse. Ces opinions sont propres à leurs auteurs. »**

**ANNEE UNIVERSITAIRE 2015 – 2016**  
**U.F.R. DE MEDECINE ET DE-PHARMACIE DE ROUEN**

-----

DOYEN :                   **Professeur Pierre FREGER**

ASSESEURS : **Professeur Michel GUERBET**  
**Professeur Benoit VEBER**  
**Professeur Pascal JOLY**  
**Professeur Stéphane MARRET**

<b>I – MEDECINE</b>
---------------------

**PROFESSEURS DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS**

Mr Frédéric <b>ANSELME</b>	HCN	Cardiologie
Mme Isabelle <b>AUQUIT AUCKBUR</b>	HCN	Chirurgie plastique
Mr Bruno <b>BACHY</b> ( <i>surnombre</i> )	HCN	Chirurgie pédiatrique
Mr Fabrice <b>BAUER</b>	HCN	Cardiologie
Mme Soumeya <b>BEKRI</b>	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mr Jacques <b>BENICHOU</b>	HCN	Bio statistiques et informatique médicale
Mr Jean-Paul <b>BESSOU</b>	HCN	Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
Mme Françoise <b>BEURET-BLANQUART</b> ( <i>surnombre</i> )	HCN	Commission E.P.P. D.P.C. Pôle Qualité
Mr Guy <b>BONMARCHAND</b> ( <i>surnombre</i> )	HCN	Réanimation médicale
Mr Olivier <b>BOYER</b>	UFR	Immunologie
Mr Jean-François <b>CAILLARD</b> ( <i>surnombre</i> )	HCN	Médecine et santé au travail
Mr François <b>CARON</b>	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
Mr Philippe <b>CHASSAGNE</b>	HCN	Médecine interne (gériatrie)
Mr Vincent <b>COMPERE</b>	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
Mr Antoine <b>CUVELIER</b>	HB	Pneumologie
Mr Pierre <b>CZERNICHOW</b>	HCH	Epidémiologie, économie de la santé
Mr Jean-Nicolas <b>DACHER</b>	HCN	Radiologie et imagerie médicale
Mr Stéfan <b>DARMONI</b>	HCN	Informatique médicale et techniques de communication
Mr Pierre <b>DECHELOTTE</b>	HCN	Nutrition
Mme Danièle <b>DEHESDIN</b> ( <i>surnombre</i> )	HCN	Oto-rhino-laryngologie
Mr Frédéric <b>DI FIORE</b>	CB	Cancérologie
Mr Fabien <b>DOGUET</b>	HCN	Chirurgie Cardio Vasculaire
Mr Jean <b>DOUCET</b>	SJ	Thérapeutique - Médecine interne et gériatrie
Mr Bernard <b>DUBRAY</b>	CB	Radiothérapie
Mr Philippe <b>DUCROTTE</b>	HCN	Hépto-gastro-entérologie
Mr Frank <b>DUJARDIN</b>	HCN	Chirurgie orthopédique - Traumatologique
Mr Fabrice <b>DUPARC</b>	HCN	Anatomie - Chirurgie orthopédique et traumatologique

Mr Eric <b>DURAND</b>	HCN	Cardiologie
Mr Bertrand <b>DUREUIL</b>	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
Mme Hélène <b>ELTCHANINOFF</b>	HCN	Cardiologie
Mr Thierry <b>FREBOURG</b>	UFR	Génétique
Mr Pierre <b>FREGER</b>	HCN	Anatomie - Neurochirurgie
Mr Jean François <b>GEHANNO</b>	HCN	Médecine et santé au travail
Mr Emmanuel <b>GERARDIN</b>	HCN	Imagerie médicale
Mme Priscille <b>GERARDIN</b>	HCN	Pédopsychiatrie
Mr Michel <b>GODIN</b> ( <i>surnombre</i> )	HB	Néphrologie
M. Guillaume <b>GOURCEROL</b>	HCN	Physiologie
Mr Philippe <b>GRISE</b> ( <i>surnombre</i> )	HCN	Urologie
Mr Olivier <b>GUILLIN</b>	HCN	Psychiatrie Adultes
Mr Didier <b>HANNEQUIN</b>	HCN	Neurologie
Mr Fabrice <b>JARDIN</b>	CB	Hématologie
Mr Luc-Marie <b>JOLY</b>	HCN	Médecine d'urgence
Mr Pascal <b>JOLY</b>	HCN	Dermato - Vénérologie
Mme Annie <b>LAQUERRIERE</b>	HCN	Anatomie et cytologie pathologiques
Mr Vincent <b>LAUDENBACH</b>	HCN	Anesthésie et réanimation chirurgicale
Mr Xavier <b>LE LOET</b>	HCN	Rhumatologie
Mr Joël <b>LECHEVALLIER</b>	HCN	Chirurgie infantile
Mr Hervé <b>LEFEBVRE</b>	HB	Endocrinologie et maladies métaboliques
Mr Thierry <b>LEQUERRE</b>	HB	Rhumatologie
Mr Eric <b>LEREBOURS</b>	HCN	Nutrition
Mme Anne-Marie <b>LEROI</b>	HCN	Physiologie
Mr Hervé <b>LEVESQUE</b>	HB	Médecine interne
Mme Agnès <b>LIARD-ZMUDA</b>	HCN	Chirurgie Infantile
Mr Pierre Yves <b>LITZLER</b>	HCN	Chirurgie cardiaque
Mr Bertrand <b>MACE</b>	HCN	Histologie, embryologie, cytogénétique
M. David <b>MALTETE</b>	HCN	Neurologie
Mr Christophe <b>MARGUET</b>	HCN	Pédiatrie
Mme Isabelle <b>MARIE</b>	HB	Médecine interne
Mr Jean-Paul <b>MARIE</b>	HCN	Oto-rhino-laryngologie
Mr Loïc <b>MARPEAU</b>	HCN	Gynécologie - Obstétrique
Mr Stéphane <b>MARRET</b>	HCN	Pédiatrie
Mme Véronique <b>MERLE</b>	HCN	Epidémiologie
Mr Pierre <b>MICHEL</b>	HCN	Hépto-gastro-entérologie
Mr Bruno <b>MIHOUT</b> ( <i>surnombre</i> )	HCN	Neurologie
Mr Jean-François <b>MUIR</b>	HB	Pneumologie
Mr Marc <b>MURAINÉ</b>	HCN	Ophtalmologie
Mr Philippe <b>MUSETTE</b>	HCN	Dermatologie - Vénérologie
Mr Christophe <b>PEILLON</b>	HCN	Chirurgie générale

Mr Jean-Marc <b>PERON</b> ( <i>surnombre</i> )	HCN	Stomatologie et chirurgie maxillo-faciale
Mr Christian <b>PFISTER</b>	HCN	Urologie
Mr Jean-Christophe <b>PLANTIER</b>	HCN	Bactériologie - Virologie
Mr Didier <b>PLISSONNIER</b>	HCN	Chirurgie vasculaire
Mr Bernard <b>PROUST</b>	HCN	Médecine légale
Mr François <b>PROUST</b>	HCN	Neurochirurgie
Mme Nathalie <b>RIVES</b>	HCN	Biologie du développement et de la reproduction
Mr Jean-Christophe <b>RICHARD</b> ( <i>détachement</i> )	HCN	Réanimation médicale - Médecine d'urgence
Mr Horace <b>ROMAN</b>	HCN	Gynécologie - Obstétrique
Mr Jean-Christophe <b>SABOURIN</b>	HCN	Anatomie - Pathologie
Mr Guillaume <b>SAVOYE</b>	HCN	Hépatogastrologie
Mme Céline <b>SAVOYE-COLLET</b>	HCN	Imagerie médicale
Mme Pascale <b>SCHNEIDER</b>	HCN	Pédiatrie
Mr Michel <b>SCOTTE</b>	HCN	Chirurgie digestive
Mme Fabienne <b>TAMION</b>	HCN	Thérapeutique
Mr Luc <b>THIBERVILLE</b>	HCN	Pneumologie
Mr Christian <b>THUILLEZ</b>	HB	Pharmacologie
Mr Hervé <b>TILLY</b>	CB	Hématologie et transfusion
Mr Jean-Jacques <b>TUECH</b>	HCN	Chirurgie digestive
Mr Jean-Pierre <b>VANNIER</b>	HCN	Pédiatrie génétique
Mr Benoît <b>VEBER</b>	HCN	Anesthésiologie - Réanimation chirurgicale
Mr Pierre <b>VERA</b>	CB	Biophysique et traitement de l'image
Mr Eric <b>VERIN</b>	CRMPR	Médecine physique et de réadaptation
Mr Eric <b>VERSPYCK</b>	HCN	Gynécologie obstétrique
Mr Olivier <b>VITTECOQ</b>	HB	Rhumatologie
Mr Jacques <b>WEBER</b>	HCN	Physiologie

### **MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS**

Mme Noëlle <b>BARBIER-FREBOURG</b>	HCN	Bactériologie – Virologie
Mr Jeremy <b>BELLIEN</b>	HCN	Pharmacologie
Mme Carole <b>BRASSE LAGNEL</b>	HCN	Biochimie
Mme Valérie <b>BRIDOUX HUYBRECHTS</b>	HCN	Chirurgie Vasculaire
Mr Gérard <b>BUCHONNET</b>	HCN	Hématologie
Mme Mireille <b>CASTANET</b>	HCN	Pédiatrie
Mme Nathalie <b>CHASTAN</b>	HCN	Physiologie
Mme Sophie <b>CLAEYSSENS</b>	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mr Moïse <b>COEFFIER</b>	HCN	Nutrition
Mr Stéphanie <b>DERREY</b>	HCN	Neurochirurgie
Mr Manuel <b>ETIENNE</b>	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
Mr Serge <b>JACQUOT</b>	UFR	Immunologie
Mr Joël <b>LADNER</b>	HCN	Epidémiologie, économie de la santé

Mr Jean-Baptiste <b>LATOUCHE</b>	UFR	Biologie cellulaire
Mr Thomas <b>MOUREZ</b>	HCN	Bactériologie
Mr Jean-François <b>MENARD</b>	HCN	Biophysique
Mme Muriel <b>QUILLARD</b>	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mr Vincent <b>RICHARD</b>	UFR	Pharmacologie
Mr Mathieu <b>SALAUN</b>	HCN	Pneumologie
Mme Pascale <b>SAUGIER-VEBER</b>	HCN	Génétique
Mme Anne-Claire <b>TOBENAS-DUJARDIN</b>	HCN	Anatomie
Mr Olivier <b>TROST</b>	HCN	Chirurgie Maxillo Faciale

**PROFESSEUR AGREGÉ OU CERTIFIÉ**

Mme Dominique <b>LANIEZ</b>	UFR	Anglais
Mr Thierry <b>WABLE</b>	UFR	Communication

## II - PHARMACIE

### PROFESSEURS

Mr Thierry <b>BESSON</b>	Chimie Thérapeutique
Mr Jean-Jacques <b>BONNET</b>	Pharmacologie
Mr Roland <b>CAPRON</b> (PU-PH)	Biophysique
Mr Jean <b>COSTENTIN</b> (Professeur émérite)	Pharmacologie
Mme Isabelle <b>DUBUS</b>	Biochimie
Mr Loïc <b>FAVENNEC</b> (PU-PH)	Parasitologie
Mr Jean Pierre <b>GOULLE</b>	Toxicologie
Mr Michel <b>GUERBET</b>	Toxicologie
Mme Isabelle <b>LEROUX - NICOLLET</b>	Physiologie
Mme Christelle <b>MONTEIL</b>	Toxicologie
Mme Martine <b>PESTEL-CARON</b> (PU-PH)	Microbiologie
Mme Elisabeth <b>SEGUIN</b>	Pharmacognosie
Mr Rémi <b>VARIN</b> (PU-PH)	Pharmacie clinique
Mr Jean-Marie <b>VAUGEOIS</b>	Pharmacologie
Mr Philippe <b>VERITE</b>	Chimie analytique

### MAITRES DE CONFERENCES

Mme Cécile <b>BARBOT</b>	Chimie Générale et Minérale
Mme Dominique <b>BOUCHER</b>	Pharmacologie
Mr Frédéric <b>BOUNOURE</b>	Pharmacie Galénique
Mr Abdeslam <b>CHAGRAOUI</b>	Physiologie
Mr Jean <b>CHASTANG</b>	Biomathématiques
Mme Marie Catherine <b>CONCE-CHEMTOB</b>	Législation pharmaceutique et économie de la santé
Mme Elizabeth <b>CHOSSON</b>	Botanique
Mme Cécile <b>CORBIERE</b>	Biochimie
Mr Eric <b>DITTMAR</b>	Biophysique
Mme Nathalie <b>DOURMAP</b>	Pharmacologie
Mme Isabelle <b>DUBUC</b>	Pharmacologie
Mr Abdelhakim <b>ELOMRI</b>	Pharmacognosie
Mr François <b>ESTOUR</b>	Chimie Organique
Mr Gilles <b>GARGALA</b> (MCU-PH)	Parasitologie
Mme Najla <b>GHARBI</b>	Chimie analytique
Mme Marie-Laure <b>GROULT</b>	Botanique
Mr Hervé <b>HUE</b>	Biophysique et mathématiques
Mme Laetitia <b>LE GOFF</b>	Parasitologie - Immunologie
Mme Hong <b>LU</b>	Biologie

Mme Sabine <b>MENAGER</b>	Chimie organique
Mr Mohamed <b>SKIBA</b>	Pharmacie galénique
Mme Malika <b>SKIBA</b>	Pharmacie galénique
Mme Christine <b>THARASSE</b>	Chimie thérapeutique
Mr Frédéric <b>ZIEGLER</b>	Biochimie

### **PROFESSEURS ASSOCIES**

Mme Cécile <b>GUERARD-DETUNCQ</b>	Pharmacie officinale
Mr Jean-François <b>HOUIVET</b>	Pharmacie officinale

### **PROFESSEUR CERTIFIE**

Mme Mathilde <b>GUERIN</b>	Anglais
----------------------------	---------

### **ASSISTANT HOSPITALO-UNIVERSITAIRE**

Mr Jérémie <b>MARTINET</b>	Immunologie
Mme Sandrine <b>DAHYOT</b>	Bactériologie

### **ATTACHES TEMPORAIRES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE**

Mr Romy <b>RAZAKANDRAINIBE</b>	Parasitologie
Mr François <b>HALLOUARD</b>	Galénique
Mme Caroline <b>LAUGEL</b>	Chimie organique
Mr Souleymane <b>ABDOUL-AZIZE</b>	Biochimie
Mme Maïté <b>NIEPCERON</b>	Microbiologie

## LISTE DES RESPONSABLES DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES

Mme Cécile <b>BARBOT</b>	Chimie Générale et minérale
Mr Thierry <b>BESSON</b>	Chimie thérapeutique
Mr Roland <b>CAPRON</b>	Biophysique
Mr Jean <b>CHASTANG</b>	Mathématiques
Mme Marie-Catherine <b>CONCE-CHEMTOB</b>	Législation et économie de la santé
Mme Elisabeth <b>CHOSSON</b>	Botanique
Mr Jean-Jacques <b>BONNET</b>	Pharmacodynamie
Mme Isabelle <b>DUBUS</b>	Biochimie
Mr Loïc <b>FAVENNEC</b>	Parasitologie
Mr Michel <b>GUERBET</b>	Toxicologie
Mr François <b>ESTOUR</b>	Chimie organique
Mme Isabelle <b>LEROUX-NICOLLET</b>	Physiologie
Mme Martine <b>PESTEL-CARON</b>	Microbiologie
Mme Elisabeth <b>SEGUIN</b>	Pharmacognosie
Mr Mohamed <b>SKIBA</b>	Pharmacie galénique
Mr Philippe <b>VERITE</b>	Chimie analytique

### **III – MEDECINE GENERALE**

#### **PROFESSEUR**

Mr Jean-Loup **HERMIL**

UFR Médecine générale

#### **PROFESSEURS ASSOCIES A MI-TEMPS**

Mr Emmanuel **LEFEBVRE**

UFR Médecine générale

Mr Alain **MERCIER**

UFR Médecine générale

Mr Philippe **NGUYEN THANH**

UFR Médecine générale

#### **MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE A MI-TEMPS**

Mr Pascal **BOULET**

UFR Médecine générale

Mme Elisabeth **MAUVIARD**

UFR Médecine générale

Mme Yveline **SEVRIN**

UFR Médecine générale

Mme Marie Thérèse **THUEUX**

UFR Médecine générale

## ENSEIGNANTS MONO-APPARTENANTS

### PROFESSEURS

Mr Serguei <b>FETISSOV</b> (med)	Physiologie (ADEN)
Mr Paul <b>MULDER</b> (phar)	Sciences du Médicament
Mme Su <b>RUAN</b> (med)	Génie Informatique

### MAITRES DE CONFERENCES

Mr Sahil <b>ADRIOUCH</b> (med)	Biochimie et biologie moléculaire (Unité Inserm 905)
Mme Gaëlle <b>BOUGEARD-DENOYELLE</b> (med)	Biochimie et biologie moléculaire (UMR 1079)
Mme Carine <b>CLEREN</b> (phar)	Neurosciences (Néovasc)
Mme Pascaline <b>GAILDRAT</b> (phar)	Génétique moléculaire humaine (UMR 1079)
Mr Nicolas <b>GUEROUT</b> (phar)	Chirurgie Expérimentale
Mr Antoine <b>OUVRARD-PASCAUD</b> (med)	Physiologie (Unité Inserm 1076)
Mr Frédéric <b>PASQUET</b>	Sciences du langage, orthophonie
Mme Isabelle <b>TOURNIER</b> (phar)	Biochimie (UMR 1079)

**CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS : Mme Véronique DELAFONTAINE**

*HCN - Hôpital Charles Nicolle*

*HB - Hôpital de BOIS GUILLAUME*

*CB - Centre Henri Becquerel*

*CHS - Centre Hospitalier Spécialisé du Rouvray*

*CRMPR - Centre Régional de Médecine Physique et de Réadaptation*

*SJ - Saint Julien Rouen*

# SOMMAIRE

---

<b>LISTE DES TABLEAUX .....</b>	<b>4</b>
<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>5</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS .....</b>	<b>7</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>8</b>
<b>GENERALITES .....</b>	<b>12</b>
1. <u>Les préparations</u> .....	12
1.1. <i>Législation des préparations réalisées en milieu hospitalier</i> .....	12
1.2. <i>Préparations en séries</i> .....	13
2. <u>Les formes orales liquides en pédiatrie</u> .....	13
2.1. <i>Avantages et inconvénients</i> .....	14
2.2. <i>Considérations pour la réalisation d'une forme orale liquide</i> .....	15
3. <u>Initiative et réglementation pédiatrique</u> .....	19
3.1. <i>Le comité pédiatrique</i> .....	19
3.2. <i>Le plan d'investigation pédiatrique</i> .....	20
3.3. <i>La paediatric use marketing authorization (PUMA)</i> .....	20
3.4. <i>Développement d'un réseau européen de recherche en pédiatrie</i> .....	21
4. <u>Hypertension artérielle en pédiatrie</u> .....	21
4.1. <i>Epidémiologie et définition</i> .....	21
4.2. <i>Mesure de la TA chez l'enfant</i> .....	23
4.3. <i>Les signes devant alerter</i> .....	24
4.4. <i>Etiologies</i> .....	24
4.5. <i>Complications de l'HTA de l'enfant</i> .....	25
4.6. <i>Particularités du nourrisson</i> .....	26
5. <u>Traitement de l'HTA en pédiatrie</u> .....	26
5.1. <i>Généralités et objectifs</i> .....	26
5.2. <i>Les inhibiteurs calciques en pédiatrie</i> .....	29
5.3. <i>Autres classes d'antihypertenseurs en pédiatrie</i> .....	32
5.4. <i>Cas particulier de l'urgence hypertensive</i> .....	35
6. <u>Nicardipine</u> .....	37
6.1. <i>Propriétés physico-chimiques</i> .....	37
6.2. <i>Propriétés pharmacocinétiques</i> .....	38
6.3. <i>Posologies</i> .....	39
6.4. <i>Place de la nicardipine dans l'HTA pédiatrique</i> .....	39

6.5. Stabilité de la nicardipine .....	43
<b>OBJECTIFS DU TRAVAIL .....</b>	<b>45</b>
<b>MATERIELS ET METHODE .....</b>	<b>46</b>
1. <u>Formulation galénique et procédé de fabrication</u> .....	46
1.1. <i>Choix de la concentration et du conditionnement</i> .....	46
1.2. <i>Excipients disponibles</i> .....	46
1.3. <i>Etudes de pré-formulation</i> .....	47
1.4. <i>Formulation</i> .....	47
2. <u>Choix de la méthode de dosage de la préparation</u> .....	48
2.1. <i>La chromatographie liquide haute performance</i> .....	48
2.2. <i>La spectrométrie de masse en tandem</i> .....	50
2.3. <i>Etalonnage interne</i> .....	51
2.4. <i>Instrumentation et conditions chromatographiques</i> .....	52
2.5. <i>Réactifs, substances de références et matériel</i> .....	56
2.6. <i>Préparation des solutions de calibration, de contrôle et des échantillons</i> .....	57
3. <u>Conditions générales et choix des méthodes pour l'étude de la stabilité microbiologique</u> .....	59
3.1. <i>Méthodes et conditions générales</i> .....	59
3.2. <i>Choix de la méthode</i> .....	61
3.3. <i>Critères de validation</i> .....	62
3.4. <i>Matériel</i> .....	63
4. <u>Plan expérimental</u> .....	64
4.1. <i>Validation de la méthode de dosage</i> .....	64
4.2. <i>Validation des méthodes pour l'étude de stabilité microbiologique</i> .....	72
4.3. <i>Etude de stabilité</i> .....	75
<b>RESULTATS.....</b>	<b>83</b>
1. <u>Formulation galénique et procédé de fabrication</u> .....	83
1.1. <i>Choix de la concentration et du conditionnement</i> .....	83
1.2. <i>Excipients disponibles</i> .....	83
1.3. <i>Etudes de pré-formulation</i> .....	84
1.4. <i>Formulation</i> .....	87
2. <u>Validation du dosage de la nicardipine</u> .....	89
2.1. <i>Spécificité</i> .....	89
2.2. <i>Fonction de réponse</i> .....	97
2.3. <i>Justesse</i> .....	99
2.4. <i>Fidélité</i> .....	99
2.5. <i>Exactitude</i> .....	100
2.6. <i>Linéarité</i> .....	100

2.7. Limite de détection et de quantification.....	101
2.8. Profil de risque .....	102
3. <u>Validation des méthodes pour l'étude de stabilité microbiologique</u> .....	104
4. <u>Etude de stabilité</u> .....	105
4.1. Stabilité chimique .....	105
4.2. Stabilité physique.....	109
4.3. Uniformité de teneur en principe actif.....	113
4.4. Stabilité microbiologique .....	115
<b>DISCUSSION .....</b>	<b>116</b>
<b>CONCLUSION .....</b>	<b>128</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>129</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>138</b>

## LISTE DES TABLEAUX

---

Tableau 1 : Transitions MRM de la nicardipine et de la nicardipine-D3	55
Tableau 2 : Conditions optimales retenues pour le réglage du spectromètre	55
Tableau 3 : Préparation de la gamme d'étalonnage de nicardipine	58
Tableau 4 : Préparation des points de contrôle de nicardipine	58
Tableau 5 : Protocole pour la dégradation forcée	68
Tableau 6 : Plan expérimental de l'étude de stabilité chimique	76
Tableau 7 : Plan expérimental de l'étude de stabilité physique	77
Tableau 8 : Composition et caractéristiques physico-chimiques des différents véhicules	84
Tableau 9 : Formule retenue pour la fabrication d'un lot de 10 flacons de solution buvable de nicardipine (2 mg/ml)	88
Tableau 10 : Transitions MRM des produits issus de la dégradation à la lumière	93
Tableau 11 : Transitions MRM des produits issus de la dégradation en milieu alcalin	96
Tableau 12 : Justesse de la méthode	99
Tableau 13 : Fidélité de la méthode	99
Tableau 14 : Exactitude de la méthode	100
Tableau 15 : Résultats de la linéarité de la méthode	100
Tableau 16 : Résultats principaux de la validation de la méthode	103
Tableau 17 : Résultats de la validation des méthodes pour l'étude de stabilité microbiologique	104
Tableau 18 : Résultats de stabilité chimique de la nicardipine sur 90 jours à 25°C	107
Tableau 19 : Résultats de stabilité chimique de la nicardipine sur 90 jours à 4°C	108
Tableau 20 : Résultats des mesures de pH au cours de l'étude de stabilité des lots conservés à 25°C et à 4°C	110
Tableau 21 : Concentration en nicardipine obtenue après prélèvement dans les différents lots et avant et après agitation	113
Tableau 22 : Résultats des paramètres de viscosité, osmolalité et densité au cours de l'étude de stabilité	114
Tableau 23 : Résultats de l'étude de stabilité microbiologique	115

## LISTE DES FIGURES

---

Figure 1 : Mécanisme d'action des inhibiteurs calciques	30
Figure 2 : Structure chimique de la nicardipine	37
Figure 3 : Représentation du système de classification biopharmaceutique (BCS)	38
Figure 4 : Nombre de préparations de gélules de nicardipine en fonction du dosage en principe actif	39
Figure 5 : Pyramide des âges des enfants traités par gélules de nicardipine sur 3 ans	40
Figure 6 : Excipients liquides disponibles	46
Figure 7 : Schéma d'une chaîne HPLC	49
Figure 8 : Chromatogramme	49
Figure 9 : Schéma du principe d'un spectromètre de masse en tandem	50
Figure 10 : Représentation d'un mode de balayage MRM	51
Figure 11 : Structure de la nicardipine-D3 utilisée comme étalon interne	52
Figure 12 : Procédé d'ionisation par électrospray	53
Figure 13 : Système chromatographique du laboratoire de Pharmacocinétique du CHU de Rouen	54
Figure 14 : Chromatogramme de la nicardipine	56
Figure 15 : Procédé de préparation des échantillons pour le dosage	59
Figure 16 : Principe des dilutions pour le dénombrement en milieu solide (ISO 7218)	63
Figure 17 : Mode d'acquisition Full Scan	68
Figure 18 : Procédé de validation de l'essai de dénombrement microbien	73
Figure 19 : Procédé de validation de la recherche d'E. coli	74
Figure 20 : Plan expérimental de l'uniformité de teneur en principe actif	80
Figure 21 : Profil général de l'étude de stabilité	82
Figure 22 : Echantillons des formulations obtenues avec l'Inorpha®, Ora -Blend® SF, Syrspond® SF liquide lors des tests de pré-formulation	85
Figure 23 : Sédiment observé après 24 heures de conservation dans l'Inorpha®	85
Figure 24 : Formulations obtenues après ajout de polysorbate 80	86
Figure 25 : Examen des formulation au microscope optique avant et après ajout de polysorbate (Microscope Leitz Diaplan, objectif x 40)	87
Figure 26 : Procédé de fabrication d'un lot de 10 flacons de solution buvable de nicardipine (2 mg/ml)	88
Figure 27 : Chromatogramme des échantillons de solution buvable sans principe actif	89
Figure 28 : Spectre de masse de la nicardipine non dégradée	90
Figure 29 : Spectre de masse de la nicardipine dégradée après 6 heures d'exposition à la lumière	91
Figure 30 : Conversion de l'anneau dihydropyridine en un cycle pyridine	92
Figure 31 : Spectre de masse de la nicardipine non dégradée en présence d'HCl et de NaOH	94
Figure 32 : Spectre de masse de la nicardipine dégradée en milieu alcalin	95
Figure 33 : Réaction proposée de la dégradation en milieu basique de la nicardipine	95
Figure 34 : Spectre de masse obtenu après contact à 100°C avec de l'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> à 6%	96
Figure 35 : Profil d'exactitude obtenu en considérant une régression linéaire pondérée (1/X)	97

Figure 36 : Profil d'exactitude obtenu en considérant une régression linéaire passant par l'origine pondérée (1/X)	98
Figure 37 : Profil d'exactitude obtenu en considérant une régression quadratique pondérée (1/X)	98
Figure 38 : Graphique de la linéarité de la méthode HPLC-MS/MS pour le dosage de la nicardipine	101
Figure 39 : Profil de risque obtenu en considérant le modèle de régression linéaire pondérée en 1/X avec un niveau de risque fixé à priori à 5%	102
Figure 40 : Evolution de la concentration moyenne de nicardipine rapportée à la concentration initiale (en %) en fonction du temps et du mode de conservation	105
Figure 41 : Evolution du pH des flacons au cours de l'étude de stabilité	109
Figure 42 : Témoin et solutions conservées 90 jours à 25°C et 4°C	111
Figure 43 : Evolution de la viscosité des flacons au cours de l'étude de stabilité	111
Figure 44 : Evolution de l'osmolalité des flacons au cours de l'étude de stabilité	112
Figure 45 : Evolution de la densité au cours de l'étude de stabilité	112

## LISTE DES ABREVIATIONS

---

**AMM** : Autorisation de mise sur le marché  
**ARA II** : antagonistes du récepteur de l'angiotensine II  
**BCS** : Biopharmaceutics Classification System  
**BPP** : Bonnes Pratiques de Préparation  
**CL** : Chromatographie liquide  
**CSP** : Code de la Santé Publique  
**DGAT** : Dénombrement des germes aérobies totaux  
**DMLT** : Dénombrement des moisissures/levures totales  
**EMA** : European Medicines Agency  
**ESI** : Electrospray Ionization  
**HPLC** : Chromatographie liquide haute performance  
**HPLC-MS** : Chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse  
**HPLC-MS/MS** : Chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem  
**HTA** : Hypertension artérielle  
**ICH** : International Conference on Harmonisation  
**IEC** : Inhibiteurs de l'enzyme de conversion  
**ISO** : Organisation internationale de normalisation  
**IV** : Intraveineuse  
**LD** : limite de détection  
**LQ** : limite de quantification  
**MeOH/H<sub>2</sub>O** : méthanol:eau  
**MRM** : multiple-reaction monitoring  
**m/z** : rapport de masse/charge  
**PDCO** : Comité des médicaments pédiatriques  
**PIP** : plans d'investigations pédiatriques  
**PUI** : Pharmacies à usage intérieur  
**PUMA** : paediatric-use marketing authorisation  
**QSP** : Quantité suffisante pour  
**SFSTP** : Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques  
**SFPC** : Société Française de pharmacie clinique  
**TA** : Tension artérielle  
**TIC** : Total Ion Chromatogram  
**UFC** : Unité Formant Colonie  
**UV** : ultra-violet

## INTRODUCTION

---

Les enfants font partie d'une population fragile, aux besoins spécifiques, et sont considérés comme des patients à risque, en médecine libérale et à l'hôpital (1). L'une des raisons est que les spécialités pharmaceutiques disponibles sont souvent inadaptées pour une utilisation pédiatrique. L'absence d'étude clinique chez l'enfant se traduit par l'absence d'indications et de posologies pédiatriques dans les résumés des caractéristiques des produits (RCP) (2).

L'utilisation hors autorisation de mise sur le marché (AMM) ou "off-label" de médicaments en pédiatrie est évoquée régulièrement depuis de nombreuses années. Selon une étude menée en 2000 (3) près de 67 % des prescriptions hospitalières pédiatriques étaient réalisées hors AMM en Europe.

En France, une étude réalisée entre 1993 et 1996 a montré que sur l'ensemble des médicaments référencés à l'Assistance Publique des Hôpitaux de Paris seulement 26% avaient l'indication en pédiatrie. Concernant les 74% restant, ils étaient réservés à l'adulte ou contre-indiqués chez l'enfant, ou bien ils ne comportaient aucune donnée pédiatrique (4). Plus récemment, une étude menée dans un hôpital pédiatrique français, a montré que 36,5% des prescriptions recensées sur un jour donné présentaient une utilisation off-label (5).

Nous avons réalisé une étude similaire au sein de notre établissement : sur 750 médicaments retenus comme étant les plus prescrits dans les services de pédiatrie du CHU de Rouen, 25,6% ne présentaient aucune recommandation posologique adaptée à l'enfant dans le RCP. Les médicaments du système cardiovasculaire étaient les plus dépourvus avec 44,7% de spécialités sans recommandations posologiques pédiatriques.

Une des explications à cette situation tient au fait que le développement des médicaments à usage pédiatrique est complexe de par leur formulation galénique particulière, la multiplicité des doses à préparer ou encore la difficulté de pouvoir réaliser des essais cliniques chez l'enfant. Enfin, la législation actuelle en matière de brevets et d'exclusivité des données encourage surtout le développement de nouveaux produits, et non l'utilisation de médicaments existants dans de nouvelles indications ou suivant de nouvelles modalités. Pour un industriel, le développement d'un médicament pédiatrique se heurte aux difficultés éthiques de mise en place des études, auxquelles s'ajoutent des problèmes de faible rentabilité économique (6).

Afin de favoriser le développement de médicaments adaptés à l'enfant, le règlement pédiatrique européen impose désormais aux firmes pharmaceutiques de soumettre un Plan d'Investigation Pédiatrique (PIP) auprès du Comité Européen Pédiatrique (PDCO) lors d'une nouvelle demande d'AMM ou lorsqu'une modification de l'AMM est proposée pour une spécialité pharmaceutique déjà autorisée.

Malheureusement, il n'existe toujours pas assez de médicaments ayant une forme galénique satisfaisante pour l'administration chez l'enfant et malgré de telles mesures, ces initiatives ont eu un effet marginal sur les prescriptions off-label (7).

Les enfants traités avec des médicaments hors-AMM présentent un risque de développer des effets indésirables (8) et les spécialités destinées aux adultes sont souvent inadaptées pour un usage pédiatrique, tant en forme galénique qu'en dosage (9).

Les préparations sont destinées à compenser cette absence de spécialités pharmaceutiques : les pharmacies à usage intérieur (PUI) des établissements de santé sont régulièrement amenées à répondre à des besoins d'adaptation des formes pharmaceutiques à l'usage pédiatrique, aussi bien pour permettre l'ajustement des doses à la posologie prescrite que pour adapter la forme galénique à l'administration chez l'enfant. Ainsi, 50 % des préparations hospitalières déclarées à l'ANSM pour la période 2008-2011 concernent la pédiatrie (10), et la plupart sont des adaptations à l'enfant de formes galéniques destinées à l'adulte.

Celles-ci sont pour la majorité des formes orales. Selon une étude menée par la Société Française de Pharmacie Clinique (SFPC) dans 53 hôpitaux français, les formes orales représentaient 87% des préparations magistrales à visée pédiatrique, réparties pour 97% en gélules et pour 3% en formes buvables (11). Le faible taux de préparations buvables s'explique par les difficultés de mise au point pharmaceutique des formes orales liquides, comparé à la préparation de gélules.

La majorité des préparations magistrales destinées à être utilisées en pédiatrie sont donc sous forme de gélules, ce qui prête réflexion quant à leur administration dans les services de pédiatrie. L'ANSM, recommande de ne pas administrer de forme orale solide à l'enfant de moins de six ans. La préparation et l'administration de gélules semblent en contradiction formelle avec cette recommandation, mais en réalité les gélules sont ouvertes dans plus de 90 % des cas (2). En effet, le personnel infirmier hospitalier est contraint pour les plus jeunes enfants à avoir recours à des pratiques non évaluées, voire même non

recommandées, qui ne permettent pas une bonne maîtrise de la dose à administrer et qui peuvent générer des erreurs dans le traitement de l'enfant. Ainsi, on observe fréquemment dans les services cliniques pédiatriques, l'ouverture des gélules et leur "dissolution" dans un véhicule souvent inadapté, ceci associé à des problèmes de goût plus ou moins bien acceptés mais aussi de solubilisation du principe actif et donc de dose réellement administrée. L'étude PEDIAD, réalisée entre mars 2001 et avril 2002, sous l'égide de la SFPC a en effet montré que les formes orales subissent de façon importante une transformation par les infirmières (2).

En outre, en pédiatrie, l'évolution rapide du poids oblige à des adaptations régulières des posologies, ce qui contraint les PUI à réaliser de nombreuses séries de gélules pour un même enfant.

La nicardipine fait partie de ces principes actifs. La seule spécialité existante en France, le Loxen®, n'est pas adaptée à l'usage pédiatrique et les comprimés dosés à 20 mg ne permettent pas de répondre aux posologies pédiatriques. Largement utilisée pour sa facilité et sa sécurité d'utilisation chez l'enfant, la nicardipine est actuellement administrée sous forme de gélules préparées par la pharmacie. Ces préparations de gélules de nicardipine ont été jugées comme indispensables par l'ANSM en 2010 lors de leur rapport d'analyse des préparations réalisées à l'hôpital (10). De plus, la nicardipine a été ajoutée à "*l'Inventory of pediatric therapeutic needs*" publié par l'EMA (European Medicines Agency). Cet inventaire souligne le manque de formulations adaptées à l'âge pour ce principe actif (12).

Pour aider au développement de médicaments pédiatriques, l'EMA a rédigé un certain nombre de lignes directrices dans lesquelles figure une réflexion sur les formulations de choix pour la population pédiatrique. Selon ce document, les formes orales liquides sont les plus adaptées aux jeunes patients (13).

Bien que les préparations magistrales de gélules de nicardipine combrent en partie le manque de spécialités disponibles en pédiatrie pour la classe des antihypertenseurs, leur préparation est chronophage, et aux difficultés d'administration viennent s'ajouter des contraintes inhérentes à la pédiatrie et aux modalités de prescription de la nicardipine. En effet, comme tous les antihypertenseurs en pédiatrie, le traitement débute à la dose recommandée la plus faible et celle-ci est progressivement augmentée jusqu'à ce que les objectifs tensionnels soient atteints. Cela conduit à des adaptations régulières de posologies

qui sont également accentuées par l'évolution rapide du poids en pédiatrie étant donné que la nicardipine est prescrite en mg par kg de poids corporel.

Ces différents éléments montrent tout l'intérêt de développer une forme orale liquide de nicardipine permettant de répondre aux adaptations posologiques mais aussi d'améliorer la qualité et la sécurité de la préparation et de l'administration de ce principe actif.

L'objectif de ce travail est donc de mettre au point une forme orale liquide de nicardipine, adaptée à la population pédiatrique, qui pourra être préparée à l'avance et disponible à tout moment pour les services de pédiatrie.

Pour répondre à cet objectif, une étude de stabilité physico-chimique et microbiologique sera entreprise sur la formulation préalablement déterminée afin d'apprécier la stabilité du principe actif et de s'assurer du maintien de l'intégralité des propriétés de la préparation permettant son utilisation en toute sécurité.

### **1. Les préparations**

#### ***1.1. Législation des préparations réalisées en milieu hospitalier***

Les missions des PUI sont définies dans le décret numéro 2000-1316 du 26 décembre 2000. En plus de l'approvisionnement et de la dispensation des médicaments et dispositifs médicaux, les PUI doivent réaliser des préparations magistrales et hospitalières à partir de matières premières ou de spécialités pharmaceutiques. Toutes les dispositions relatives à ces préparations figurent dans le guide des Bonnes Pratiques de Préparation (BPP) (14).

Les préparations magistrales sont définies dans l'article L.5121-1 du Code de la Santé Publique (CSP) (15) : il s'agit de «tout médicament préparé selon une prescription médicale destinée à un malade déterminé en raison de l'absence de spécialité pharmaceutique disponible disposant d'une autorisation de mise sur le marché, de l'une des autorisations mentionnées aux articles L. 5121-9-1 et L. 5121-12, d'une autorisation d'importation parallèle ou d'une autorisation d'importation délivrée à un établissement pharmaceutique dans le cadre d'une rupture de stock d'un médicament, soit extemporanément en pharmacie, soit dans les conditions prévues à l'article L. 5125-1 ou à l'article L. 5126-2 » (16).

Les préparations hospitalières, également définies dans l'article L.5121-1 du CSP, consistent en «tout médicament, à l'exception des produits de thérapies génique ou cellulaire, préparé selon les indications de la Pharmacopée et en conformité avec les bonnes pratiques mentionnées à l'article L. 5121-5, en raison de l'absence de spécialité pharmaceutique disponible ou adaptée disposant d'une autorisation de mise sur le marché, de l'une des autorisations mentionnées aux articles L. 5121-9-1 et L. 5121-12, d'une autorisation d'importation parallèle ou d'une autorisation d'importation délivrée à un établissement pharmaceutique dans le cadre d'une rupture de stock d'un médicament, par une pharmacie à usage intérieur d'un établissement de santé, ou par l'établissement pharmaceutique de cet établissement de santé autorisé en application de l'article L. 5124-9 ou dans les conditions prévues à l'article L. 5126-2. Les préparations hospitalières sont dispensées sur prescription médicale à un ou plusieurs patients par une pharmacie à usage intérieur du dit établissement. Elles font l'objet d'une déclaration auprès de l'Agence

nationale de sécurité du médicament et des produits de santé, dans des conditions définies par arrêté du ministre chargé de la santé » (16) .

### **1.2. Préparations en séries**

La préparation en série doit permettre de répondre sans délai et à toute heure aux demandes urgentes d'un service de soins. Sous réserve de l'enregistrement de la préparation auprès de l'ANSM, une préparation hospitalière n'impose pas de fabrication extemporanée, elle peut être donc préparée à l'avance et stockée dans des conditions appropriées à sa bonne conservation.

En plus d'un gain attendu de qualité de prise en charge du patient par une meilleure capacité de réponse, un gain organisationnel est également recherché par la réalisation de préparations hospitalières. Ces préparations réalisées en séries peuvent être effectuées si un système d'assurance de la qualité a été mis en place dans le cadre des BBP et pour des échelles de production compatibles avec les moyens humains et techniques dont la pharmacie dispose (14). La taille des lots doit être compatible avec la quantité de médicament consommé (17).

Ces préparations nécessitent de réaliser néanmoins un plus grand nombre de contrôles avant de pouvoir libérer un lot et notamment tout contrôle rendu nécessaire par le caractère de la préparation terminée : la teneur en substance active, des contrôles galéniques, de stérilité, et le contrôle du conditionnement et de l'étiquetage de la préparation (14). Un échantillon de chaque lot de préparations terminées est conservé dans l'échantillothèque d'une quantité minimale permettant de réaliser au moins une analyse complète.

## **2. Les formes orales liquides en pédiatrie**

L'absence de spécialités spécifiques destinées aux enfants pose des problèmes évidents de sécurité. Les préparations magistrales et hospitalières réalisées par les PUI des établissements de santé permettent la mise à disposition de formes galéniques adaptées à l'âge (18).

Le manque de données sur l'acceptabilité des formes orales en fonction de l'âge rend difficile le choix d'une forme galénique chez l'enfant (19,20). Dans ce contexte, l'European Paediatric Formulations a listé des critères de choix d'une forme orale en pédiatrie (19) :

- l'acceptabilité par l'enfant, critère capital influençant directement l'observance médicamenteuse ;
- des doses adaptées à la posologie pédiatrique ;
- la facilité d'utilisation (préparation, administration) avec un impact minimal sur le style de vie de l'enfant ;
- l'efficacité et la sécurité (excipients, stabilité, erreurs d'administration) ;
- la facilité de mise au point pour l'industrie pharmaceutique, avec un coût acceptable pour l'assurance maladie et les patients (21).

La mise à disposition par les pharmacies à usage intérieur de formes liquides buvables prêtes à l'emploi et ayant un dosage adapté est une solution de choix pour la pédiatrie, réduisant ainsi les risques d'erreurs (9,22). La présentation des médicaments sous forme buvable multidose facilite ces adaptations, en évitant aux PUI de devoir refaire des gélules à chaque modification de posologie. De plus, les formes buvables sont aussi très intéressantes lors des phases de titration nécessaire dans le cas de certains traitements tels que la nicardipine, avec des adaptations de posologies très fréquentes (22).

Ainsi, le projet de développement des formes buvables à l'hôpital s'inscrit dans un contexte global d'amélioration de la qualité et de la sécurité de la préparation et de l'administration des médicaments en pédiatrie.

### ***2.1. Avantages et inconvénients***

Les formes orales liquides ont l'avantage d'être faciles à avaler pour les très jeunes enfants et d'être bien acceptées (20). Elles permettent un ajustement posologique précis en fonction de l'âge et du poids de l'enfant. En phase de titration ou pour les nouveau-nés, les posologies étant fréquemment modifiées, une partie des gélules préparées risque d'être inutile et de nombreuses séries de dosages différents doivent être réalisées. C'est pourquoi les formes buvables peuvent, dans certains cas, présenter un intérêt économique, comparées à la fabrication de gélules. Cependant, le volume de liquide à administrer par unité de prise est un facteur contraignant (19,20). Les recommandations de l'EMA, selon lesquelles ce volume ne devrait pas excéder 5 ml chez l'enfant de moins de 5 ans et 10 ml au-delà (23), sont difficiles à respecter (20). D'autre part, le goût amer de certains principes actifs peut être difficile à masquer dans une formulation liquide (24). Le développement d'une formulation orale liquide pédiatrique est une tâche complexe qui exige des considérations multiples. En plus du goût ou de la stabilité, le criblage et le choix rigoureux

des excipients est une étape critique dans le développement d'une formulation pédiatrique (25). L'ajout de conservateurs et d'autres excipients peut ne pas être approprié pour l'usage pédiatrique et leur innocuité n'est pas toujours démontrée chez l'enfant (26,27). La reconstitution des suspensions, le calcul et la mesure du volume de formes orales liquides à administrer sont des étapes longues, délicates et sources d'erreurs pour le personnel soignant. Ces manipulations augmentent le risque d'erreur médicamenteuse dont l'erreur de calcul est la plus commune (28). Les erreurs médicamenteuses sont la première cause d'évènements indésirables médicamenteux évitables en pédiatrie, deux tiers de ces erreurs survenant au moment de l'administration (29). Le manque de précision des mesures du volume à administrer et la multiplicité des systèmes d'administrations peut également conduire à des erreurs de dose. Au CHU de Rouen, 65 spécialités buvables utilisées par la pédiatrie ont été recensées. Sept systèmes d'administration différents ont été retrouvés.

## ***2.2. Considérations pour la réalisation d'une forme orale liquide***

Plusieurs difficultés techniques se présentent lors de la mise au point d'une forme pharmaceutique liquide pour la voie orale (sirop, suspension...), ce qui explique pourquoi les gélules représentent la forme pharmaceutique la plus fréquemment préparée (22) :

### **• Solubilité :**

La réalisation de formes orales liquides fait appel à la notion de solubilité qui est un des facteurs physico-chimiques décisifs à considérer. Dans le domaine pharmaceutique, un grand nombre de substances actives pose des problèmes de mise en forme, notamment du fait de leur faible solubilité aqueuse entraînant une mauvaise biodisponibilité. La solubilité du principe actif dépend du type de solvant utilisé, de la concentration finale et du pH dans certains cas. Les molécules hydrophiles, solubles dans des solutions aqueuses peuvent être facilement préparées sous forme de solution buvable ou de sirop. Les variations de pH pouvant influencer la solubilité des molécules, il est parfois nécessaire d'ajouter un tampon déterminé en fonction du pKa de la molécule, permettant de maîtriser le pH des solutions. De même des co-solvants (alcools, glycérine, sorbitol, propylène glycol, polyéthylène glycol) ou d'autres agents de solubilisation comme des tensioactifs (30) peuvent être nécessaires pour améliorer la solubilité de certains principes actifs. Lorsque ces approches ne sont pas possibles, le galéniste s'oriente vers la préparation de suspensions ou d'émulsions pour permettre une utilisation sous forme buvable.

• **Stabilité chimique :**

Les principaux facteurs affectant la stabilité chimique des molécules sont la température, l'exposition à la lumière, à l'oxygène de l'air ou à l'humidité. Dans le cas d'une préparation orale liquide, d'autres facteurs interviennent tels que le pH, la taille des particules d'une suspension, la présence d'eau, de solvants ou d'autres excipients et enfin le type de contenant. Les réactions chimiques de dégradation les plus communes sont l'hydrolyse, l'oxydation et la réduction (31). Ceux ci peuvent conduire à une dégradation du principe actif en molécules inactives, voire toxiques. La perte d'activité peut être accompagnée de changement dans l'apparence du produit (décoloration, formation d'un précipité...). En comparaison avec les formes orales sèches, la stabilité chimique des principes actifs préparés en solution buvable est souvent plus difficile à préserver (32,33). Il est impératif de disposer de données de stabilité chimique concernant la préparation envisagée. Dans le cas contraire, on ne pourra pas se passer d'étudier la stabilité chimique de la solution buvable préparée, en mettant en œuvre une méthode validée.

• **Stabilité physique :**

Les problèmes de stabilité physique se traduisent principalement par la floculation des particules médicamenteuses en suspension qui peuvent sédimenter. La structure du sédiment varie selon les cas : il forme soit une couche mince, dense et compacte qui ne se remet pas en suspension après agitation, soit un floculat volumineux, facile à redisperser par simple agitation. Dans le premier cas le sédiment est "défloculé". On parle de "gâteau" ou de phénomène de "caking". Dans le second cas, il est "floculé". La floculation est favorisée par des variations importantes de température et peut être minimisée par l'utilisation de polymères ou de surfactants. La vitesse de sédimentation, gouvernée par la loi de Stokes, dépend de la taille des particules, de la viscosité du véhicule et de la différence de densité entre la particule et le véhicule :

$$V = \frac{2r^2(\rho_1 - \rho_2)g}{9\eta}$$

Avec V la vitesse de sédimentation, r le rayon des particules,  $\rho_1 - \rho_2$  la différence de masse volumique entre la phase dispersée et la phase dispersante, g l'accélération due à la gravité et  $\eta$  la viscosité de la phase dispersante.

Pour limiter la vitesse de sédimentation, il est nécessaire de bien pulvériser la poudre. De plus, on peut améliorer la viscosité à l'aide d'agents de viscosité (carboxyméthylcellulose, carbomer, gomme xanthane, etc...) et augmenter la densité du

véhicule à l'aide d'agents épaississants (sucrose, sorbitol, glycérine). Des tensioactifs peuvent également être utilisés. À très faible concentration, les tensioactifs sont capables de former des solutions dans une phase aqueuse. Dans le cas des suspensions, les tensioactifs ont pour rôle de faciliter le mouillage des particules en diminuant la tension superficielle du liquide. Le choix du tensioactif dépend de son interaction possible avec le principe actif. On peut citer le polysorbate 80 (tensioactif non ionique) ou le laurylsulfate de sodium (tensioactif anionique) (30). Un autre élément important à prendre en compte pour garantir une bonne stabilité physique des préparations buvables est leur mode de préparation. Pour les sirops, il est recommandé de dissoudre au préalable le principe actif dans un peu d'eau, puis de le diluer dans la quantité nécessaire de sirop. Dans le cas des suspensions buvables, il est impératif d'humidifier la poudre avec un volume le plus faible possible de véhicule afin d'obtenir une première pâte bien lisse. Dans un second temps, cette pâte sera diluée avec la quantité nécessaire de véhicule pour obtenir la concentration désirée. Une erreur fréquente est d'utiliser une première quantité de véhicule trop importante entraînant une mauvaise dispersion du principe actif avec, comme conséquence, une hétérogénéité de la suspension buvable pouvant conduire à une imprécision de la dose administrée. Ainsi certains paramètres peuvent être évalués afin d'apprécier une potentielle instabilité de la formulation : la viscosité, la densité, le pH, l'osmolalité, la facilité de remise en suspension, la distribution granulométrique, ou la limpidité (33,34).

• **Stabilité microbiologique :**

L'instabilité microbiologique d'une préparation sous-entend la croissance de germes au sein de celle-ci au cours de sa durée de conservation. Comme pour la stabilité chimique, la stabilité microbiologique des formes orales liquides pose plus de problèmes que celles des formes orales sèches (35). La qualité microbiologique des préparations pour administration par voie orale est définie par la Pharmacopée européenne (36).

Des conservateurs peuvent être utilisés afin de limiter une contamination ou une croissance de micro-organismes. Une étude sur la stabilité microbienne de la spironolactone dans du sirop simple a montré l'importance d'utiliser des conservateurs, étant donné que la contamination microbienne est produite lors de la préparation, et qu'elle est présente même lorsque les flacons sont conservés à basse température (37). Différents types de conservateurs peuvent être utilisés comme les alcools, l'acide benzoïque, les parabènes, ou l'acide sorbique par exemple. Pour une préparation stérile, il est attendu une absence de germes, alors que pour les préparations non obligatoirement stériles, il existe dans la

Pharmacopée européenne des seuils de tolérance en germes aérobies et moisissures/levures ainsi que des limites en germes spécifiés.

• **Caractères organoleptiques et palatabilité :**

L'un des objectifs lors de la préparation d'une forme buvable va être de masquer le goût éventuellement désagréable du médicament, mais aussi de certains excipients. La palatabilité est un facteur critique dans l'observance médicamenteuse, en particulier dans le cas de traitements chroniques en pédiatrie, où l'acceptabilité du traitement est strictement corrélée au goût agréable de la préparation à administrer (24,38). L'addition d'arômes et/ou d'édulcorants est une approche souvent utilisée pour pallier au goût indésirable d'une formulation destinée à l'enfant.

• **Choix des excipients :**

Le criblage et le choix rigoureux des excipients sont une étape critique dans le développement d'une formulation pédiatrique (25). Lors de la formulation, il convient de limiter l'utilisation de co-solvants comme l'alcool pour les enfants ou de tenir compte de la teneur en sucre de la préparation pour les patients diabétiques.

• **Le conditionnement :**

Pour pallier au risque de dégradation par la lumière du principe actif et des excipients, le conditionnement préférable est le flacon en verre ou plastique ambré. La mise à disposition de conditionnements sécuritaires pour les enfants est particulièrement importante pour les formes orales liquides où une dose importante peut être administrée par erreur par rapport aux gélules ou comprimés (39). Les dispositifs adaptés à la distribution d'une forme orale liquide sont indispensables pour un dosage précis (23).

• **Aspects pharmacocinétiques et biodisponibilité :**

L'enfant est un organisme humain en maturation. L'administration d'une dose adulte proportionnelle au poids de l'enfant d'un médicament ne permet pas d'obtenir une concentration plasmatique à l'équilibre équivalente car l'enfant n'est pas un adulte en miniature. Il se distingue non seulement par la taille mais également par son état de croissance et la maturation fonctionnelle rapide des différents organes. C'est pourquoi les méthodes pour estimer la dose à administrer chez l'enfant se basent sur la tranche d'âge, le poids corporel, ou la surface corporelle (40). Il a été suggéré que l'absorption et l'efficacité

thérapeutique d'un principe actif mis en solution ne diffèrent pas de la forme galénique initiale (39).

- **Conditions de préparation :**

La disponibilité des matériaux de départ et des excipients, le temps de préparation par le personnel, l'accès à des installations appropriées et l'évaluation précise de la composition de la préparation finale sont des éléments importants à prendre en considération (39).

### **3. Initiative et réglementation pédiatrique**

Face au manque de données concernant l'utilisation des médicaments en pédiatrie, la Food and Drug Administration (FDA) a créé en 1994 la Pediatric Labelling Rule. Cette législation prévoyait que les laboratoires pharmaceutiques soumettent des données de la littérature et toutes autres informations disponibles sur l'utilisation des médicaments dans la population pédiatrique. Cette première démarche volontaire ayant eu peu d'impact, la FDA a introduit en 1997 la Pediatric Rule qui exige des études cliniques dans la population pédiatrique pour tout nouveau médicament ainsi que pour toute modification du brevet. Cette réglementation est devenue en 2003 le Pediatric Research Equity Act (PREA) complétée en 2007 par le Best Pharmaceutical for Children Act (BPCA) (41).

Parallèlement, en 1997, l'EMA a conclu à la nécessité de renforcer la législation en vigueur sur le sujet des médicaments à usage pédiatrique, en particulier par la mise en place d'incitations destinées aux laboratoires pharmaceutiques. Ainsi, en 2006, l'EMA a lancé par l'intermédiaire du Règlement n° 1901/2006 du Parlement européen et du conseil relatif aux médicaments à usage pédiatrique, des mesures contraignantes s'inspirant de la législation américaine, associant des obligations, des récompenses et des mesures incitatives. Pour atteindre ces objectifs, le règlement a mis en place un Comité européen pédiatrique (PDCO) au sein de l'EMA, et la mise à disposition de bases de données sur les essais cliniques en pédiatrie (EudraCT) et sur les médicaments autorisés en pédiatrie (EudraPharma).

#### ***3.1. Le comité pédiatrique***

Le PDCO est responsable de la coordination des activités relatives aux médicaments pédiatriques. Il comprend des membres du Committee for human Medicinal Products (CHMP), des experts en pédiatrie des états membres, ainsi que des spécialistes dans le domaine de la santé publique et des représentants d'associations de parents. Le Comité

Pédiatrique a pour responsabilité l'expertise des différents aspects des médicaments en pédiatrie c'est à dire le développement pharmaceutique, la médecine pédiatrique, la recherche clinique, la pharmacovigilance, l'éthique et la santé publique (42). La mission principale du PDCO concerne l'évaluation et l'approbation des plans d'investigations pédiatriques.

### ***3.2. Le plan d'investigation pédiatrique***

Le Règlement Européen (n°1901/2006) impose désormais aux firmes pharmaceutiques le dépôt d'un plan d'investigation pédiatrique (PIP) auprès du PDCO. Le PIP contient les mesures prévues pour évaluer la qualité, la sécurité et l'efficacité du médicament dans tous les sous-ensembles de la population pédiatrique susceptibles d'être concernés. Le laboratoire pharmaceutique doit proposer également le calendrier envisagé pour la réalisation de ces mesures et la communication des résultats aux autorités de santé. Le PIP doit aussi décrire les mesures envisagées pour adapter la formulation du médicament de façon à rendre son utilisation plus facile et plus sûre dans les différents groupes d'âge.

Les PIPs sont obligatoires:

- avant toute nouvelle demande d'AMM, européenne ou nationale pour une spécialité pharmaceutique
- avant toute demande de modification de l'AMM relative à une nouvelle indication, une nouvelle forme pharmaceutique ou une nouvelle voie d'administration pour des spécialités déjà autorisées mais protégées par des droits de brevet
- lors d'une demande d'un paediatric-use marketing authorisation (PUMA), en vue d'un usage pédiatrique (indication, dosage, forme pharmaceutique ou voie d'administration appropriée).

En récompense, lorsqu'une demande d'AMM ou de modification d'AMM comprend les résultats de l'ensemble des études réalisées selon un PIP approuvé, le titulaire du brevet ou d'un CCP bénéficie d'une extension de 6 mois des droits de propriété intellectuelle.

### ***3.3. La Paediatric Use Marketing Authorization (PUMA)***

Afin de mettre en œuvre une mesure d'incitation en faveur des substances qui ne sont plus protégées par des brevets, un nouveau type d'AMM a été créé par le règlement pédiatrique: la Paediatric Use Marketing Autorisation (PUMA), autorisation de mise sur le marché en vue d'un usage pédiatrique. Celle-ci est accordée aux médicaments développés

exclusivement en vue d'un usage pédiatrique et contenant une substance active n'étant plus protégée par des droits de propriété intellectuelle. Les indications thérapeutiques sont exclusivement dans la population pédiatrique ou ses sous-ensembles. Le dosage, la forme pharmaceutique et la voie d'administration doivent aussi être appropriés à l'usage pédiatrique. En contrepartie, le laboratoire pharmaceutique bénéficie d'une protection de mise sur le marché de 10 ans dans l'indication pédiatrique posée.

### ***3.4. Développement d'un réseau européen de recherche en pédiatrie***

Afin d'améliorer les compétences en recherche pédiatrique au niveau national et européen, le règlement a mis en place un réseau européen d'investigation clinique en pédiatrie : Enpr-EMA (European Network of Paediatric Research at the European Medicines Agency). Ce réseau se base sur les structures nationales déjà existantes, et sur les différents réseaux de centres d'essais cliniques et travaille en collaboration étroite avec des partenaires internationaux et notamment l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) par le biais du Paediatric Medicines Regulators Network. L' Enpr-EMA a pour objectif de faciliter la conduite d'études cliniques de qualité, répondant aux besoins chez l'enfant, en évitant la redondance des investigations dans cette population.

## **4. Hypertension artérielle en pédiatrie**

### ***4.1. Epidémiologie et définition***

#### **4.1.1. Epidémiologie**

L'hypertension artérielle (HTA) pédiatrique est de plus en plus fréquente et cette augmentation est intimement liée à l'accroissement de la prévalence de l'obésité chez l'enfant (43,44). Selon des études récentes basées sur le dépistage en milieu scolaire, l'HTA affecte désormais entre 3 et 5% de la population pédiatrique (45).

#### **4.1.2. Définition**

La tension artérielle (TA) normale de l'enfant est plus basse que chez l'adulte; celle-ci augmente avec l'âge et la taille du sujet. Les chiffres tensionnels doivent donc être comparés

à des valeurs de référence. D'après les dernières recommandations américaines et européennes (46,47) :

- Sont considérés comme hypertendus les enfants dont la moyenne des TA systolique ou diastolique, mesurées à trois occasions différentes, est supérieure ou égale aux valeurs observées chez 95% des enfants du même sexe, du même âge et de même taille, c'est-à-dire au 95<sup>ème</sup> percentile.
- La TA est considérée « normale haute » ou « pré-hypertension » ou « TA limite » si elle est comprise entre le 90<sup>ème</sup> et le 95<sup>ème</sup> percentile ou chez l'adolescent si elle est supérieure à 120/80 mmHg.
- L'HTA est classée « grade 1 » si la TA est comprise entre le 95<sup>ème</sup> et le 99<sup>ème</sup> percentile.
- Elle est classée « grade 2 » si la TA est supérieure au 99<sup>ème</sup> percentile + 5 mmHg.

#### **4.1.3. Tables de référence**

Ces dernières années, de nombreuses études se sont succédées afin de récolter des informations démographiques concernant la taille, le poids, le sexe et la TA des enfants. De ces études sont ressorties :

- Une table américaine présentée en 2005 dans « *The fourth report on the Diagnosis, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure in Children and Adolescents* », issue d'une large enquête du National Health and Nutrition Examination Survey (47).

Dans cette table, les normes de TA sont fonction du sexe, du percentile de la taille du sujet par rapport à son âge (annexe 1).

- Une table française issue d'une étude nancéenne (48) datant de 1980, qui établit les normes de TA en fonction de la taille du sujet uniquement, débutant à l'âge de 4 ans (annexe 2).

Alors que la Société Française de Néphrologie Pédiatrique retient comme référence l'étude française de 1980, l'European Society of Hypertension reprend en 2009 les dernières recommandations américaines, dans un article intitulé : "Management of high blood pressure in children and adolescents" (46).

Notons également les disparités concernant la définition de l'HTA :

- Aux USA : selon les dernières recommandations, l'HTA est définie pour des chiffres supérieurs au 95<sup>ème</sup> percentile.

- En France : dans le cadre de la société française de néphrologie pédiatrique, l'HTA de l'enfant est définie depuis 1980 comme une TA systolique ou diastolique supérieure au 97,5<sup>ème</sup> percentile des valeurs établies à Nancy.

#### **4.2. Mesure de la TA chez l'enfant**

Le dépistage est recommandé de façon systématique à partir de l'âge de 3 ans et sur point d'appel avant 3 ans (47). Il s'agit d'un acte délicat qui pose le problème de sa reproductibilité et impose des modalités de mesure précises pour pouvoir se référer aux courbes de références (48). Outre la méthode de référence par mesure auscultatoire (sphygmomanomètre), il existe des méthodes oscillométriques automatisées ainsi que des méthodes invasives réservées généralement aux nouveaux nés et nourrissons.

La mesure doit être effectuée au repos, depuis au moins 5 minutes, en position allongée ou assise, au niveau du bras droit de préférence (49). Il est nécessaire de mesurer la pression à plusieurs reprises au cours d'une même visite et lors de plusieurs consultations. L'appréhension liée à la mesure elle-même ou à la consultation favorise une hausse transitoire de la pression.

La taille du brassard est le facteur le plus important de la variabilité des résultats (49). Le brassard utilisé doit être adapté à la taille du bras. La longueur de la partie gonflable doit couvrir 80 à 100% de la circonférence du bras. Quatre tailles sont en général disponibles, nommées taille « nourrisson », « enfant », « adulte » et « obèse ». La TA est surestimée si le brassard est trop petit pour l'enfant, et donc trop serré. Il peut majorer les chiffres de 12 mmHg. Et inversement, un brassard trop large minore les résultats (49). La mesure au membre inférieur a un intérêt limité au monitoring en réanimation quand les membres supérieurs sont inaccessibles.

En néonatalogie, la mesure de la pression artérielle peut être effectuée soit par des méthodes non-invasives, soit par des méthodes invasives directes (Intra-arterial blood monitoring - IBP) *via* un cathéter artériel ombilical ou périphérique. Ces techniques directes sont généralement considérées comme les méthodes de référence pour la mesure de la TA en néonatalogie. Les artères les plus couramment utilisées comprennent l'artère ombilicale, l'artère radiale, et l'artère tibiale postérieure (50).

Ces mesures invasives restent réservées aux enfants les plus à risque, avec de larges variations d'utilisation selon les services, en raison des complications thromboemboliques possibles (50).

### **4.3. Les signes devant alerter**

Ils sont liés à l'affection en cause ou aux conséquences de l'HTA. Les signes les plus souvent évoqués sont (49):

- céphalées, acouphènes, vertiges, troubles visuels
- épistaxis
- douleurs abdominales, anorexie, vomissements
- polyuro-polydipsie

Les complications graves sont parfois révélatrices, elles sont les suivantes :

- encéphalopathies hypertensives, hémorragie cérébrale, convulsions, coma
- diminution brutale de l'acuité visuelle
- insuffisance rénale
- défaillance cardiaque

Dans d'autres cas, ce sont les signes spécifiques de l'affection causale qui font découvrir l'HTA.

### **4.4. Etiologies**

En pratique, une fois l'HTA confirmée, la recherche d'une cause est l'étape essentielle de la prise en charge des enfants hypertendus (46). Le bilan diagnostique d'une HTA de l'enfant se fait en deux étapes : une investigation initiale anamnestique, clinique, radiologique et biologique, puis des examens spécifiques en fonction de la première orientation.

#### **• HTA secondaire : les principales causes**

↪ Causes rénales et rénovasculaires :

Elles concernent 70% des cas d'HTA secondaires chez l'enfant (49). On distingue :

- les glomérulopathies aiguës ou chroniques (30 à 40 %)
- le syndrome hémolytique et urémique, souvent associé à une insuffisance rénale
- les reins cicatriciels
- la sténose de l'artère rénale
- les polykystoses rénales

↳ Causes endocriniennes :

Elles concernent, selon les auteurs, entre 1 et 8% des causes d'HTA de l'enfant. Elles sont surtout représentées par le phéochromocytome (49). Parmi les autres causes, on distingue : les hyperaldostéronismes, les défauts enzymatiques, le syndrome de Liddle, le syndrome de Cushing, les tumeurs à sécrétion de rénine.

↳ Causes cardiaques :

La plus fréquente est la coarctation de l'aorte. Cette anomalie représente 6% à 8% des cardiopathies congénitales.

↳ Causes neurologiques :

Elles sont rares: encéphalites, hypertension intracrânienne, syndrome de Guillain-Barré.

↳ Causes métaboliques :

Hypercalcémie, porphyrie.

↳ Causes médicamenteuses :

Corticothérapie, ciclosporine, hypervitaminose D, vasoconstricteurs, amphétamines.

• **HTA essentielle** :

C'est un diagnostic d'élimination chez l'enfant. Exceptionnelle avant l'âge de 7 ans, elle concerne surtout l'adolescent et le préadolescent. Schématiquement, plus l'enfant est jeune, plus il y a de probabilité que l'HTA soit secondaire et inversement plus l'enfant se rapproche de l'âge adulte, plus il y a de risque qu'il s'agisse d'une HTA essentielle (47). Dans la plupart des cas, l'HTA essentielle est modérée ou « limite ». Cette HTA limite pourrait être une expression précoce dès l'enfance d'une HTA essentielle de l'adulte (46,49). Elle survient surtout chez les enfants obèses ou ayant une histoire familiale d'HTA ou de pathologie cardiovasculaire.

#### ***4.5. Complications de l'HTA de l'enfant***

L'HTA est associée chez l'adulte à une augmentation des infarctus du myocarde, des accidents vasculaires cérébraux, et de la mortalité cardiovasculaire. Les conséquences cliniques de l'HTA de l'enfant sont moins connues. Il n'a pas été établi le niveau d'hypertension à partir duquel il existe des lésions sur les organes cibles (47). Parmi les principales complications, on peut citer :

- *Complications vasculaires* (ex : épaissement de l'intima média carotidienne)
- *Complications cardiaques* (ex : hypertrophie ventriculaire gauche)
- *Complications rénales* (ex : néphroangiosclérose)

- *Complications cérébrales* (ex : encéphalopathies hypertensives, convulsions)
- *Complications oculaires* (ex : œdème papillaire)

#### **4.6. Particularités du nourrisson**

La coarctation de l'aorte et la polykystose sont les principales étiologies. La thrombose de l'artère rénale, après pose de cathéter ombilical ou déshydratation sévère sont rares (49). En période néonatale, la perfusion cérébrale est étroitement liée à la pression artérielle systémique en raison d'une limitation des capacités d'autorégulation du débit sanguin cérébral. Cette situation favoriserait les complications neurologiques de l'HTA et notamment les hémorragies intracrâniennes chez le prématuré. D'autres manifestations cliniques (convulsions, encéphalopathie hypertensive, atteintes rétiniennes, insuffisance cardiaque, polyurie) peuvent émailler l'évolution de toutes les HTA néonatales y compris celles observées au cours des dysplasies broncho-pulmonaires traitées par les corticoïdes (51).

### **5. Traitement de l'HTA en pédiatrie**

#### **5.1. Généralités et objectifs**

Le traitement de l'HTA repose avant tout sur le traitement de la cause dans le cas des HTA secondaires, et le traitement des comorbidités dans le cas des HTA primaires. Quelle que soit la sévérité de l'HTA, le traitement comporte toujours des règles hygiéno-diététiques et suivant les cas, un traitement médicamenteux. Le traitement de l'HTA chez l'enfant vise à obtenir des chiffres tensionnels le mettant à l'abri de toutes complications.

Les objectifs de TA sont les suivants : (47)

- TA inférieure au 90<sup>eme</sup> percentile en dehors de l'existence d'une néphropathie
- TA inférieure au 75<sup>eme</sup> percentile si existence d'une néphropathie sans protéinurie
- TA inférieure au 50<sup>eme</sup> percentile si existence d'une néphropathie avec protéinurie

### ▪ **Traitement non pharmacologique :**

Les mesures non pharmacologiques sont indiquées dans tous les cas, mais de manière isolée, sans traitement médicamenteux associé en cas de pré-HTA (90<sup>ème</sup> percentile < TA < 95<sup>ème</sup> percentile), et en adjonction à tout traitement pharmacologique.

Les conseils hygiéno-diététiques habituels concernent d'abord la correction et la prévention de toute surcharge pondérale, puis la modération des apports sodés. L'efficacité de la réduction de l'obésité a été démontrée non seulement sur l'HTA mais aussi sur la sensibilité au sel et sur la diminution d'autres facteurs de risque vasculaire tels que les dyslipidémies ou l'hyperinsulinisme (52).

L'évolution vers une HTA confirmée peut faire envisager la prescription de médicaments antihypertenseurs à doses progressives (46,47,49).

### ▪ **Traitement pharmacologique :**

Selon le 4<sup>ème</sup> rapport du National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Children and Adolescents (47), il est recommandé de débiter un traitement pharmacologique hypotenseur en cas de :

- HTA > 99<sup>ème</sup> percentile plus 5 mmHg,
- HTA symptomatique,
- HTA secondaire,
- Altération d'un organe cible,
- Diabète,
- HTA persistante (> 95<sup>ème</sup> percentile) malgré la bonne application des mesures non pharmacologiques.

#### ○ **But du traitement :**

Chez un enfant ayant une HTA essentielle non compliquée, sans retentissement sur les organes cibles, le but du traitement est d'atteindre une TA < 95<sup>ème</sup> percentile, alors que chez les enfants ayant une HTA secondaire, un diabète, ou un retentissement organique, l'objectif est d'atteindre une PA < 90<sup>ème</sup> percentile (47).

Le traitement pharmacologique, lorsqu'il est indiqué, devrait être initié avec un seul médicament. Il convient de débiter à la dose recommandée la plus faible. La posologie peut ensuite être augmentée jusqu'à ce que les objectifs tensionnels soient atteints. Une fois la

dose maximale atteinte, ou si l'enfant ne tolère pas le traitement, un autre antihypertenseur d'une autre classe devra être testé.

Les hypertensions sévères et symptomatiques doivent être traitées avec un antihypertenseur par voie intraveineuse (47).

#### ○ Choix du traitement :

Le traitement pharmacologique de l'hypertension artérielle chez l'enfant a été (et est encore) caractérisé par un nombre restreint d'études sur l'usage des médicaments antihypertenseurs dans cette classe d'âge (53). Une étude américaine utilisant la base de données Medstat MarketScan, qui enregistre l'ensemble des données fournies par les assurances de santé américaines a montré que sur une durée de 1 an, 50% des prescriptions d'antihypertenseurs en pédiatrie étaient hors-AMM (54). En plus de leur utilisation off-label, de nombreux médicaments antihypertenseurs ne disposent pas de preuves d'efficacité chez les enfants (55). Une récente revue de bibliographie Cochrane a identifié 21 essais de médicaments antihypertenseurs en pédiatrie, dont cinq seulement ont comparé les antihypertenseurs avec un placebo (56). Cette étude a mis en évidence le manque de preuves de l'efficacité de nombreux médicaments antihypertenseurs couramment utilisés chez les enfants. Elle a aussi montré que tous les traitements antihypertenseurs étaient équivalents et semblaient sûrs, du moins à court terme.

Il n'y a donc pas de consensus sur le choix du traitement initial de l'HTA en pédiatrie, les essais comparatifs faisant défaut (57). Une enquête de 2005 auprès de néphro-pédiatres américains a indiqué que 47% d'entre eux estimaient les inhibiteurs de l'enzyme de conversion comme une thérapie de choix en première ligne, 37% ont choisi les inhibiteurs calciques, 15 % ont choisi les diurétiques, et 7% les bêtabloquants (58). Une revue de 27 études pédiatriques signale des réductions de TA comparables avec les inhibiteurs de l'enzyme de conversion (10,7 / 8,1 mmHg), les antagonistes du récepteur de l'angiotensine II (10,5 / 6,9 mmHg) et les antagonistes calciques (9,3 / 7,2mmHg) (59).

Les classes d'agents antihypertenseurs utilisables en pédiatrie sont, selon les recommandations européennes et américaines : les inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IEC), les antagonistes du récepteur de l'angiotensine II (ARA II), les inhibiteurs calciques, les bêtabloquants et les diurétiques (46,47).

## **5.2. Les inhibiteurs calciques en pédiatrie**

### **○ Généralités :**

Les inhibiteurs calciques représentent une classe thérapeutique hétérogène tant au plan chimique que pharmacologique.

On distingue classiquement 3 familles chimiques :

- Les dihydropyridines (de 1<sup>ère</sup> et 2<sup>ème</sup> génération)
- Les phenylalkylamines (vérapamil)
- Les benzothiazépines (diltiazem)

De part leur action pharmacologique, ils peuvent être répartis en deux grands groupes : les médicaments à effets sélectifs vasculaires prédominants (dihydropyridines) et les médicaments ayant des effets vasculaires et cardiaques (vérapamil et diltiazem). Ils sont donc indiqués dans des pathologies diverses telle que le traitement de l'angor, de l'hypertension artérielle ou de certaines arythmies.

### **○ Propriétés pharmacologiques :**

Ils ont en commun la propriété de bloquer les canaux calciques voltage-dépendants de type L, prédominant au niveau cardiaque et des fibres lisses par opposition aux canaux de type N présents sur les neurones et les canaux de type T présents au niveau des glandes sécrétrices. Ces canaux contrôlent le gradient électrochimique existant du fait de la différence de concentration en calcium extracellulaire, 10 000 fois plus élevée que dans le milieu intracellulaire (60). Ainsi, sous l'effet d'une dépolarisation membranaire créée par la libération d'acétylcholine par la synapse au niveau d'une jonction neuromusculaire, les canaux passent de l'état fermé à ouvert. L'ouverture de ces canaux calciques de type L conduit à une libération intracellulaire de calcium qui conduit à la contraction des cellules musculaires lisses et cardiaques, en se fixant à la troponine (cardiomyocytes) ou à la calmoduline (cellules musculaires lisses). Ces interactions permettent notamment l'interaction actine-myosine à l'origine de la contraction (60).

Ainsi, quand les inhibiteurs calciques se fixent sur ces canaux de type L, ils limitent la libération de calcium et limitent donc la contraction musculaire (figure 1).

Les dihydropyridines ont une grande affinité pour les canaux inactivés, particulièrement présents sur les cellules musculaires lisses du fait de leur dépolarisation prolongée. Ainsi, ils diminuent nettement la tension artérielle, sans trop modifier la

conduction intracardiaque ou l'inotropisme; on les choisit donc pour traiter l'hypertension artérielle.

Inversement, les benzothiazépines et phenylalkylamines agissent sur les récepteurs activés, particulièrement présents sur le myocarde et ses tissus de conduction. Ils ralentissent la conduction auriculo-ventriculaire, ont un effet inotrope négatif marqué, mais ne modifient que peu la tension artérielle; ce sont eux qu'on utilise pour le traitement de certains troubles du rythme et des cardiopathies hypertrophiques.

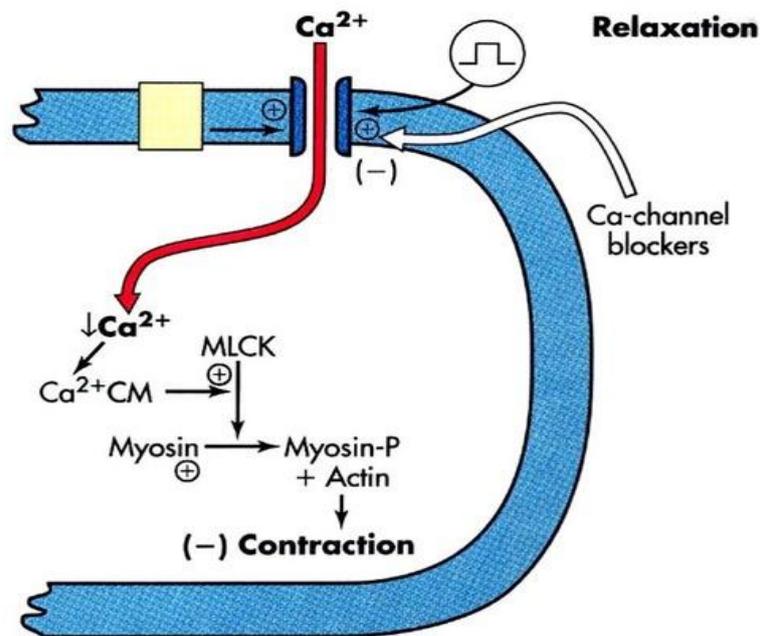


Figure 1 : Mécanisme d'action des inhibiteurs calciques

o Place dans l'HTA pédiatrique :

Les inhibiteurs calciques sont les agents les plus prescrits avec les IEC pour le traitement de l'HTA en pédiatrie (55).

Malgré la rareté des données pédiatriques spécifiques concernant la sécurité et l'efficacité de ces médicaments chez les enfants, les inhibiteurs calciques ont supplanté les agents plus anciens tels que les diurétiques et les bêta-bloquants comme traitement de première intention de l'hypertension pédiatrique, non seulement dans la pratique clinique, mais aussi dans les recommandations publiées concernant le traitement de l'hypertension chez les enfants (47,60).

Cette classe de médicaments semble efficace et bien tolérée chez l'enfant et a relativement peu de contre-indications absolues, en faisant des agents de première ligne pour le traitement de l'hypertension en phase aiguë. Ils peuvent être utilisés pour le traitement de l'hypertension dans de nombreux contextes cliniques différents (60). Ils constituent une bonne option chez les patients souffrant de diabète ou de syndrome métabolique, car ils améliorent la sensibilité à l'insuline (61). Contrairement aux IEC et aux ARA II, les dihydropyridines ne démontrent pas d'effets anti-protéinurique chez les adultes (62), mais d'autres études ont montré des effets néphroprotecteurs chez les patients transplantés rénaux (63). Ils entraînent une augmentation du débit plasmatique rénal, et une diminution des résistances vasculaires rénales (64). Ces médicaments sont aussi préférés chez les patients atteints d'insuffisance rénale, de part leur métabolisme hépatique (64).

○ **Effets indésirables :**

Cette classe d'antihypertenseurs a peu de contre-indications et est bien tolérée chez les enfants (60,65) ce qui en fait des molécules de choix pour initier un traitement (55). Les effets indésirables des inhibiteurs calciques sont généralement mineurs et comprennent l'œdème périphérique et les céphalées. Ceux-ci sont dues à la vasodilatation périphérique provoquée par ces agents (56,60). Des étourdissements, des bouffées de chaleur, des nausées, des maux de tête, des hyperplasies gingivales et des hypotensions orthostatiques ont également été rapportés (61,62). Les situations d'hypotension restent rares avec l'utilisation de doses de départ standard (55). Des cas de vasodilatation cérébrale ont été observés ce qui les contraint à une utilisation prudente chez les enfants souffrant de pathologies intracrâniennes (61).

○ **Les molécules :**

Outre la nifédipine dont les caractéristiques seront détaillées plus loin, les autres inhibiteurs calciques disponibles en pédiatrie sont l'amlodipine, la nifédipine, la féléodipine, et l'isradipine.

- L'amlodipine a été largement appliquée au traitement de l'HTA chez les enfants (60) et a montré son efficacité dans des essais cliniques pédiatriques (66). L'amlodipine peut être administrée une fois par jour en raison de sa longue demi-vie de 36 à 45 heures, et son état d'équilibre est atteint souvent après 5 à 6 jours de traitement (66). Cette propriété est intéressante en vue d'obtenir une bonne adhérence lors d'un traitement chronique, mais

elle ne permet pas l'utilisation de l'amlodipine en 1<sup>ère</sup> intention lorsque l'étiologie n'est pas encore connue ou dans le traitement de l'hypertension en phase aiguë.

- La nifédipine de courte durée d'action a été largement recommandée pour la gestion de l'HTA aiguë en pédiatrie (67). Cependant, son utilisation est contre-indiquée chez les adultes souffrant d'HTA aiguë en raison du risque d'une réduction soudaine et sévère de la TA pouvant conduire à des événements ischémiques (68). Les données de la littérature pédiatrique sur cette molécule restent controversées. Bien que son efficacité ait été soutenue dans de nombreux cas, les rapports d'événements indésirables après son utilisation chez les enfants existent (67,68). Pour ces raisons, certains experts limitent son utilisation. Des comprimés de nifédipine à libération prolongé sont disponibles mais ils ne peuvent pas être écrasés ou mâchés, ce qui rend leur utilisation difficile en pédiatrie et notamment chez les enfants de moins de 6 ans (55). Une solution buvable de nifédipine sous autorisation temporaire d'utilisation (ATU à délivrance nominative) est disponible.

- L'isradipine doit être administrée 3 à 4 fois par jour et il y a peu d'expérience de son utilisation chez les enfants (55).

- Des données limitées existent sur l'utilisation de la féلودipine chez les enfants (69). De plus, comme avec les comprimés à libération modifiée de nifédipine, le comprimé de féلودipine doit être avalé en entier.

### ***5.3. Autres classes d'antihypertenseurs en pédiatrie***

#### ***○ Les inhibiteurs de l'enzyme de conversion :***

Les IEC empêchent la conversion de l'angiotensine I en angiotensine II en inhibant l'action de l'enzyme de conversion de l'angiotensine. Cette inhibition se traduit par une vasodilatation, une diminution de la production d'aldostérone et donc une augmentation de l'excrétion sodée, ce qui réduit finalement la TA. En outre, l'utilisation d'IEC provoque une diminution du métabolisme de la bradykinine. L'accumulation de cette substance vasoactive chez les patients prenant des IEC semble contribuer à leurs effets bénéfiques sur le remodelage cardiaque.

Le blocage de l'enzyme de conversion réduit le risque de néphropathies en abaissant la pression intraglomérulaire, diminuant ainsi la pression de filtration, la protéinurie et la détérioration de la fonction rénale. Il a été montré que les inhibiteurs de l'enzyme de conversion réduisent le débit de filtration glomérulaire chez les patients adultes atteints de néphropathie non diabétique, et cet effet bénéfique est extrapolé à l'enfant (70). Des études

ont montré une amélioration du profil lipidique et une diminution de l'insulino-résistance chez les enfants obèses avec un syndrome métabolique recevant des IEC (55).

De nombreux IEC ont été cliniquement testés chez les enfants et sont révélés sûrs et efficaces (70). Ils représentent une des classes thérapeutiques les plus fréquemment utilisées en première intention en pédiatrie notamment chez les patients présentant une HTA par excès de rénine, situation commune chez les enfants présentant une atteinte du parenchyme rénal (65). Leurs effets anti-protéinuriques sont particulièrement bénéfiques chez les enfants atteints d'un syndrome néphrotique ou d'une maladie rénale chronique (62). Les effets secondaires des IEC chez les enfants ne diffèrent pas de ceux observés chez les adultes. L'accumulation de bradykinine serait responsable d'une toux, mais cet effet semble plus fréquent chez les adultes que chez les enfants (65). Ils peuvent précipiter une insuffisance rénale aiguë chez les patients présentant une sténose bilatérale des artères rénales. Ils sont connus pour provoquer une hyperkaliémie par leur inhibition de la production d'aldostérone, et peuvent également diminuer le taux de filtration glomérulaire.

Bien qu'ils soient un choix de première ligne dans le traitement de l'HTA pédiatrique, leur utilisation nécessite un contrôle étroit et régulier de la créatinine et des électrolytes (61). Dans le cadre d'une initiation de traitement sans étiologie retrouvée, leur utilisation peut perturber l'évaluation de l'axe rénine angiotensine et est à risque chez les enfants déshydratés (55).

#### ○ Les inhibiteurs des récepteurs de l'angiotensine II :

Les ARA II bloquent directement et de façon compétitive l'action de l'angiotensine II sur son récepteur membranaire cellulaire. Ce récepteur se retrouve au niveau du cœur, des reins, des vaisseaux sanguins et des glandes surrénales. L'action de l'angiotensine II décrite précédemment dans la section IEC est donc également inhibée par les ARA II, empêchant ainsi la vasoconstriction et diminuant la résistance vasculaire systémique. Contrairement aux IEC, les ARA II n'affectent pas les niveaux de bradykinine et donc provoquent moins de toux. Ils sont principalement utilisés sur les enfants hypertendus présentant une pathologie rénale chronique lorsque les IEC ne fonctionnent pas efficacement. Ils constituent donc un bon choix thérapeutique pour les patients qui ne tolèrent pas les IEC (47). Les effets bénéfiques sur la protéinurie observés chez les adultes avec l'utilisation des ARA II ont également été observés dans la population pédiatrique (70). Les ARA II sont généralement bien tolérés, et les effets secondaires signalés comprenaient des rhinites, des infections gastro-intestinales, des maux de tête, des vertiges, une vision floue, une fatigue, et des

hyperkaliémies. En outre, leur utilisation chez les patients présentant une sténose bilatérale des artères rénales peut précipiter une insuffisance rénale aiguë. Les ARA II apparaissent donc comme une alternative aux IEC, et à l'instar de cette classe, leur utilisation s'accompagne d'une surveillance étroite des électrolytes et une élimination préalable des contre-indications avant leur utilisation.

#### ○ Les bêta-bloquants :

Les bêta-bloquants ont été les premiers hypotenseurs à être utilisés très largement chez l'enfant (61). Leur efficacité met en jeu plusieurs mécanismes : diminution du débit cardiaque, diminution des résistances vasculaires périphériques, inhibition de la sécrétion de rénine, diminution du volume plasmatique circulant, inhibition du système nerveux sympathique. L'importance de chacun de ces mécanismes varie en fonction des molécules. La cardiosélectivité, l'activité sympathomimétique intrinsèque, l'antagonisme alpha-adrénergique et les caractéristiques de lipophilie/hydrophilie les distinguent. Peu de travaux ont été effectués récemment sur l'utilisation des bêta-bloquants en pédiatrie. Le profil d'effets indésirables de ces molécules chez les enfants est considéré comme plus important que celui des autres antihypertenseurs et ces médicaments sont actuellement le plus souvent utilisés en deuxième ou en troisième intention dans le traitement de l'HTA pédiatrique (47). Les effets secondaires les plus fréquents des bêta-bloquants sont cardiovasculaires (bradycardie, syncope, rétention hydrosodée), neurologiques (ataxie, sensation d'ébriété, fatigue, irritabilité, perturbations visuelles et auditives, cauchemar, dépression), gastro-intestinaux (nausées, diarrhées, constipations, douleurs abdominales), et hématologiques (éosinophilie transitoire, cytopénie). Ils sont contre-indiqués en cas d'insuffisance cardiaque ou de bloc auriculo-ventriculaire, et sont à utiliser avec précaution chez les enfants asthmatiques et diabétiques (55).

#### ○ Les diurétiques :

Les diurétiques augmentent l'élimination urinaire d'électrolytes, notamment de sodium. Tous ont un effet antihypertenseur par diminution des résistances vasculaires périphériques attribuée à une déplétion sodée, consécutive à leur effet diurétique. Les 3 classes de diurétiques utilisés dans le traitement de l'hypertension en pédiatrie comprennent les diurétiques de l'anse, les diurétiques thiazidiques et les diurétiques épargneurs de potassium. Les diurétiques de l'anse, comme le furosémide, inhibent la réabsorption du sodium et du chlore au niveau de la branche ascendante de l'anse de Henlé

(70). Les diurétiques thiazidiques (hydrochlorothiazide) inhibent la réabsorption du sodium dans le tubule rénal distal. La spironolactone, diurétique d'épargne potassique le plus couramment utilisé, est un antagoniste du récepteur de l'aldostérone non sélectif. Son effet dans le tubule contourné distal du rein empêche la régulation positive du canal sodique, entraînant la diurèse (70). Peu d'essais cliniques contrôlés existent quant à leur utilisation en pédiatrie. Les diurétiques thiazidiques produisent des élévations de la glycémie et de l'insuline et ils peuvent provoquer des troubles électrolytiques, notamment une hypokaliémie (55). La surveillance des électrolytes est donc recommandée lors de leur utilisation. Le plus souvent, les diurétiques sont utilisés en association à d'autres traitements (62) ou en 2<sup>ème</sup> intention lorsque les cibles tensionnelles n'ont pas été atteintes notamment chez les adolescents et les enfants atteints d'insuffisance rénale en état d'hypervolémie (55). Des hypokaliémies, hypotensions, anorexies, nausées, vomissements, une élévation des niveaux d'acide urique, et des pancréatites ont été rapportés.

○ **Les combinaisons médicamenteuses :**

Contrairement à l'adulte, les combinaisons médicamenteuses dans le traitement de l'HTA sont rarement utilisées chez l'enfant (46). Ceci provient du fait que l'HTA est plus rarement essentielle, surtout chez le jeune enfant, et répond donc à un phénomène physiopathologique plus précis que chez l'adulte. Quand l'hypertension est réfractaire aux monothérapies de première ligne, des combinaisons peuvent être envisagées en associant par exemple un IEC et un diurétique. Néanmoins peu de données sont disponibles sur l'utilisation de combinaison d'antihypertenseurs en pédiatrie, notamment concernant les doses à l'exception de la combinaison hydrochlorothiazide / bisoprolol (47).

#### **5.4. Cas particulier de l'urgence hypertensive**

Le traitement de l'HTA sévère doit se faire en milieu hospitalier et nécessite le plus souvent un traitement par voie intraveineuse permettant une baisse rapide mais graduelle de la TA, en visant une diminution de 25 % de la TA au cours des 8 premières heures et sa normalisation en 48 heures (47).

La manifestation la plus redoutable de l'HTA sévère est la survenue d'une HTA maligne avec une encéphalopathie hypertensive, des crises convulsives et/ou un déficit neurologique et éventuellement une insuffisance rénale. Les formes moins sévères qui s'accompagnent de céphalées, vomissements, acouphènes peuvent être traitées *per os*.

Devant une HTA maligne avec atteinte d'organe, le but du traitement est de diminuer rapidement les chiffres tensionnels. En cas d'HTA sévère sans atteinte d'organe, l'objectif est de préserver la fonction des organes cibles tout en évitant les complications liées à une baisse trop brutale de la pression sanguine que sont la myélite ischémique aiguë transverse, l'ischémie du nerf optique, l'hypovascularisation rénale et l'ischémie cérébrale. Les urgences hypertensives doivent être traitées avec un agent qui possède à la fois une action rapide afin de limiter les lésions des organes cibles et une demi-vie courte permettant de contrôler la diminution de la pression artérielle.

Par voie intraveineuse, la nicardipine est un excellent traitement de l'hypertension sévère et est considérée comme la première ligne de traitement chez les enfants souffrant d'hypertension (47). Efficace, rapidement préparée et titrée, elle peut être administrée par perfusion intraveineuse (IV), son utilisation comporte peu de risques (71). Son délai d'action n'est que de quelques minutes, sa demi-vie de 10 à 15 min. Treluyer et al. ont rapporté en 1993 la première utilisation de la nicardipine par voie IV chez 14 enfants hypertendus incluant 7 nouveau-nés à terme. Ils ont reçu une posologie de 1 µg/kg/min qui a parfois été augmentée jusqu'à 2 ou 3 µg/kg/min. La baisse de pression artérielle était significative dès la première heure. Aucun effet secondaire n'a été observé (72).

Parmi les autres traitements, on peut citer le labétalol qui est utilisable dans le traitement de l'HTA sévère. Sa demi-vie plasmatique est de 3 à 5 heures, le rendant plus difficile à titrer que la nicardipine. Il peut aggraver les hyperkaliémies et doit être utilisé avec prudence chez les enfants souffrant d'insuffisance rénale. Il peut être administré sous forme de bolus, ce qui peut être avantageux lorsqu'une perfusion ne peut être préparée rapidement (67). La nifédipine par voie sublinguale n'est plus utilisée en raison de la baisse imprévisible de la TA et une incidence élevée d'événements indésirables (68).

Le nitroprussiate de sodium est un vasodilatateur artériel et veineux toujours efficace. Son effet est immédiat et cesse dès l'arrêt de la perfusion. Néanmoins son utilisation impose une surveillance des gaz du sang pour déceler l'apparition d'une acidose métabolique, et un dosage quotidien du taux des thiocyanates sanguins pour les traitements dépassant 24-48 heures ainsi que chez les insuffisants hépatiques et rénaux (67).

L'hydralazine est un vasodilatateur artériolaire. Bien que ce soit un des plus anciens traitements, il est maintenant le plus souvent remplacé par de nouveaux médicaments qui agissent plus rapidement, plus efficacement et qui sont mieux tolérés. Il peut être néanmoins une alternative aux bolus de labétalol (67).

Une fois la TA stabilisée, un relais par voie orale peut être envisagé.

## 6. Nicardipine

### 6.1. *Propriétés physico-chimiques*

La nicardipine est une base faible de formule brute  $C_{26}H_{29}N_3O_6$  possédant une masse moléculaire de 479,525 g/mol, un point d'ébullition de 136°C, et une constante d'acidité (pKa) de 8,18. Elle se présente sous la forme d'une poudre cristalline jaunâtre. Elle est facilement soluble dans le méthanol, l'éthanol et dans l'acide acétique et peu soluble dans l'eau, l'acétonitrile et dans l'anhydride acétique. Elle possède un coefficient de partage octanol-eau de 3,82. Son nom IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) est le 3-{2-[benzyl(méthyl)amino]éthyl} 5-méthyl 2,6-diméthyl-4-(3-nitrophenyl)-1,4-dihydropyridine-3,5-dicarboxylate (figure 2).

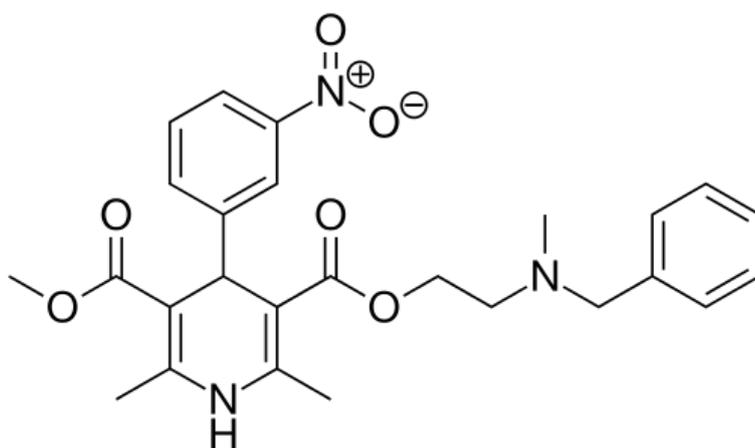


Figure 2 : Structure chimique de la nicardipine

C'est un composé organique appartenant à la classe des dihydropyridines. Leur caractéristique structurelle est le groupement 1,4-dihydropyridine substitué en position 4 par un groupement phényle. L'activité des dihydropyridines nécessite un groupe imine NH libre, sa substitution supprime l'effet au niveau des canaux calciques. Les groupes esters potentialisent l'activité. La présence d'un groupe nitro (NO<sub>2</sub>) ou d'un atome de chlore est indispensable (73). La sélectivité vasculaire des dihydropyridines semble liée à la substitution en position 2, de groupements phényles en position 4 et du type de substituant (74). La nicardipine ne possède pas de monographie dans la Pharmacopée européenne. Elle est plus soluble en milieu acide (75). C'est un principe actif appartenant à la classe II du Biopharmaceutics Classification System (BCS). Ce système de classification permet d'estimer la biodisponibilité *in vivo* des substances actives en se basant sur leur solubilité

dans l'eau et leur perméabilité intestinale (76). Il définit 4 classes de substances actives (figure 3) :

<b>Perméabilité</b> 	<b>Classe II</b> Faible solubilité Haute perméabilité	<b>Classe I</b> Haute solubilité Haute perméabilité
	<b>Classe IV</b> Faible solubilité Faible perméabilité	<b>Classe III</b> Haute solubilité Faible perméabilité
	<b>Solubilité</b> 	

Figure 3 : Représentation du système de classification biopharmaceutique (BCS)

Une substance active est considérée comme ayant une haute solubilité lorsque la dose administrable maximale par libération immédiate est soluble dans 250 ml d'un milieu aqueux avec un pH allant de 1 à 6,8 à  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ . Quand plus de 85% de la dose de substance active initialement administrée est absorbée à travers la barrière intestinale, elle présente une haute perméabilité. La nicardipine présente donc une faible solubilité et une haute perméabilité.

## **6.2. Propriétés pharmacocinétiques**

Après administration par voie orale, la nicardipine est donc rapidement et complètement absorbée. Elle est fortement liée aux protéines plasmatiques (95%) et son volume de distribution est faible. Il existe un effet de premier passage. Sa demi-vie de 2 à 4 heures est dose dépendante. Son action débute entre 30 min et 2 heures après la prise. Elle est métabolisée de façon importante par le cytochrome P450 isoenzyme 3A4. Les principaux métabolites sont éliminés par voie urinaire (60%) et biliaire (35%). Aucun ne paraît participer à l'activité du produit (77). Il a été rapporté que la principale voie de biotransformation des inhibiteurs calciques chez l'homme implique l'oxydation de l'anneau hydropyridinique en pyridine correspondante suivie d'une hydrolyse des groupements esters et une hydroxylation des groupes méthyles (74).

La pharmacocinétique de la nicardipine par voie orale a été étudiée dans 3 groupes d'enfants : des patients porteurs de pathologies cardio-vasculaires recevant 0,33 mg/kg de

nicardipine, des enfants atteints de mucoviscidose recevant la même dose et un troisième groupe d'enfants hypertendus traités par une dose de 1 mg/kg de nicardipine. Les paramètres pharmacocinétiques pédiatriques retrouvés sont : un tmax de 30 à 60 min, un Cmax de 2 à 4 ng/ml, et une demi-vie de 1 à 3 heures (78).

### **6.3. Posologies**

Les posologies initiales pour débiter un traitement par nicardipine en pédiatrie sont comprises entre 0,25 mg/kg et 0,3 mg/kg (49).

Une posologie de 1 mg/kg/prise renouvelée 3 à 4 fois par jour est efficace pour contrôler les poussées hypertensives (79–81).

Les posologies maximales sont de 3 à 4 mg/kg/jour (79–81)

A l'instar de tous les antihypertenseurs en pédiatrie, il conviendra de débiter le traitement avec la dose minimale efficace et d'augmenter la posologie en fonction des chiffres tensionnels (47).

### **6.4. Place de la nicardipine dans l'HTA pédiatrique**

#### **6.4.1. Fabrication de gélules au CHU de Rouen**

Un bilan de la fabrication de gélules de nicardipine au sein de notre CHU a été réalisé sur une durée de 3 ans, de 2013 à 2015, à partir du logiciel Prepa® (figure 4).

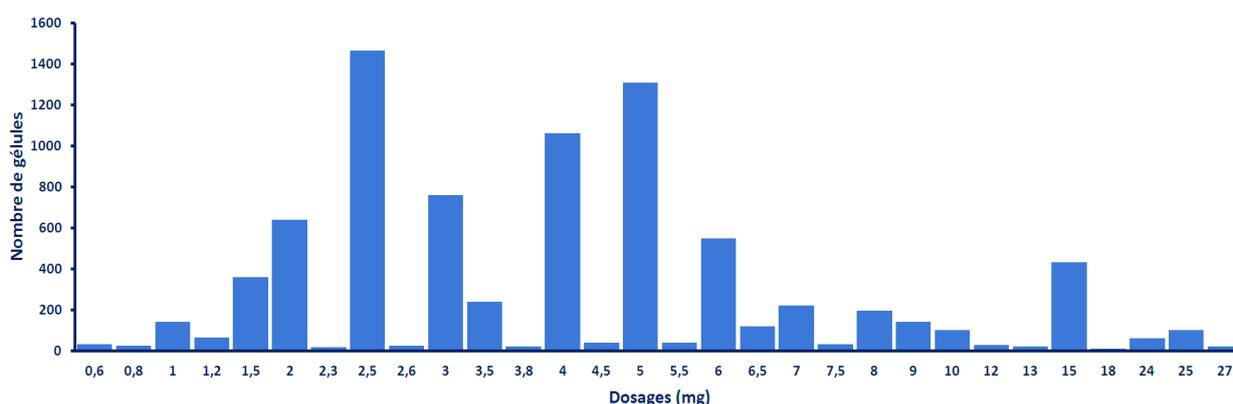


Figure 4 : Nombre de préparations de gélules de nicardipine en fonction du dosage en principe actif

Au total, 8332 gélules ont été réalisées correspondant à la fabrication de 321 séries de gélules différentes. Trente dosages différents ont été réalisés. Soixante-huit enfants ont été traités avec ces gélules de nicardipine fabriquées par la pharmacotechnie. Pour pallier au

changement de posologies, la pharmacie est contrainte de refaire des gélules à des dosages différents pour un même enfant. En moyenne, 4 séries de gélules à différentes posologies ont été réalisées par enfants.

#### 6.4.2. Caractéristiques des enfants traités par nicardipine

Un recueil rétrospectif des situations cliniques et des caractéristiques des enfants traités par les gélules de nicardipine a été réalisé à partir des dossiers patients sur une période de 3 ans.

Soixante huit enfants ont été traités. Le sex-ratio de la population était de 1,5 et la moyenne d'âge de 3,7 ans  $\pm$  3 ans (figure 5).

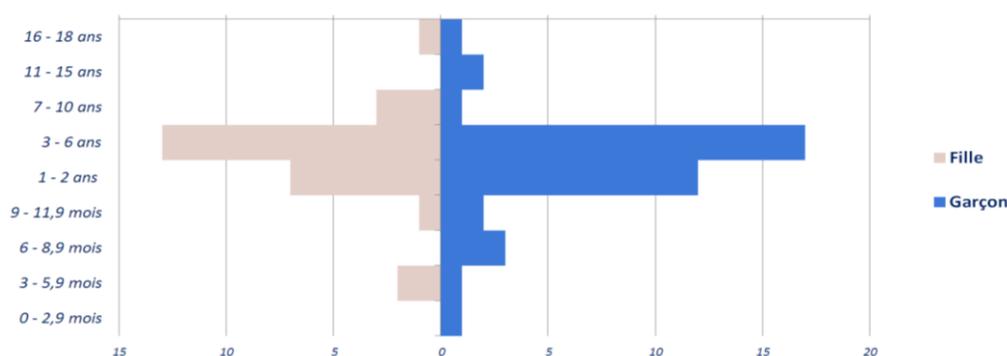


Figure 5 : Pyramide des âges des enfants traités par gélules de nicardipine sur 3 ans

La quasi totalité des enfants présentaient une HTA secondaire, excepté pour 3 enfants dont l'étiologie n'a pas été retrouvée. Dans la majorité des cas, l'origine exacte de l'HTA n'était pas explorée. Elle était imputable soit à la pathologie pour laquelle les enfants étaient hospitalisés, soit aux traitements reçus dans le cadre de cette pathologie, soit l'association de ces deux étiologies.

L'examen des dossiers patients a montré que plus de la moitié des enfants (51,5%) semblaient présenter une HTA d'origine médicamenteuse (ou aggravée par les traitements).

○ 26% des enfants ont reçu des gélules de nicardipine dans le cadre de leur traitement pour des leucémies aiguës. Celles ci étaient prises en charge selon le protocole FRALLE recommandé par la SFCE (Société Française de lutte contre les Cancers et leucémies de l'Enfant et de l'adolescent). Ce protocole a recours à la corticothérapie et privilégie actuellement la prednisone et la dexaméthasone. Ces glucocorticoïdes peuvent être

responsables de multiples effets secondaires dont l'hypertension artérielle. Cette toxicité potentielle est connue notamment au cours de l'induction, destinée à obtenir une rémission complète, où l'utilisation d'une préphase d'une semaine avec administration de 60mg/m<sup>2</sup>/j de prednisone, est devenue un standard.

- 9% des enfants présentaient une HTA néonatale secondaire au traitement par corticoïdes dans le cadre de dysplasie bronchopulmonaire (DBP). C'est une affection pulmonaire chronique fréquemment retrouvée chez les enfants prématurés, pour laquelle l'administration de corticoïdes en IV est recommandée pour prévenir ou traiter ces DBP.

- De la même manière, 9% des enfants présentaient des HTA cortico-induite dans le cadre d'exacerbations d'asthme.

- 7% des enfants étaient hypertendus suite aux cures d'hydrocortisone prescrites pour contrôler les spasmes dans le syndrome de West.

Les autres étiologies retrouvées responsables d'HTA et ayant conduit au traitement par nicardipine sont : syndrome hémolytique et urémique (6%), néphroblastomes (4%), drépanocytose (4%), neuroblastome (4%), syndrome néphrotique (3%), rétinoblastomes (3%), gliomes (3%), insuffisance rénale chronique secondaire à des lithiases rénales bilatérales obstructives (1%), glomérulonéphrite aiguë post-streptococcique (1%), rhabdomyosarcome vésical (1%), syndrome de Guillain Barré (1%), hépatoblastome (1%).

### 6.4.3. Intérêt clinique

L'efficacité de la nicardipine par voie orale lors des poussées hypertensives est bien établie (81). Soixante-cinq accès hypertensifs chez 6 enfants ont été traités par des doses moyennes de 1,2 mg/kg/prise (1 à 1,8 mg/kg/prise) de nicardipine. Les chiffres de pression artérielle systolique et diastolique baissaient dès la 15 minute (6 et 12 %), avec un maximum d'efficacité à la 90 minute (28 et 38 %). L'effet antihypertenseur se prolongeait jusqu'à la 8<sup>ème</sup> heure après la prise. L'utilisation de la nicardipine par voie orale en pédiatrie est recommandée de part sa sécurité et sa facilité d'utilisation (49,55,79). Une place de choix lui est accordée chez les transplantés rénaux où elle aurait un rôle protecteur vis-à-vis des effets vasculaires délétères des anti-calcineurines (79). La nicardipine et les inhibiteurs calciques sont d'ailleurs les médicaments de choix dans l'hypertension pédiatrique post-transplantation (46). En néonatalogie, l'administration d'un traitement antihypertenseur

est indispensable lorsqu'une HTA s'associe à des signes cliniques de mauvaise tolérance. Les baisses brutales de pression artérielle sont alors à proscrire impérativement pour éviter des accidents d'hypoperfusion cérébrale comme cela a déjà été observé avec l'utilisation d'IEC (82). La nicardipine se situe actuellement en première place dans la prise en charge de l'urgence hypertensive en néonatalogie mais aussi dans le traitement de toutes les HTA du prématuré (79).

L'utilisation fréquente de la nicardipine s'explique aussi en raison de la nécessité d'initier rapidement un traitement antihypertenseur chez l'enfant après avoir détecté l'HTA (61). Dans 95 % des cas, l'HTA est secondaire chez l'enfant, contrairement à l'adulte, et il est recommandé d'initier un traitement antihypertenseur dès sa détection (46). Dans les hôpitaux français, les pédiatres impliqués dans la prise en charge de l'HTA s'attachent dès le diagnostic à en rechercher l'étiologie. Les inhibiteurs calciques et la nicardipine constituent un excellent premier choix car leur utilisation ne va pas interférer avec les dosages futurs de rénine et d'aldostérone, des cathécholamines urinaires et dérivés méthoxylés qui restent des bilans étiologiques systématiques à réaliser en cas d'HTA confirmée (55). Bien que les IEC soient également largement préconisés pour le traitement de l'HTA pédiatrique en 1<sup>ère</sup> intention, ils sont contre-indiqués en cas de sténose bilatérale des artères rénales. Leur utilisation impose donc également des examens radiologiques avant de débiter le traitement afin d'exclure cette contre indication. De plus, leur utilisation est associée à un risque d'hyperkaliémie en cas d'insuffisance rénale. La faible demi-vie de la nicardipine permet également un ajustement posologique aisé et adapté à l'effet recherché. A cela s'ajoute son profil de sécurité : elle entraîne peu d'effets indésirables et trouve donc une place de choix lors d'une initiation de traitement. Contrairement à la nifédipine, elle ne modifie pas la contractilité cardiaque (64).

D'autre part, le traitement des urgences hypertensives pédiatriques en milieu hospitalier, se fait en première intention avec la nicardipine par voie IV (67). La perfusion continue de nicardipine offre la possibilité d'une recherche de dose adaptée. Les posologies utilisables varient de 0,3 µg/kg/min à 3 à 4 µg/kg/min. Une fois que la TA est contrôlée et qu'une dose efficace a été déterminée, un relais par voie orale peut être envisagé. Le relais *per os* avec la même molécule est une pratique encouragée assurant aux cliniciens une certaine sécurité, une diminution de temps de perfusion, et une conversion posologique aisée. Les bénéfices d'un relais IV – *per os*, largement décrits avec les antibiotiques, sont également applicables aux antihypertenseurs (83). Cela permet un meilleur confort du patient, une diminution des coûts et une plus grande facilité d'administration. Parmi les autres éléments renforçant

l'intérêt de la nicardipine, on peut citer le rapport d'analyse des préparations hospitalières de l'ANSM, dans lequel les préparations de gélules de nicardipine ont été jugées comme indispensables.

### **6.5. Stabilité de la nicardipine**

Plusieurs types de formes galéniques ont été proposés pour l'administration de la nicardipine (comprimés, gélules, gélules à libération prolongée...) mais aucune forme orale n'est adaptée à l'usage pédiatrique. Il n'existe pas, à notre connaissance, de données de stabilité de la nicardipine préparée en forme orale liquide. La solution injectable (10mg/10ml) est stable 2 ans à température ambiante.

Les antagonistes calciques du groupe des 1,4-dihydropyridines ont comme principale propriété d'être photosensibles. Leur dégradation photochimique semble entraîner une diminution de leur activité thérapeutique (84) et conduit à la formation de produits de dégradation qui n'ont pas d'activité pharmacologique (74,85,86).

Plusieurs études ont évalué le profil de dégradation de la nicardipine. En 1992, Bonferoni et al. (87) ont évalué la photostabilité de la nicardipine lors d'une exposition à la lumière ultra-violet (UV) et à la lumière du jour. Ils ont conclu que la cinétique de photodégradation d'une solution méthanolique de chlorhydrate de nicardipine est un processus de premier ordre. Une étude similaire a été menée par polarographie en 1990 par Squella et Nunez-Vergara (88). En 1998, Rango et Vetuschchi (85) ont montré que sous l'influence de la lumière, ce médicament est décomposé par photo-oxydation de l'anneau de dihydropyridine pour former l'analogue pyridine biologiquement inactif, qui est aussi le principal métabolite du médicament. Baranda et al. (2006) (74) ont étudié l'effet de la lumière sur 11 antagonistes calciques appartenant à la classe des 1,4-dihydropyridines. Les produits de photodécomposition ont été identifiés et quantifiés après dégradation forcée par chromatographie liquide couplée à un spectrophotomètre à barrettes de diodes (LC-UV-DAD) et par chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse en tandem (LC-MS-MS) respectivement. Ils ont montré que la nicardipine était moins photosensible que la nifédipine. Néanmoins, une dégradation de 50% de la nicardipine a été observée après 2 heures d'exposition à la lumière du jour. Pour la nicardipine, qui possède un substituant nitro en position 3, les analogues de la pyridine étaient les principaux produits de dégradation, connus comme étant biologiquement inactifs. Il n'a pas été retrouvé de produits de dégradation appartenant à la classe des nitrosopyridines,

contrairement à la nifédipine, qui présente un groupement nitro en position 2, et pour laquelle ces produits de dégradation seraient responsables d'effets toxiques (74,89).

Pour les auteurs, la protection contre la lumière du jour en gardant les échantillons dans des flacons en verre brun est suffisante pour éviter la photodégradation (74).

Cette étude a aussi montré que les produits de dégradation et les métabolites peuvent avoir la même structure que la molécule mère entraînant des difficultés d'interprétation des résultats analytiques. Ainsi, Baranda et al. recommandent l'utilisation de techniques LC-MS ou LC-MS-MS en MRM (multiple-reaction monitoring) assurant une quantification certaine. Chen et al. en 2008 (84) ont ainsi déterminé 4 principaux produits de dégradation par LC-ESI-MS (ESI : Electrospray Ionization) après exposition sous lampe UV pendant 3 heures et plus récemment, Al-Ghannam et al. (2014) (86) ont aussi utilisé une technique HPLC-MS afin d'identifier les produits de dégradation de la nicardipine.

Outre sa sensibilité à la lumière, la présence de liaisons esters dans la formule structurelle de la nicardipine la rend théoriquement sensible à l'hydrolyse par les acides et les bases (74). En 2010, Gadkari et al. (90) ont montré, en plus d'une photodégradation, une instabilité de la nicardipine en milieu basique et une dégradation oxydative. La nicardipine semble stable en milieu acide. Cela a été confirmé en 2011 par Ubale et al. (91) et en 2014 par Al-Ghannam et al., qui, à l'aide d'une détection HPLC-MS, ont identifié 1 produit issu de la dégradation oxydative et 3 composés suite à la dégradation forcée de la nicardipine en milieu basique. En 2016, Lotfy et al. (92) ont identifié également 3 produits de dégradation par LC-MS après hydrolyse alcaline de la nicardipine. Les liaisons esters de la nicardipine semblent donc plus sensibles en milieu alcalin qu'en milieu acide.

## OBJECTIFS DU TRAVAIL

---

### ○ **Mise au point de la formulation :**

A notre connaissance, il n'existe pas d'étude disponible quant au développement d'une forme orale liquide de nicardipine. Ainsi, dans un premier temps, notre but est de mettre au point une forme galénique liquide de nicardipine destinée à la voie orale. Celle-ci devra être adaptée à la population pédiatrique et compatible avec une préparation en lot et les futurs dosages. En effet, notre objectif est de développer une préparation hospitalière qui autoriserait une fabrication à l'avance et le stockage de quelques unités. Cela permettrait de répondre plus rapidement aux demandes, de dégager du temps supplémentaire pour l'équipe de pharmacotechnie afin de réaliser d'autres activités, et de retirer une contrainte sur les gardes et les astreintes pharmaceutiques dans notre établissement.

### ○ **Mise au point de la méthode de dosage et étude de stabilité :**

Dans un deuxième temps, notre objectif sera de mettre au point une méthode appropriée au dosage de la nicardipine à partir de la formulation développée et compatible avec les équipements disponibles à la pharmacie.

Enfin, notre but est de réaliser une étude de stabilité physicochimique et microbiologique de la formulation. Celle-ci permettra d'apprécier la stabilité de la formulation développée et d'avoir une date limite d'utilisation assurant son stockage et son administration en toute sécurité.

### 1. Formulation galénique et procédé de fabrication

#### 1.1. *Choix de la concentration et du conditionnement*

Le choix de la concentration en principe actif de la préparation à étudier est fonction de l'utilisation thérapeutique de celle-ci.

L'analyse rétrospective des prescriptions de gélules de nifédipine sur 3 années nous a permis d'avoir un aperçu des différents dosages prescrits par les pédiatres de notre établissement (figure 4). Un recensement des modalités d'administration des formes orales liquides dans les services de pédiatrie a également été réalisé afin de déterminer le volume minimal administrable. La quantité de flacon par lot a été préalablement fixée à 10 flacons.

#### 1.2. *Excipients disponibles*

Afin de faciliter l'acceptabilité, le goût ainsi que la mise en solution ou en suspension, plusieurs gammes de véhicules sont aujourd'hui disponibles pour la formulation des préparations buvables. Nous disposons de trois gammes dans notre établissement : Ora-Blend® SF (*Paddock*), Syrspend® SF liquide (*Fagron*), et Inorpha® (*Inresa*) (figure 6).

(SF : Sugar Free)



Figure 6 : Excipients liquides disponibles

Nous avons réalisé une analyse et une comparaison de la composition et des caractéristiques physico-chimiques de ces véhicules.

Une analyse des excipients à effet notoire déclarés par l'ANSM (93) a également été réalisée à partir de la composition des différents véhicules.

Il existe des véhicules à pH acide ou basique, dont le choix s'orientera en fonction des caractéristiques du principe actif à véhiculer. D'autres critères physico-chimiques tels que l'osmolalité et la viscosité ont également été pris en compte pour le choix du véhicule.

### **1.3. Etudes de pré-formulation**

Les BPP recommandent d'utiliser des matières premières plutôt que des spécialités qui contiennent déjà d'autres produits en plus du principe actif d'intérêt (14).

Ainsi pour la fabrication, nous avons utilisé systématiquement de la poudre de nicardipine (*Nicardipine chlorhydrate, 10 g, réf : 5427-10, Inresa Pharma, Bartenheim, France*).

Dans un premier temps, les trois véhicules ont été testés à la concentration de nicardipine préalablement déterminée. Les véhicules étaient ajoutés et mélangés à la poudre afin d'obtenir le mélange le plus homogène possible. La quantité nécessaire de véhicule était ensuite ajoutée.

Les préparations ainsi fabriquées ont ensuite été comparées et le véhicule le plus approprié à la formulation de la nicardipine et à son utilisation en pédiatrie a été retenu.

### **1.4. Formulation**

A l'issue de l'étude de pré-formulation, la formule retenue a été appliquée sur des quantités de nicardipine permettant la fabrication d'un lot de 10 flacons afin d'assurer une préparation future en série.

## **2. Choix de la méthode de dosage de la préparation**

La concentration en nicardipine a été déterminée par chromatographie liquide haute performance (HPLC) couplée à un spectromètre de masse en tandem (HPLC - MS / MS).

La majorité des études de stabilité publiées, utilisent la spectrométrie UV/Visible pour quantifier le principe actif d'intérêt. Le couplage HPLC – MS/MS en tandem est une méthode analytique qui permet les analyses qualitatives et quantitatives de composés présents à l'état de trace et n'est pas destinée initialement aux études de stabilité pharmaceutiques. Néanmoins cette technique présente de nombreux avantages, et apparaît beaucoup plus sensible et spécifique que la spectrométrie UV/Visible. Dans le cas des formes orales liquide, la détection par spectrométrie de masse permet de quantifier le principe actif tout en s'affranchissant des contraintes analytiques liées à la constitution d'un mélange complexe que représentent ces formes galéniques. Il existe d'ailleurs de plus en plus de publications sur des études de stabilités de formes orales liquides utilisant la spectrométrie de masse comme mode de détection (94–96). D'autre part, comme vu précédemment, la spécificité de ce type de détecteur constitue un avantage au vu du profil de dégradation de la nicardipine. En outre, la pharmacie du CHU de Rouen, a fait l'acquisition en 2013 d'un spectromètre de masse en tandem. L'utilisation de cet appareil est mutualisée avec le laboratoire de pharmacocinétique et des projets communs antérieurs ont déjà été développés entre ce service et la pharmacie.

### ***2.1. La chromatographie liquide haute performance***

La chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) est une technique de séparation analytique de composés permettant de conduire à leur identification et/ou leur quantification. L'échantillon à analyser est introduit par un système d'injection sur une colonne analytique remplie d'une phase stationnaire parcourue de façon permanente par un liquide appelé phase mobile qui est amené par une pompe fonctionnant en continue (figure 7).

La phase mobile est souvent composée d'un mélange de plusieurs solvants (méthanol, acétonitrile,...) et de sels (tampons, réactif ionique...).

La phase stationnaire peut être constituée de silice, polaire (phase normale) ou de silice greffée par des chaînes linéaires de huit ou dix-huit atomes de carbones (C8 et C18). Cette dernière phase est apolaire (phase inverse) et nécessite un solvant polaire (acétonitrile, méthanol) pour éluer les composés retenus sur celle-ci.

Au cours de l'analyse, la composition de la phase mobile peut rester la même, c'est le mode "isocratique" ou la proportion de chaque solvant peut être modifiée dans le temps, c'est le mode "gradient de solvant".

Selon le choix de la phase stationnaire et la composition de la phase mobile, les composés du mélange à analyser sont plus ou moins retenus sur la phase stationnaire et sont élués de la colonne les uns après les autres de façon séparée.

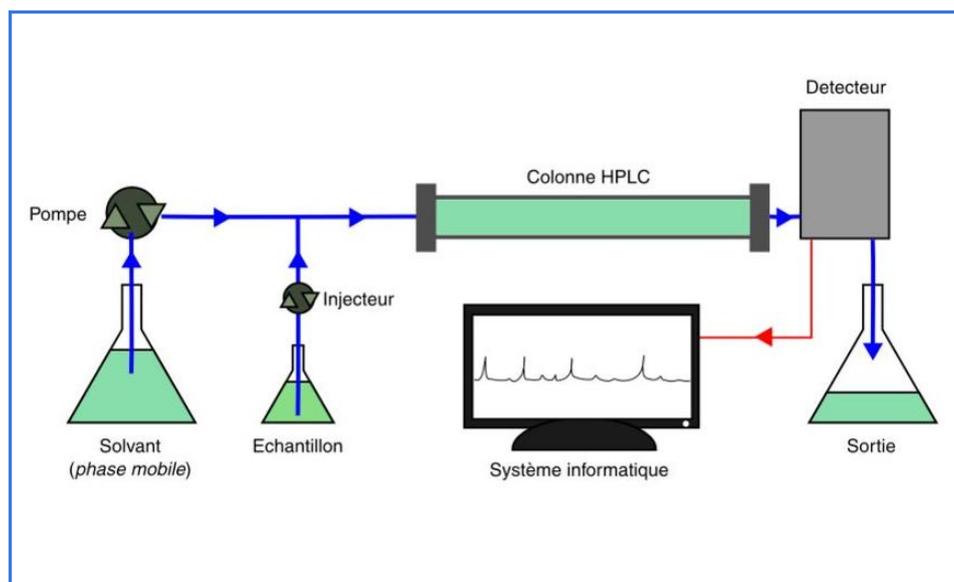


Figure 7 : Schéma d'une chaîne HPLC

Un détecteur, choisi en fonction des composés à analyser, est placé à la sortie de la colonne et est couplé à un ordinateur qui pilote l'ensemble et recueille les informations. Le détecteur conduit à l'obtention d'un tracé appelé chromatogramme (figure 8) constitué d'une ligne de base, générée par l'enregistrement continu du signal de la détection de la phase mobile et d'un ou plusieurs pics chromatographiques obtenus au passage de chaque composé retenu puis élué et enfin détecté.

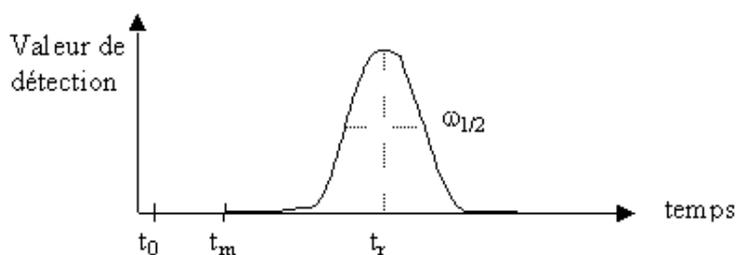


Figure 8 : Chromatogramme

Dans des conditions chromatographiques données, le "temps de rétention" ( $t_r$ ), temps au bout duquel un composé est élué de la colonne et détecté, caractérise qualitativement une substance. L'aire des pics permet de mesurer la concentration de chaque composé constitutif du mélange injecté.

Une bonne séparation chromatographique doit conduire à l'obtention d'un chromatogramme constitué de pics bien distincts (bonne résolution) et parfaitement reproductibles d'une injection à l'autre.

## 2.2. La spectrométrie de masse en tandem

La spectrométrie de masse est une technique analytique permettant d'identifier et de quantifier des composés grâce à leur masse moléculaire. Le principe nécessite de transformer les molécules dans leur état naturel en ions à l'état gazeux et permet d'obtenir leur masse moléculaire en analysant leur rapport de masse/charge, noté  $m/z$ .

Un spectromètre de masse est constitué des parties suivantes : (figure 9)

- une source d'ions dans laquelle se produit le passage en phase gazeuse de l'échantillon à analyser, ainsi que l'ionisation des molécules,
- un analyseur (quadripôle) qui permet de trier les ions en fonction de leur rapport  $m/z$ ,
- un détecteur qui compte les ions en leur associant leur rapport  $m/z$ ,
- un système d'enregistrement pour le traitement du signal et la visualisation des spectres.

La spectrométrie de masse en tandem combine deux analyseurs (quadripôles). Les ions formés dans la source entrent dans le premier analyseur (q1) de type quadripôle. Parmi ces ions, seuls les ions précurseurs ayant le rapport  $m/z$  sélectionné pourront sortir de Q1. Ils entrent alors dans une cellule de collision (q2) où ils sont fragmentés en ions fils grâce à un gaz (azote dans notre cas). Les ions fils générés sont alors étudiés dans le second analyseur (q3) en fonction de leur rapport  $m/z$ .

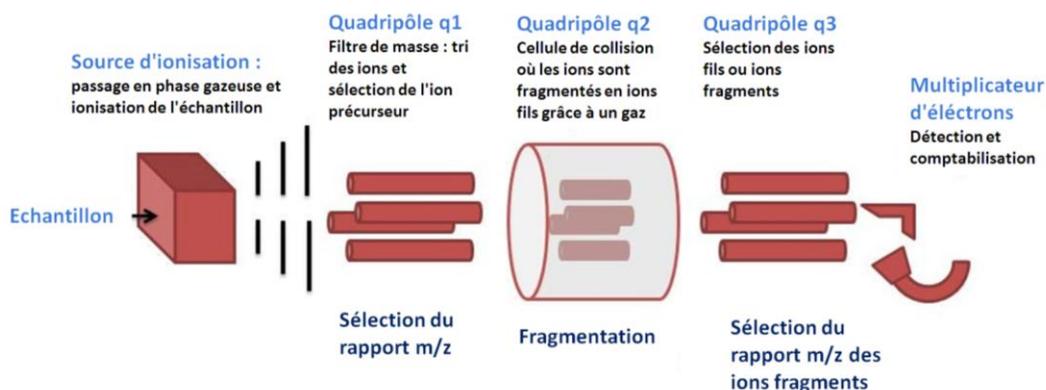


Figure 9 : Schéma du principe d'un spectromètre de masse en tandem

Selon le mode de fonctionnement choisi, on pourra obtenir un spectre de masse/masse qui apportera des informations qualitatives et structurales sur le composé précurseur ou des informations quantitatives en suivant une filiation précise ion précurseur/ion fils. La spectrométrie de masse en tandem apporte ainsi une sélectivité et une sensibilité améliorées relativement à la spectrométrie de masse. Ce triple quadripôle peut s'utiliser dans différents modes d'acquisition dont le mode Multiple Reaction Monitoring (MRM), qui est le plus adapté à la quantification. Dans ce mode de balayage, les ions parents sont sélectionnés spécifiquement en Q1, de même que les ions fils produits en Q2 sont sélectionnés spécifiquement en Q3. La relation entre un ion parent et un ion produit ( $m/z$  ion parent et  $m/z$  ion fils) est appelée "transition MRM" (figure 10). Ce mode d'acquisition est hautement spécifique car il élimine par deux fois tous les ions autres que ceux d'intérêts.

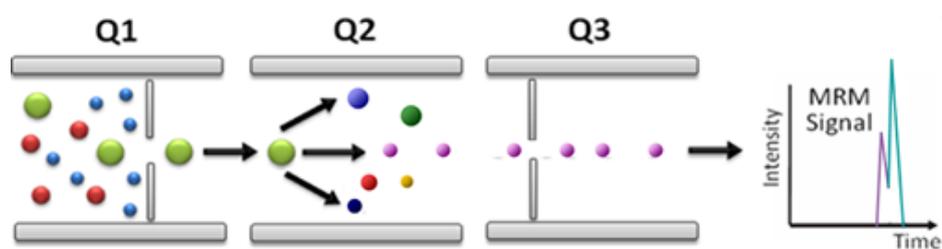


Figure 10 : Représentation d'un mode de balayage MRM

### **2.3. Etalonnage interne**

Il est généralement difficile d'effectuer une détermination quantitative en utilisant uniquement la réponse absolue du détecteur. En effet, lorsque la détection se fait par spectrométrie de masse, un grand nombre de facteurs peuvent influencer la réponse du détecteur : propreté de la cellule de collision, de la source d'ions, variations de pression dans la cellule de collision, de débit, etc... Il est difficile de contrôler l'ensemble de ces facteurs et, en conséquence, la réponse du détecteur est sujette à des variations importantes de jour en jour et elle n'est pas parfaitement proportionnelle à la concentration de l'analyte cible, sur la gamme de concentration choisie (97). En conséquence, l'utilisation d'un étalon interne est généralement nécessaire afin d'obtenir des résultats quantitatifs fiables et précis. Cette méthode consiste à ajouter un composé différent de l'analyte en quantité connue dans l'échantillon. L'étalon doit avoir des caractéristiques physico-chimiques (masse, hydrophobicité, pKa...) très proches de l'analyte recherché afin de corriger un maximum de sources de variations. En spectrométrie de masse, le meilleur

étalon interne est l'analyte marqué par des isotopes stables. En effet, puisque la séquence de l'étalon et de l'analyte sont les mêmes, l'étalon subira les mêmes pertes éventuelles lors de la préparation d'échantillon et sera élué en même temps que l'analyte. En revanche, l'incorporation d'isotopes stables s'accompagne d'une augmentation de la masse de l'étalon par rapport à celle de l'analyte. Les deux pourront donc être aisément distingués par le détecteur. En travaillant avec le rapport des deux signaux (analyte et étalon interne), il est alors possible de s'affranchir des variations et d'obtenir un résultat précis et stable dans le temps. Pour notre étude, l'étalon interne choisi est la nicardipine-D3, qui est l'analogue deutéré de la nicardipine (figure 11).

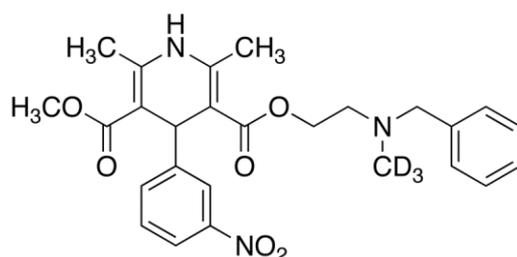


Figure 11 : Structure de la nicardipine-D3 utilisée comme étalon interne

#### **2.4. Instrumentation et conditions chromatographiques**

Le système chromatographique est composé d'une chaîne HPLC Shimadzu comprenant un sélecteur de solvant, un dégazeur, une pompe binaire haute pression, un passeur d'échantillons réfrigéré, un four multi-colonnes thermostaté et un ensemble de vannes de commutation de colonnes.

La phase stationnaire utilisée est de type C18 (apolaire). Il s'agit d'une colonne Alltima HP C18 HL 3 $\mu$ m 150 x 3 mm (Grace Discovery Sciences) thermostatée à 40°C. La phase mobile est un mélange de 70v d'acétonitrile et 30v de Formiate d'ammonium 2mM à 0,2% d'acide formique. Le pompage est en mode isocratique au débit de 0,4 ml/min.

La majorité des méthodes HPLC utilisent des tampons comme phase mobile pour la séparation des analytes. Quand le système de chromatographie liquide est couplé à un détecteur de masse, toute phase mobile contenant un sel non-volatil est à proscrire. De tels sels s'accumulent dans la source d'ionisation, entraînant ainsi rapidement des problèmes lors de l'ionisation. Une phase mobile contenant un acide organique très volatil, comme l'acide formique utilisé ici, demeure une solution idéale pour fournir une source de protons et ainsi ioniser des composés en mode positif sous la forme [M+H]<sup>+</sup> (98).

L'ajustement du pH de la phase mobile est nécessaire pour obtenir une résolution optimale en HPLC. Mais cet ajustement peut affecter de manière significative la sensibilité en spectrométrie de masse. Pour la majorité des techniques HPLC standard, les analytes sont plus fortement retenus quand ils sont sous forme non ionisés. Mais dans le cas de la spectrométrie de masse, la stratégie est différente : les composés, séparés selon leur rapport  $m/z$ , doivent être sous forme ionisée pour être détectés. Quand la phase mobile permet d'introduire les analytes déjà sous forme ionisée, la sensibilité de la détection est beaucoup plus élevée (98). Par exemple, les bases, comme la nicardipine, existent sous forme protonée à  $pH = pK_a - 2$ , alors que les analytes acides, comme les acides carboxyliques existent sous forme déprotonée à  $pH = pK_a + 2$ . En conséquence, les bases subissent une protonation à pH faible, tandis que les analytes acides sont déprotonés à pH élevé. Dans notre cas, le pH de la phase mobile est voisin de 3,2. La nicardipine est donc sous forme ionisée.

Les conditions chromatographiques retenues sont les mêmes que celles appliquées au dosage de l'acide mycophénolique dans le laboratoire de pharmacocinétique. Cette configuration nous a permis un enchaînement des analyses sans perturber l'activité de routine du laboratoire.

Le détecteur est un spectromètre de masse 3200 QTRAP (Sciex), un triple quadripôle équipé d'une trappe d'ion linéaire. Il s'agit d'un appareil de type hybride associant les potentialités d'un triple quadripôle en terme de quantification à l'efficacité d'un piège à ions linéaire pour la recherche et l'identification de composés présents dans un mélange complexe. Il permet, par mesure de la masse moléculaire, de détecter, d'identifier et de quantifier les molécules d'intérêt qui auront été préalablement séparées sur le système chromatographique. Il est équipé d'une source ESI (Electrospray Ionization). Il s'agit d'une source d'ionisation douce opérant à pression atmosphérique permettant de produire en mode d'ionisation positif, des ions moléculaires chargés en phase gazeuse du type  $[M+H]^+$  (figure 12).

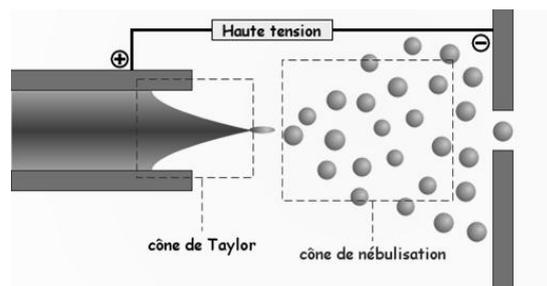


Figure 12 : Procédé d'ionisation par électrospray

Les médicaments qui ont des groupes fonctionnels basiques (par exemple, des amines) sont ionisés en mode positif, tandis que ceux contenant des groupes fonctionnels acides, comme des acides carboxyliques s'ionisent en mode négatif. Les inhibiteurs calciques s'ionisent en mode positif (98).

Les ions précurseurs  $[M+H]^+$  ainsi formés sont ensuite transférés vers le premier quadripôle (Q1), réglé pour ne laisser passer que ces ions. Puis ils atteignent le deuxième quadripôle où de l'azote ultra pur est introduit. Il s'agit d'une cellule de collision : les ions précurseurs se fragmentent en ions fragments caractéristiques de la molécule à analyser (spectre de fragmentation unique pour chaque molécule). Ces ions fragments sont expulsés vers le dernier quadripôle (Q3), où ils sont filtrés pour atteindre le détecteur : un multiplicateur d'électrons. De cette manière, les ions séparés selon leur rapport masse/charge viennent percuter le détecteur ou cellule CEM (Channel Electron Multiplier) afin d'être détectés et comptabilisés. Ce principe de fonctionnement est appelé mode MRM (Multiple Reaction Monitoring). C'est le mode le plus adapté à la quantification.

Le tout est piloté par le logiciel Analyst®.

Le système utilisé est représenté dans la figure 13.



Figure 13 : Système chromatographique du laboratoire de Pharmacocinétique du CHU de Rouen

Les transitions MRM de quantification (ion précurseur > ion fragment) ont été déterminées en mode infusion pour la nicardipine et son analogue deutéré. L'infusion dans le

spectromètre de masse a permis d'optimiser leur détection et de définir les transitions à inclure dans la méthode. Les paramètres concernés sont :

- la tension d'orifice (DP : Declustering Potential),
- le potentiel d'entrée (EP : Entrance Potential),
- le potentiel d'entrée de la cellule de collision (CEP : Cell Entrance Potential),
- l'énergie de collision (CE : Collision Energy),
- et le potentiel de sortie de la cellule de collision (CXP : Cell Exit Potential).

Deux transitions par molécule ont ainsi été déterminées. La transition MRM la plus abondante est choisie comme transition de quantification et une deuxième transition est choisie en tant que transition de confirmation.

Les conditions optimales retenues sont présentées dans les tableaux 1 et 2.

Tableau 1 : Transitions MRM de la nicardipine et de la nicardipine-D3

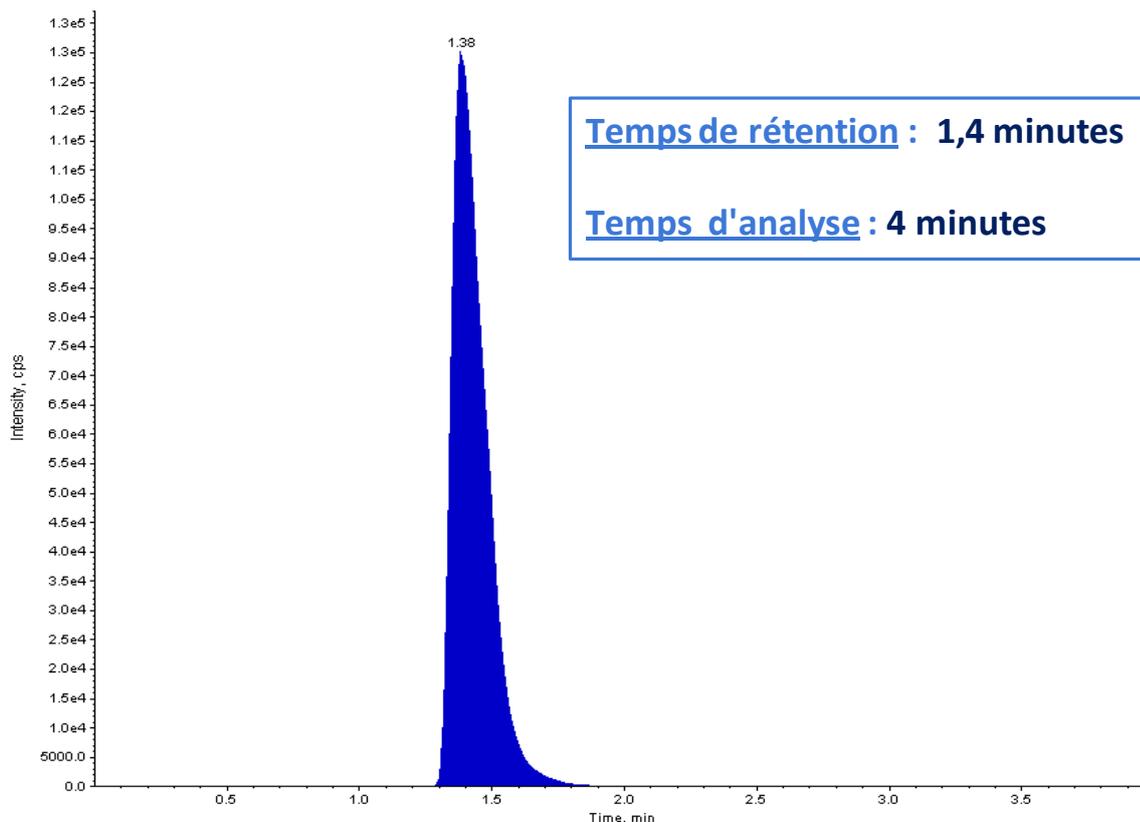
Nom	Ion père	Ion fils	DP	EP	CEP	CE	CXP
Nicardipine	480,264	314,9	46	10	24	35	6
Nicardipine-conf	480,264	166,1	46	10	24	23	10
Nicardipine-D3	483,259	315,2	66	5	22	25	6
Nicardipine-D3-conf	483,259	91,2	66	5	22	65	4

Tableau 2 : Conditions optimales retenues pour le réglage du spectromètre

(psi : pound-force per square inch)

<b>CUR</b> (Curtain Gas : gaz rideau)	25 psi
<b>CAD</b> (Collisionally Activated Dissociation) Gaz de collision = N <sub>2</sub>	3 psi
<b>IS</b> (Ion Spray voltage)	5500 V
<b>TEM</b> (température de la source)	500°C
<b>GS1</b> (Gaz de nébulisation)	40 psi
<b>GS2</b> (Gaz de désolvation)	65 psi

Ces conditions ont permis d'obtenir des pics parfaitement définis et parfaitement reproductibles d'une injection à l'autre, avec un temps d'analyse très court (Figure 14).



**Figure 14 : Chromatogramme de la nicardipine**

### ***2.5. Réactifs, substances de références et matériel***

Les différents matériels, réactifs et substances de référence utilisés pour les dosages de la nicardipine sont les suivants :

- Micropipettes à volume réglable (déplacement positif), Eppendorf
- Multipettes avec seringues combitips advanced, Eppendorf
- Fioles jaugées 10 ml et 20 ml Pyrex, Classe A
- Eprouvettes graduées 60 ml et 500 ml
- Spatule métallique
- Flacons à vis en verre teinté 15 ml, réf 27161 Sigma Aldrich
- Matériel pour injecteur automatique : flacons en verre borosilicaté (vials) et bouchons étanches avec septa en silicone/polytétrafluoroéthylène pré-perçés.
- Balance de précision, Sartorius® (précision 0,00001 g)
- Centrifugeuse Heraeus megafuge 16r, Thermo Scientific
- Agitateur vibrant type Vortex

- Agitateur magnétique Top-Mix Bioblock®
- Nicardipine chlorhydrate, 10 g, réf : 5427-10, lot : 43 00A/01/12 Inresa Pharma
- Eau Plus pour HPLC, réf : 412141, Carlo Erba
- Méthanol pour HPLC, réf : 412532, Carlo Erba
- Ethanol pour HPLC, réf : 4146072, Carlo Erba
- Acétonitrile pour HPLC, réf : 412411000, Carlo Erba
- Acide formique, réf : 8.22254.1000, Merck VWR
- Formate d'ammonium, réf : 70221-25G-F, Sigma-Aldrich
- Nicardipine-D3-hydrochloride, 1mg, réf : N394502, lot : 1-BSR-153-2, Toronto research chemicals
- Eau versable stérile Versol® 1000 ml, réf : 600018, Aguettant
- Flacon verre brun 60 ml, réf : 2506511, lot : L20, Cooper

## ***2.6. Préparation des solutions de calibration, de contrôle et des échantillons***

### **○ Préparation d'une solution mère de nicardipine à 2 mg/ml (SM) :**

Peser exactement 100 mg de nicardipine et dissoudre dans 50 ml d'un mélange méthanol : eau (MeOH/H<sub>2</sub>O, 50:50) pour HPLC. La solution est conditionnée dans un flacon brun en verre teinté.

### **○ Préparation d'une solution de nicardipine-D3 à 40µg/ml (EI) :**

A 1 mg de poudre de nicardipine-D3 est ajouté 1 ml de méthanol pour HPLC. Après agitation, 400 µl de cette solution sont ajoutés dans une fiole jaugée de 10 ml QSP 10 ml de méthanol pour HPLC. La solution est conditionnée en flacon brun et est stockée au congélateur.

### **○ Préparation des solutions intermédiaires de calibration et de contrôle (5µg/ml) :**

Avec une pipette à déplacement positif (M1000), déposer 1 ml de SM dans un tube Chromacol® de 3 ml puis ajouter 1 ml d'éthanol pour HPCL pour obtenir une solution à 1 mg/ml. Mélanger au vortex.

Prélever 50 µl avec pipette à déplacement positif (M100) et les ajouter dans une fiole jaugée de 10 ml. Rincer les parois de la fiole avec le mélange MeOH/H<sub>2</sub>O et faire le QSP à 10 ml. Mélanger puis transférer la solution dans des flacons bruns de 15 ml.

○ **Préparation de la gamme d'étalonnage de nicardipine :**

Préparation d'une gamme en cinq points dans des fioles jaugées de 20 ml à partir de la solution intermédiaire de nicardipine à 5 µg/ml en suivant le tableau 3:

Tableau 3 : Préparation de la gamme d'étalonnage de nicardipine

Concentration des points de gamme (ng/ml)	Volume de la solution intermédiaire à 5 µg/ml (µl)	Volume de la solution de nicardipine-D3 à 40µg/ml (µl)	Volume de MeOH / Eau (50:50) (ml)
85	340	50	QSP 20 ml
92,5	370	50	QSP 20 ml
100	400	50	QSP 20 ml
107,5	430	50	QSP 20 ml
115	460	50	QSP 20 ml

Homogénéisation de chaque fiole par agitation et mise en flacon pour injection.

○ **Préparation des points de contrôle de nicardipine :**

Préparation de trois contrôles qualité interne dans des fioles jaugées de 20 ml à partir de la solution intermédiaire de nicardipine à 5µg/ml en suivant le tableau 4 :

Tableau 4 : Préparation des points de contrôle de nicardipine

Concentration des points de contrôle (ng/ml)	Volume de la solution intermédiaire à 5 µg/ml (µl)	Volume de la solution de nicardipine-D3 à 40µg/ml (µl)	Volume de MeOH / Eau (50:50) (ml)
85	340	50	QSP 20 ml
100	400	50	QSP 20 ml
115	460	50	QSP 20 ml

Homogénéisation de chaque fiole par agitation et mise en flacon pour injection.

○ **Préparation des échantillons pour le dosage :**

Trois échantillons pour chaque flacon de nicardipine sont dilués à la concentration de 100 ng/ml (équivalent au milieu de gamme) selon la même méthodologie que les solutions intermédiaires et les points de contrôle. La procédure de préparation est indiquée sur la figure 15. Compte tenu de la viscosité de la formulation, des pipettes à déplacement positif ont été utilisées pour la préparation des échantillons.

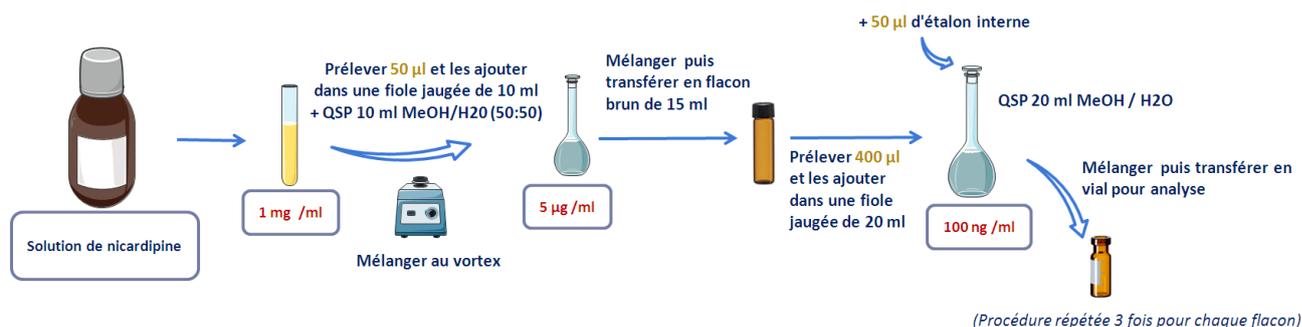


Figure 15 : Procédé de préparation des échantillons pour le dosage

### **3. Conditions générales et choix des méthodes pour l'étude de la stabilité microbiologique**

#### ***3.1. Méthodes et conditions générales***

Pour les préparations non obligatoirement stériles telle que la formulation que l'on souhaite développer, la Pharmacopée spécifie des seuils de contamination bactérienne à ne pas dépasser. L'essai de dénombrement microbien selon la Pharmacopée européenne (2.6.12) et la recherche de micro-organismes spécifiés selon le chapitre 2.6.13 appliqués à plusieurs temps de conservation permet de répondre à la question de la stabilité microbiologique de ces préparations.

Une préparation aqueuse destinée à la voie orale devra ainsi respecter les critères suivants : (36)

- Germes aérobies totaux <  $10^2$  UFC/mL
- Moisissures et levures <  $10^1$  UFC/mL
- Absence d'Escherichia coli

(UFC : Unité Formant Colonie)

La pharmacopée européenne indique 3 types de méthodes de dénombrement pour les germes aérobies totaux (DGAT) et les moisissures et levures (DMLT). Certaines nécessitent une culture réalisée dans des conditions d'incubation adaptées aux exigences de la flore dénombrée (temps, température, atmosphère) et à l'aide d'un milieu adapté à ses exigences nutritives (milieu pouvant en plus être sélectif et discriminatif). Le dénombrement après culture repose sur le principe suivant : si l'inoculum est assez dilué, chaque bactérie (ou

amas bactérien) déposée donne naissance à une colonie, isolée et clonale. Le nombre de colonies traduit alors le nombre de bactéries présentes initialement dans l'inoculum déposé. Les résultats sont souvent exprimés en terme d'unités formatrices de colonies ou UFC. Ainsi, la culture peut se faire sur :

○ Milieu solide (milieu gélosé) :

- Dénombrement dans la masse ou ensemencement en profondeur :

Le dénombrement dans la masse s'effectue avec un volume d'échantillon de 1 ml. L'inoculum est introduit dans une boîte de Pétri vide et stérile. Le milieu gélosé adéquat est liquéfié et maintenu en surfusion à 65°C. On compte 15 ml pour la première couche et 5 ml pour la seconde couche (20 ml par boîte). Le milieu est ensuite refroidi à une température pour laquelle le tube peut être tenu dans la main sans se brûler, permettant la survie des micro-organismes et pour laquelle la gélose ne prend pas en masse (environ 45°C). Puis l'inoculum est recouvert du milieu gélosé coulé aseptiquement et une homogénéisation est réalisée en imprimant à la boîte de Pétri fermée des mouvements circulaires. Pour chaque micro-organisme, au minimum 2 boîtes de Pétri seront réalisées.

- Dénombrement en surface ou étalement en surface :

Le dénombrement en surface s'effectue avec un volume d'échantillon de 0,1 ml, à étaler à la surface d'un milieu gélosé préalablement coulé en boîte de Pétri. Deux boîtes sont ensemencées par micro-organisme.

- Filtration sur membrane :

Pour certains produits liquides, les micro-organismes sont à une concentration très faible (voire nulle si le produit est stérile).

Leur dénombrement impose donc de « concentrer les micro-organismes » pour pouvoir compter des colonies. Cette « concentration » se fait grâce à la filtration d'un grand volume de produit sur une membrane filtrante retenant les micro-organismes. Elle possède des pores d'un diamètre de 0,45 µm permettant de retenir à sa surface les bactéries. La membrane filtrante, et un entonnoir stérilisable sont déposés sur une rampe de filtration qui est reliée à une pompe à vide permettant de faire passer rapidement le volume de produit à analyser à travers la membrane. La membrane est ensuite déposée sur une gélose nutritive adaptée au type de flore recherchée et l'ensemble est mis à incuber.

○ **En milieu liquide : méthode du Nombre le Plus Probable (NPP) :**

Si les conditions optimales de croissance sont réunies, un micro-organisme présent dans l'inoculum introduit dans un milieu liquide se développe en y créant un trouble ou une modification visible du milieu si celui-ci est discriminatif. Le résultat sera binaire (négatif ou positif). La méthode repose sur la répartition aléatoire des micro-organismes dans le prélèvement (méthode statistique reposant sur l'utilisation de la loi de Poisson). On ensemence donc une série de tubes avec un volume donné du produit à analyser ou ses dilutions. Connaissant le nombre de résultats positifs obtenus dans la série de tubes, on détermine la concentration en micro-organismes présents dans une unité de volume du produit analysé. A l'aide d'une table statistique de Mac Grady, on y lit le Nombre le Plus Probable (NPP) de micro-organismes présents dans l'inoculum de la dilution correspondant au chiffre des centaines du nombre caractéristique. Il s'agit d'une interprétation probabiliste.

### **3.2. Choix de la méthode**

Cette partie de notre étude fait appel à des compétences microbiologiques spécifiques. Réalisant nous même l'étude de stabilité microbiologique, les aspects techniques ont préalablement été étudiés afin de choisir une méthode simple et adaptée.

La technique de l'étalement en surface est moins lourde techniquement que l'ensemencement en profondeur par le fait notamment que les géloses sont pré-coulées. Néanmoins, pour l'exploitation des résultats, la norme ISO 7218 (ISO : Organisation internationale de normalisation) impose un intervalle significatif d'UFC entre 10 et 300 lors de la lecture finale des boîtes (99). Au regard des exigences émises par la Pharmacopée quant à la préparation des échantillons et des spécificités de la technique (volume de 0,1 ml d'échantillon), la méthode de l'étalement en surface ne nous permet pas en théorie d'obtenir au final un minimum de 10 UFC par boîte. Aussi, la technique de l'ensemencement en profondeur est plus sensible que celle l'étalement en surface (dénombrement dans la masse sur 1 ml de dilution pour 0,1 ml en surface). Mais ces deux méthodes sont aussi moins sensibles que la technique de filtration sur membrane, qui est une technique bien adaptée aux produits liquides tels que les solutés pharmaceutiques buvables où les micro-organismes sont à une concentration très faible. La méthode du nombre le plus probable (NPP) présente une fidélité et une exactitude inférieures aux autres méthodes et donne notamment des résultats peu fiables pour le dénombrement des levures et moisissures (36).

Ainsi, le choix de la méthode a porté en première intention sur une méthode de filtration sur membrane. Cependant cette méthode n'a pu être finalement retenue, le produit n'ayant pas pu être correctement filtré du fait de sa viscosité.

La méthode du dénombrement sur plaque par ensemencement en profondeur a donc été choisie.

### **3.3. Critères de validation**

Avant de réaliser l'étude de stabilité microbiologique, il est nécessaire de valider la méthode afin de démontrer que celle-ci permet de détecter une contamination microbiologique du produit testé (100).

Les essais de validation sont effectués à l'aide d'un panel de cinq micro-organismes représentatifs comme indicateurs : *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Bacillus subtilis* pour les DGAT et *Candida albicans* et *Aspergillus brasiliensis* pour les DMLT.

Les essais doivent montrer que l'ajout d'un inoculum  $\leq 100$  UFC du micro-organisme représentatif n'est pas inhibé par le produit ou par la méthode de neutralisation. La préparation est délibérément contaminée avec ces micro-organismes et le dénombrement est effectué contre un témoin sans produit également contaminé. Un autre témoin négatif, sans produit et cette fois non contaminé, est également nécessaire pour montrer que la méthode utilisée n'est pas source d'une contamination bactérienne. La Pharmacopée précise également que si le produit à examiner possède une activité antimicrobienne, celle-ci est autant que possible éliminée ou neutralisée. Nous n'avons pas connaissance d'une telle activité de la nicardipine. Il conviendra donc de vérifier que celle-ci n'empêche pas la pousse des bactéries. De même, il existe des conservateurs dans la composition des véhicules faisant partie des substances potentiellement interférentes citées par la Pharmacopée.

La méthode doit au final permettre d'obtenir un nombre significatif d'UFC pour l'interprétation : entre 10 et 250 pour les DGAT et 10 et 50 pour les DMLT. Une série de dilution du produit sera réalisée de manière à déterminer quelle est la dilution qui permet d'obtenir un nombre exploitable d'UFC (figure 16). La dilution choisie sera alors celle appliquée lors de l'étude de stabilité.

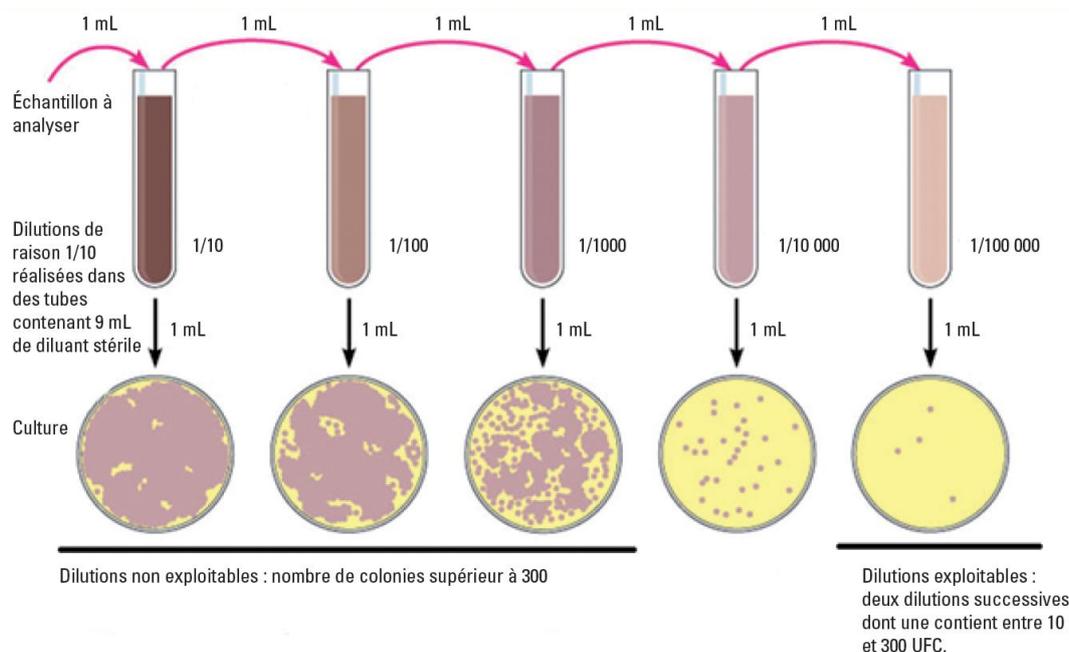


Figure 16 : Principe des dilutions pour le dénombrement en milieu solide (ISO 7218)

### 3.4. Matériel

Les différents matériels, réactifs et souches de référence utilisés pour l'étude de stabilité microbiologique sont les suivants :

- Bouillon tryptone sel, 100 ml, réf : AEB611496, lot : 532713, Biomérieux
- Bouillon Mac Conkey, 100 ml, réf : 42622, lot : 1004700080, Biomérieux
- Bouillon trypcase soja, tube de 9 ml, réf : 42100, lot : 1004699840, Biomérieux
- Gélose sabouraud, réf : AEB122208, lot : 1140020, Biomérieux
- Gélose sabouraud chloramphénicol , réf : AEB122350, lot : 1143420, Biomérieux
- Gélose trypto caséine soja, réf : AEB122858, lot : 533402, Biomérieux
- Gélose Mac Conkey , réf : 43141, lot : 1004736710, Biomérieux
- Pointes stériles 200 µl pour micropipette epTIPS, réf : 0030075021, Eppendorf
- Pipette stérile 10 ml cotonnée, réf : 357551, Falcon
- Micropipettes à volume réglable (déplacement positif), Eppendorf
- Boite de Pétri stérile 14,2 mm x 90 mm, réf : BP93B-102, Corning-Gosselin
- Eprouvettes graduées 60 ml et 500 ml
- Eau versable stérile Versol® 1000 ml, réf : 600018, Aguetant
- Nicardipine chlorhydrate, 10 g, réf : 5427-10, lot : 43 00A/01/12 Inresa Pharma
- Flacon verre brun 60 ml, réf : 2506511, lot : L20, Cooper
- Balance de précision, Sartorius® (précision 0,00001 g)
- Agitateur magnétique Top-Mix Bioblock®

- Pastilles BioRéférence, souche Staphylococcus aureus (ATCC 6538) , 45216 UFC / pastille, lot : 3100111-A1527-3049, AES
- Pastilles BioRéférence, souche Pseudomonas aeruginosa (ATCC 9027), 3382 UFC / pastille, lot : 3070101-A1525-3081, Oxoid
- Pastilles BioRéférence, souche Bacillus subtilis (ATCC 6633) : 2361 UFC / pastille, lot : 3020101-A1527-3069, Oxoid
- Pastilles BioRéférence, souche Candida albicans (ATCC 10231) : 15137 UFC / pastille, lot : 3030101-A1426-2860, Oxoid
- Pastilles BioRéférence, souche Aspergillus brasiliensis (ATCC 16404) : 6793 UFC / pastille, lot : 3010101-A1426-3956, Oxoid
- Pastilles BioRéférence, souche Escherichia coli (ATCC 8739) : 874 UFC / pastille, lot : 1050102-A1527-3119, AES

## **4. Plan expérimental**

### ***4.1. Validation de la méthode de dosage***

#### **4.1.1. Définitions**

##### **○ Stratégie du profil d'exactitude :**

Le but de la validation d'une méthode est de démontrer que celle ci est adaptée à l'usage pour lequel elle est prévue. Dans le cas d'une méthode de dosage, il s'agit d'évaluer les performances de la méthode dans les conditions attendues d'utilisation et de vérifier sur la base de ces performances son aptitude à quantifier à l'avenir chaque échantillon inconnu qu'elle aura à doser (101). L'approche classique consiste à valider la méthode de dosage selon des critères de performance définis à l'avance et en se basant sur des critères d'acceptation qui considèrent de manière dissociée le biais (justesse, qui donne des indications sur les erreurs systématiques) et la variance (fidélité, qui donne des indications sur les erreurs aléatoires) (102).

Dans l'étude présente, nous avons opté pour la validation selon une stratégie différente, basée sur les recommandations de la SFSTP (Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques), qui permet, après le calcul des différents paramètres de validation, de définir le profil d'exactitude de la méthode analytique développée (101). Cette stratégie est basée sur l'intervalle de tolérance d'espérance  $\beta$  de l'erreur totale d'une mesure. Cette erreur prend en compte à la fois la justesse et la fidélité. Elle permet de contrôler le risque

d'acceptation d'une méthode non adéquate au moyen du profil d'exactitude qui est un outil de décision visuel et graphique permettant de prévoir avec quelle garantie une proportion donnée des résultats futurs seront compris dans des limites d'acceptabilité fixées *a priori*. Cet outil de décision très utile pour accepter ou rejeter une méthode selon son usage prévu en routine a par ailleurs, l'avantage de pouvoir étudier simultanément plusieurs fonctions de réponse et de choisir le modèle de régression le plus approprié pour la calibration.

Nous avons construit le profil d'exactitude à partir de la Norme Afnor NF V03-110:2010 : *Protocole de caractérisation en vue de la validation d'une méthode d'analyse quantitative par construction du profil d'exactitude*. Les différents calculs ont été effectués à l'aide d'une application développée sous Excel®.

D'un point de vue pratique, cette stratégie de validation peut se résumer en différentes étapes :

- définir les objectifs de validation. Il faut en premier lieu définir des limites d'acceptabilité  $\lambda$  qui doivent être choisies en considérant l'usage attendu de la méthode. Cette limite est classiquement de 5% pour le dosage d'une substance active dans un produit fini (103);
- définir un plan d'expérience de validation et d'étalonnage. Le plan d'expérience de validation doit être choisi de manière à se situer en situation de fidélité intermédiaire, en effectuant les mesures par séries en tenant compte de diverses sources d'incertitude;
- ajustement d'un modèle de régression à partir des standards de calibration;
- calcul des concentrations des standards de validation à partir du modèle sélectionné;
- détermination du biais moyen à chaque niveau de concentration;
- calcul des limites de tolérance bilatérales pour les résultats attendus au niveau  $\beta$  à chaque niveau de concentration en considérant le biais et l'écart-type de fidélité intermédiaire;
- établissement du profil d'exactitude, représentant comme fonction de la concentration, le biais moyen, l'intervalle de tolérance des valeurs attendues au niveau  $\beta$  et les limites d'acceptation;

La méthode pourra être considérée comme valide pour l'intervalle de dosage où le profil d'exactitude est inclus dans les limites d'acceptation fixées *a priori*. Cette approche garantit

que seules 5% des futures mesures d'échantillons inconnus seront en dehors de ces limites (si  $\beta = 95\%$ ).

○ **Critères de validation :**

Les critères de validation sont ceux couramment utilisés dans les procédures analytiques de séparation et repris dans le document Q2A de la Conférence Internationale sur l'Harmonisation (104). Il s'agit de la spécificité, la fonction de réponse, la justesse, la fidélité, l'exactitude, la linéarité, des limites de détection et de quantification.

• **Spécificité :**

Une méthode est dite spécifique lorsqu'elle permet de garantir que le signal mesuré provient uniquement de la substance à analyser et non d'autres composants potentiellement présents (105).

Dans le cadre d'une méthode de dosage, toutes les méthodes ne sont pas spécifiques. Ainsi, concernant les méthodes séparatives, la notion de spécificité ou de sélectivité dépend du mode de détection (106). La majorité des études de stabilité des préparations pharmaceutiques se font à l'aide d'un détecteur UV-visible. Ce type de détection, bien que largement adapté à ce genre d'études, présente une faible spécificité et son couplage avec une technique séparative (HPLC) devra lors de la validation de la méthode permettre une séparation des produits de dégradation du principe actif, des excipients, et des impuretés. La capacité indicatrice de stabilité de la méthode est alors évaluée par une dégradation forcée du principe actif.

L'analyste devra être d'autant plus vigilant lorsque la formulation présente de nombreux excipients susceptibles d'absorber à la longueur d'onde choisie ou lorsque les produits de dégradation possèdent une structure similaire à celle du principe actif pouvant alors être élués en même temps.

Ces conditions sont retrouvées dans notre étude comme nous l'avons vu précédemment.

Aussi, l'utilisation d'un spectromètre de masse en tandem permet d'accéder à la notion de pureté des pics et offre par son mode de fonctionnement une spécificité très importante. Cependant, cette approche requiert pour chaque analyte la sélection des ions précurseurs et produits, et l'optimisation de l'énergie de collision. Cela prend non seulement du temps lors du développement d'une méthode, mais nécessite d'avoir des composés de référence des analytes non ciblés tels que les produits de dégradation.

Comme proposé en amont, la nicardipine présente de nombreux produits de dégradation présentant une structure souvent très proche. Nombreux de ces produits ne sont pas disponibles dans le commerce, mais aucun ne semble présenter une toxicité ou une activité pharmacologique.

Bien qu'assurée par le mode de détection, la spécificité de la méthode de dosage a été renforcée par différents essais :

▪ *Effet matrice* : Pour vérifier que les excipients de la forme liquide n'interfèrent pas dans le dosage, il faut prouver que la droite de régression obtenue avec le principe actif seul et celle obtenue en présence des excipients sont similaires. Pour réaliser ce test, nous avons effectué une comparaison des pentes obtenues avec des gammes de principe actif seul (pente  $b_1$  de variance  $S^2_{b1}$ ) et celles obtenues avec des gammes reconstituées (pente  $b_2$  de variance  $S^2_{b2}$ ). Un test de Student est réalisé :

$$t = \frac{|b_1 - b_2|}{\sqrt{S^2_{b1} + S^2_{b2}}}$$

Les pentes ne seront pas significativement différentes au risque  $\alpha$  de 5%, si la valeur obtenue « t » est inférieure à  $t(\alpha ; n_1 + n_2 - 4 \text{ ddl})$ .

Si le résultat obtenu montre une différence significative, cela traduit un effet matrice, ce qui oblige à revoir la procédure de dosage.

Nous avons également effectué une comparaison des ordonnées à l'origine obtenues avec les gammes de principe actif seul (pente  $a_1$  de variance  $S^2_{a1}$ ) et celles obtenues avec les gammes reconstituées (pente  $a_2$  de variance  $S^2_{a2}$ ), un test de Student sera également effectué :

$$t = \frac{|a_1 - a_2|}{\sqrt{S^2_{a1} + S^2_{a2}}}$$

Si le résultat obtenu montre une différence significative, cela traduit une erreur systématique.

Les gammes sans matrices ont été préparées avec un mélange MeOH/H<sub>2</sub>O à la place des excipients.

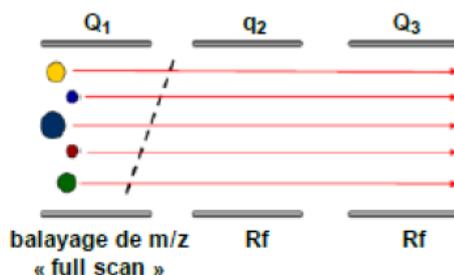
Nous avons également effectué une analyse par HPLC-MS/MS de tous les excipients utilisés sans principe actif et dilués de façon équivalente aux préparations futures, afin d'évaluer une éventuelle interférence chromatographique.

▪ Dégradation forcée : La quantification d'analytes non connus étant impossible en spectrométrie de masse en mode MRM, les produits de dégradation potentiels de la nicardipine décrits dans la littérature ont été répertoriés. Afin de retrouver ces produits nous avons réalisé une dégradation forcée de la molécule en s'inspirant des recommandations du guide de la SFPC : (106) (Tableau 5)

**Tableau 5 : Protocole pour la dégradation forcée**

DEGRADATION ACIDE	1 ml de solution de nicardipine 10 µg/ml + 1 ml HCL 1N	1h / 80°C	1 ml NaOH 1N + 1 ml MeOH/H <sub>2</sub> O	Analyse 
	1 ml MeOH/H <sub>2</sub> O + 1 ml HCL 1N		1 ml NaOH 1N + 1 ml MeOH/H <sub>2</sub> O	
	Témoins		1 ml nicardipine à 2,5 µg/ml non dégradée 2 ml MeOH/H <sub>2</sub> O + 1 ml HCL 1N + 1 ml NaOH 1N	
DEGRADATION BASIQUE	1 ml de solution de nicardipine 10 µg/ml + 1 ml NaOH 1N	1h / 80°C	1 ml HCL 1N + 1 ml MeOH/H <sub>2</sub> O	Analyse 
	1 ml MeOH/H <sub>2</sub> O + 1 ml NaOH 1N		1 ml HCL 1N + 1 ml MeOH/H <sub>2</sub> O	
	Témoins		1 ml nicardipine à 2,5 µg/ml non dégradée 2 ml MeOH/H <sub>2</sub> O + 1 ml HCL 1N + 1 ml NaOH 1N	
DEGRADATION OXYDATIVE	1 ml d'une solution à 1 mg/ml + 9 ml eau oxygénée à 6%		Solutions laissées en contact 3 h à 100°C	Analyse 
	1 ml MeOH/H <sub>2</sub> O + 9 ml eau oxygénée à 6%		10 ml nicardipine à 100 µg/ml non dégradée	
	Témoins		1 ml MeOH/H <sub>2</sub> O + 9 ml eau oxygénée à 6%	
PHOTODEGRADATION	1 ml de solution de nicardipine 10 µg/ml		Dépot à 10 cm d'une lampe UVB pendant 6 h (Transilluminateur TFX-20.MC, Vilbert Lourmat)	Analyse 
	1 ml MeOH/H <sub>2</sub> O		1 ml nicardipine à 10 µg/ml non dégradée	
	Témoins		1 ml MeOH/H <sub>2</sub> O	

Les solutions ainsi dégradées ont été ensuite analysées en mode full scan : ce mode d'acquisition disponible sur l'appareil permet d'obtenir un signal par un balayage continu et répété d'une gamme de masse spécifique (intervalle m/z fixé de 50 à 600). Ici, seul le premier quadripôle (Q1) fonctionne et permet d'observer la totalité des ions formés appartenant à cette gamme de rapport m/z (figure 17).



**Figure 17 : Mode d'acquisition Full Scan**

Les solutions dégradées ont été comparées à des blancs de solvants dégradés (dans les mêmes conditions) et non dégradés ainsi qu'à des échantillons de nicardipine non dégradés. On obtient alors des TIC (Total Ion Chromatogram) qui représentent tous les ions détectés dans l'intervalle de  $m/z$  fixé, soit 50 à 600. Dans chaque cas le signal correspond à l'ion  $[M+H]^+$ . Les signaux ont ensuite été comparés et les produits de dégradation recherchés à partir de leur rapport  $m/z$  théorique. Les produits de dégradation retrouvés ont ensuite été optimisés à partir des échantillons dégradés par infusion directe dans la masse afin de déterminer leur transitions MRM.

Ainsi cet essai a pour objectif d'identifier les principaux produits de dégradation et de déterminer leurs transitions MRM pour pouvoir suivre leur apparition au cours de l'étude de stabilité. La spécificité de la méthode est alors renforcée par le suivi de chaque transition spécifique à la masse moléculaire de chaque produit de dégradation.

- **Fonction de réponse :**

La fonction de réponse d'une procédure d'analyse traduit, à l'intérieur du domaine de dosage, la relation existant entre la réponse (le signal) et la concentration en substance à examiner dans l'échantillon. Cette relation s'exprime au travers d'une relation mathématique définie (ex : fonction linéaire, quadratique,...). La fonction de réponse sera testée sur cinq niveaux de concentration (zéro non compris) placés à intervalle régulier sur toute la gamme de concentration étudiée (105). La stratégie de validation mise en place nous a permis d'analyser plusieurs modèles de régression et de choisir celui qui était le plus approprié.

- **Justesse :**

La justesse fournit une indication sur les erreurs systématiques de la procédure analytique (105). Elle exprime l'étroitesse de l'accord entre la valeur qui est acceptée comme une valeur vraie ou théorique et la valeur calculée obtenue en appliquant la procédure d'analyse un certain nombre de fois. La justesse est calculée à partir des standards de validation sur trois niveaux de concentration. La justesse est exprimée en terme de biais absolu (ng/ml), de biais relatif (%) ou de taux de recouvrement (%) pour chaque niveau de concentration des standards de validation. Pour être acceptable, le recouvrement doit être compris entre 98 et 102% sauf à la limite de quantification où il est

accepté entre 90 et 110% de recouvrement. Le biais relatif acceptable doit être inférieur à 2% (101).

- **Fidélité** :

La fidélité fournit une indication sur les erreurs liées au hasard (erreurs aléatoires). Elle exprime l'étroitesse de l'accord définie en terme de coefficient de variation entre une série de mesures provenant de multiples prises d'un même échantillon homogène dans des conditions définies. Elle est évaluée à partir des standards de validation utilisés pour la détermination de la justesse. Elle comprend la mesure de la fidélité intra-jour ou inter-série, aussi appelée répétabilité, et la mesure de la fidélité intermédiaire et s'exprime par le coefficient de variation (CV).

- **Exactitude** :

L'exactitude exprime l'étroitesse de l'accord entre le résultat d'essai et la valeur de référence acceptée comme telle ("valeur vraie"). L'exactitude prend en compte l'erreur totale, c'est à dire l'erreur systématique et l'erreur aléatoire liées au résultat. Il s'agit donc de l'expression de la somme de la justesse et de la fidélité. Elle est exprimée à partir du profil d'exactitude. Les limites d'acceptabilités ( $\lambda$ ) ont été fixées à  $\pm 5\%$ .

- **Linéarité** :

La linéarité d'une méthode d'analyse est sa capacité, à l'intérieur du domaine de dosage, de fournir des concentrations calculées directement proportionnelles à la concentration théorique en analyte.

- **Limite de détection** :

La limite de détection (LD) d'une méthode analytique est la plus petite concentration d'une substance pouvant être détectée et considérée comme différente de la valeur du blanc, mais non quantifiée comme une valeur exacte, dans les conditions expérimentales décrites dans la méthode. La LD a été estimée en utilisant l'ordonnée à l'origine moyenne du modèle de calibration et l'écart-type résiduel de la régression.

- **Limite de quantification** :

La limite de quantification (LQ) correspond à la plus petite concentration d'une substance qui peut être dosée, dans les conditions expérimentales décrites dans la méthode,

avec une exactitude définie. La définition peut également être appliquée pour la limite supérieure de quantification qui est la plus grande quantité de l'analyte dans l'échantillon pouvant être dosée dans les conditions expérimentales décrites, avec une exactitude définies. La LQ a été obtenue en calculant la plus petite concentration en dessous de laquelle les limites d'exactitude ou les limites de tolérance sont en dehors des limites d'acceptation.

- **Profil de risque** :

Le profil de risque exprime par niveau de concentration investigué, la probabilité pour que le résultat d'une mesure effectuée en analyse de routine puisse tomber en dehors des limites d'acceptation, en considérant le biais estimé ainsi que les paramètres de précision obtenus en phase de validation. Il permet de contrôler le risque à l'aide de critères adéquats obtenus en validation (erreur systématique et erreur aléatoire). Il exprime la proportion des mesures qui sont susceptibles d'être en dehors des limites d'acceptation si toutes les conditions demeurent équivalentes, par exemple aucun changement n'apparaît dans la procédure analytique.

#### **4.1.2. Plan expérimental**

- **Effet matrice** : Le plan de validation est formé de 3 séries (jours) avec des gammes (avec et sans matrice) à 5 niveaux de concentration et 2 répétitions par jour et par niveau, ce qui fait un total 60 essais. Les résultats sont exprimés en rapport des deux signaux (analyte et étalon interne). Les gammes avec matrices sont préparées à partir de flacons dosés à 2 mg/ml et fabriqués selon le protocole de formulation établi. Les manipulations suivantes (dilutions) sont les mêmes que celles décrites dans la partie 3.6.

- **Dégradation forcée** : Les essais ont été conduits sur 2 jours sur des échantillons dégradés et non dégradés.

- **Validation du dosage de la nicardipine** : La validation du dosage a été réalisée sur un total de 6 jours. Les mesures sont exprimées en unités de rapport de surface des deux pics (analyte et étalon interne).

- *Choix du domaine et des limites d'acceptabilité* : Le domaine de validation va de 85 à 115 ng/ml. Les limites d'acceptabilité sont fixées  $\pm 5\%$  autour de la valeur cible et la probabilité de tolérance  $\beta$  est égale à 95 %.

- *Plan d'étalonnage* : Il comporte 6 séries (jours), 5 niveaux de concentration, et 1 répétition par jour et par niveau, soit un total de 30 essais.

▪ *Plan de validation* : Il est formé de 6 séries (jours) avec 3 niveaux de concentration et 6 répétitions pour le premier jour par niveau et 2 répétitions pour les 5 jours suivant par niveau de concentration, soit un total de 48 essais.

#### **4.2. Validation des méthodes pour l'étude de stabilité microbiologique**

Conformément aux chapitres 2.6.12 et 2.6.13 de la Pharmacopée européenne, les suspensions mères étaient préparées à partir d'un échantillon d'au moins 1 ml de produit. Le temps qui s'écoulait entre la fin de la préparation des échantillons et le moment où l'inoculum entrant en contact avec le milieu de culture ne devait pas dépasser 45 minutes. Les manipulations ont été réalisées sous un poste de sécurité microbiologique (PSM) afin de limiter les contaminations et l'apparition de faux positifs.

##### **○ Validation de l'essai de dénombrement microbien ( DGAT / DMLT) :**

L'essai a porté sur le produit pur (2 mg/ml) et sur le produit dilué au 1/10<sup>e</sup> et au 1/100<sup>e</sup> dans du tryptone-sel.

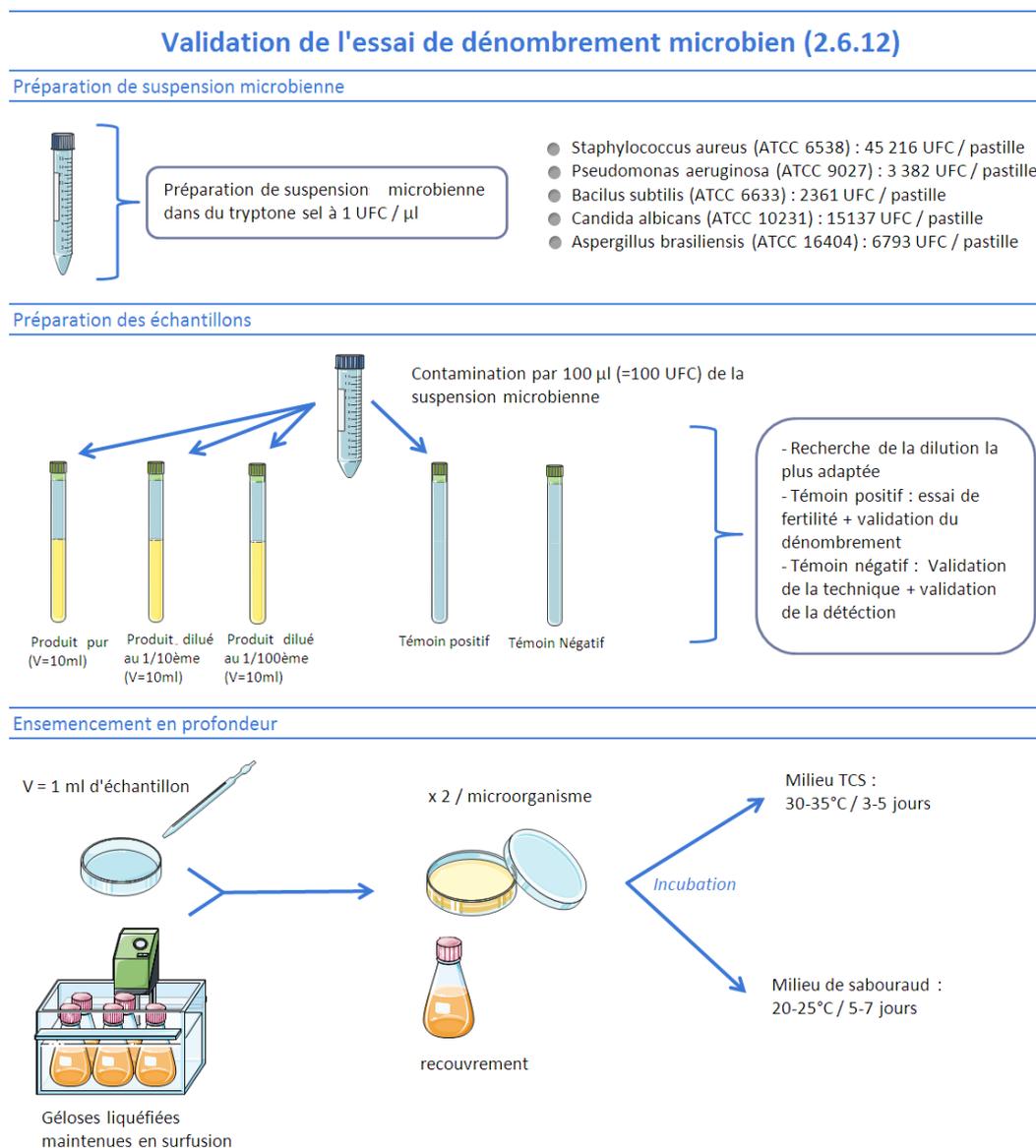
Deux tubes témoins sans produit ont été préparés avec le même volume final. Des suspensions microbiennes ont été préparées à l'aide de pastilles calibrées et lyophilisées de micro-organismes de référence. Ces dernières étaient donc diluées dans du Tryptone-sel de manière à avoir des suspensions microbiennes concentrées à 1 UFC/μl.

Les échantillons préalablement préparés étaient ensuite contaminés avec les suspensions microbiennes par un volume de 100 μl afin d'obtenir un inoculum de 100 UFC. Un seul des deux témoins sans produit était contaminé. Un volume de 1 ml de chaque échantillon a ensuite été prélevé et déposé au fond d'une boîte de Pétri dans laquelle était coulée une gélose (trypticase-soja pour les DGAT et sabouraud pour les DMLT).

Deux boîtes de Pétri pour chaque micro-organisme et pour chaque niveau de dilution étaient réalisées.

Les géloses trypticase-soja étaient incubées 3 jours à 35°C et les milieux de sabouraud 5 jours à 20-25°C. La moyenne des deux résultats était effectuée à chaque fois. L'essai de fertilité (permettant de s'assurer qu'un des produits présent dans la formulation n'inhibait pas la pousse des germes) était satisfait si le nombre moyen obtenu pour chaque micro-organisme de référence ne différait pas de plus d'un facteur 2 de la valeur obtenue sur le témoin contaminé sans produit. L'absence de colonies sur les géloses réalisées à partir du témoin sans produit et non contaminé doit permettre de valider la technique employée. La

dilution retenue pour l'étude de stabilité était celle qui présentait un nombre exploitable d'UFC. Le procédé de validation est illustré sur la figure 18.



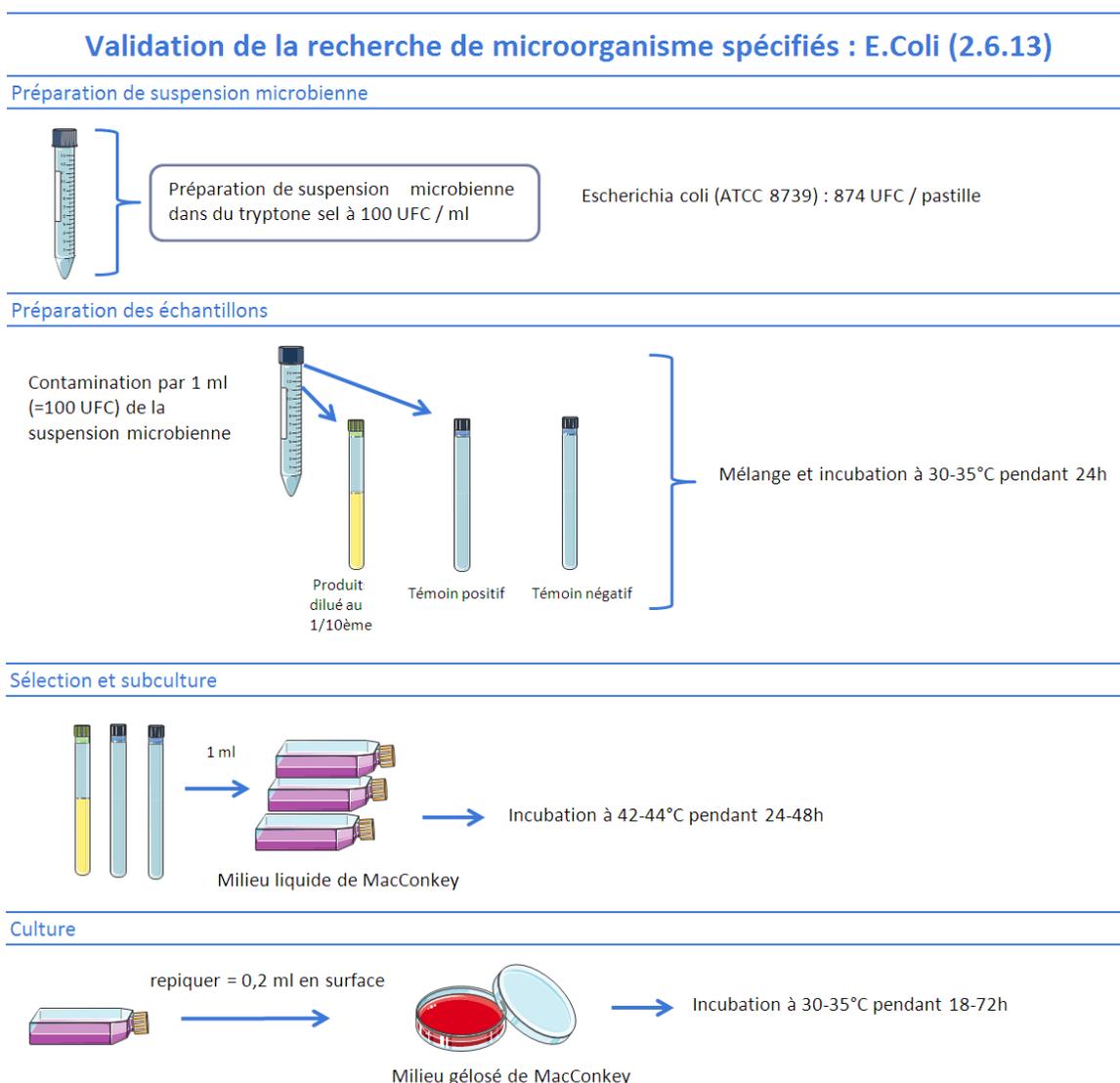
**Figure 18 : Procédé de validation de l'essai de dénombrement microbien**

○ **Validation de la recherche de micro-organismes spécifiés (E. coli) :**

Comme pour les DGAT et DMLT, le produit et un témoin ont été contaminés à l'aide d'une suspension microbienne fabriquée à partir d'une pastille calibrée d'E. coli et concentrée à 100 UFC/ml. Les échantillons étaient contaminés de manière à obtenir un inoculum de 100 UFC. Le produit était dilué au 1/10<sup>ème</sup> dans du tryptone-sel. Un témoin négatif sans produit et non contaminé a également été préparé. Les échantillons ainsi préparés ont été pré-incubés pendant 24h à 35°C.

- *Sélection et subculture* : 1 ml de chaque échantillon était transféré dans 100 ml de milieu liquide de MacConkey et incubé à 42°C pendant 24h-48h.
- *Culture* : La culture était réalisée en repiquant 0,2 ml des milieux liquides sur des milieux gélosés de MacConkey. Les géloses étaient incubées à 35°C pendant 18-72h. Deux géloses pour chaque échantillon étaient préparées.

La recherche d'Escherichia coli est une recherche qualitative. Aussi, la technique était validée quand les géloses présentaient des colonies caractéristiques (colonies rouges) et qu'il y avait une absence de colonies sur le témoin négatif. L'essai de fertilité était satisfait quand le nombre moyen de colonies obtenues avec le produit ne différait pas de plus d'un facteur 2 de la valeur obtenue sur le témoin contaminé sans produit. La validation s'est déroulée sur 3 jours. Le procédé de validation est illustré sur la figure 19.



**Figure 19 : Procédé de validation de la recherche d'E. coli**

### **4.3. Etude de stabilité**

Une préparation pharmaceutique est considérée comme stable lorsqu'en un laps de temps déterminé ses propriétés essentielles ne changent pas ou changent au plus dans des proportions tolérables (106). En effet, selon l'ICH, la stabilité d'une préparation est l'aptitude « à conserver ses propriétés chimiques, physiques, microbiologiques et biopharmaceutiques dans des limites spécifiées pendant toute sa durée de validité » (102).

#### **• Profil général de l'étude :**

L'objectif de l'étude est de démontrer une stabilité physico-chimique et microbiologique de la formulation orale de nicardipine dosée selon les conditions de préparation établies.

Il a été décidé de tester deux conditions de conservation : conservation au réfrigérateur ( $4^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ ) et à température ambiante ( $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ). Dans les deux cas, tous les lots étaient préparés à l'abri de la lumière.

La stabilité physico-chimique et microbiologique de la formulation a été évaluée avant et après ouverture afin de refléter les conditions futures réelles d'utilisation. Un essai d'uniformité de teneur en principe actif a également été réalisé.

Au total 6 lots de 10 flacons ont été engagés dans l'étude de stabilité.

Le profil général de l'étude est représenté dans la figure 21.

#### **4.3.1. Etude de stabilité chimique**

L'étude de stabilité chimique a évalué la conservation de l'intégrité chimique et de la teneur du principe actif qui doit être maintenu au cours du temps.

La majeure partie des études de stabilité utilise une limite de  $\pm 10\%$  en teneur de principe actif (90-110 % de la teneur initiale). Il est reconnu que cette limite classique de 10% peut être inappropriée pour certaines préparations et d'autres paramètres doivent être pris en considération tels que la toxicité des produits de dégradation, ou l'index thérapeutique du principe actif. Ici, cette valeur semble appropriée étant donné que la nicardipine n'est pas un principe actif à marge thérapeutique étroite et que ses principaux produits de dégradation sont connus et non-toxiques.

Trois lots de dix flacons ont été fabriqués pour cette partie.

L'étude de stabilité chimique a été réalisée à 9 temps différents.

Les flacons dosés à J0 (valeur de référence) ont ensuite été conservés à 25°C et à 4°C et dosés à J1, J2, J7, J15, J30, J60 et J90. Des flacons non ouverts ont été placés à 25°C et à 4°C puis dosés à J60 et J83 (tableau 6).

Dans tous les cas, trois flacons de trois lots différents sont dosés chacun trois fois. Afin de s'affranchir des variabilités liées à l'instrumentation et pour être certain de la spécificité du dosage, les flacons sont dosés à chaque temps de prélèvement par rapport à une gamme de calibration en cinq points et trois points de contrôle, préparés extemporanément le jour du dosage. Les échantillons étaient dilués afin que les concentrations soient équivalentes au milieu de la gamme (soit 100 ng/ml) selon le même protocole que les standards de calibration et de validation. Un étalonnage interne a été réalisé pour chaque échantillon.

Tableau 6 : Plan expérimental de l'étude de stabilité chimique

		J0	J1	J2	J7	J15	J30	J60	J83	J90
25°C	<b>Stabilité après ouverture</b> <i>Flacon 1 - Lot 1 (x3); Flacon 1 - Lot 2 (x3); Flacon 1 - Lot 3 (x3)</i>	X	X	X	X	X	X	X		X
	<b>Stabilité avant ouverture (J60)</b> <i>Flacon 3 - Lot 1 (x3); Flacon 3 - Lot 2 (x3); Flacon 3 - Lot 3 (x3)</i>							X		
	<b>Stabilité avant ouverture (J83)</b> <i>Flacon 5 - Lot 1 (x3); Flacon 5 - Lot 2 (x3); Flacon 5 - Lot 3 (x3)</i>								X	
4°C	<b>Stabilité après ouverture</b> <i>Flacon 2 - Lot 1 (x3); Flacon 2 - Lot 2 (x3); Flacon 2 - Lot 3 (x3)</i>	X	X	X	X	X	X	X		X
	<b>Stabilité avant ouverture (J60)</b> <i>Flacon 4 - Lot 1 (x3); Flacon 4 - Lot 2 (x3); Flacon 4 - Lot 3 (x3)</i>							X		
	<b>Stabilité avant ouverture (J83)</b> <i>Flacon 6 - Lot 1 (x3); Flacon 6 - Lot 2 (x3); Flacon 6 - Lot 3 (x3)</i>								X	

#### 4.3.2. Etude de stabilité physique

L'étude de stabilité physique a évalué les propriétés physiques initiales, à savoir les caractères organoleptiques (couleur, odeur, aspect), le pH, la viscosité, la densité et l'osmolalité. Les échantillons utilisés sont ceux employés pour l'étude de stabilité chimique (Tableau 7).

Tableau 7 : Plan expérimental de l'étude de stabilité physique

		J0	J1	J2	J7	J15	J30	J60	J90
25°C	<b>pH</b> <i>Flacon 7 - Lot 1 (x1); Flacon 7 - Lot 2 (x1); Flacon 7 - Lot 3 (x1)</i>	X		X	X	X	X	X	X
	<b>Viscosité</b> <i>Flacon 7 - Lot 1 (x1); Flacon 7 - Lot 2 (x1); Flacon 7 - Lot 3 (x1)</i>	X			X	X	X	X	X
	<b>Osmolalité</b> <i>Flacon 9 - Lot 1 (x1); Flacon 9 - Lot 2 (x1); Flacon 9 - Lot 3 (x1)</i>	X			X	X	X	X	X
	<b>Densité</b> <i>Flacon 9 - Lot 1 (x1); Flacon 9 - Lot 2 (x1); Flacon 9 - Lot 3 (x1)</i>	X			X	X	X	X	X
4°C	<b>pH</b> <i>Flacon 8 - Lot 1 (x1); Flacon 8 - Lot 2 (x1); Flacon 8 - Lot 3 (x1)</i>	X		X	X	X	X	X	X
	<b>Viscosité</b> <i>Flacon 8 - Lot 1 (x1); Flacon 8 - Lot 2 (x1); Flacon 8 - Lot 3 (x1)</i>	X			X	X	X	X	X
	<b>Osmolalité</b> <i>Flacon 10 - Lot 1 (x1); Flacon 10 - Lot 2 (x1); Flacon 10 - Lot 3 (x1)</i>	X			X	X	X	X	X
	<b>Densité</b> <i>Flacon 10 - Lot 1 (x1); Flacon 10 - Lot 2 (x1); Flacon 10 - Lot 3 (x1)</i>	X			X	X	X	X	X

○ Caractères organoleptiques :

Les caractères organoleptiques d'une solution ou d'une suspension sont des caractéristiques évaluées par les organes des sens : couleur, aspect, odeur, goût... (107). Une préparation pharmaceutique sous forme de solution doit garder tout au long de sa conservation ses caractères organoleptiques, notamment une couleur et un aspect constant. Un changement de couleur peut signifier un changement de composition (106). L'appréciation de la couleur et de l'aspect de la formulation a consisté à faire un contrôle visuel par rapport à un témoin. La présence d'un éventuel sédiment ou de particules a également été surveillée à l'œil nu. La préparation développée étant atoxique, un contrôle de l'odeur de la formulation a aussi été réalisé.

Les contrôles de ces caractères organoleptiques ont été réalisés à J1, J2, J7, J15, J30, J60 et J90.

○ Etude du pH :

Le pH de la formulation est une donnée importante qui peut influencer sur la conservation et la dégradation ou non du principe actif. Lors de la conservation, plusieurs causes peuvent induire une modification de pH : une dégradation du principe actif lui-même, une dégradation d'un excipient, une interaction contenant/contenu... Ainsi, toute modification du pH marquera une modification de la formulation initiale préparée. En outre, comme vu précédemment, la nicardipine est plus stable en milieu acide (86). Sa solubilité est également améliorée en milieu acide (75).

La détermination du pH se fait par mesure de la différence de potentiel entre deux électrodes plongeant dans la solution à examiner. Pour pouvoir obtenir une mesure exacte, il est nécessaire de calibrer régulièrement le pH-mètre à l'aide de solutions tampons. La mesure du pH a été effectuée avec un le pH-mètre WTW Inolab® pH Level 2P du laboratoire de pharmacocinétique du CHU de Rouen. Les mesures ont été réalisées à J0, J1, J2, J7, J15, J30, J60 et J90. A chaque temps et pour les deux températures de conservation, trois flacons de trois lots différents étaient contrôlés (6 mesures par temps). Le résultat est donné avec une précision de  $\pm 0,001$  unités de pH.

#### ○ Etude de la viscosité :

La viscosité peut se définir comme les forces de frottement qui s'opposent à l'écoulement des couches de liquide les unes par rapport aux autres. Chaque forme liquide aura une viscosité plus ou moins importante. Cette viscosité est directement liée à la température. Durant la conservation, la viscosité peut évoluer soit en donnant des produits plus fluides soit au contraire plus visqueux. La modification de ce paramètre au cours de l'étude peut être le témoin d'une instabilité de la formulation (106).

La mesure de la viscosité a été effectuée avec un viscosimètre DV-I (Brookfield®). Il s'agit d'un viscosimètre rotationnel qui mesure le couple nécessaire pour faire tourner une tige en immersion dans un fluide. Ne disposant pas des équipements matériels, ce contrôle a été sous traité au laboratoire d'hématologie du CHU de Rouen qui utilise cet équipement pour évaluer la viscosité sanguine et plasmatique. Les mesures ont été réalisées à J0, J7, J15, J30, J60 et J90 pour chaque température de conservation et sur trois flacons de trois lots différents.

#### ○ Etude de la densité :

La densité d'une substance est le rapport entre la masse d'un volume donné de cette substance et la masse de même volume d'eau.

La mesure de la densité d'une forme liquide est un paramètre de stabilité additionnel (108). Pour cette étude, la mesure de la densité a été effectuée avec un réfractomètre à main (Master- $\alpha$ , Atago®) habituellement utilisé par le laboratoire de biochimie pour évaluer la densité urinaire. Son principe de fonctionnement est le suivant : la lumière change de direction lorsqu'elle passe d'un milieu à un autre, elle est dite réfractée et la propriété qui caractérise les différents milieux transparents est la réfringence, qui se traduit par une valeur numérique, l'indice de réfraction. L'angle de réfraction de la lumière est lié à la

concentration des produits qu'elle traverse. Le réfractomètre permet de mesurer cet angle de réfraction. Après calibration de l'appareil, la mesure de la densité s'effectue par lecture visuelle. Ce contrôle a été sous traité au laboratoire de biochimie. Les mesures ont été réalisées à J0, J7, J15, J30, J60 et J90 pour chaque température de conservation et sur trois flacons de trois lots différents.

○ Etude de l'osmolalité :

Cette mesure permet de calculer le nombre de moles effectives en solution et donc la contribution des différents solutés à la pression osmotique de la solution. L'osmolalité est donc la quantité de particules osmotiquement actives contenues dans 1 kg de solution. Elle s'exprime en mOsm/kg. L'estomac supporte une osmolalité jusqu'à 1000 mOsm/kg. L'administration par voie orale de médicaments avec une osmolalité supérieure à 1000 mOsm/kg peut conduire à une constriction du pylore et causer des nausées, vomissements, une irritation gastrique et des diarrhées osmotiques (109). L'osmolalité des sécrétions gastro-intestinales se situe autour de 300 mOsm/kg. Pour éviter une intolérance, il est recommandé de diluer les solutions ayant une osmolalité supérieure à 600 mOsm/kg avant administration. Une osmolalité de 330-350 mOsm/Kg est considérée comme appropriée pour une administration entérale en pédiatrie (109). En outre, une solution qui ne se dégrade pas conserve une osmolalité constante. L'osmomètre, modèle Fiske® Micro-osmometer model 210 (Norwood, Massachussets, USA), mesure l'abaissement du point de congélation. En effet, à partir de ce résultat, il est possible de connaître l'osmolalité par la relation suivante :

$$\varepsilon m = \frac{\Delta T}{1,86} \times 1000$$

avec  $\varepsilon m$  = osmolalité et  $\Delta T$  = différence de température.

Ce contrôle a été sous traité au laboratoire de biochimie. Le technicien prélevait environ 200  $\mu$ l de chacun des flacons. Avant chaque mesure, un témoin à 290 mOsm/kg est testé afin de vérifier que l'osmomètre fonctionne correctement. Le résultat est donné avec une précision de  $\pm 1$  mOsm/kg. Les mesures ont été réalisées à J0, J7, J15, J30, J60 et J90 pour chaque température de conservation et sur trois flacons de trois lots différents.

### 4.3.3. Etude de l'uniformité de teneur en principe actif

Des prélèvements de formulation de nicardipine ont été réalisés à des niveaux différents (haut, milieu et bas du flacon) sur 3 flacons avant et après agitation. Ces prélèvements ont ensuite été dilués et analysés par HPLC-MS/MS (figure 20). La dose de 5 mg a été retenue pour réaliser ce test (soit 2,5 ml à prélever). Le but de cet essai est de montrer l'uniformité de teneur de la préparation et la nécessité ou non d'agiter les flacons avant chaque utilisation.

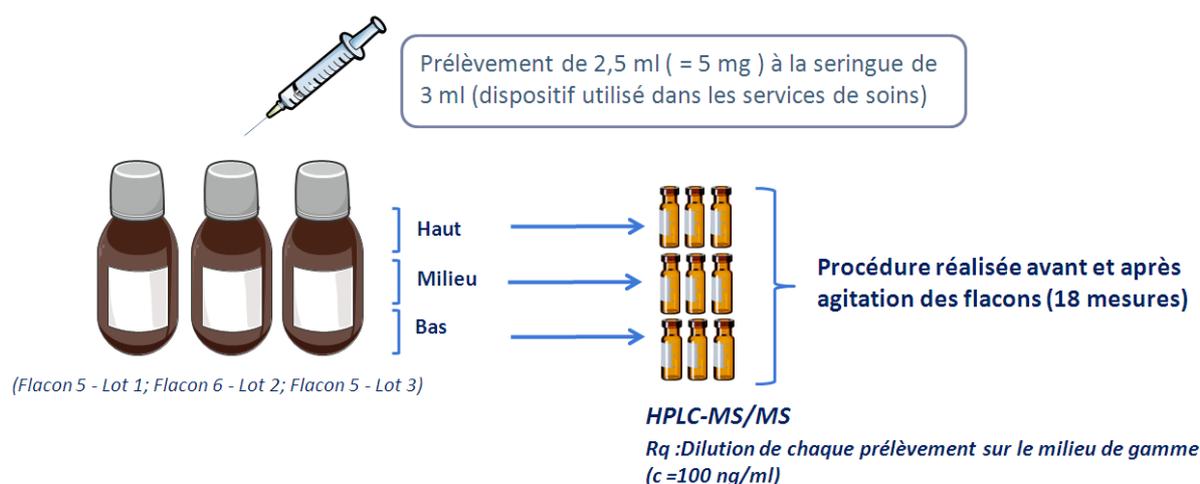


Figure 20 : Plan expérimental de l'uniformité de teneur en principe actif

### 4.3.4. Etude de stabilité microbiologique

Les préparations aqueuses destinées à la voie orale sont considérées comme stables sur le plan microbiologique si le dénombrement des DGAT est inférieur à  $10^2$  UFC/ml, le dénombrement des DMLT est inférieur à  $10^1$  UFC/ml et si elles ne contiennent pas d'Escherichia coli.

L'étude s'est décomposée en 6 jours d'analyse : J0, J7, J15, J43, J60 et J90.

A J0, trois lots de la formulation buvable de nicardipine ont été fabriqués et deux types de conditionnement ont été préparés :

- 20 flacons de 50 ml afin de déterminer la stabilité microbiologique avant ouverture. Dix flacons ont été placés à température ambiante et les dix autres ont été stockés en chambre froide à 4°C.

- 2 flacons de 250 ml pour évaluer la qualité microbiologique de la solution après ouverture, dans des conditions d'utilisation. Un flacon a été placé à température ambiante et l'autre à 4°C.

A J0, les flacons de 250 ml ont été ouverts et 4 échantillons ont été préparés avec la dilution la plus appropriée retenue lors de l'étape de validation : 2 échantillons (25°C et 4°C) pour le dénombrement des DGAT et DMLT et 2 échantillons (25°C et 4°C) pour la recherche d'E. coli.

Pour les temps de prélèvements suivants, 8 échantillons étaient préparés : 4 échantillons pour le dénombrement des DGAT et DMLT et 4 échantillons pour la recherche d'E. coli (aux deux températures, et avant et après ouverture). Deux boîtes par milieu étaient préparées systématiquement (figure 26).

Les critères d'acceptation sont interprétés comme suit :

- $10^1$  UFC : nombre maximal acceptable = 20
- $10^2$  UFC : nombre maximal acceptable = 200

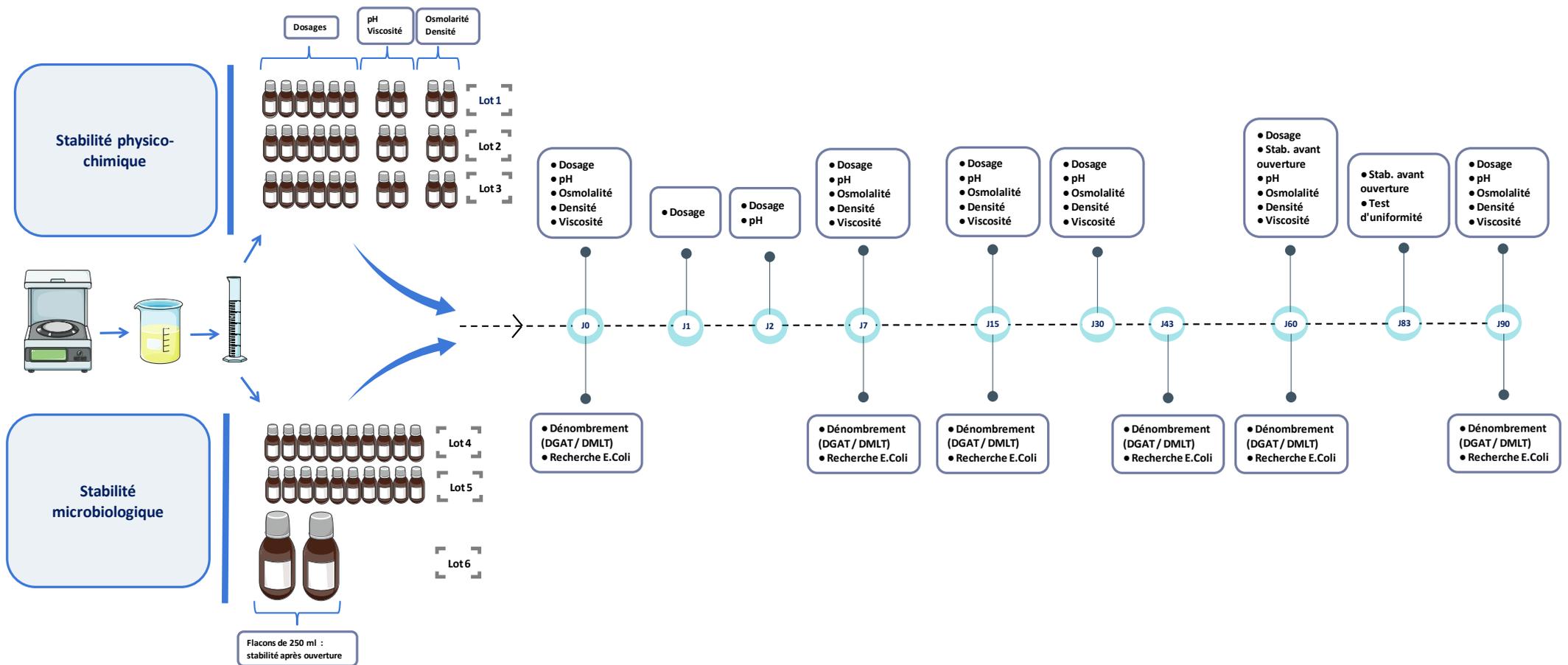


Figure 21 : Profil général de l'étude de stabilité

### **1. Formulation galénique et procédé de fabrication**

#### ***1.1. Choix de la concentration et du conditionnement***

La posologie moyenne prescrite sur 3 ans est de 5 mg. Le recensement des modalités d'administration des formes orales liquides dans les services de pédiatrie a montré que le volume minimal administrable est de 0,5 ml.

Afin de couvrir la large plage des dosages prescrits, nous avons choisi une concentration de 2 mg/ml. Les posologies étant prescrites en mg/kg, l'utilisation d'une forme buvable oblige le personnel infirmier à effectuer un calcul pour déterminer le volume à administrer. Une seule concentration a donc été étudiée afin de limiter le risque d'erreur. Nous avons choisi de conditionner la forme buvable dans des flacons de 60 ml en verre teinté afin de protéger le principe actif de la lumière (verre de type III, verre sodocalcique). Le volume de chaque flacon a été fixé à 50 ml.

#### ***1.2. Excipients disponibles***

L'analyse des caractéristiques physico-chimiques et de la composition des véhicules est représentée dans le tableau 8.

La gamme Ora-Blend® SF présente une osmolalité élevée par rapport aux autres gammes, pouvant entraîner des risques de diarrhées (109).

Le Syrspend® SF liquide est beaucoup plus visqueux que les autres véhicules. Cette propriété peut être intéressante pour éviter la sédimentation du principe actif dans le cas d'une suspension. Néanmoins, la forme liquide obtenue peut être plus difficile à prélever.

Les 3 véhicules possèdent un pH acide. Comme nous l'avons vu précédemment, la nicardipine est plus soluble et plus stable en milieu acide.

Certains excipients à effet notoire déclarés par l'ANSM sont présents dans la composition des véhicules :

○ Parabenzoates et leurs esters : les dérivés méthylés et propylés sont utilisés comme conservateurs dans l'Ora-Blend® SF; ils sont identifiés comme potentiellement perturbateurs endocriniens, et provoquent des réactions allergiques.

- Acide benzoïque et benzoates : le benzoate de sodium est utilisé comme conservateur dans le Syrspend® SF liquide. Il peut être à l'origine d'ictère nucléaire chez le nouveau-né du fait de sa fixation à l'albumine.
- Glycérol : il est utilisé comme anti cristallisant dans l'Ora-Blend® SF et l'Inorpha®. Cet excipient peut être responsable de maux de tête, et troubles digestifs.
- Sorbitol : employé comme édulcorant dans l'Ora-Blend® SF, il est métabolisé en fructose et galactose et représente donc une contre-indication en cas d'intolérance au fructose. Il possède de plus un léger effet laxatif (diarrhée osmotique).

Tableau 8 : Composition et caractéristiques physico-chimiques des différents véhicules

Véhicule	InOrpha®	OraBlend® SF	Syrspend® SF liquide
Conditionnement	Flacon de 1L	Flacon de 473 mL	Flacon de 450 mL
Qualification	Excipient liquide	Véhicule de suspension	Véhicule de suspension
Conservation	3 mois après ouverture	2 mois après ouverture	1 an après ouverture
<b>Composition</b>			
Nombre de composants	9	16	9
Phase liquide	Eau purifiée	Eau purifiée	Eau purifiée
Agents épaississants	Hydroxyéthylcellulose	Cellulose microcristalline, carboxyméthylcellulose sodique, gomme xanthane, carragheenan	Amidon de maïs modifié
Anticristallisation	Glycérol	Glycérol	
Edulcorant	Sucralose	Sorbitol, sucrose	Sucralose
Agent masquant l'amertume	oui		
Aromatisant	Arome caramel	Arome citron agrume	Arome cerise
Agent tampon	Acide citrique, citrate de sodium	Acide citrique, citrate de sodium, phosphate de sodium	Acide citrique, citrate de sodium, acide malique
Agent anti mousse		Simeticone	Simeticone
Conservateur	Sorbate de potassium	Sorbate de potassium, methylparaben, propylparaben	Benzoate de sodium
pH	4,2 - 5,0	4,0 - 5,0	4,0 - 5,0
Osmolalité	170 mOsm/Kg	1073 mOsm/Kg	< 50 mOsm/kg
Viscosité	≈ 100 mPa.s	≈ 1000 mPa.s	3000 - 6000 mPa.s
Densité	1,007	1,018 - 1,058	1,016 - 1,019

### **1.3. Etudes de pré-formulation**

Avec l'Ora-Blend® SF, une agrégation du principe actif a été observée avec formation de sédiments grossiers et difficilement dispersables (figure 22). Des suspensions beaucoup plus homogènes étaient obtenues avec l'Inorpha® et le Syrspend® SF.

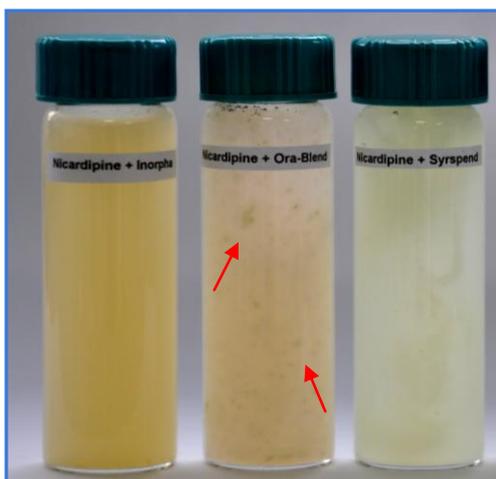


Figure 22 : Echantillons des formulations obtenues avec l'Inorpha<sup>®</sup>, Ora -Blend<sup>®</sup> SF, Syrspend<sup>®</sup> SF liquide lors des tests de pré-formulation

Cependant, la viscosité trop importante de ce dernier ne permet pas l'échantillonnage et la fabrication en lots. Il était également difficile à prélever. De plus, le Syrspend<sup>®</sup> SF est insoluble dans le méthanol ce qui compliquait le processus futur de dosage.

Comme vu précédemment, l'Inorpha<sup>®</sup> se caractérise par sa formule épurée au maximum, sans sorbitol ni parabènes, sans sucre, contenant un tampon acide et un agent masquant d'amertume. Pour les enfants, il existe donc un risque théorique plus faible de réactions indésirables avec ce véhicule.

De part ces caractéristiques et au vu des résultats obtenus sur les tests de pré-formulations, l'Inorpha<sup>®</sup> a été retenu comme véhicule pour la formulation.

Cependant, après 24 h, l'examen des flacons a montré une sédimentation importante du principe actif avec la formation d'un sédiment défloculé (figure 23).



Figure 23 : Sédiment observé après 24 heures de conservation dans l'Inorpha<sup>®</sup>

La nicardipine est un composé de classe II BCS. Parmi les méthodes permettant d'augmenter la solubilité des substances actives BCS II, l'utilisation de tensioactifs est recommandée (30). A faible concentration, ces agents de solubilisation ou agents mouillants permettent, en diminuant la tension superficielle, un plus grand étalement du liquide. Ils permettent également de ralentir la vitesse de sédimentation. Pour une utilisation par voie orale, le polysorbate 80 peut être utilisé dans une proportion de 1 à 15 % (110) dans la formulation. Plusieurs études ont utilisé cette stratégie pour solubiliser le principe actif dans des formes orales liquides pédiatriques (111–114). Nous avons donc choisi d'ajouter 1% de polysorbate 80 (réf: 90056-100, 100 ml, Inresa Pharma, Bartenheim, France) à notre formulation. Après homogénéisation, nous avons obtenu une solution limpide ayant pris la couleur de la nicardipine (jaune) et ne présentant aucune particule visible (figure 24).

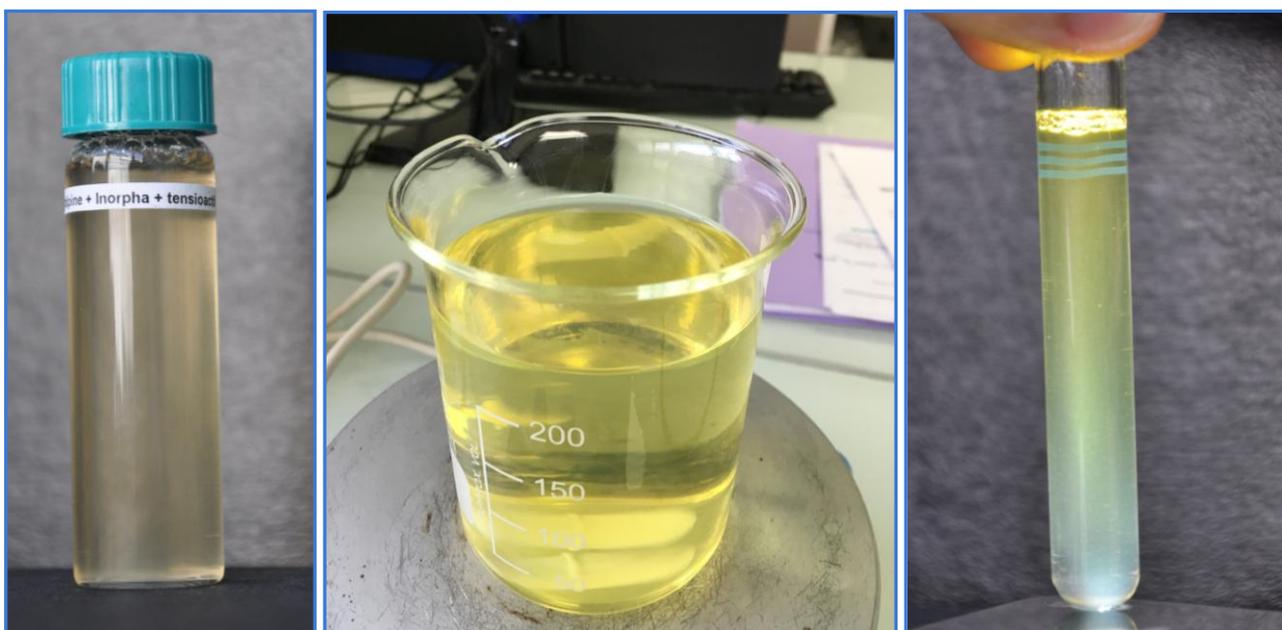


Figure 24 : Formulations obtenues après ajout de polysorbate 80

Nous avons fait des essais sur l'ordre d'ajout des différentes matières premières. La nicardipine ne se solubilise que lorsqu'elle est ajoutée sur le liquide et pas l'inverse.

Les flacons fabriqués ne présentaient pas de sédimentation après plusieurs semaines de stockage à température ambiante. Des tests supplémentaires ont été réalisés :

- Un examen des solutions au microscope optique (*Leitz Diaplan 10x/18*) a été effectué. Avant l'ajout de polysorbate 80, on observe des cristaux de taille moyenne de 4  $\mu\text{m}$ .

Après l'ajout de 1% de polysorbate aucun cristal n'était visible pour la limite de résolution de l'appareil (0,2  $\mu\text{m}$ ) (figure 25).

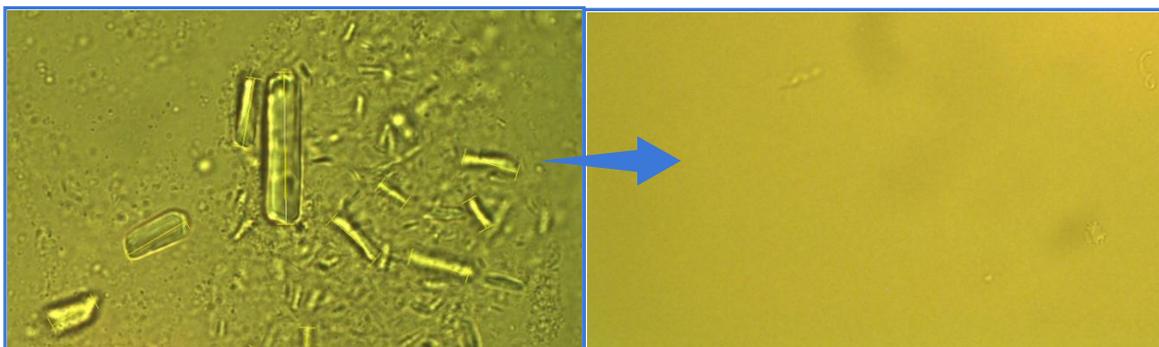


Figure 25 : Examen des formulation au microscope optique avant et après ajout de polysorbate (Microscope Leitz Diaplan, objectif x 40)

- La centrifugation de 10 ml de la solution obtenue, à 3000 tours/minutes pendant 10 minutes, n'a fait apparaître aucun changement d'aspect ni aucun sédiment ou précipité.
- Le chauffage de la solution au bain marie pendant 15 minutes à 60°C puis à 80°C n'a entraîné aucun changement macroscopique de la solution.

#### **1.4. Formulation**

A partir de ces résultats, la formulation retenue a été appliquée sur des quantités de nicardipine permettant la fabrication d'un lot de 10 flacons de 50 ml.

La poudre de nicardipine est ajoutée à une solution aqueuse de polysorbate 80 préalablement préparée dans un bécher de 200 ml. Après quelques minutes d'agitation à l'abri de la lumière, 200 ml d'Inorpha® sont ajoutés. La solution est laissée sous agitation jusqu'à dissolution complète. Puis, elle est transférée dans une éprouvette graduée de 500 ml. Après agitation pour homogénéisation, la solution est échantillonnée dans 10 flacons bruns de 60 ml à raison de 50 ml par flacon.

Le procédé de fabrication est illustré dans la figure 26. La formule retenue est précisée dans le tableau 9.

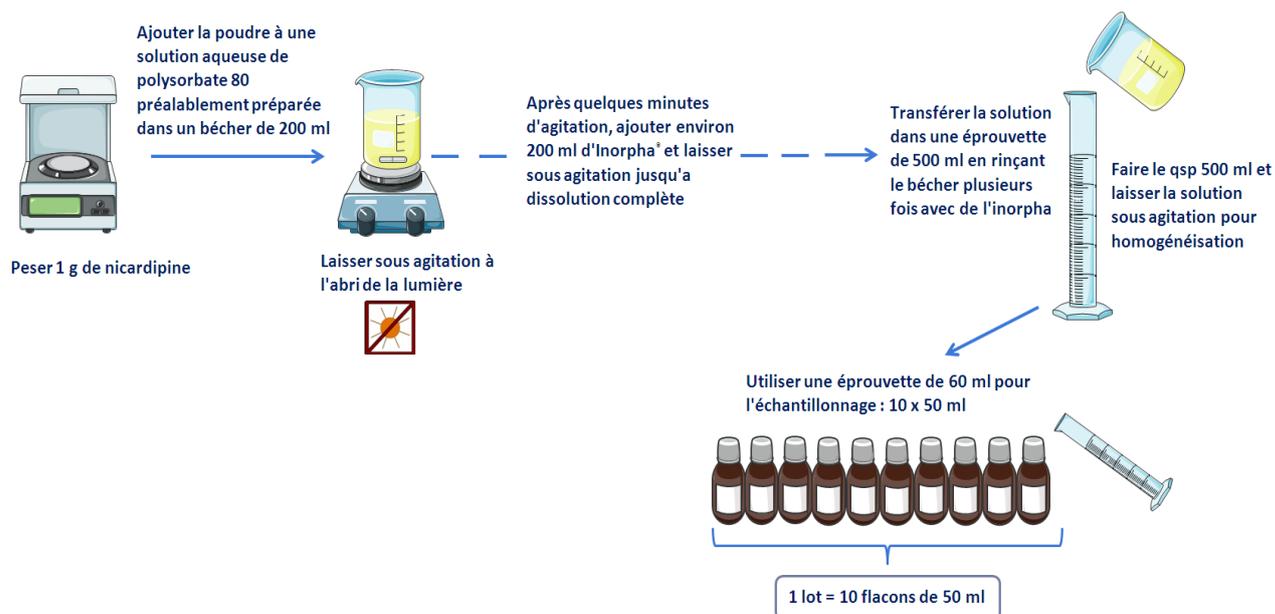


Figure 26 : Procédé de fabrication d'un lot de 10 flacons de solution buvable de nicardipine (2 mg/ml)

Tableau 9 : Formule retenue pour la fabrication d'un lot de 10 flacons de solution buvable de nicardipine (2 mg/ml)

Matières premières	Quantité
Poudre de nicardipine chlorhydrate	1 gramme
Eau versable stérile	35 grammes (35 millilitres)
Polysorbate 80	5 grammes (4,5 millilitres)
Inorpha®	Q.S.P 500 millilitres

Les solutions obtenues sont de couleur jaune et limpide. Aucune particule n'est visible à l'œil. Les tests réalisés lors de l'étape de pré-formulation ont été réitérés. La centrifugation et le chauffage des solutions ne laissent apparaître aucun dépôt ou sédiment.

## 2. Validation du dosage de la nicardipine

### 2.1. Spécificité

#### ▪ Effet matrice :

○ L'injection d'échantillons de solution buvable sans principe actif et dilués de façon équivalente à la préparation future des dosages n'a pas montré d'interférence chromatographique au temps de rétention de la nicardipine (figure 27).

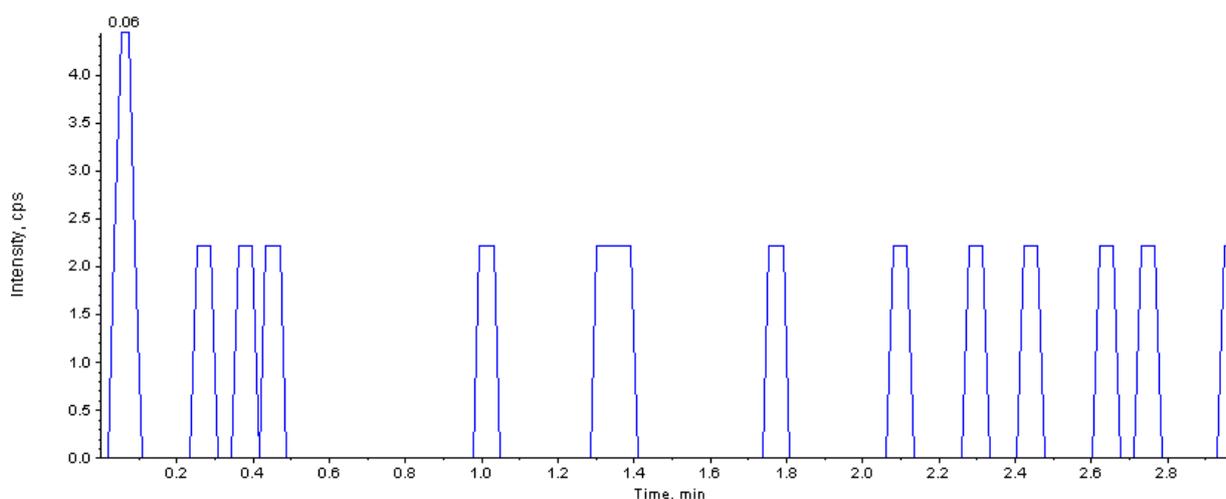


Figure 27 : Chromatogramme des échantillons de solution buvable sans principe actif

○ Le test de comparaison des variances a montré qu'il n'y avait pas de différence significative entre les variances des deux groupes (avec et sans matrice) ( $p=0,88$ ). Le test de Student (variances égales) a montré qu'il n'y avait pas de différence significative entre les moyennes des pentes des deux groupes ( $p=0,42$ ). Les résultats sont présentés en annexe 3.

Il n'y a donc pas d'effet matrice : la matrice (excipient) ne modifie pas le signal en présence du médicament à doser. On pourra donc s'affranchir de la matrice pour la préparation des standards de calibration lors de la validation.

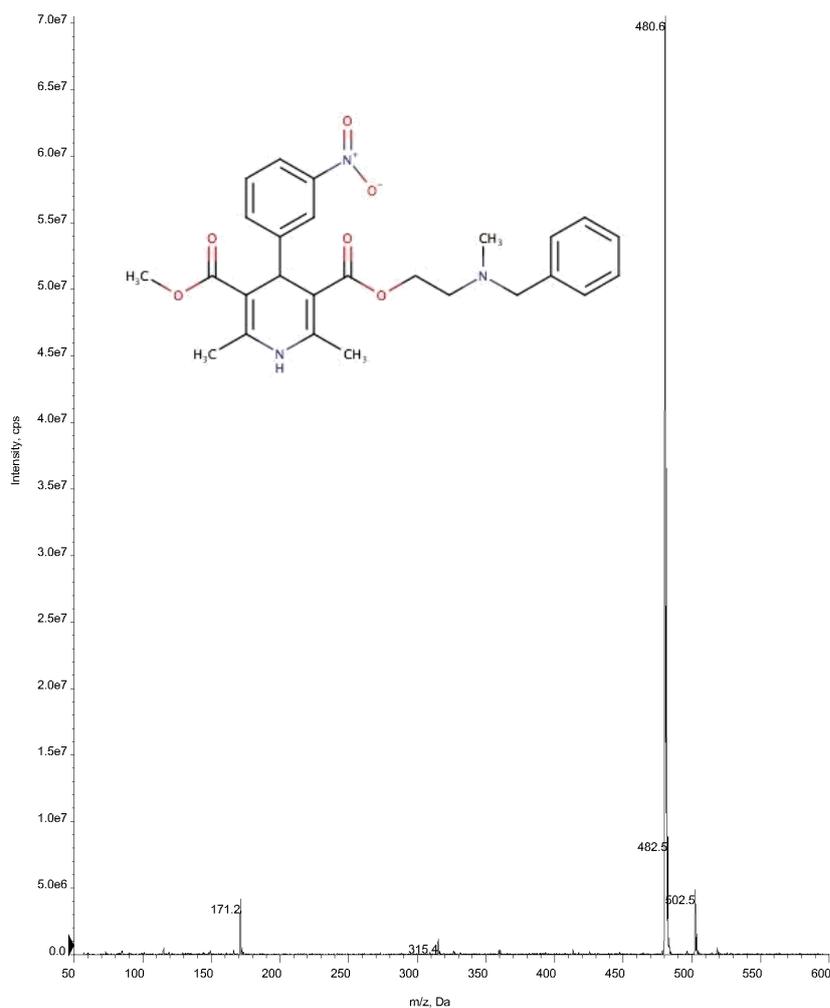
La comparaison des ordonnées à l'origine n'a pas montré de différence significative ( $p=0,73$ ) entre les deux groupes démontrant l'absence d'erreur systématique lors de la préparation.

▪ **Dégradation forcée :**

Sept produits de dégradation décrits dans la littérature ont été retrouvés suite à la dégradation forcée de notre formulation.

○ **Photodégradation :**

La figure 28 montre le spectre de masse de la nicardipine non dégradée (dans du MeOH/H<sub>2</sub>O).

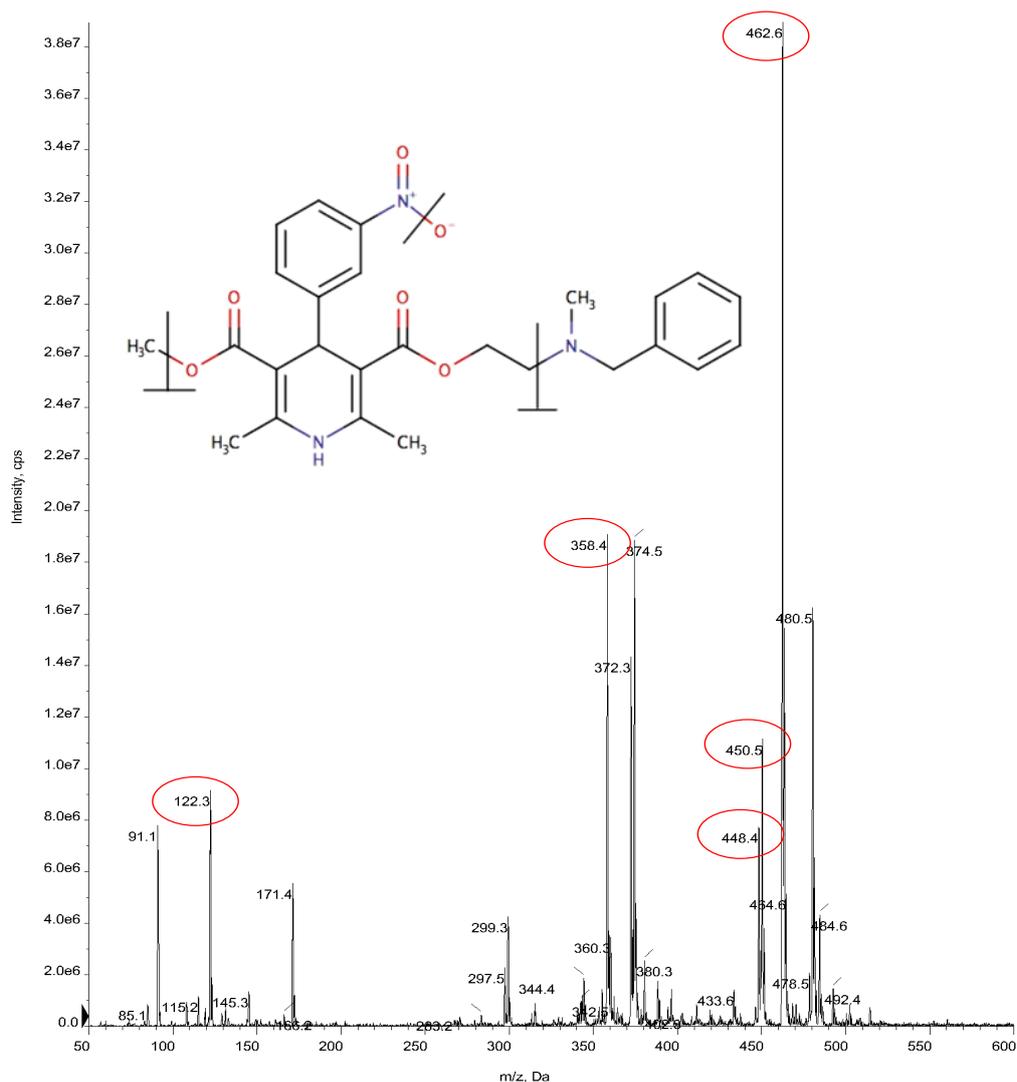


**Figure 28 : Spectre de masse de la nicardipine non dégradée**

L'ion majoritaire obtenu correspond à l'ion  $[M+H]^+$  de la nicardipine (479 + 1). Le spectre à 502 Da correspond à l'adduit sodium  $[M+adduit+H]^+$  formé en raison de la méthode d'ionisation (479+22+1).

En annexe 4 figurent les spectres de masse obtenus après infusion de solvant dégradé et non dégradé. Ces spectres ont servi de comparateurs pour distinguer les véritables produits issus de la dégradation de la nicardipine.

Comme toutes les dihydropyridines, la nicardipine s'est montrée très sensible à la lumière. Après 6 heures d'exposition, 5 produits de dégradation ont pu être identifiés. Le spectre de masse issu de la photodégradation est représenté sur la figure 29.



**Figure 29 : Spectre de masse de la nicardipine dégradée après 6 heures d'exposition à la lumière**

La nicardipine a été dégradée à un taux de 73 % par rapport à la valeur initiale.

En 1992, Bonferoni et al. avaient identifié comme principal photo-produit, un composé de masse moléculaire de 477 Da ( $[M+H]^+ : 478$ ). Ce dernier est formé par la conversion de l'anneau dihydropyridine en un cycle pyridine par perte de 2 H<sup>+</sup> (figure 30).

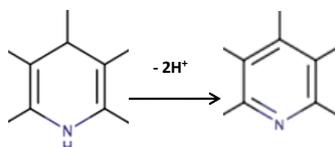
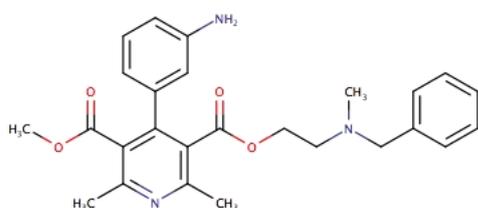


Figure 30 : Conversion de l'anneau dihydropyridine en un cycle pyridine

Ce composé n'est retrouvé qu'en faible quantité dans notre échantillon dégradé. En effet, Chen et al. en 2008 ont montré que ce produit intermédiaire donnait par réduction progressive d'autres produits de dégradation. Ceux ci ont été retrouvés et pour la plupart d'entre eux, un changement structurel commun a été observé par l'oxydation de l'anneau dihydropyridinique. D'autres modifications, comme l'hydrolyse des groupements esters en positions 3 et/ou 5 du noyau dihydropyridinique et une réduction du groupement nitro au niveau du cycle phényle par les radicaux hydrogènes, peuvent être suggérées.

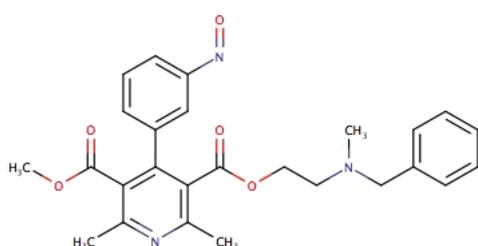
Les produits de dégradation identifiés sont les suivants :

• Produit de dégradation 1 :



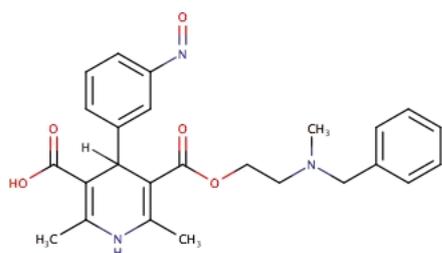
m/z : 448,5

• Produit de dégradation 2 :



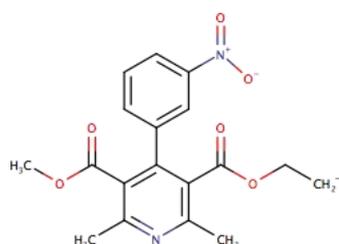
m/z : 462,6

• Produit de dégradation 3 :



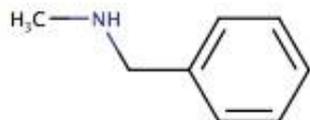
m/z: 450,5

• Produit de dégradation 4 :



m/z : 358,5

• Produit de dégradation 5 :



m/z : 122,4

L'infusion directe dans la masse des échantillons dégradés a permis de déterminer les transitions MRM de chaque produit de dégradation (tableau 10)

Tableau 10 : Transitions MRM des produits issus de la dégradation à la lumière

Nom	Ion père	Ion fils
Produit de dégradation 1	448,5	297
Produit de dégradation 2	462,6	91,2
Produit de dégradation 3	450,5	299,1
Produit de dégradation 4	358,5	297
Produit de dégradation 5	122,4	91,1

○ Dégradation acido-basique :

Les spectres de masse obtenus suite à la dégradation acido-basique ont montré de nombreuses interférences, probablement dues aux solutions d'acides et de bases utilisées.

La figure 31 illustre le spectre de masse de la nicardipine non dégradée en présence d'HCl et de NaOH (préalablement neutralisés).

Malgré ces interférences, deux produits issus de la dégradation de la nicardipine en milieu alcalin ont pu être retrouvés. Ces composés étaient également retrouvés dans la littérature. En milieu acide, aucun produit de dégradation n'a été retrouvé.

Le spectre de masse obtenu suite à la dégradation en milieu basique est représenté sur la figure 32.

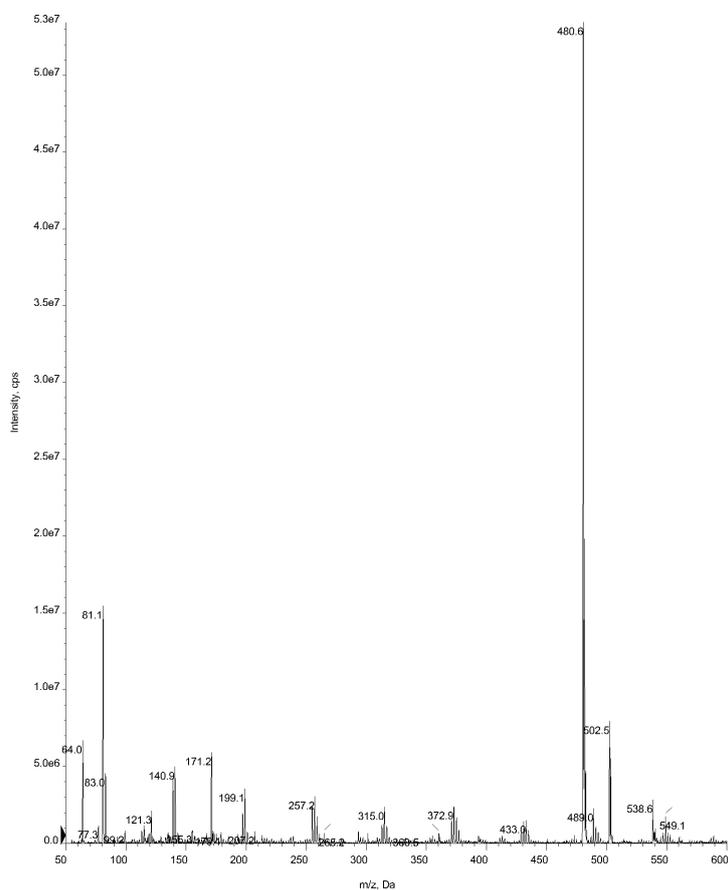


Figure 31 : Spectre de masse de la nicardipine non dégradée en présence d'HCl et de NaOH

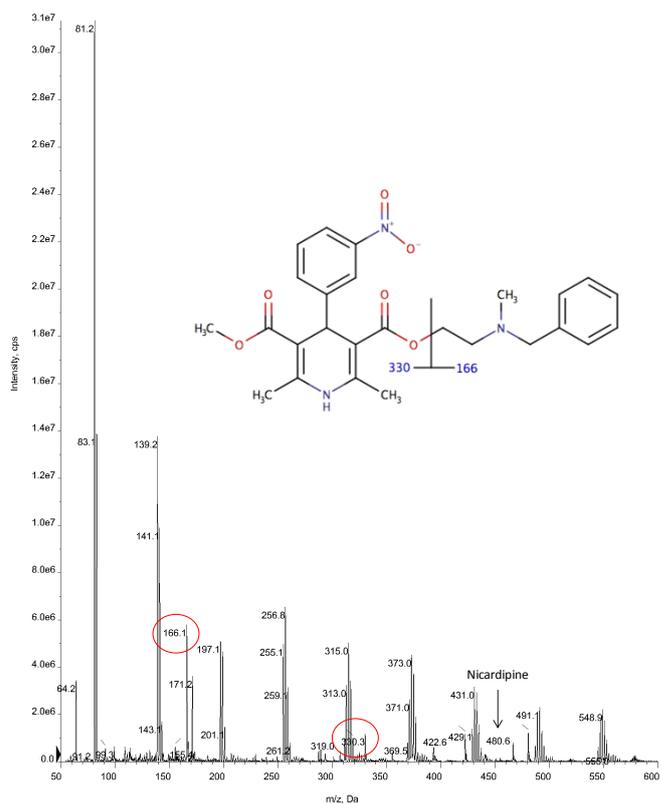


Figure 32 : Spectre de masse de la nicardipine dégradée en milieu alcalin

Le groupement ester en position 3 du noyau dihydropyridine est hydrolysé en milieu alcalin conduisant à la formation de deux produits de dégradation. La réaction proposée est la suivante (figure 33) :

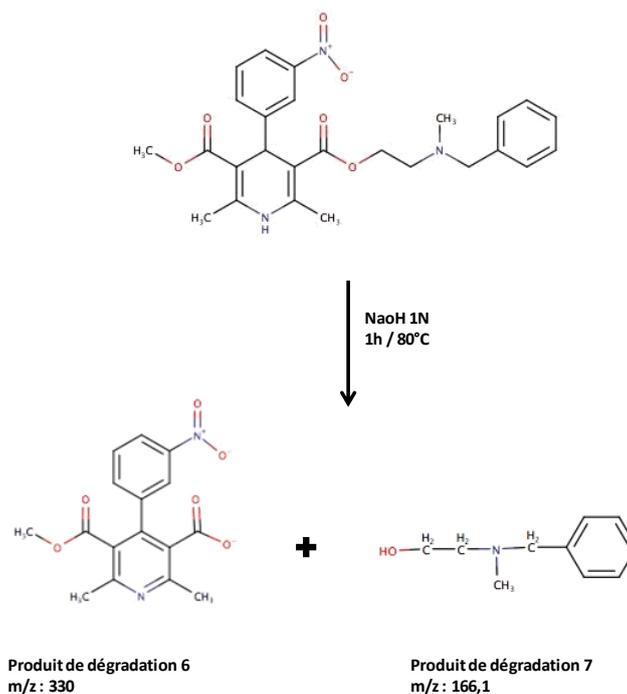


Figure 33 : Réaction proposée de la dégradation en milieu basique de la nicardipine

Les transitions MRM de ces deux produits sont les suivantes (tableau 11) :

Tableau 11 : Transitions MRM des produits issus de la dégradation en milieu alcalin

Nom	Ion père	Ion fils
Produit de dégradation 6	330	226,4
Produit de dégradation 7	166,1	91,2

○ *Dégradation oxydative :*

Trois heures après mise en contact à 100°C avec de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 6%, aucun produit de dégradation n'a été identifié et retrouvé (figure 34). Al-Ghannam et al. avaient retrouvé un produit issu de la dégradation oxydative présentant un poids moléculaire de 496. Ce composé n'a pas été retrouvé dans les échantillons dégradés.

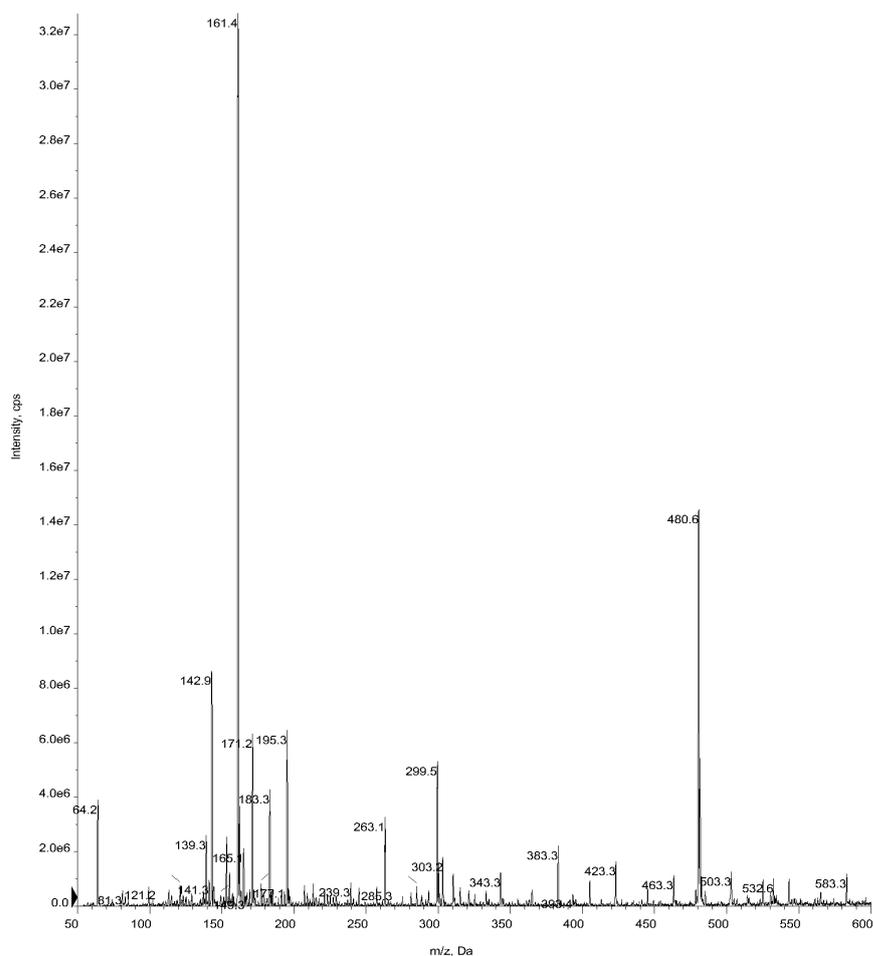


Figure 34 : Spectre de masse obtenu après contact à 100°C avec de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 6%

## 2.2. Fonction de réponse

Cette étape constitue l'une des plus importantes du fait que la fiabilité des résultats de validation qui seront obtenus dépend du modèle de régression sélectionné. La fonction de réponse a été évaluée au moyen de six courbes de calibration construites à partir des standards de calibration et utilisant cinq niveaux de concentration (annexe 5). Ensuite, plusieurs modèles de régression ont été ajustés en vue d'analyser la relation entre la concentration en nicardipine (ng/mL) et la réponse analytique (ratio entre les surfaces du pic de nicardipine et celui de l'étalon interne) et de décider lequel est le plus approprié.

Les concentrations des standards de validation ont été calculées à partir de chaque courbe obtenue, ce qui a permis d'obtenir pour chaque niveau de concentration le biais relatif moyen, les limites de tolérance supérieures et inférieures des valeurs attendues au niveau  $\beta$  et ce, en considérant l'écart-type pour la fidélité intermédiaire. Ensuite, différents profils d'exactitude ont été construits à partir de ces données. Après avoir essayé trois types de régression (droite passant par l'origine, linéaire, quadratique) et deux facteurs de pondération (non pondéré ou  $1/x$ ), un modèle de régression linéaire pondérée ( $1/x$ ) a été retenu. Avec des limites d'acceptation fixées à  $\pm 5\%$  et un niveau de risque maximal de 5%, le profil d'exactitude obtenu avec ce modèle de régression n'exécède pas les limites d'acceptation (figure 35).

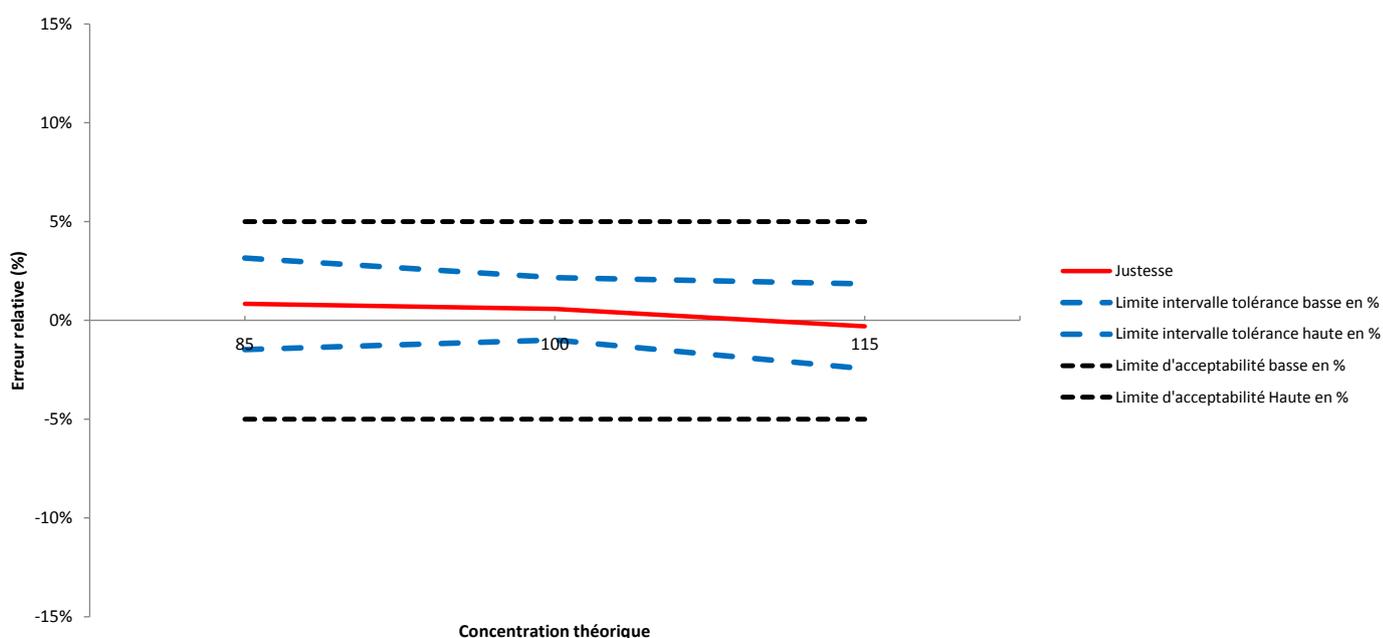


Figure 35 : Profil d'exactitude obtenu en considérant une régression linéaire pondérée ( $1/X$ )

En conséquence, nous avons sélectionné ce modèle de régression qui d'une part, rencontre les objectifs de la méthode et d'autre part, correspond à l'utilisation en analyse de routine. Ce modèle a été ainsi utilisé pour évaluer les différents critères de validation. De plus, il garantit que 95 fois sur 100 les futures mesures seront incluses dans les limites d'acceptation. Les autres modèles de régression présentent des résultats acceptables, où le profil d'exactitude n'excède pas les limites d'acceptation, mais des erreurs relatives et des biais plus importants sont observés (figure 36 et 37).

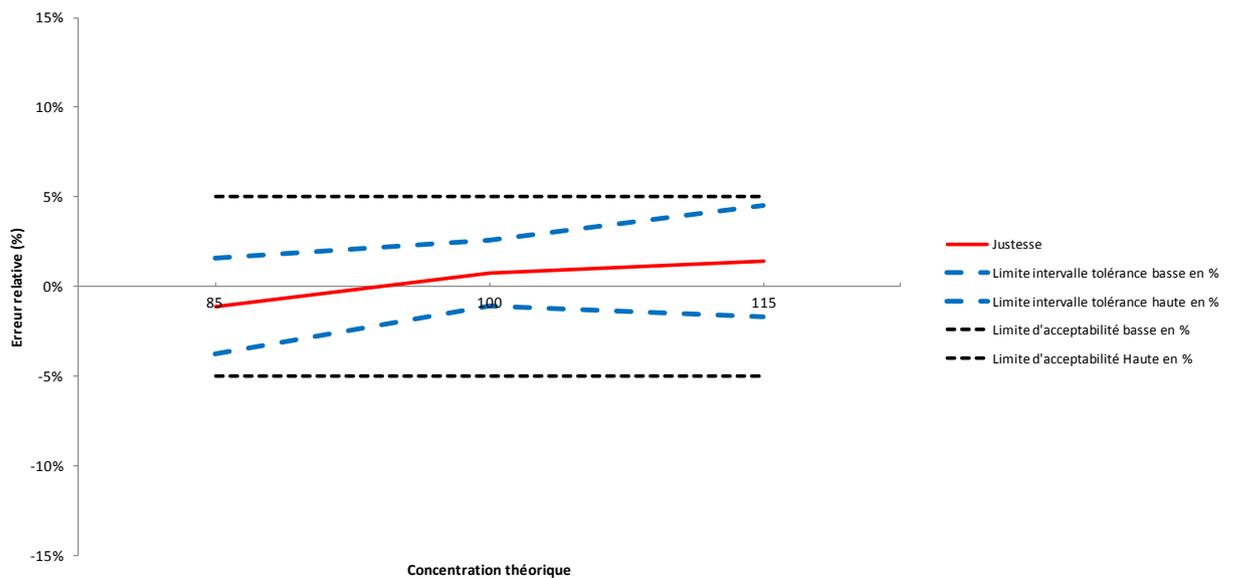


Figure 36 : Profil d'exactitude obtenu en considérant une régression linéaire passant par l'origine pondérée ( $1/X$ )

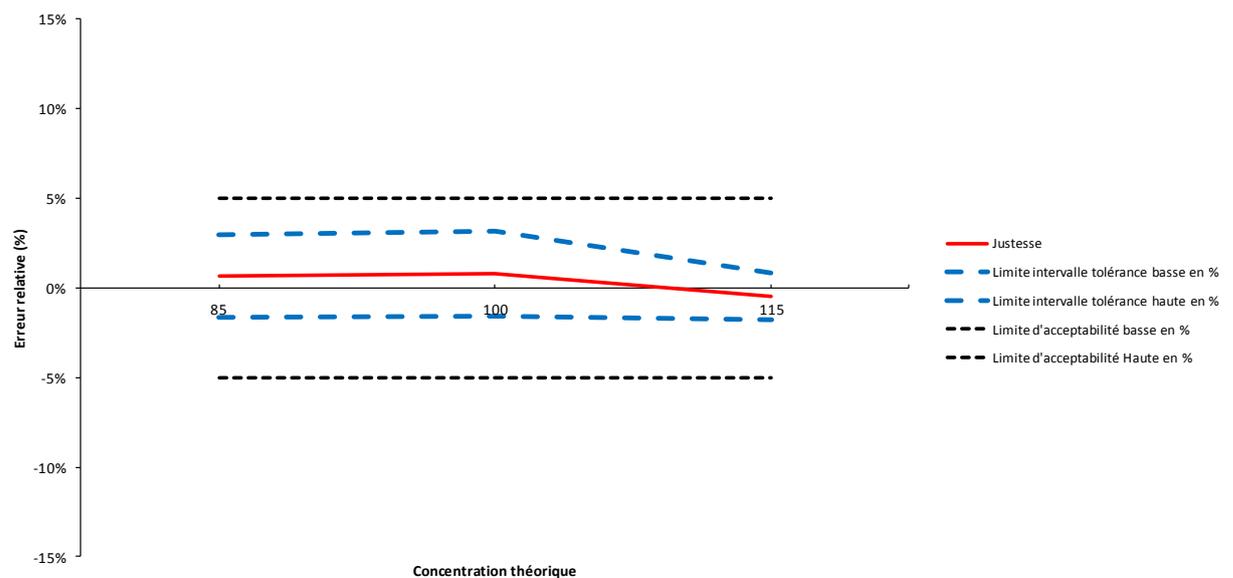


Figure 37 : Profil d'exactitude obtenu en considérant une régression quadratique pondérée ( $1/X$ )

### 2.3. Justesse

La justesse, qui fournit une indication sur les erreurs systématiques de la procédure analytique, a été estimée au moyen des standards de validation à trois niveaux de concentration (annexe 6). Elle est exprimée en termes de biais relatif (%). Les biais de la méthode développée ont été trouvés acceptables puisqu'ils sont relativement proches de zéro et que les recouvrement sont compris entre 99,7 et 100,8 % (tableau 12).

Tableau 12 : Justesse de la méthode

Niveaux de concentration (p = 6)	Biais absolu : ng / ml	Biais relatif (%)	Recouvrement (%)
85 ng / ml	0,712	0,84%	100,8%
100 ng / ml	0,581	0,58%	100,6%
115 ng / ml	-0,345	-0,30%	99,7%

### 2.4. Fidélité

La fidélité, qui fournit une indication sur les erreurs dues au hasard, a été estimée en calculant la répétabilité et la fidélité intermédiaire à chaque niveau de concentration utilisé en validation (annexe 6).

Les coefficients de variation de répétabilité qui reflètent la fidélité intra-jour pour chaque niveau de concentration ne dépassent pas 0,7%. Pour la fidélité intermédiaire qui reflète la fidélité inter-jour, les coefficients de variation ne dépassent pas 0,87%. Ces résultats démontrent une fidélité très satisfaisante de la méthode développée (Tableau 13).

Tableau 13 : Fidélité de la méthode

Niveaux de concentration (p = 6)	Répétabilité (coefficients de variation %)	Fidélité intermédiaire (coefficients de variation %)
85 ng / ml	0,4	0,9
100 ng / ml	0,6	0,7
115 ng / ml	0,5	0,8

## 2.5. Exactitude

L'exactitude de la méthode est représentée à partir du profil illustré figure 37. Au vu des résultats présentés dans le tableau, la méthode proposée est exacte étant donné qu'à chaque niveau de concentration, les différentes limites de tolérance des résultats restent incluses dans les limites d'acceptation de  $\pm 5\%$  (tableau 14).

Tableau 14 : Exactitude de la méthode

Niveaux de concentration (p = 6)	Limites de tolérance (en ng / ml)	Limites de tolérance (en %)
85 ng / ml	[83,74 ; 87,68]	[-1,48 ; 3,16]
100 ng / ml	[98,99 ; 102,16]	[-1 ; 2,16]
115 ng / ml	[112,18 ; 117,12]	[-2,44 ; 1,85]

## 2.6. Linéarité

La linéarité d'une procédure analytique est sa capacité à obtenir, à l'intérieur d'un certain intervalle de dosage, des résultats (et non des signaux) directement proportionnels à la concentration (quantité) de la substance à examiner dans l'échantillon (104). Pour toutes les séries (jours) de validation, une droite de régression a été ajustée sur les concentrations calculées par rapport aux concentrations introduites en appliquant le modèle de régression linéaire pour lequel le coefficient de détermination ( $r^2$ ), la pente et l'ordonnée à l'origine sont présentés dans le tableau 15.

Tableau 15 : Résultats de la linéarité de la méthode

<b>n = 2 répétition sauf à j1 où n = 6</b>	<b>Intervalle de dosage 85 - 115</b>
<b>m = 3 niveaux de concentration</b>	<b>Pente 0,9648</b>
<b>p = 6 séries (jours)</b>	<b>Ordonnée à l'origine 3,8387</b>
<b>N = 48 observations totales</b>	<b>r<sup>2</sup> 0,9957</b>

La linéarité est exprimée par le coefficient de corrélation  $r^2$  qui doit être le plus proche possible de 1. D'après la commission SFSTP le  $r^2$  doit être au moins supérieur à 0,9900. La linéarité de notre méthode est donc suffisante ( $r^2 = 0,9957$ ).

Une autre approche basée sur les limites de tolérance absolues peut être appliquée pour vérifier la linéarité de la méthode. Pour qu'une droite de régression soit démontrée linéaire, il faudrait que les limites de tolérance absolues soient comprises dans les limites d'acceptation prédéfinies. Puisque les limites de tolérance absolues telles qu'illustrées dans la figure 38 sont comprises dans les limites d'acceptation de  $\pm 5\%$ , la linéarité de la méthode développée est ainsi démontrée.

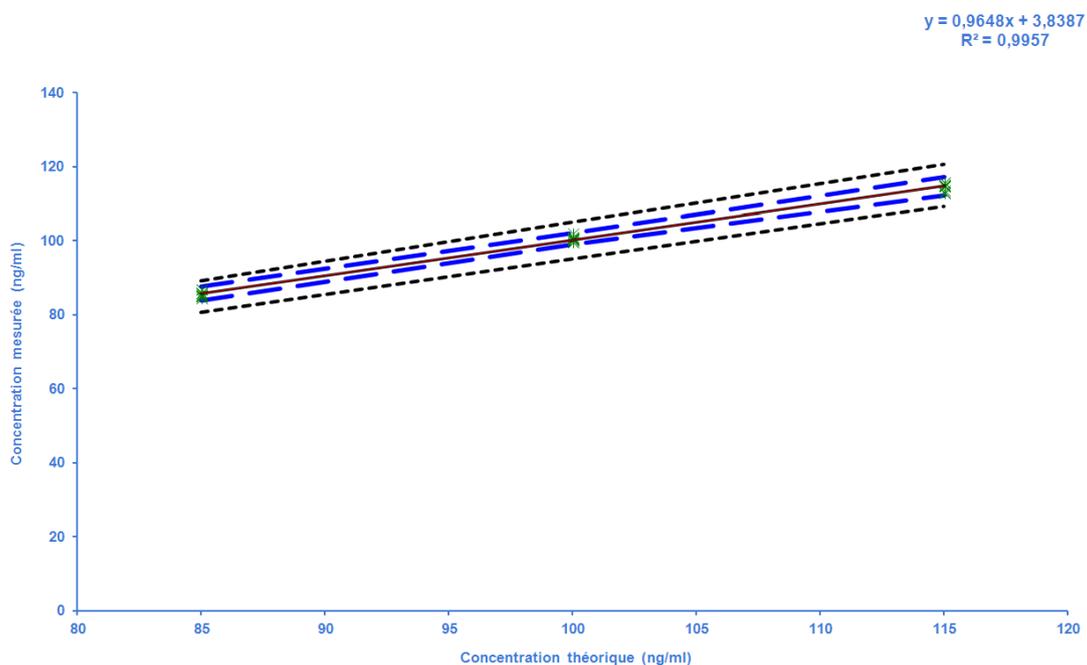


Figure 38 : Graphique de la linéarité se rapportant à la méthode HPLC-MS/MS pour le dosage de la nicardipine

**Légendes :** La ligne continue est la droite d'identité ( $y = x$ ) sur laquelle les points devraient se retrouver dans le cas d'une méthode validée. Les lignes en traits bleus correspondent au profil d'exactitude, par exemple, les limites de tolérance exprimées en valeur absolue, et les lignes pointillées en noir représentent les limites d'acceptation.

## ***2.7. Limite de détection et de quantification***

La LD a été estimée en utilisant l'ordonnée à l'origine moyenne du modèle de calibration et l'écart-type résiduel de la régression. En appliquant cette méthode de calcul, la LD de la méthode vaut 1,107 ng/ml.

La LQ a été obtenue en calculant la plus petite concentration en dessous de laquelle les limites d'exactitude ou les limites de tolérance sont en dehors des limites d'acceptation. Etant donné que le profil d'exactitude obtenu, en considérant le modèle de régression sélectionné, est inclus dans les limites d'acceptation, le premier niveau de concentration (85 ng/ml) qui est le niveau le plus bas investigué correspond à la limite de quantification.

## 2.8. Profil de risque

Le profil de risque exprime par niveau de concentration investigué, la probabilité pour que le résultat d'une mesure effectuée en analyse de routine puisse tomber en dehors des limites d'acceptation, en considérant le biais estimé ainsi que les paramètres de précision obtenus en phase de validation.

Dans le domaine de validation des procédures analytiques, la notion de la gestion du risque au moyen d'un profil de risque peut être utilisé. Il permet de contrôler le risque du futur utilisateur à l'aide de critères adéquats obtenus en validation (erreur systématique et erreur aléatoire).

Lorsque plusieurs déterminations sont envisagées en analyse de routine, le risque exprime la proportion des mesures qui sont susceptibles d'être en dehors des limites d'acceptation si toutes les conditions demeurent équivalentes, par exemple aucun changement n'apparaît dans la procédure analytique. Nous avons donc investigué le profil de risque à chaque niveau de concentration utilisé en validation (Figure 39).

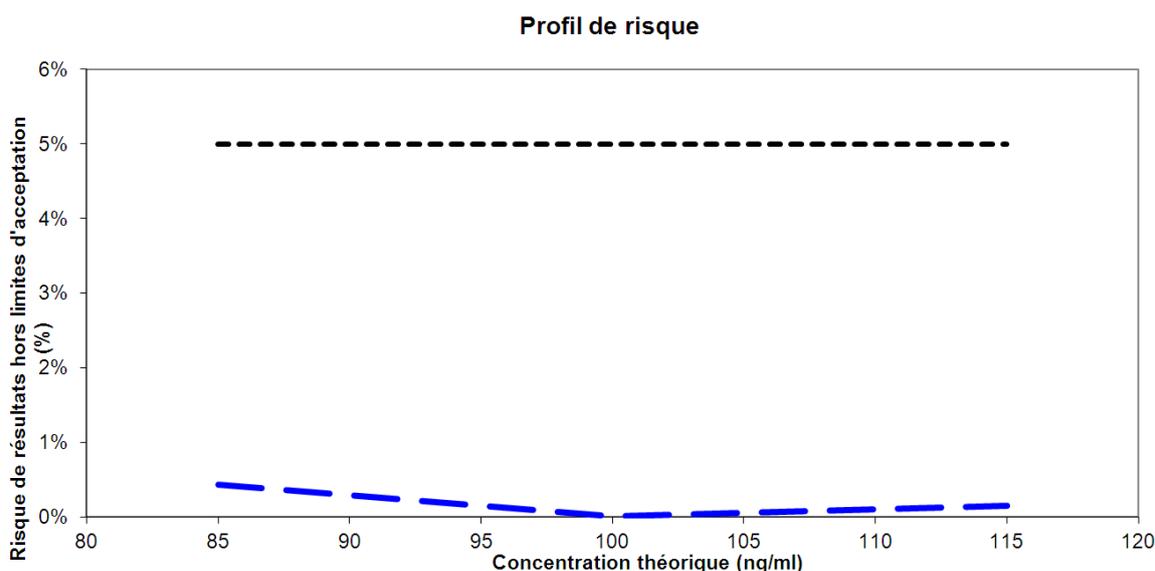


Figure 39 : Profil de risque obtenu en considérant le modèle de régression linéaire pondérée en  $1/X$  avec un niveau de risque fixé à priori à 5%.

Comme le montre la figure, le risque d'avoir des mesures futures en dehors des limites d'acceptation de 5 % est pratiquement nul au niveau de concentration de 100 ng/mL (0,01%) alors que ce risque augmente aux concentrations de 85 ng/ml (0,43%) et 115 ng/ml (0,15%) en considérant le modèle de régression linéaire pondéré. Dans tous les cas, les risques ne dépassent pas 5 %, confortant ainsi la justification de la sélection du modèle.

Les résultats principaux de la validation de la méthode sont repris sur le tableau 16.

Tableau 16 : Résultats principaux de la validation de la méthode

Fonction de réponse			
Modèle mathématique		Régression linéaire pondérée (1/x)	
Série	Pente	Ordonnée à l'origine	r <sup>2</sup>
1	0,0067	-0,0697	0,9986
2	0,0068	-0,0813	0,9989
3	0,0067	-0,075	0,9972
4	0,0069	-0,1113	0,9976
5	0,0067	-0,0895	0,9999
6	0,0058	-0,0107	0,9975
Justesse			
Concentration (ng / ml)	Biais (%)		
85 ng / ml	0,84%		
100 ng / ml	0,58%		
115 ng / ml	-0,30%		
Fidélité			
Concentration (ng / ml)	Répétabilité [CV %]	Fidélité intermédiaire [CV %]	
85 ng / ml	0,4	0,9	
100 ng / ml	0,6	0,7	
115 ng / ml	0,5	0,8	
Exactitude			
Concentration (ng / ml)	Limites de l'intervalle de tolérance au niveau β [%]		Risque
85 ng / ml	[-1,48 ; 3,16]		0,43%
100 ng / ml	[-1 ; 2,16]		0,01%
115 ng / ml	[-2,44 ; 1,85]		0,15%
Linéarité			
Pente	0,9648		
Ordonnée à l'origine	3,8387		
r <sup>2</sup>	0,9957		

### 3. Validation des méthodes pour l'étude de stabilité microbiologique

La dilution qui nous a permis d'obtenir un nombre d'UFC significatif est la dilution au 1/10<sup>ème</sup>.

Les échantillons contaminés, avec ou sans nicardipine, considérés comme témoins positifs ont montré une contamination microbiologique, ce qui signifie que ni la nicardipine, ni le conservateur (sorbate de potassium) contenus dans l'Inorpha® n'empêchent le développement des micro-organismes. La présence de colonies caractéristiques des germes introduits a montré que les milieux utilisés étaient appropriés pour l'étude de stabilité. L'absence de colonies sur les géloses coulées avec le témoin négatif (non contaminé et sans produit) a prouvé que la technique mise en œuvre était adaptée. La condition posée par Pharmacopée pour mener une étude bactériologique est donc respectée. Les résultats sont présentés dans le tableau 17.

Tableau 17 : Résultats de la validation des méthodes pour l'étude de stabilité microbiologique

	<b>Produit dilué au 1 / 10<sup>ème</sup></b>	<b>Témoin positif</b>	<b>Témoin Négatif</b>
<i>Staphylococcus aureus</i>	<b>+</b> moyenne = 20,5 UFC/ml	<b>+</b> moyenne = 24 UFC/ml	<b>-</b> moyenne = 0 UFC/ml
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<b>+</b> moyenne = 23 UFC/ml	<b>+</b> moyenne = 20 UFC/ml	<b>-</b> moyenne = 0 UFC/ml
<i>Bacillus subtilis</i>	<b>+</b> moyenne = 45 UFC/ml	<b>+</b> moyenne = 56,5 UFC/ml	<b>-</b> moyenne = 0 UFC/ml
<i>Candida albicans</i>	<b>+</b> moyenne = 21 UFC/ml	<b>+</b> moyenne = 18,5 UFC/ml	<b>-</b> moyenne = 0 UFC/ml
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	<b>+</b> moyenne = 32 UFC/ml	<b>+</b> moyenne = 34 UFC/ml	<b>-</b> moyenne = 0 UFC/ml
<i>Escherichia coli</i>	<b>+</b> Colonnies rouges caractéristiques	<b>+</b> Colonnies rouges caractéristiques	<b>-</b>

## 4. Etude de stabilité

L'Inorpha® possède une stabilité de 3 mois après ouverture. L'étude de stabilité s'est donc limitée à cette durée.

### 4.1. *Stabilité chimique*

Les échantillons prélevés ont été dilués et analysés selon la méthode précédemment validée.

A J0, la concentration moyenne en nicardipine des trois flacons qui seront conservés à 25°C est de  $97,47 \pm 1,86$  ng/ml, et de  $97,13 \pm 3,43$  ng/ml pour ceux conservés à 4°C.

Ces résultats mettent en évidence que chacun des lots a été correctement fabriqué et pourra être utilisé pour les dosages des jours suivants.

Les concentrations en nicardipine ont ensuite été mesurées aux différents temps d'analyse. Les résultats sont répertoriés dans les tableaux 18 et 19.

La figure 40 illustre l'évolution du pourcentage de nicardipine restant par rapport à la concentration initiale (100%) après conservation à température ambiante et à 4°C :

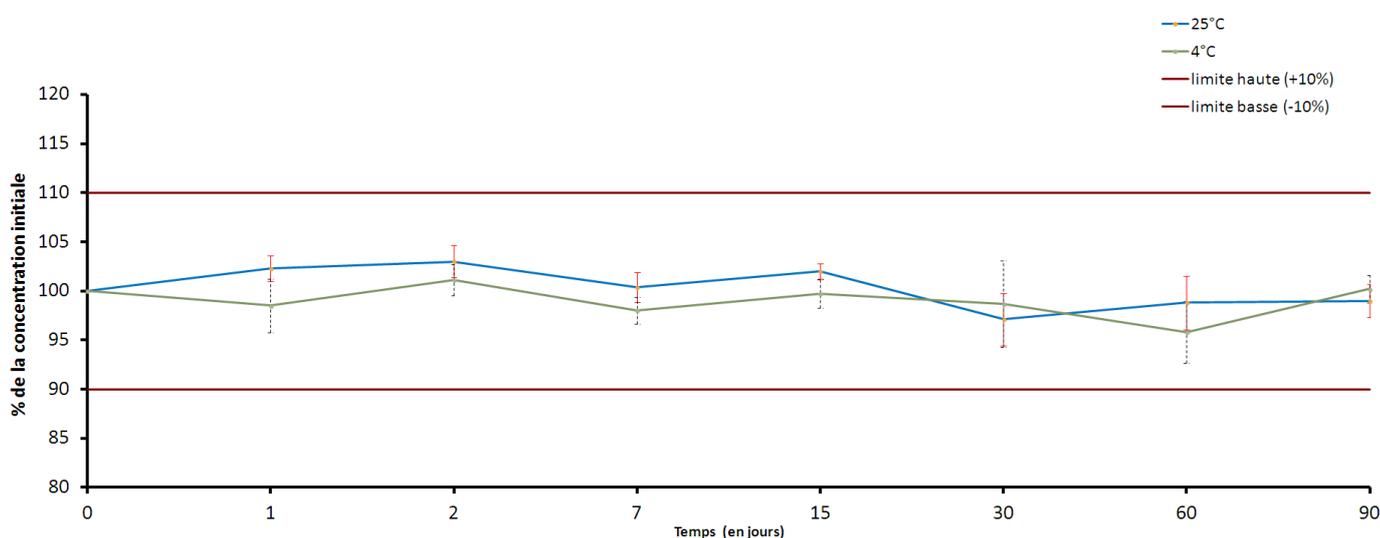


Figure 40 : Evolution de la concentration moyenne de nicardipine rapportée à la concentration initiale (en %) en fonction du temps et du mode de conservation

Les concentrations en nicardipine restent toujours dans les limites d'acceptabilité fixées à  $\pm 10\%$  de la valeur initiale. En considérant une limite acceptable de 90% de la

teneur initiale en nicardipine pour définir la stabilité, les solutions sont stables jusqu'à 3 mois avant et après ouverture, et aux deux températures de conservation.

Tableau 18 : Résultats de stabilité chimique de la nicardipine sur 90 jours à 25°C

J - 0				J - 1				J - 2				J - 7			
	Flacon 1 - Lot 1 25°C	Flacon 1 - Lot 2 25°C	Flacon 1 - Lot 3 25°C		Flacon 1 - Lot 1 25°C	Flacon 1 - Lot 2 25°C	Flacon 1 - Lot 3 25°C		Flacon 1 - Lot 1 25°C	Flacon 1 - Lot 2 25°C	Flacon 1 - Lot 3 25°C		Flacon 1 - Lot 1 25°C	Flacon 1 - Lot 2 25°C	Flacon 1 - Lot 3 25°C
Répétition 1 (ng/ml)	98,60	96,8	96,2	Répétition 1 (ng/ml)	96,00	100	100	Répétition 1 (ng/ml)	97,60	103	100	Répétition 1 (ng/ml)	93,60	97,8	97,5
Répétition 2 (ng/ml)	96,20	99,3	99	Répétition 2 (ng/ml)	97,30	97,7	102	Répétition 2 (ng/ml)	97,80	99,2	102	Répétition 2 (ng/ml)	94,60	94,8	100
Répétition 3 (ng/ml)	100,00	96,8	94,3	Répétition 3 (ng/ml)	96,00	99,2	97,5	Répétition 3 (ng/ml)	95,50	99,9	96,3	Répétition 3 (ng/ml)	94,40	99,6	96,7
moyenne (ng/ml)	98,27	97,63	96,50	moyenne (ng/ml)	96,43	98,97	99,83	moyenne (ng/ml)	96,97	100,70	99,43	moyenne (ng/ml)	94,20	97,40	98,07
écart type	1,92	1,44	2,36	écart type	0,75	1,17	2,25	écart type	1,27	2,02	2,89	écart type	0,53	2,42	1,72
% CV	1,96	1,48	2,45	% CV	0,78	1,18	2,26	% CV	1,31	2,01	2,91	% CV	0,56	2,49	1,76
TOTAL J-0	moyenne (ng / ml)		97,47	TOTAL J-1	moyenne (ng / ml)		98,41	TOTAL J-2	moyenne (ng / ml)		99,03	TOTAL J-7	moyenne (ng / ml)		96,56
	écart type		1,86		écart type		2,02		écart type		2,49		écart type		2,34
	% CV		1,90		% CV		2,06		% CV		2,52		% CV		2,43
Pourcentage restant de Nicardipine ± IC 95%			100,0	Pourcentage restant de Nicardipine ± IC 95%			102,3 ± 1,32	Pourcentage restant de Nicardipine ± IC 95%			103,0 ± 1,63	Pourcentage restant de Nicardipine ± IC 95%			100,4 ± 1,53

J - 15				J - 30				J - 60				J - 90			
	Flacon 1 - Lot 1 25°C	Flacon 1 - Lot 2 25°C	Flacon 1 - Lot 3 25°C		Flacon 1 - Lot 1 25°C	Flacon 1 - Lot 2 25°C	Flacon 1 - Lot 3 25°C		Flacon 1 - Lot 1 25°C	Flacon 1 - Lot 2 25°C	Flacon 1 - Lot 3 25°C		Flacon 1 - Lot 1 25°C	Flacon 1 - Lot 2 25°C	Flacon 1 - Lot 3 25°C
Répétition 1 (ng/ml)	98,60	96,4	96,8	Répétition 1 (ng/ml)	91,30	93,7	92,4	Répétition 1 (ng/ml)	95,20	98,8	93,9	Répétition 1 (ng/ml)	95,70	95	91
Répétition 2 (ng/ml)	98,10	97,5	100	Répétition 2 (ng/ml)	88,30	97,9	92,5	Répétition 2 (ng/ml)	102,00	94,2	92,8	Répétition 2 (ng/ml)	93,30	95,3	97,2
Répétition 3 (ng/ml)	97,50	99,5	98,3	Répétition 3 (ng/ml)	96,70	88	99,7	Répétition 3 (ng/ml)	90,30	89,2	99	Répétition 3 (ng/ml)	97,70	99	92,5
moyenne (ng/ml)	98,07	97,80	98,37	moyenne (ng/ml)	92,10	93,20	94,87	moyenne (ng/ml)	95,83	94,07	95,23	moyenne (ng/ml)	95,57	96,43	93,57
écart type	0,55	1,57	1,60	écart type	4,26	4,97	4,19	écart type	5,88	4,80	3,31	écart type	2,20	2,23	3,23
% CV	0,56	1,61	1,63	% CV	4,62	5,33	4,41	% CV	6,13	5,10	3,47	% CV	2,31	2,31	3,46
TOTAL J-15	moyenne (ng / ml)		98,08	TOTAL J-30	moyenne (ng / ml)		93,39	TOTAL J-60	moyenne (ng / ml)		95,04	TOTAL J-90	moyenne (ng / ml)		95,19
	écart type		1,18		écart type		4,07		écart type		4,21		écart type		2,59
	% CV		1,20		% CV		4,35		% CV		4,43		% CV		2,72
Pourcentage restant de Nicardipine ± IC 95%			102,0 ± 0,77	Pourcentage restant de Nicardipine ± IC 95%			97,1 ± 2,65	Pourcentage restant de Nicardipine ± IC 95%			98,8 ± 2,75	Pourcentage restant de Nicardipine ± IC 95%			99,0 ± 1,69

J - 60 avant ouverture				J - 83 avant ouverture			
	Flacon 3 - Lot 1 25°C	Flacon 3 - Lot 2 25°C	Flacon 3 - Lot 3 25°C		Flacon 5 - Lot 1 25°C	Flacon 5 - Lot 2 25°C	Flacon 5 - Lot 3 25°C
Répétition 1 (ng/ml)	97,10	93,4	93,8	Répétition 1 (ng/ml)	94,90	90,9	91,2
Répétition 2 (ng/ml)	93,20	93	96,1	Répétition 2 (ng/ml)	95,00	96,1	94,8
Répétition 3 (ng/ml)	89,40	93,7	90,7	Répétition 3 (ng/ml)	94,70	100	97,5
moyenne (ng/ml)	93,23	93,37	93,53	moyenne (ng/ml)	94,87	95,67	94,50
écart type	3,85	0,35	2,71	écart type	0,15	4,57	3,16
% CV	4,13	0,38	2,90	% CV	0,16	4,77	3,34
TOTAL J-60 a.o	moyenne (ng / ml)		93,38	TOTAL J-83 a.o	moyenne (ng / ml)		95,01
	écart type		2,36		écart type		2,83
	% CV		2,53		% CV		2,97
Pourcentage restant de Nicardipine ± IC 95%			97,1 ± 1,54	Pourcentage restant de Nicardipine ± IC 95%			98,8 ± 1,84

**Tableau 19 : Résultats de stabilité chimique de la nicardipine sur 90 jours à 4°C**

J - 0				J - 1				J - 2				J - 7			
	Flacon 2 - Lot 1 4°C	Flacon 2 - Lot 2 4°C	Flacon 2 - Lot 3 4°C		Flacon 2 - Lot 1 4°C	Flacon 2 - Lot 2 4°C	Flacon 2 - Lot 3 4°C		Flacon 2 - Lot 1 4°C	Flacon 2 - Lot 2 4°C	Flacon 2 - Lot 3 4°C		Flacon 2 - Lot 1 4°C	Flacon 2 - Lot 2 4°C	Flacon 2 - Lot 3 4°C
Répétition 1 (ng/ml)	93,30	101	102	Répétition 1 (ng/ml)	87,70	90,9	97,8	Répétition 1 (ng/ml)	98,30	101	101	Répétition 1 (ng/ml)	92,60	97,5	97,1
Répétition 2 (ng/ml)	94,40	99,6	95,2	Répétition 2 (ng/ml)	95,30	95,4	102	Répétition 2 (ng/ml)	96,00	101	96,4	Répétition 2 (ng/ml)	91,40	95,1	96,5
Répétition 3 (ng/ml)	92,60	97,2	98,9	Répétition 3 (ng/ml)	96,20	96,9	98,9	Répétition 3 (ng/ml)	96,10	99,3	95,1	Répétition 3 (ng/ml)	94,60	97,2	95,2
moyenne (ng/ml)	93,43	99,27	98,70	moyenne (ng/ml)	93,07	94,40	94,40	moyenne (ng/ml)	96,80	100,43	97,50	moyenne (ng/ml)	92,87	96,60	96,27
écart type	0,91	1,92	3,40	écart type	4,67	3,12	3,12	écart type	1,30	0,98	3,10	écart type	1,62	1,31	0,91
% CV	0,97	1,94	3,45	% CV	5,02	3,31	3,31	% CV	1,34	0,98	3,18	% CV	1,74	1,35	1,01
TOTAL J-0	moyenne (ng / ml)		97,13	TOTAL J-1	moyenne (ng / ml)		95,68	TOTAL J-2	moyenne (ng / ml)		98,24	TOTAL J-7	moyenne (ng / ml)		95,24
	écart type		3,43		écart type		4,23		écart type		2,42		écart type		2,13
	% CV		3,53		% CV		4,42		% CV		2,46		% CV		2,23
Pourcentage restant de Nicardipine ± IC 95%			100,0	Pourcentage restant de Nicardipine ± IC 95%			98,5 ± 2,76	Pourcentage restant de Nicardipine ± IC 95%			101,1 ± 1,58	Pourcentage restant de Nicardipine ± IC 95%			98,0 ± 1,38

J - 15				J - 30				J - 60				J - 90			
	Flacon 2 - Lot 1 4°C	Flacon 2 - Lot 2 4°C	Flacon 2 - Lot 3 4°C		Flacon 2 - Lot 1 4°C	Flacon 2 - Lot 2 4°C	Flacon 2 - Lot 3 4°C		Flacon 2 - Lot 1 4°C	Flacon 2 - Lot 2 4°C	Flacon 2 - Lot 3 4°C		Flacon 2 - Lot 1 4°C	Flacon 2 - Lot 2 4°C	Flacon 2 - Lot 3 4°C
Répétition 1 (ng/ml)	94,30	96,3	95,1	Répétition 1 (ng/ml)	91,60	85,7	92,8	Répétition 1 (ng/ml)	90,90	92,4	92,2	Répétition 1 (ng/ml)	96,10	97,9	97,2
Répétition 2 (ng/ml)	95,20	98,5	101	Répétition 2 (ng/ml)	99,20	97,6	95,5	Répétition 2 (ng/ml)	87,80	92,6	90,5	Répétition 2 (ng/ml)	95,30	97,9	101
Répétition 3 (ng/ml)	96,60	99	95,8	Répétition 3 (ng/ml)	97,60	100	99,4	Répétition 3 (ng/ml)	98,80	103	89,7	Répétition 3 (ng/ml)	94,70	95,6	100
moyenne (ng/ml)	95,37	97,93	97,30	moyenne (ng/ml)	96,13	94,43	95,90	moyenne (ng/ml)	92,50	96,00	90,80	moyenne (ng/ml)	95,37	97,13	99,40
écart type	1,16	1,44	3,22	écart type	4,01	7,66	3,32	écart type	5,67	7,06	1,28	écart type	0,70	1,33	1,97
% CV	1,22	1,47	3,31	% CV	4,17	8,11	3,46	% CV	6,13	6,32	1,41	% CV	0,74	1,37	1,98
TOTAL J-15	moyenne (ng / ml)		96,87	TOTAL J-30	moyenne (ng / ml)		95,49	TOTAL J-60	moyenne (ng / ml)		93,10	TOTAL J-90	moyenne (ng / ml)		97,30
	écart type		2,19		écart type		4,70		écart type		4,79		écart type		2,14
	% CV		2,26		% CV		4,92		% CV		5,14		% CV		2,20
Pourcentage restant de Nicardipine ± IC 95%			99,7 ± 1,43	Pourcentage restant de Nicardipine ± IC 95%			98,7 ± 4,40	Pourcentage restant de Nicardipine ± IC 95%			95,8 ± 3,13	Pourcentage restant de Nicardipine ± IC 95%			100,2 ± 1,40

J - 60 avant ouverture				J - 83 avant ouverture			
	Flacon 4 - Lot 1 4°C	Flacon 4 - Lot 2 4°C	Flacon 4 - Lot 3 4°C		Flacon 6 - Lot 1 4°C	Flacon 6 - Lot 2 4°C	Flacon 6 - Lot 3 4°C
Répétition 1 (ng/ml)	103,00	92,5	89,7	Répétition 1 (ng/ml)	101,00	99,2	95,4
Répétition 2 (ng/ml)	92,20	93,6	104	Répétition 2 (ng/ml)	100,00	99,7	100
Répétition 3 (ng/ml)	94,30	90,7	87,5	Répétition 3 (ng/ml)	98,50	99,5	103
moyenne (ng/ml)	96,50	92,27	93,73	moyenne (ng/ml)	99,83	99,47	99,47
écart type	5,73	1,46	8,96	écart type	1,26	0,25	3,83
% CV	5,93	1,59	9,56	% CV	1,26	0,25	3,85
TOTAL J-60 a.o	moyenne (ng / ml)		94,17	TOTAL J-83 a.o	moyenne (ng / ml)		99,59
	écart type		5,68		écart type		2,03
	% CV		6,03		% CV		2,04
Pourcentage restant de Nicardipine ± IC 95%			96,9 ± 3,71	Pourcentage restant de Nicardipine ± IC 95%			102,5 ± 1,32

## 4.2. Stabilité physique

### 4.2.1. pH et aspect visuel

#### ○ pH :

Après leur fabrication, à J0, les trois solutions des trois lots conservés à température ambiante ont un pH moyen de  $4,72 \pm 0,01$  et de  $4,73 \pm 0,00$  pour ceux conservés à 4°C. Ce pH légèrement acide est obtenu par la présence d'un tampon acide citrique/citrate de sodium présent dans l'Inorpha® et assure à la formulation une plus grande stabilité et solubilité du principe actif comme cela a été démontré précédemment.

Les résultats des mesures du pH sont répertoriés dans le tableau 20.

La figure 41 permet de visualiser l'évolution du pH moyen des flacons conservés à température ambiante et à 4°C.

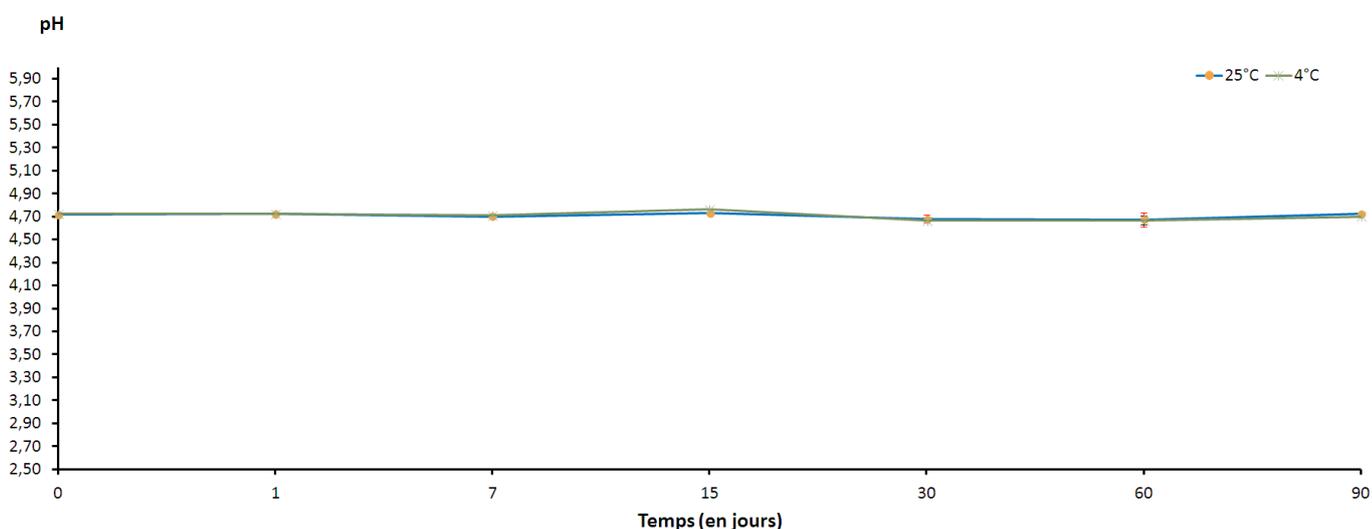


Figure 41 : Evolution du pH des flacons au cours de l'étude de stabilité

Au cours de l'étude, aucune variation de pH n'est mise en évidence. Pour les flacons conservés à température ambiante, la variation de pH maximale est de -1,06% par rapport à la valeur initiale et de -1,48 % pour ceux conservés à 4°C. Le pH ne varie pas de plus de 0,07 unité par rapport au pH initial. Le mode de conservation n'a pas d'influence sur le pH de la formulation.

Tableau 20 : Résultats des mesures de pH au cours de l'étude de stabilité des lots conservés à 25°C et à 4°C

	<b>J0 (22°C)</b>			<b>J2 (22°C)</b>			<b>J7 (22°C)</b>			<b>J15 (22°C)</b>			<b>J30 (22°C)</b>			<b>J60 (22°C)</b>			<b>J90 (22°C)</b>		
<b>pH 25°C</b>	<i>Flacon 7 Lot 1</i>	<i>Flacon 7 Lot 2</i>	<i>Flacon 7 Lot 3</i>	<i>Flacon 7 Lot 1</i>	<i>Flacon 7 Lot 2</i>	<i>Flacon 7 Lot 3</i>	<i>Flacon 7 Lot 1</i>	<i>Flacon 7 Lot 2</i>	<i>Flacon 7 Lot 3</i>	<i>Flacon 7 Lot 1</i>	<i>Flacon 7 Lot 2</i>	<i>Flacon 7 Lot 3</i>	<i>Flacon 7 Lot 1</i>	<i>Flacon 7 Lot 2</i>	<i>Flacon 7 Lot 3</i>	<i>Flacon 7 Lot 1</i>	<i>Flacon 7 Lot 2</i>	<i>Flacon 7 Lot 3</i>	<i>Flacon 7 Lot 1</i>	<i>Flacon 7 Lot 2</i>	<i>Flacon 7 Lot 3</i>
	4,72	4,72	4,71	4,72	4,72	4,73	4,70	4,70	4,70	4,73	4,73	4,72	4,70	4,67	4,66	4,72	4,67	4,64	4,72	4,72	4,73
<b>Moyenne</b>	4,72			4,72			4,70			4,73			4,68			4,67			4,72		
<b>Ecart type</b>	0,01			0,00			0,00			0,00			0,02			0,04			0,01		
<b>% CV</b>	0,17			0,05			0,02			0,09			0,43			0,82			0,13		
<b>pH 4°C</b>	<i>Flacon 8 Lot 1</i>	<i>Flacon 8 Lot 2</i>	<i>Flacon 8 Lot 3</i>	<i>Flacon 8 Lot 1</i>	<i>Flacon 8 Lot 2</i>	<i>Flacon 8 Lot 3</i>	<i>Flacon 8 Lot 1</i>	<i>Flacon 8 Lot 2</i>	<i>Flacon 8 Lot 3</i>	<i>Flacon 8 Lot 1</i>	<i>Flacon 8 Lot 2</i>	<i>Flacon 8 Lot 3</i>	<i>Flacon 8 Lot 1</i>	<i>Flacon 8 Lot 2</i>	<i>Flacon 8 Lot 3</i>	<i>Flacon 8 Lot 1</i>	<i>Flacon 8 Lot 2</i>	<i>Flacon 8 Lot 3</i>	<i>Flacon 8 Lot 1</i>	<i>Flacon 8 Lot 2</i>	<i>Flacon 8 Lot 3</i>
	4,73	4,73	4,73	4,72	4,72	4,73	4,72	4,71	4,71	4,77	4,76	4,76	4,67	4,66	4,66	4,67	4,70	4,63	4,70	4,70	4,70
<b>Moyenne</b>	4,73			4,72			4,71			4,76			4,66			4,67			4,70		
<b>Ecart type</b>	0,00			0,00			0,00			0,00			0,01			0,03			0,00		
<b>% CV</b>	0,03			0,06			0,06			0,04			0,11			0,73			0,01		

### ○ *Caractères organoleptiques :*

Aucun changement de coloration n'a été observé sur toute la durée de l'étude et ce jusqu'au 90<sup>ème</sup> jour (figure 42). Les solutions ont conservé leur odeur initiale ainsi que leur aspect et aucune sédimentation n'a été détectée.

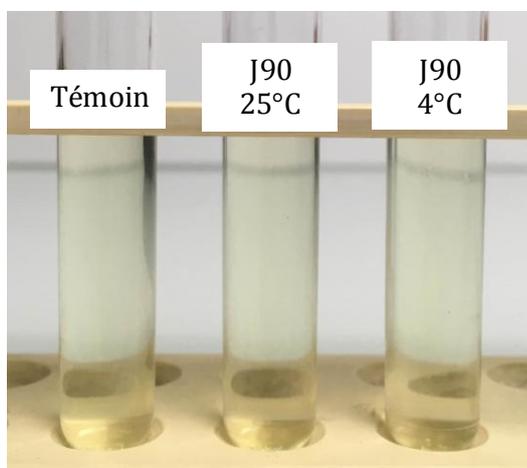


Figure 42 : Témoin et solutions conservées 90 jours à 25°C et 4°C.

## 4.2.2. Viscosité, osmolalité et densité

### ○ *Viscosité :*

La figure 43 illustre l'évolution de la moyenne des mesures de la viscosité réalisées sur les solutions stockées à température ambiante et à 4°C.

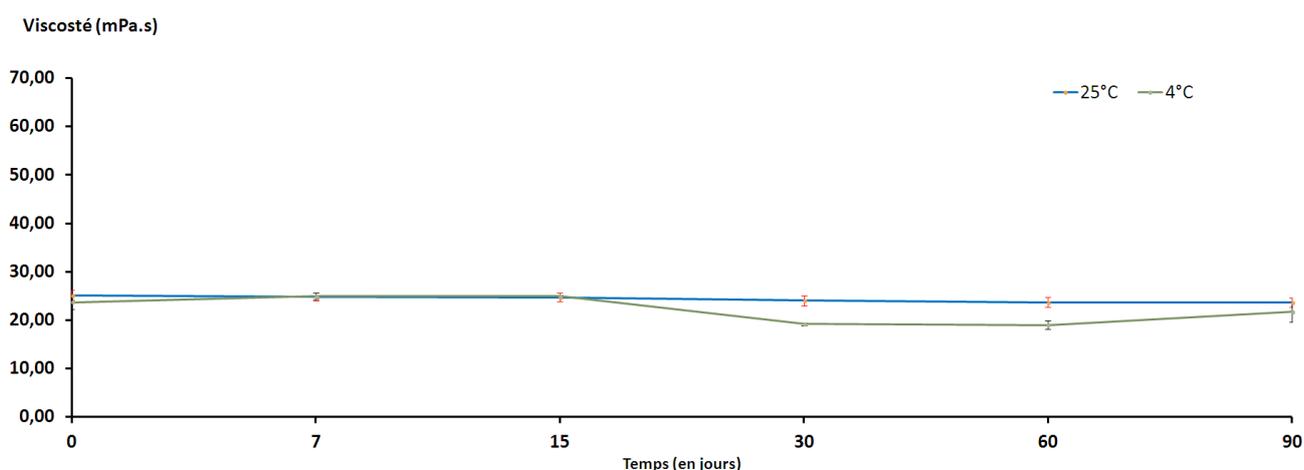


Figure 43 : Evolution de la viscosité des flacons au cours de l'étude de stabilité

Les résultats sont représentés dans le tableau 22. Si les valeurs ne varient pas de plus de 10% par rapport à la valeur initiale pour les flacons stockés à température

ambiante, on observe une légère diminution de la viscosité des flacons conservés à 4°C entre le J30 et le J60.

#### ○ *Osmolalité :*

L'osmolalité au cours de cette étude est restée stable quelles que soient les conditions de conservation. Les résultats sont représentés dans le tableau 22. A J0, les solutions conservées à température ambiante ont une osmolalité moyenne de  $166,67 \pm 1,15$  mOsm/Kg et celles conservées à 4°C de  $174,00 \pm 5,20$  mOsm/Kg. L'évolution de l'osmolalité moyenne des différents lots est représentée dans la figure 44.

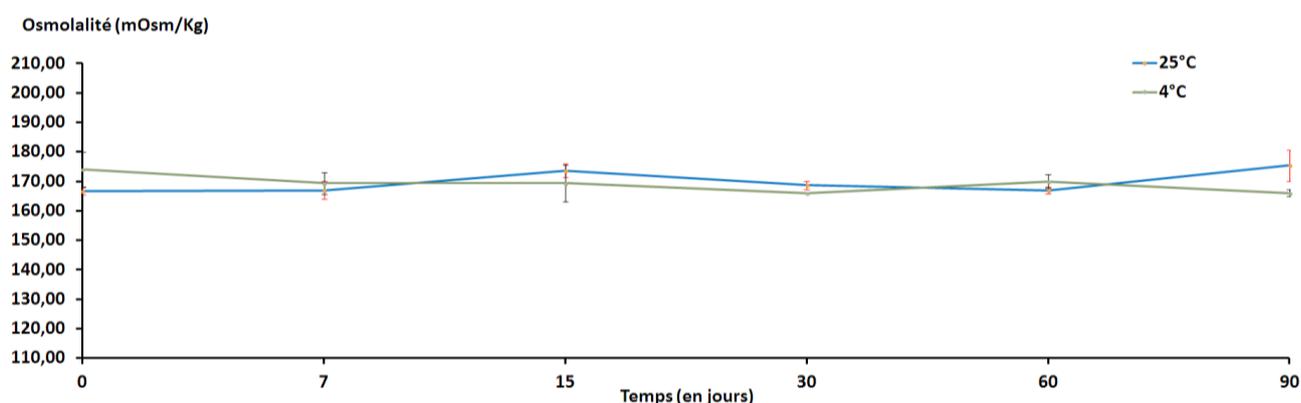


Figure 44 : Evolution de l'osmolalité des flacons au cours de l'étude de stabilité

#### ○ *Densité :*

Les résultats des mesures de densité des solutions sont représentés dans le tableau 22. Il n'y a pas de variation significative de la densité des solutions au cours du temps quelles que soient les conditions de conservation comme l'illustre la figure 45.

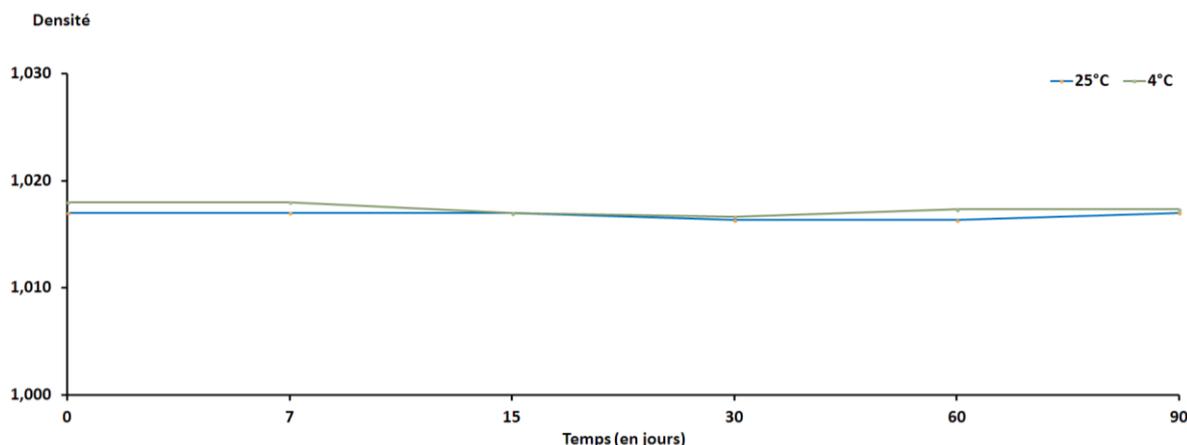


Figure 45 : Evolution de la densité au cours de l'étude de stabilité

### 4.3. Uniformité de teneur en principe actif

Les résultats des essais effectués sont présentés dans le tableau 21.

Avant agitation (ng/ml)						
	Flacon 5 - lot 1	Flacon 6 - lot 2	Flacon 5 - lot 3	Moyenne	Ecart-type	% CV
<b>Haut</b>	98,2	98,6	95,7	<b>97,5</b>	<b>1,6</b>	<b>1,6%</b>
<b>Milieu</b>	99,1	98,1	94,3	<b>97,2</b>	<b>2,5</b>	<b>2,6%</b>
<b>Bas</b>	97,3	97,5	97,7	<b>97,5</b>	<b>0,2</b>	<b>0,2%</b>
<i>Moyenne</i>	<b>98,2</b>	<b>98,1</b>	<b>95,9</b>			
<i>Ecart-type</i>	<b>0,9</b>	<b>0,6</b>	<b>1,7</b>			
<i>% CV</i>	<b>0,9%</b>	<b>0,6%</b>	<b>1,8%</b>			

Après agitation (ng/ml)						
	Flacon 5 - lot 1	Flacon 6 - lot 2	Flacon 5 - lot 3	Moyenne	Ecart-type	% CV
<b>Haut</b>	96,9	98,4	97,5	<b>97,6</b>	<b>0,8</b>	<b>0,8%</b>
<b>Milieu</b>	95,4	99,2	95,1	<b>96,6</b>	<b>2,3</b>	<b>2,4%</b>
<b>Bas</b>	96,9	99,4	97,2	<b>97,8</b>	<b>1,4</b>	<b>1,4%</b>
<i>Moyenne</i>	<b>96,4</b>	<b>99,0</b>	<b>96,6</b>			
<i>Ecart-type</i>	<b>0,9</b>	<b>0,5</b>	<b>1,3</b>			
<i>% CV</i>	<b>0,9%</b>	<b>0,5%</b>	<b>1,4%</b>			

Tableau 21 : Concentration en nifedipine obtenue après prélèvement dans les différents lots et avant et après agitation

Les résultats obtenus ne montrent pas de différence significative de concentration entre les lots fabriqués, en fonction du point de prélèvement et avant et après agitation.

Un test de Wilcoxon-Mann-Whitney réalisé sur les résultats des dosages avant et après agitation, ne montre pas de différences significatives entre les deux groupes (avant et après agitation) au seuil de 5% ( $p=0,9$ ).

Ces résultats témoignent de l'uniformité de teneur en principe actif de la formulation.

**Tableau 22 : Résultats des paramètres de viscosité, osmolalité et densité au cours de l'étude de stabilité**

	J0			J7			J15			J30			J60			J90		
<b>Viscosité (mPa.s) 25°C</b>	Flacon 7 Lot 1	Flacon 7 Lot 2	Flacon 7 Lot 3	Flacon 7 Lot 1	Flacon 7 Lot 2	Flacon 7 Lot 3	Flacon 7 Lot 1	Flacon 7 Lot 2	Flacon 7 Lot 3	Flacon 7 Lot 1	Flacon 7 Lot 2	Flacon 7 Lot 3	Flacon 7 Lot 1	Flacon 7 Lot 2	Flacon 7 Lot 3	Flacon 7 Lot 1	Flacon 7 Lot 2	Flacon 7 Lot 3
	25,3	24,2	26	24	25,1	25,3	23,9	25,4	24,8	23,4	23,7	25,1	24,7	23,2	23,1	23,7	22,8	24,4
Moyenne (mPa.s)	25,17			24,80			24,70			24,07			23,67			23,63		
Ecart type	0,91			0,70			0,75			0,91			0,90			0,80		
% CV	3,61			2,82			3,06			3,77			3,79			3,39		
<b>Viscosité (mPa.s) 4°C</b>	Flacon 8 Lot 1	Flacon 8 Lot 2	Flacon 8 Lot 3	Flacon 8 Lot 1	Flacon 8 Lot 2	Flacon 8 Lot 3	Flacon 8 Lot 1	Flacon 8 Lot 2	Flacon 8 Lot 3	Flacon 8 Lot 1	Flacon 8 Lot 2	Flacon 8 Lot 3	Flacon 8 Lot 1	Flacon 8 Lot 2	Flacon 8 Lot 3	Flacon 8 Lot 1	Flacon 8 Lot 2	Flacon 8 Lot 3
	22,3	24,7	24,1	25,5	24,4	25	24,8	25,2	24,8	19,1	19,5	19	19,6	18,1	19,2	19,6	23,2	22,4
Moyenne (mPa.s)	23,70			24,97			24,93			19,20			18,97			21,73		
Ecart type	1,25			0,55			0,23			0,26			0,78			1,89		
% CV	5,27			2,21			0,93			1,38			4,10			8,70		
<b>Osmolalité (mOsm/kg) 25°C</b>	Flacon 9 Lot 1	Flacon 9 Lot 2	Flacon 9 Lot 3	Flacon 9 Lot 1	Flacon 9 Lot 2	Flacon 9 Lot 3	Flacon 9 Lot 1	Flacon 9 Lot 2	Flacon 9 Lot 3	Flacon 9 Lot 1	Flacon 9 Lot 2	Flacon 9 Lot 3	Flacon 9 Lot 1	Flacon 9 Lot 2	Flacon 9 Lot 3	Flacon 9 Lot 1	Flacon 9 Lot 2	Flacon 9 Lot 3
	166	168	166	169	168	164	172	173	176	168	170	168	166	168	167	178	178	170
Moyenne (mOsm/kg)	166,67			167,00			173,67			168,67			167,00			175,33		
Ecart type	1,15			2,65			2,08			1,15			1,00			4,62		
% CV	0,69			1,58			1,20			0,68			0,60			2,63		
<b>Osmolalité (mOsm/kg) 4°C</b>	Flacon 10 Lot 1	Flacon 10 Lot 2	Flacon 10 Lot 3	Flacon 10 Lot 1	Flacon 10 Lot 2	Flacon 10 Lot 3	Flacon 10 Lot 1	Flacon 10 Lot 2	Flacon 10 Lot 3	Flacon 10 Lot 1	Flacon 10 Lot 2	Flacon 10 Lot 3	Flacon 10 Lot 1	Flacon 10 Lot 2	Flacon 10 Lot 3	Flacon 10 Lot 1	Flacon 10 Lot 2	Flacon 10 Lot 3
	171	180	171	168	167	173	164	169	175	166	166	166	168	172	170	166	165	167
Moyenne (mOsm/kg)	174,00			169,33			169,33			166,00			170,00			166,00		
Ecart type	5,20			3,21			5,51			0,00			2,00			1,00		
% CV	2,99			1,90			3,25			0,00			1,18			0,60		
<b>Densité 25°C</b>	Flacon 9 Lot 1	Flacon 9 Lot 2	Flacon 9 Lot 3	Flacon 9 Lot 1	Flacon 9 Lot 2	Flacon 9 Lot 3	Flacon 9 Lot 1	Flacon 9 Lot 2	Flacon 9 Lot 3	Flacon 9 Lot 1	Flacon 9 Lot 2	Flacon 9 Lot 3	Flacon 9 Lot 1	Flacon 9 Lot 2	Flacon 9 Lot 3	Flacon 9 Lot 1	Flacon 9 Lot 2	Flacon 9 Lot 3
	1017	1017	1017	1017	1017	1017	1017	1017	1017	1017	1016	1016	1017	1016	1016	1017	1017	1017
Moyenne	1017,00			1017,00			1017,00			1016,33			1016,33			1017,00		
Ecart type	0,00			0,00			0,00			0,06			0,06			0,00		
% CV	0,00			0,00			0,00			0,65			0,65			0,00		
<b>Densité 4°C</b>	Flacon 10 Lot 1	Flacon 10 Lot 2	Flacon 10 Lot 3	Flacon 10 Lot 1	Flacon 10 Lot 2	Flacon 10 Lot 3	Flacon 10 Lot 1	Flacon 10 Lot 2	Flacon 10 Lot 3	Flacon 10 Lot 1	Flacon 10 Lot 2	Flacon 10 Lot 3	Flacon 10 Lot 1	Flacon 10 Lot 2	Flacon 10 Lot 3	Flacon 10 Lot 1	Flacon 10 Lot 2	Flacon 10 Lot 3
	1018	1018	1018	1018	1018	1018	1017	1017	1017	1017	1017	1016	1018	1017	1017	1017	1018	1017
Moyenne	1018,00			1018,00			1017,00			1016,67			1017,33			1017,33		
Ecart type	0,00			0,00			0,00			0,58			0,58			0,58		
% CV	0,00			0,00			0,00			0,06			0,06			0,06		

#### 4.4. Stabilité microbiologique

Les résultats présentés dans le tableau 23 montrent que le produit est stable 90 jours après sa fabrication d'un point de vue microbiologique avant ouverture. Les résultats montrent également que la qualité microbiologique des solutions n'est pas altérée lors de l'ouverture répétée du flacon sur une période de 90 jours, autorisant la fabrication d'un flacon multidose.

Tableau 23 : Résultats de l'étude de stabilité microbiologique

Temps d'analyse (jours)	Dénombrement des germes aérobies totaux (DGAT) (UFC / ml)		Dénombrement des moisissures et levures (DMLT) (UFC / ml)		Présence d'Escherichia coli	
	Flacons de 50 ml	Flacons de 250 ml	Flacons de 50 ml	Flacons de 250 ml	Flacons de 50 ml	Flacons de 250 ml
	J0	-	< 10 <sup>2</sup>	-	< 10 <sup>1</sup>	-
J7	< 10 <sup>2</sup>	< 10 <sup>2</sup>	< 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>	Non	Non
J15	< 10 <sup>2</sup>	< 10 <sup>2</sup>	< 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>	Non	Non
J43	< 10 <sup>2</sup>	< 10 <sup>2</sup>	< 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>	Non	Non
J60	< 10 <sup>2</sup>	< 10 <sup>2</sup>	< 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>	Non	Non
J90	< 10 <sup>2</sup>	< 10 <sup>2</sup>	< 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>1</sup>	Non	Non

## DISCUSSION

---

### ○ Formulation :

La forme orale liquide de nicardipine développée dans cette étude permet de répondre en partie au manque de formulations adaptées à l'usage pédiatrique pour le traitement de l'hypertension artérielle chez l'enfant (47). Dans cette indication, la nicardipine constitue un traitement de choix : efficace, elle entraîne peu d'effets indésirables, sa posologie peut être facilement augmentée, son administration ne perturbe pas les examens complémentaires et elle peut être utilisée à la fois par voie IV et *per os*. Ces propriétés offrent aux pédiatres une flexibilité et une grande sécurité pour initier un traitement. Néanmoins sa faible demi-vie nécessite plusieurs administrations par jour. Si cette propriété est un avantage dans les phases d'initiation où les posologies sont fréquemment modifiées par titration, dans le cas d'un traitement chronique, des principes actifs présentant une demi-vie plus longue comme l'amlodipine pourront être préférés pour améliorer l'observance (60,66).

Sous condition d'un enregistrement auprès de l'ANSM, la préparation hospitalière développée nous permet de fabriquer un ou plusieurs lots à l'avance et ainsi répondre plus rapidement aux demandes des services de pédiatrie. Le procédé de fabrication proposé est facilement réalisable en routine et simple à mettre en œuvre. En outre, sous réserve d'études complémentaires, ce procédé pourrait permettre de dégager du temps préparateur pour d'autres activités, voire de présenter un intérêt économique, par rapport à la fabrication de gélules.

Le choix de la concentration de 2 mg/ml apparaît ici adapté afin de répondre au mieux aux éventuels changements de posologies en cours de traitement sans administrer des volumes trop importants pour les fortes posologies et en étant précis pour les plus faibles posologies.

Le plus grand défi dans le développement de notre formulation a été la faible solubilité aqueuse de la nicardipine. Celle-ci s'est confirmée dans les études de pré-formulation.

Plusieurs approches peuvent être envisagées afin d'améliorer la solubilité des principes actifs. Parmi les méthodes les plus simples, on peut citer : la modification du

pH, l'utilisation de solvants organiques solubles dans l'eau, l'ajout de tensioactif, ou encore de solvants organiques insolubles dans l'eau (30).

La nicardipine, composé de classe II BCS, présente une solubilité dépendante du pH et est plus soluble à pH acide (75). Cependant, le véhicule utilisé dans cette étude présente déjà un pH acide et cette propriété n'a pas permis une amélioration satisfaisante de la solubilité du principe actif.

L'utilisation de solvants organiques insolubles dans l'eau aurait été incompatible avec la formulation aqueuse que l'on souhaitait développer. Parmi les solvants organiques solubles dans l'eau, le propylène glycol est un excipient couramment utilisé. Néanmoins son utilisation en pédiatrie s'est avérée nocive pour les patients (115). Notre choix s'est donc tourné vers l'utilisation de tensioactif. L'ajout de polysorbate 80 nous a permis de solubiliser la nicardipine dans notre formulation. Si cet agent de solubilisation est fréquemment retrouvé dans la composition de formes orales liquides commercialisées, il fait néanmoins parti des composés ciblés par une large étude sur la toxicité des excipients en néonatalogie qui a débuté au niveau européen depuis 2011 (116). Cependant, un seul cas de toxicité est rapporté dans la littérature chez un prématuré (117) et aucun seuil de toxicité n'a été défini.

Une contrainte liée à l'ajout de tensioactif dans une formulation pharmaceutique est que ces derniers peuvent conduire à une modification de la biodisponibilité du principe actif (30). Des études complémentaires sur l'impact biopharmaceutique ou pharmacocinétique de la forme liquide comparativement à la forme gélule délivrée actuellement pourront être développées. Cependant, les tensioactifs ont tendance à augmenter la biodisponibilité des principes actifs et non la diminuer (30). Dans notre cas, la nicardipine est surtout utilisée dans le cadre d'initiation de traitement antihypertenseur où les pédiatres cherchent à faire baisser la TA de façon rapide afin de limiter les dommages sur les organes cibles, notamment chez les jeunes enfants. Si la formulation liquide développée présentait une biodisponibilité améliorée par rapport la forme gélule, cela pourrait être davantage bénéfique que délétères au regard de son utilisation clinique.

Par manque de moyens matériels, nous n'avons pas caractérisé avec exactitude le type de solution développée dans cette étude. Les solutions obtenues présentent un avantage par rapport à la formulation d'une suspension en raison d'une meilleure acceptation par voie orale. En outre, elles sont moins sensibles aux erreurs de dosage

comparativement aux suspensions, toujours à risque d'être mal mélangées, et sont plus faciles à administrer.

○ Méthode de dosage :

▪ Choix de la méthode de dosage :

Aujourd'hui, la majeure partie des études de stabilité sur des préparations pharmaceutiques se font en chromatographie liquide couplée à un détecteur UV/visible. Cela est expliqué par plusieurs raisons.

Tout d'abord la disponibilité des équipements : la chromatographie en phase liquide couplée à un détecteur UV/visible est souvent un des rares équipements présents dans les pharmacies hospitalières, quand elle n'est pas le seul. D'autre part, si le choix de la technique est d'abord dicté par l'appareil à disposition, il est également étroitement lié aux propriétés physico-chimiques des composés à doser. La sensibilité offerte par ce type de détecteur est largement appropriée pour quantifier les composés présents dans les formulations pharmaceutiques. En outre, 80% des substances médicamenteuses présentent un groupement chromophore et peuvent être détectées par spectrophotométrie UV/visible. Néanmoins, c'est une technique non séparative et non spécifique. Ainsi, pour réaliser une étude de stabilité avec ce type d'équipement, il est indispensable d'avoir démontré, avant de doser le principe actif, que la technique séparative située en amont du détecteur (HPLC) permet de séparer le ou les principes actifs des produits de dégradation et des excipients contenus dans la formulation pharmaceutique. Cela constitue une des étapes les plus difficiles et les plus chronophages dans la mise en place d'une étude de stabilité avec ce type d'équipement. Elle permet notamment de répondre au critère de spécificité de la méthode développée.

Le couplage HPLC – MS/MS en tandem est une méthode analytique qui présente deux qualités essentielles : la spécificité et la sensibilité. Aussi, cette technique est très utilisée pour détecter, identifier et quantifier les différents constituants d'un mélange complexe et permet les analyses qualitatives et quantitatives de composés présents à l'état de trace. Ses domaines d'applications sont donc multiples : suivi thérapeutique des médicaments, analyse agroalimentaire, recherche des intoxications médicamenteuses... Néanmoins, elle n'est initialement pas

destinée à des études de stabilité pharmaceutique et au dosage de principes actifs présents à forte concentration dans des formulations.

D'ailleurs, les recommandations existant actuellement pour mener à bien une étude de stabilité de préparation ne font que très peu mention de ce genre de détecteur, et sont le plus souvent adaptées aux techniques HPLC-UV (106).

Quand le choix est possible entre les deux techniques, l'HPLC-UV reste une méthode largement suffisante, moins chère et plus facile à mettre en œuvre. Les recommandations actuelles sont suffisamment riches pour mener à bien une étude de stabilité avec ce type d'appareil.

Dans notre cas, nous avons à notre disposition une chaîne HPLC couplée à un spectromètre de masse en tandem, acquise en 2013 par la pharmacie du CHU de Rouen.

Nous avons recensé plusieurs études de stabilité sur des préparations pharmaceutiques utilisant les avantages de la spectrométrie de masse pour démontrer la stabilité de leurs formulations (94–96,118–121).

D'une manière générale, il est préconisé d'opter pour une technique de détection adaptée à la molécule d'intérêt et à la matrice dans laquelle elle est formulée (106). La nifedipine est une molécule ancienne dont le profil de dégradation est connu. Comme toutes les dihydropyridines, elle est photosensible et son exposition à la lumière conduit à une diminution de son activité et à la formation de produits de dégradation non toxiques, dénués d'activité pharmacologique et présentant une structure relativement proche de la nifedipine. Les études qui ont étudié sa dégradation préconisent d'utiliser la spectrométrie de masse pour assurer une quantification certaine de la nifedipine (74). Ce type de détecteur est en effet particulièrement utile pour vérifier la séparation entre le principe actif et les produits de dégradation. De plus, notre étude porte sur une formulation buvable dans laquelle sont présents de nombreux excipients. Dans ce type de matrice complexe, plusieurs constituants peuvent être absorbés en UV et entraîner des contraintes analytiques lors du dosage.

Pour ces différentes raisons, l'appareillage mis à notre disposition apparaît approprié. L'HPLC-MS/MS permet d'améliorer la productivité en diminuant le temps global nécessaire à la réalisation d'une analyse. De plus, la configuration matérielle choisie

dans l'unité de Pharmacocinétique permet l'enchaînement automatique des différentes méthodes d'analyses utilisées dans le laboratoire. Cela nous a permis de réaliser notre étude sans bouleverser l'activité propre de ce service. Enfin, cette méthode d'analyse permet d'avoir une grande spécificité, paramètre capital dans la mise en œuvre d'une étude de stabilité de préparation.

Cependant, les qualités d'une telle technique constituent dans notre cas, également une contrainte. En effet, la grande sensibilité offerte par un spectromètre de masse représente une des principales difficultés dans le développement de la méthode. Dans notre étude, les solutions dosées à 2 mg/ml nécessitent d'être diluées de façon importante pour ne pas saturer le signal du détecteur. Ces étapes pré-analytiques représentent une source d'erreurs, et il est indispensable de bien valider la méthode de dosage avant de se lancer dans l'étude de stabilité proprement dite.

▪ Validation de la méthode :

La difficulté principale rencontrée lors de la validation de la méthode a donc été la construction d'un protocole de validation approprié. En effet, il devait comporter le moins d'étapes possible pour diminuer l'erreur liée à la préparation des échantillons. Pour améliorer la précision, les dilutions ont été systématiquement réalisées avec des fioles jaugées et des pipettes à déplacement positif ont été utilisées pour la préparation des échantillons afin de s'affranchir des problèmes inhérents à la viscosité ou à la volatilité des liquides prélevés. Après avoir démontré l'absence d'effet matrice, les standards ont pu être préparés dans un mélange MeOH/H<sub>2</sub>O permettant la solubilisation complète de la nicardipine.

Dans le cadre des études de stabilité pharmaceutiques, les coefficients de variations de fidélité intra-jour et inter-jour des standards de validation doivent être de  $\pm 2\%$ . De même, concernant la justesse et l'exactitude, le recouvrement doit être compris entre 98 et 102%. Les résultats des validations analytiques de la technique développée sont tout à fait satisfaisants : les trois niveaux de standards de validation ont un recouvrement compris entre 99,7 et 100,8 % ainsi qu'un CV  $< 1\%$  en intra et en inter-jour témoignant de la robustesse de la méthode.

La stratégie basée sur le profil d'exactitude a été appliquée avec succès pour démontrer la capacité de la méthode à quantifier la nicardipine. Le profil de risque a été investigué en vue d'évaluer la probabilité d'obtenir des mesures futures en dehors des limites d'acceptation. Celle-ci est minimale au niveau des concentrations étudiées. Ces résultats montrent que la méthode analytique utilisée est adaptée à l'analyse de la nicardipine.

Ces résultats particulièrement positifs peuvent être expliqués de différentes façons :

- Un même manipulateur a réalisé toutes les expériences au cours de l'étude limitant ainsi la variabilité inter-opérateur ;
- Tous les échantillons étaient préparés extemporanément et injectés au dernier moment ;
- Afin de réduire les incertitudes liées aux conditions analytiques ou à la préparation, un étalon interne deutéré a été introduit dans les échantillons.

La spécificité de la méthode développée est assurée par le mode de détection utilisé. En effet, contrairement à la détection UV, la détection par spectrométrie de masse est en corrélation avec le poids moléculaire spécifique d'un composé. Cette spécificité est renforcée par le suivi de deux transitions MRM spécifiques à la nicardipine. Cela permet d'assurer que le pic chromatographique obtenu ne correspond qu'à la nicardipine et non à un produit de dégradation du médicament. L'ensemble de l'étude de dégradation forcée nous a permis de retrouver les produits de dégradation décrits dans la littérature. Après optimisation, ces derniers présentent des transitions MRM différentes de celles de la nicardipine. Ainsi ils n'interfèrent pas dans le dosage du principe actif. Le suivi de leurs transitions au cours de l'étude de stabilité nous a permis de détecter leur potentielle apparition. Ne disposant pas des produits de référence, nous n'avons pas pu assurer leur quantification. Malgré l'absence de séparation chromatographique, le risque pris dans notre cas est minimal car les produits de dégradation sont connus et non toxiques.

#### ○ *Evaluation de la stabilité microbiologique :*

Outre la stabilité physico-chimique, la stabilité microbiologique est un autre problème lié à la qualité des formes orales liquides. Bien que non stériles, ces préparations doivent montrer la conservation dans le temps des caractéristiques

limites de contaminations définies dans la Pharmacopée (36). Cette qualité microbiologique est particulièrement importante puisque la présence d'un micro-organisme dans la formulation peut réduire l'efficacité du principe actif ou être dangereuse pour des patients à risque tels que les nourrissons et jeunes enfants.

Les essais de dénombrement microbiens, réalisés conformément aux recommandations de la Pharmacopée européenne, ont démontré la stabilité microbiologique des solutions après la fabrication sur une période de 3 mois. La qualité microbiologique n'a pas non plus été altérée par des ouvertures répétées des flacons au cours de la période d'étude.

Les essais préliminaires de validation de la fertilité des milieux et de l'applicabilité de la méthode en présence de produit ont également été réalisés. Néanmoins, nous avons été confrontés à de nombreuses contraintes lors des étapes de validation. Ces essais font appel à des connaissances spécifiques, et des compétences de microbiologistes ont été nécessaires pour mener à bien notre étude. Des équipements spécifiques sont aussi indispensables pour réaliser ce type de projet et ne sont pas toujours à disposition des PUI. En outre, les méthodes de dénombrement décrites par la Pharmacopée ne sont pas applicables à tous types de formulation et il convient d'avoir un regard critique sur l'applicabilité de ces méthodes. Des techniques alternatives plus simples, utilisées couramment dans les laboratoires de bactériologie pourraient être proposées afin de répondre plus facilement à la question de la stabilité microbiologique des préparations non obligatoirement stériles.

#### ○ *Etude de stabilité physique:*

Le pH des solutions de nicardipine est resté stable au cours du temps et en fonction de la température avec une valeur moyenne de  $4,71 \pm 0,01$ . Le mode de conservation n'a pas influencé le pH de la formulation. Ce pH bas est à la fois compatible avec une absorption orale et adapté à la conservation du principe actif en regard des données de stabilité de la nicardipine. De plus, il permet au conservateur présent dans l'Inorpha® (sorbate de potassium) d'être actif. Ce pH, resté constant au cours de l'étude, est le témoin d'une absence de modification de la solution initiale préparée.

Cette absence de modification a également été confirmée par l'évaluation des caractères organoleptiques qui n'ont pas varié au cours du temps, ainsi que la densité mesurée par réfractométrie. L'évaluation de ce paramètre additionnel a l'inconvénient

de ne pas être spécifique à un composé, mais présente l'avantage d'être rapide à mettre en œuvre et d'être peu coûteux. Son domaine d'application est large et constitue une preuve supplémentaire pour apprécier la stabilité d'une formulation au cours du temps notamment pour les formes liquides (122).

L'osmolalité reste également stable tout au long de l'étude avec une valeur moyenne proche de 169 mOsm/kg pour les deux conditions de conservation. Ces valeurs faibles d'osmolalité permettent une bonne tolérance digestive des solutions préparées.

La viscosité des solutions conservées à température ambiante varie peu au cours de l'étude. Toutefois, une diminution anormale a été observée pour les flacons conservés à 4°C entre J30 et J60. Ayant sous-traité ce contrôle au laboratoire d'hématologie, nous avons peu de recul pour incriminer une potentielle erreur lors de l'analyse. La mesure de la viscosité est dépendante de la température et ce paramètre a pu être insuffisamment contrôlé au cours de l'acheminement des échantillons au laboratoire. Il n'existe cependant pas de critères limites d'acceptabilité concernant la viscosité. Ces faibles variations de viscosité ne sont accompagnées d'aucune variation de concentration en principe actif ou autres paramètres physiques. Des études rhéologiques plus poussées pourraient être envisagées.

#### ○ Etude de stabilité chimique:

Au vu des résultats des dosages, la solution buvable peut être conservée pendant 90 jours consécutifs avant et après ouverture, à température ambiante comme à 4 °C. L'étude de stabilité chimique a en effet permis de démontrer la stabilité du principe actif dans la formulation développée sur la base d'une teneur en nicardipine supérieure à 90% de la valeur cible. Une préparation reste stable d'un point de vue dosage que si la variation en concentration obtenue à un instant  $t$  n'excède pas 10%. Cette limite peut être discutable : les "*guidelines for the practical stability studies of anticancer drugs : a European consensus conference*" (123) indiquent que pour chaque molécule, en considérant notamment son index thérapeutique et les risques liés aux produits de dégradation, la limite classique de 10% maximum de dégradation peut être inappropriée. Au regard de ces considérations, nous pouvons conserver cette limite de 10% étant donné que la nicardipine n'est pas un principe actif à marge

thérapeutique étroite et que ses principaux produits de dégradation sont connus et non-toxiques.

Les CV calculés sur le pourcentage restant de nicardipine sont de l'ordre de 3% et ne dépassent jamais les 6%. Cela démontre une bonne fidélité tout au long du processus, de la préparation des lots, à la dilution des échantillons prélevés et leur analyse en HPLC-MS/MS.

Au cours de l'étude, nous n'avons pas retrouvé la présence de produits de dégradation. Ces résultats pouvaient être attendus. En effet, la majeure partie des produits de dégradation retrouvés lors de la dégradation forcée, sont issus de l'instabilité de la nicardipine à la lumière. S'ils ont été obtenus après exposition de solutions à la lumière artificielle UVB, ces mêmes produits sont également retrouvés dans la littérature sur des solutions exposées à la lumière du jour, dans des conditions plus représentatives de la réalité (74,87). Les mêmes auteurs de ces études soulignent qu'une protection des solutions dans des flacons en verre brun est suffisante pour éviter la photodégradation. Ces conditions sont retrouvées dans notre étude. Quant aux produits issus de la dégradation basique, ils sont obtenus en soumettant la nicardipine à des conditions qui restent artificielles et drastiques. Ce principe actif est d'ailleurs connu pour être parfaitement stable en milieu acide (86), condition retrouvée dans notre formulation. La solution injectable de nicardipine, qui présente un pH acide, est stable 2 ans à température ambiante. En outre, d'autres dihydropyridines présentant une structure proche de la nicardipine, et formulés de façon similaire, ont montré une stabilité largement satisfaisante. Ainsi, une équipe pharmaceutique hollandaise a démontré récemment la stabilité d'une solution buvable d'amlodipine dosée à 0,5 mg/ml contenant du méthylparabène, du propylène glycol et du sirop simple pendant 1 an (124). La nifédipine s'est montrée quant à elle stable jusqu'à 3 mois dans deux types de formes orales liquides à température ambiante comme à 4°C (125).

En synthèse, notre étude a permis de valider la conservation à température ambiante comme à 4°C d'une forme buvable de nicardipine dosée à 2 mg/ml et formulée dans de l'Inorpha® avec 1% de polysorbate 80.

○ Perspectives :

La nicardipine a une place importante dans les options thérapeutiques pour la prise en charge de l'hypertension artérielle en pédiatrie. La mise à disposition d'une solution buvable est attendue par les pédiatres et les équipes soignantes. Une étude d'appréciation pourra être effectuée auprès des services prescripteurs. Il serait intéressant, pour compléter ce travail, de réaliser également une étude de biodisponibilité de cette nouvelle formulation.

Une des limites concernant sa délivrance aux services de soins est l'absence de mise à disposition de système d'administration standard et approprié telle qu'une seringue orale. Cela est extrapolable à l'ensemble des préparations orales liquides dispensées dans notre CHU. Elles sont administrées le plus souvent à l'aide de seringues graduées destinées à la voie parentérale qui, bien que précises, peuvent entraîner des erreurs d'administration. En outre, il existe une grande multiplicité des systèmes d'administration des formes buvables commercialisées. Dans notre établissement, sept systèmes d'administration différents sont retrouvés sur l'ensemble des spécialités liquides distribuées aux services de pédiatrie. Ces éléments peuvent contribuer à la survenue d'évènements indésirables médicamenteux évitables en pédiatrie, dont deux tiers surviennent au moment de l'administration (29). Une réflexion pourrait être menée afin d'assurer la délivrance de dispositifs uniques et standards avec tous les liquides oraux dans le but de réduire l'incidence d'évènements indésirables.

La réalisation des contrôles et de l'étude de stabilité nécessite d'avoir à disposition des équipements nécessaires et un personnel formé. Ces contraintes nous ont conduit à développer et/ou renforcer nos collaborations avec les laboratoires d'analyse du CHU afin de sous-traiter certaines analyses conformément au chapitre cinq des BPP relatif aux conditions de sous-traitance des contrôles des préparations.

Ces moyens mis à disposition ont permis de mener à bien notre étude, et permettront par la suite d'effectuer l'ensemble des contrôles nécessaires à la libération des lots imposés par la réalisation de préparations hospitalières. Ils assurent une plus grande sécurisation des préparations et *in fine* une plus grande sécurité pour le patient.

Il conviendra de définir un plan pour la libération d'un lot de solution buvable de nicardipine. Cependant, il existe une réelle absence de recommandations précises concernant les analyses à mettre en œuvre pour la libération des lots de telles préparations. L'application d'exigences proches de celles de l'industrie pharmaceutique sont difficilement réalisables sur ces préparations hospitalières, comportant un nombre restreint d'unité par lot (dix dans notre cas) et du fait de la destruction inévitable d'une partie du lot fabriqué.

Ce constat nous a conduit à envisager notre propre schéma de validation. Les BPP stipulent qu'un échantillon de chaque lot de préparations terminées est conservé dans l'échantillothèque d'une quantité minimale permettant de réaliser au moins une analyse complète. Un flacon du lot fabriqué pourra être stocké ainsi pour la réalisation d'une éventuelle analyse en cas de non conformité. Il est à conserver dans les conditions prévues pour la préparation pendant une durée au moins égale à sa date limite d'utilisation augmentée d'un an. Pour le contrôle libératoire, les BPP précisent que les échantillons doivent être représentatifs du lot dont ils sont issus. Statistiquement, l'échantillon est représentatif s'il est prélevé au hasard. Bien que l'étude ait montré une homogénéité de la teneur en principe actif entre les unités fabriquées d'un même lot, il convient d'effectuer les analyses sur plusieurs flacons à des stades significatifs de la production. Ainsi, 2 flacons (un en début de production et l'autre en fin) pourront être utilisés pour les contrôles du lot (soit 20% de la production). Le pharmacien ou l'interne chargé des contrôles devra récupérer l'ensemble des flacons constitutifs du lot et les placer en quarantaine. En plus des premiers contrôles d'étiquetage, de conditionnement, d'uniformité de volume à réaliser sur l'ensemble du lot, deux flacons pourront ensuite être prélevés afin de réaliser un dosage en teneur de nicardipine. Il serait particulièrement intéressant d'appliquer le concept du profil d'exactitude à tous les contrôles de qualité obtenus en routine. Les mêmes échantillons permettront de réaliser un contrôle du pH et un contrôle visuel des solutions.

Ces différents contrôles peuvent être très simples à appliquer sur une préparation hospitalière telle que la solution buvable de nicardipine. Néanmoins, de part les avantages offerts par ces préparations en série, nous pouvons envisager d'autres projets tels que la préparation à l'avance de collyres fortifiés ou d'autres solutions

buvables pédiatriques. Les contraintes organisationnelles de la sous-traitance représentent alors une vraie limite en regard de ces perspectives. Aux problèmes de coordination des différentes équipes et de la disponibilité des équipements conditionnant le temps d'analyse des préparations (inadéquat avec une libération rapide du produit fini) s'associe le problème de main d'œuvre souvent insuffisante pour accomplir ces différents contrôles. Dans ce contexte, l'implémentation, au sein même de la PUI, d'un laboratoire de contrôle disposant d'équipements spécifiques et d'un personnel formé permettrait la réalisation d'autres préparations hospitalières mais aussi de renforcer la sécurisation du processus de préparation, d'améliorer la qualité des fabrications internes, et contribuerait aux développements de nouvelles études de stabilité.

## CONCLUSION

---

Malgré une prévalence moins importante que chez l'adulte, l'hypertension artérielle en pédiatrie reste une pathologie grave par sa morbidité et ses répercussions rapides aux niveaux cardiovasculaire, neurologique et rénal. Son traitement est donc essentiel. La nicardipine fait partie des traitements hypotenseurs de première intention chez l'enfant du fait de sa bonne tolérance et de sa maniabilité.

Afin de répondre aux besoins des services de pédiatrie, nous avons développé une forme orale de nicardipine dosée à 2 mg/ml et adaptée à une administration chez les enfants.

L'étude de stabilité mise en place nous a permis de conclure à une stabilité physico-chimique et microbiologique de la formulation et de valider sa conservation pendant 3 mois lorsque les flacons sont conservés à l'abri de la lumière et à température ambiante comme à 4°C.

Nous avons opté pour une fabrication en série de cette nouvelle préparation hospitalière qui offre des avantages multiples en permettant notamment de limiter les contraintes organisationnelles et de répondre sans délai aux demandes des services de pédiatrie.

Il serait intéressant, pour compléter ce travail, de réaliser des études de biodisponibilité et un examen plus approfondi des caractéristiques rhéologiques de la formulation.

Cette nouvelle préparation hospitalière vient combler en partie le manque de médicaments antihypertenseurs disponibles pour la pédiatrie et s'inscrit dans un contexte global d'amélioration de la qualité et de la sécurité de la préparation et de l'administration des médicaments en pédiatrie.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

1. Levine SR, Cohen MR, Blanchard NR, Frederico F, Magelli M, Lomax C, et al. Draft guidelines for preventing medication errors in pediatrics. *J Pediatr Pharmacol Ther.* 2001;6:427-43.
2. Fontan JE, Mille F, Brion F. L'administration des médicaments à l'enfant hospitalisé. *Arch Pédiatrie.* 2004;11(10):1173-84.
3. Conroy S, Choonara I, Impicciatore P, Mohn A, Arnell H, Rane A, et al. Survey of unlicensed and off label drug use in paediatric wards in European countries. European Network for Drug Investigation in Children. *BMJ.* 2000;320(7227):79-82.
4. Combeau D, Fontan JE, Brion F. Analyse du livret thérapeutique d'un hôpital pédiatrique. *J Pharm Clin.* 1999;18(1):5-10.
5. Joret-Descout P, Prot-Labarthe S, Brion F, Bataille J, Hartmann JF, Bourdon O. Off-label and unlicensed utilisation of medicines in a French paediatric hospital. *Int J Clin Pharm.* 2015;37(6):1222-7.
6. Kmietowicz Z. Drug industry is unwilling to run trials in children. *BMJ.* 2000;320(7246):1362.
7. Corny J, Lebel D, Bailey B, Bussièrès JF. Unlicensed and off-label drug use in children before and after pediatric governmental initiatives. *J Pediatr Pharmacol Ther.* 2015;20(4):316-28.
8. Mason J, Pirmohamed M, Nunn T. Off-label and unlicensed medicine use and adverse drug reactions in children: a narrative review of the literature. *Eur J Clin Pharmacol.* 2012;68(1):21-8.
9. Conroy S. Extemporaneous (magistral) preparation of oral medicines for children in European hospitals. *Acta Paediatr.* 2003;92(4):408-410.
10. ANSM - Résumé du rapport d'analyse des préparations hospitalières déclarées à l'ANSM. Janvier 2008-janvier 2010 (cité 17 sept 2016). Disponible sur: [http://ansm.sante.fr/var/ansm\\_site/storage/original/application/add4cc16c0ebc582eaa27c153e3bb163.pdf](http://ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/add4cc16c0ebc582eaa27c153e3bb163.pdf)
11. Fontan JE, Combeau D, Brion F. Les préparations pédiatriques dans les hôpitaux français. *Arch Pédiatrie.* 2000;7(8):825-32.
12. EMA - Human Medicines Research and Development Support, 2014. Inventory of Paediatric Therapeutic Needs : Nephro-urology. London (EMA/PDCO/358806/2013)
13. EMA - Committee for Human Medicinal Products, 2006. Reflection Paper: Formulations of Choice for the Paediatric Population

14. Bonnes Pratiques de Préparation. Ministère de la Santé, de la Jeunesse et des Sports, AFSSAPS. Paris: 2008, 47-57. (cité 4 juill 2016). Disponible sur: <http://social-sante.gouv.fr/IMG/pdf/bo0707.pdf>
15. Code de la santé publique - Article L5126-1. Code de la santé publique.
16. Code de la santé publique - Article L5126-2. Code de la santé publique.
17. Draft guidelines on compounding of nonsterile products in pharmacies. American Society of Hospital Pharmacists. *Am J Hosp Pharm.* 1993;50(7):1452-61.
18. Nunn A, Aindow A, Woods D. International initiatives on extemporaneous dispensing. *Int J Pharm.* 2012;435(2):135-7.
19. Salunke S, Hempenstall J, Kendall R, Roger B, Mroz C, Nunn T, et al. European Paediatric Formulation Initiative's (EuPFI) 2nd conference commentary - Formulating better medicines for children. *Int J Pharm.* 2011;419(1-2):235-9.
20. EMA - Guideline on pharmaceutical development of medicines for paediatric use. London, 2012 (EMA/CHMP/QWP/805880/2012 Rev 2)
21. Sam T, Ernest TB, Walsh J, Williams JL. A benefit/risk approach towards selecting appropriate pharmaceutical dosage forms. An application for paediatric dosage form selection. *Int J Pharm.* 2012;435(2):115-23.
22. Bay M, Saint-Laurent C, Dupuis A. Les préparations buvables en pédiatrie. *Actual Pharm Hosp.* 2011;7(26):20-4.
23. Nunn T, Williams J. Formulation of medicines for children. *Br J Clin Pharmacol.* 2005;59(6):674-6.
24. Cram A, Breitreutz J, Dessetbrethes S, Nunn T, Tuleu C. Challenges of developing palatable oral paediatric formulations. *Int J Pharm.* 2009;365(1-2):1-3.
25. Ivanovska V, Rademaker CMA, Van Dijk L, Mantel-Teeuwisse AK. Pediatric drug formulations: a review of challenges and progress. *Pediatrics.* 2014;134(2):361-72.
26. Shehab N, Lewis CL, Streetman DD, Donn SM. Exposure to the pharmaceutical excipients benzyl alcohol and propylene glycol among critically ill neonates. *Pediatr Crit Care Med.* 2009;10(2):256-9.
27. Kulo A, Smits A, Naulaers G, De Hoon J, Allegaert K. Biochemical tolerance during low dose propylene glycol exposure in neonates: a formulation-controlled evaluation. *DARU J Pharm Sci.* 2012;20(1):1.
28. Conroy S, Sweis D, Planner C, Yeung V, Collier J, Haines L, et al. Interventions to reduce dosing errors in children: a systematic review of the literature. *Drug Saf.* 2007;30(12):1111-25.
29. Kaushal R, Goldmann DA, Keohane CA, Christino M, Honour M, Hale AS, et al. Adverse drug events in pediatric outpatients. *Ambul Pediatr.* 2007;7(5):383-9.

30. Strickley RG. Solubilizing excipients in oral and injectable formulations. *Pharm Res.* 2004;21(2):201-230.
31. Connors KA, Amidon GL, Stella VJ. *Chemical stability of pharmaceuticals: a handbook for pharmacists.* John Wiley & Sons; 1986. 854 p.
32. Jackson M, Lowey A. *Handbook of extemporaneous preparation: a guide to pharmaceutical compounding.* Pharmaceutical Press; 2010. 464 p.
33. Costello I. *Paediatric drug handling.* Pharmaceutical Press; 2007. 148 p.
34. Stansfield S. The art, science, and technology of pharmaceutical compounding. *Can J Hosp Pharm.* 2000;53(4).
35. Mugoyela V, Mwambete KD. Microbial contamination of nonsterile pharmaceuticals in public hospital settings. *Ther Clin Risk Manag.* 2010;443.
36. European Pharmacopoeia Online 9.0 (cité 5 juill 2016). Disponible sur: <http://online6.edqm.eu/ep900/>
37. Salgado AC, Rosa ML, Duarte MA, Almeida AJ. Stability of spironolactone in an extemporaneously prepared aqueous suspension: the importance of microbiological quality of compounded paediatric formulations. *Eur J Hosp Pharm Sci.* 2005;11(3):68-73.
38. Ernest TB, Elder DP, Martini LG, Roberts M, Ford JL. Developing paediatric medicines: identifying the needs and recognizing the challenges. *J Pharm Pharmacol.* 2007;59(8):1043-55.
39. Haywood A, Glass BD. Liquid dosage forms extemporaneously prepared from commercially available products - considering new evidence on stability. *J Pharm Pharm Sci.* 2013;16(3):441-55.
40. Johnson TN. Modelling approaches to dose estimation in children. *Br J Clin Pharmacol.* 2005;59(6):663-9.
41. Christensen ML. Best pharmaceuticals for children act and pediatric research equity act: time for permanent status. *J Pediatr Pharmacol Ther.* 2012;17(2):140-1.
42. Dempsey EM, Connolly K. Who are the PDCO? *Eur J Pediatr.* 2014;173(2):233-5.
43. Flynn J. The changing face of pediatric hypertension in the era of the childhood obesity epidemic. *Pediatr Nephrol Berl Ger.* 2013;28(7):1059-66.
44. Lo JC, Sinaiko A, Chandra M, Daley MF, Greenspan LC, Parker ED, et al. Prehypertension and hypertension in community-based pediatric practice. *Pediatrics.* 2013;131(2):e415-424.
45. Redwine KM, Acosta AA, Poffenbarger T, Portman RJ, Samuels J. Development of hypertension in adolescents with pre-hypertension. *J Pediatr.* 2012;160(1):98-103.

46. Lurbe E, Cifkova R, Cruickshank JK, Dillon MJ, Ferreira I, Invitti C, et al. Management of high blood pressure in children and adolescents: recommendations of the European Society of Hypertension. *J Hypertens*. 2009;27(9):1719-42.
47. National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Children and Adolescents. The fourth report on the diagnosis, evaluation, and treatment of high blood pressure in children and adolescents. *Pediatrics*. 2004;114(2 Suppl 4th Report):555-76.
48. André JL, Deschamps JP, Gueguen R. La tension artérielle chez l'enfant et l'adolescent. Valeurs rapportées à l'âge et à la taille chez 17 067 sujets. *Arch Fr Pédiatrie*. 1980;37(7):477-82.
49. André JL. Hypertension artérielle chez l'enfant et l'adolescent. *EMC - Cardiol-Angéiologie*. 2005;2(4):478-90.
50. Flynn JT. Hypertension in the neonatal period. *Curr Opin Pediatr*. 2012;24(2):197-204.
51. Greenough A, Emery EF, Gamsu HR. Dexamethasone and hypertension in preterm infants. *Eur J Pediatr*. 1992;151(2):134-5.
52. Williams CL, Hayman LL, Daniels SR, Robinson TN, Steinberger J, Paridon S, et al. Cardiovascular health in childhood: a statement for health professionals from the Committee on Atherosclerosis, Hypertension, and Obesity in the Young (AHOY) of the Council on Cardiovascular Disease in the Young, American Heart Association. *Circulation*. 2002;106(1):143-60.
53. Nahata MC. Lack of pediatric drug formulations. *Pediatrics*. 1999;104(3 Pt 2):607-9.
54. Yoon EY, Dombkowski KJ, Rocchini A, Lin JJ, Davis MM. Off-label utilization of antihypertensive medications in children. *Ambul Pediatr*. 2007;7(4):299-303.
55. Misurac J, Nichols KR, Wilson AC. Pharmacologic management of pediatric hypertension. *Paediatr Drugs*. 2016;18(1):31-43.
56. Chaturvedi S, Lipszyc DH, Licht C, Craig JC, Parekh R. Pharmacological interventions for hypertension in children. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014;(2):CD008117.
57. Ingelfinger JR. The child or adolescent with elevated blood pressure. *N Engl J Med*. 2014;371(11):1075.
58. Woroniecki RP, Flynn JT. How are hypertensive children evaluated and managed? A survey of North American pediatric nephrologists. *Pediatr Nephrol Berl Ger*. 2005;20(6):791-7.
59. Simonetti GD, Rizzi M, Donadini R, Bianchetti MG. Effects of antihypertensive drugs on blood pressure and proteinuria in childhood. *J Hypertens*. 2007;25(12):2370-6.

60. Flynn JT, Pasko DA. Calcium channel blockers: pharmacology and place in therapy of pediatric hypertension. *Pediatr Nephrol Berl Ger.* 2000;15(3-4):302-16.
61. Bruyne PD, Walle JV. Management of hypertension in children and adolescents. *Acta Clin Belg.* 2015;70(2):87-94.
62. Chu PY, Campbell MJ, Miller SG, Hill KD. Anti-hypertensive drugs in children and adolescents. *World J Cardiol.* 2014;6(5):234-44.
63. Silverstein DM, Palmer J, Baluarte HJ, Brass C, Conley SB, Polinsky MS. Use of calcium-channel blockers in pediatric renal transplant recipients. *Pediatr Transplant.* 1999;3(4):288-92.
64. Temple ME, Nahata MC. Treatment of pediatric hypertension. *Pharmacotherapy.* 2000;20(2):140-50.
65. Portman RJ, McNiece KL, Swinford RD, Braun MC, Samuels JA. Pediatric hypertension: diagnosis, evaluation, management, and treatment for the primary care physician. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care.* 2005;35(7):262-94.
66. Flynn JT. Efficacy and safety of prolonged amlodipine treatment in hypertensive children. *Pediatr Nephrol.* 2005;20(5):631-5.
67. Webb TN, Shatat IF, Miyashita Y. Therapy of acute hypertension in hospitalized children and adolescents. *Curr Hypertens Rep.* 2014;16(4):425.
68. Yiu V, Orrbine E, Rosychuk RJ, MacLaine P, Goodyer P, Girardin C, et al. The safety and use of short-acting nifedipine in hospitalized hypertensive children. *Pediatr Nephrol Berl Ger.* 2004;19(6):644-50.
69. Trachtman H, Frank R, Mahan JD, Portman R, Restaino I, Matoo TK, et al. Clinical trial of extended-release felodipine in pediatric essential hypertension. *Pediatr Nephrol Berl Ger.* 2003;18(6):548-53.
70. Meyers RS, Siu A. Pharmacotherapy review of chronic pediatric hypertension. *Clin Ther.* 2011;33(10):1331-56.
71. Flynn JT, Mottes TA, Brophy PD, Kershaw DB, Smoyer WE, Bunchman TE. Intravenous nicardipine for treatment of severe hypertension in children. *J Pediatr.* 2001;139(1):38-43.
72. Treluyer JM, Hubert P, Jouvet P, Couderc S, Cloup M. Intravenous nicardipine in hypertensive children. *Eur J Pediatr.* 1993;152(9):712-4.
73. Kirkiacharian S. *Guide de chimie médicinale et médicaments.* Tec & Doc Lavoisier; 2010.
74. Baranda AB, Alonso RM, Jiménez RM, Weinmann W. Instability of calcium channel antagonists during sample preparation for LC-MS-MS analysis of serum samples. *Forensic Sci Int.* 2006;156(1):23-34.

75. Maurin MB, Rowe SM, Koval CA, Hussain MA. Solubilization of nicardipine hydrochloride via complexation and salt formation. *J Pharm Sci.* 1994;83(10):1418-20.
76. Amidon GL, Lennernäs H, Shah VP, Crison JR. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharm Res.* 1995;12(3):413-20.
77. Munoz R, Cruz E da, Vetterly CG, Cooper D, Berry D. *Handbook of pediatric cardiovascular drugs.* Springer; 2014. 651 p.
78. Hubert M, Lusson JR. Pharmacokinetics of oral nicardipine in children with cardiovascular diseases, cystic fibrosis and systemic arterial hypertension. In : *Pharmacocinétique : de la recherche à la clinique.* Brès J., Panis G., eds. John Libbey, Paris, 513-514. 1992.
79. Decramer S, Gouyon JB. Inhibiteurs calciques dans l'hypertension artérielle de l'enfant. *Médecine Thérapeutique.* 2002;8(6):309-16.
80. Eymery V, Niel O, Mousnier A, Bérard E. Posologies des principaux médicaments dans le traitement de l'hypertension artérielle de l'enfant en France. *Arch Pédiatrie.* 2009;16(10):1419-23.
81. Buttet C, Cochat P, Floret D, Malfroy J, David L. Traitement des poussées hypertensives de l'enfant par la nicardipine. *Pédiatrie.* 1988;43(5):447-50.
82. Tack ED, Perlman JM. Renal failure in sick hypertensive premature infants receiving captopril therapy. *J Pediatr.* 1988;112(5):805-10.
83. Dasta JF, Boucher BA, Brophy GM, Cohen H, Hassan E, Maclaren R, et al. Intravenous to oral conversion of antihypertensives: a toolkit for guideline development. *Ann Pharmacother.* 2010;44(9):1430-47.
84. Chen SM, Hsieh MC, Chao SH, Chang EE, Wang PY, Wu A-B. Separation and structure determination of nicardipine photoproducts by LC-ESI-MS. *Biomed Chromatogr BMC.* 2008;22(9):1008-12.
85. Ragno G, Vetuschi C. UV derivative spectrophotometric assay of nicardipine and its photodegradation product. *Pharmazie.* 1998;53(9):628-31.
86. Al-Ghannam SM, Al-Olayan AM. Stability-indicating HPLC method for the determination of nicardipine in capsules and spiked human plasma. Identification of degradation products using HPLC/MS. *Arab J Chem.* 2014;
87. Bonferoni MC, Mellerio G, Giunchedi P, Caramella C, Conte U. Photostability evaluation of nicardipine · HCl solutions. *Int J Pharm.* 1992;80(1):109-17.
88. Squella JA, Borges Y, Celedon C, Peredo P, Nuñez-Vergara LJ. Nicardipine: Differential pulse polarography and photodecomposition. *Electroanalysis.* 1991;3(3):221-5.

89. Gibbs NK, Traynor NJ, Johnson BE, Ferguson J. In vitro phototoxicity of nifedipine: Sequential induction of toxic and non-toxic photoproducts with UVA radiation. *J Photochem Photobiol B.* 1992;13(3):275-88.
90. Gadkari T, Chandrachood P, Torane R, Tele S, Deshpande N, Salvekar J. Forced degradation study to develop and validate stability indicating RP-LC method for quantification of nicardipine HCl in bulk and tablet formulation. *Int J Pharm Pharm Sci.* 2(Suppl 4):162-4.
91. Ubale MB, Dhakane VD, Chaudhari VR. A validated stability-indicating HPLC assay method for Nicardipine Hydrochloride in bulk drug and dosage form. *Elixir Int J.* 2011;(41):5867-70.
92. Lotfy HM, Hegazy MAE, El-aziz MMA, Fattah LEA. Stability indicating spectrophotometric methods determination of nicardipine in the presence of its alkaline induced degradation products. *Int J Pharm Pharm Sci.* 2016;8(3):62-6.
93. ANSM - Liste des Excipients à Effet Notoire - Mise à Jour de la liste et des libellés selon le Guideline européen 2003 (cité 31 août 2016). Disponible sur: [http://ansm.sante.fr/var/ansm\\_site/storage/original/application/29aa941a3e557fb62cbe45ab09dce305.pdf](http://ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/29aa941a3e557fb62cbe45ab09dce305.pdf)
94. Aliabadi HM, Romanick M, Somayaji V, Mahdipoor P, Lavasanifar A. Stability of compounded thioguanine oral suspensions. *Am J Health Syst Pharm.* 2011;68(10):900-8.
95. Morrison JT, Lugo RA, Thigpen JC, Brown SD. Stability of extemporaneously prepared lansoprazole suspension at two temperatures. *J Pediatr Pharmacol Ther.* 2013;18(2):122-7.
96. Navid F, Christensen R, Minkin P, Stewart CF, Furman WL, Baker S. Stability of sunitinib in oral suspension. *Ann Pharmacother.* 2008;42(7):962-6.
97. Pitt JJ. Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry. *Clin Biochem Rev.* 2009;30(1):19-34.
98. Narayanam M, Handa T, Sharma P, Jhajra S, Muthe PK, Dappili PK, et al. Critical practical aspects in the application of liquid chromatography-mass spectrometric studies for the characterization of impurities and degradation products. *J Pharm Biomed Anal.* 2014;87:191-217.
99. ISO 7218 : 2007 - Numérations par comptage de colonies - Exigences générales et recommandations. ISO. (cité 2 sept 2016). Disponible sur: [http://www.iso.org/iso/fr/home/store/catalogue\\_ics/catalogue\\_detail\\_ics.htm?ics1=07&ics2=100&ics3=30&csnumber=36534](http://www.iso.org/iso/fr/home/store/catalogue_ics/catalogue_detail_ics.htm?ics1=07&ics2=100&ics3=30&csnumber=36534)
100. Vu N, Lou JR, Kupiec TC. Quality control analytical methods: microbial limit tests for nonsterile pharmaceuticals, Part 1. *Int J Pharm Compd.* 2014;18(3):213-21.

101. Hubert P, Nguyen-Huu JJ, Boulanger B. Validation des procédures analytiques quantitatives : harmonisation des démarches. STP Pharma Prat. 2003;13(3):101-38.
102. EMA - ICH Topic Q6A Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for New Drug Substances and New Drug Products: Chemical Substances.
103. EMA - European Commission. Eudralex volume 3 - Medicinal products for human and veterinary use: Guidelines 3AQ11A: Specifications and control tests on the finished product (1992).
104. ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE: validation of analytical procedures: definitions and terminology (Q2A), Tripartite International Conference on Harmonization (ICH) text, ICH Tech coordination, Londres, 1994.
105. Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (FDA), Center for Drug Evaluation and Research (CDER), 2015.
106. Guide méthodologique des études de stabilité des préparations. SFPC; 2013. (cité 2 sept 2016). Disponible sur : [http://www.gerpac.eu/IMG/pdf/guide\\_de\\_stabilite\\_vf\\_avril2013.pdf](http://www.gerpac.eu/IMG/pdf/guide_de_stabilite_vf_avril2013.pdf)
107. ACADEMIE NATIONALE DE PHARMACIE. Dictionnaire des sciences pharmaceutiques & biologiques. 2e éd. Paris: Editions Louis Pariente; 2001. 572 p.
108. Ongoing Stability Testing: Requirements, Solutions and Potential Pitfalls - Innovations in Pharmaceutical Technology, April 2009, S. 78-80.
109. Polo AF, Poy MC, Bautista SC, Arenas MO, Salinas FC, Albert EH. Osmolality of oral liquid dosage forms to be administered to newborns in a hospital. Farm Hosp. 2007;31(5):311.
110. Rowe RC. Handbook of pharmaceutical excipients. Pharmaceutical Press; 2009. 888 p.
111. Alexander KS, Thyagarajapuram N. Formulation and accelerated stability studies for an extemporaneous suspension of amiodarone hydrochloride. Int J Pharm Compd. 2003;7(5):389-93.
112. Fawcett JP, Boulton DW, Jiang R, Woods DJ. Stability of hydrocortisone oral suspensions prepared from tablets and powder. Ann Pharmacother. 1995;29(10):987-90.
113. Santovena A, Llabre's M, Farina JB. Quality control and physical and chemical stability of hydrocortisone oral suspension: an interlaboratory study. Int J Pharm Compd. 2010;14(5):430-5.
114. Zietsman S, Kilian G, Worthington M, Stubbs C. Formulation development and stability studies of aqueous metronidazole benzoate suspensions containing various suspending agents. Drug Dev Ind Pharm. 2007;33(2):191-7.

115. EMA - Committee for Human Medicinal Products. Background Review for the Excipient Propylene Glycol. European Medicines Agency, London, 2014.
116. Turner MA, Duncan J, Shah U, Metsvaht T, Varendi H, Nellis G, et al. European study of neonatal exposure to excipients: an update. *Int J Pharm.* 2013;457(1):357-8.
117. Alade SL, Brown RE, Paquet A. Polysorbate 80 and E-Ferol toxicity. *Pediatrics.* 1986;77(4):593-7.
118. Casas M, Álvarez J, Lucero MJ. Physicochemical stability of captopril and enalapril extemporaneous formulations for pediatric patients. *Pharm Dev Technol.* 2015;20(3):271-8.
119. Dreno C, Gicquel T, Harry M, Tribut O, Aubin F, Brandhonneur N, et al. Formulation and stability study of a pediatric 2% phenylephrine hydrochloride eye drop solution. *Ann Pharm Fr.* 2015;73(1):31-6.
120. Garg A, Garg S, She RW. Development of an extemporaneous oral liquid formulation of oxandrolone and its stability evaluation. *Burns.* 2011;37(7):1150-3.
121. Kintzel PE, Zhao T, Wen B, Sun D. Stability of i.v. admixture containing metoclopramide, diphenhydramine hydrochloride, and dexamethasone sodium phosphate in 0.9% sodium chloride injection. *Am J Health Syst Pharm.* 2014;71(23):2061-5.
122. Hendrickx S, Verón AM, Van Schepdael A, Adams E. Applicability of refractometry for fast routine checking of hospital preparations. *Eur J Pharm Sci.* 2016;86:13-9.
123. Bardin C, Astier A, Vulto A, Sewell G, Vigneron J, Trittler R, et al. Guidelines for the practical stability studies of anticancer drugs: a European consensus conference. *Ann Pharm Fr.* 2011;69(4):221-31.
124. Van Der Vossen AC, Van Der Velde I, Smeets OSNM, Postma DJ, Vermes A, Koch BCP, et al. Design and stability study of an oral solution of amlodipine besylate for pediatric patients. *Eur J Pharm Sci.* 2016;92:220-3.
125. Nahata MC, Morosco RS, Willhite EA. Stability of nifedipine in two oral suspensions stored at two temperatures. *J Am Pharm Assoc.* 2002;42(6):865-7.

# ANNEXES

**Annexe 1 :** Tables des normes de TA de l'enfant, fonction du percentile de la taille et du sexe, publiées en 2005, dans « The fourth report on the Diagnosis, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure in Children and Adolescents »

**Blood Pressure Levels for Boys by Age and Height Percentile\***

Age (Year)	BP Percentile ↓	Systolic BP (mmHg)							Diastolic BP (mmHg)						
		← Percentile of Height →							← Percentile of Height →						
		5th	10th	25th	50th	75th	90th	95th	5th	10th	25th	50th	75th	90th	95th
1	50th	80	81	83	85	87	88	89	34	35	36	37	38	39	39
	90th	94	95	97	99	100	102	103	49	50	51	52	53	53	54
	95th	98	99	101	103	104	106	106	54	54	55	56	57	58	58
	99th	105	106	108	110	112	113	114	61	62	63	64	65	66	66
2	50th	84	85	87	88	90	92	92	39	40	41	42	43	44	44
	90th	97	99	100	102	104	105	106	54	55	56	57	58	58	59
	95th	101	102	104	106	108	109	110	59	59	60	61	62	63	63
	99th	109	110	111	113	115	117	117	66	67	68	69	70	71	71
3	50th	86	87	89	91	93	94	95	44	44	45	46	47	48	48
	90th	100	101	103	105	107	108	109	59	59	60	61	62	63	63
	95th	104	105	107	109	110	112	113	63	63	64	65	66	67	67
	99th	111	112	114	116	118	119	120	71	71	72	73	74	75	75
4	50th	88	89	91	93	95	96	97	47	48	49	50	51	51	52
	90th	102	103	105	107	109	110	111	62	63	64	65	66	66	67
	95th	106	107	109	111	112	114	115	66	67	68	69	70	71	71
	99th	113	114	116	118	120	121	122	74	75	76	77	78	78	79
5	50th	90	91	93	95	96	98	98	50	51	52	53	54	55	55
	90th	104	105	106	108	110	111	112	65	66	67	68	69	69	70
	95th	108	109	110	112	114	115	116	69	70	71	72	73	74	74
	99th	115	116	118	120	121	123	123	77	78	79	80	81	81	82
6	50th	91	92	94	96	98	99	100	53	53	54	55	56	57	57
	90th	105	106	108	110	111	113	113	68	68	69	70	71	72	72
	95th	109	110	112	114	115	117	117	72	72	73	74	75	76	76
	99th	116	117	119	121	123	124	125	80	80	81	82	83	84	84
7	50th	92	94	95	97	99	100	101	55	55	56	57	58	59	59
	90th	106	107	109	111	113	114	115	70	70	71	72	73	74	74
	95th	110	111	113	115	117	118	119	74	74	75	76	77	78	78
	99th	117	118	120	122	124	125	126	82	82	83	84	85	86	86
8	50th	94	95	97	99	100	102	102	56	57	58	59	60	60	61
	90th	107	109	110	112	114	115	116	71	72	72	73	74	75	76
	95th	111	112	114	116	118	119	120	75	76	77	78	79	79	80
	99th	119	120	122	123	125	127	127	83	84	85	86	87	87	88
9	50th	95	96	98	100	102	103	104	57	58	59	60	61	61	62
	90th	109	110	112	114	115	117	118	72	73	74	75	76	76	77
	95th	113	114	116	118	119	121	121	76	77	78	79	80	81	81
	99th	120	121	123	125	127	128	129	84	85	86	87	88	88	89
10	50th	97	98	100	102	103	105	106	58	59	60	61	61	62	63
	90th	111	112	114	115	117	119	119	73	73	74	75	76	77	78
	95th	115	116	117	119	121	122	123	77	78	79	80	81	81	82
	99th	122	123	125	127	128	130	130	85	86	86	88	88	89	90

<sup>10</sup>

The Fourth Report on the Diagnosis, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure in Children and Adolescents

Age (Year)	BP Percentile ↓	Systolic BP (mmHg)							Diastolic BP (mmHg)						
		← Percentile of Height →							← Percentile of Height →						
		5th	10th	25th	50th	75th	90th	95th	5th	10th	25th	50th	75th	90th	95th
11	50th	99	100	102	104	105	107	107	59	59	60	61	62	63	63
	90th	113	114	115	117	119	120	121	74	74	75	76	77	78	78
	95th	117	118	119	121	123	124	125	78	78	79	80	81	82	82
	99th	124	125	127	129	130	132	132	86	86	87	88	89	90	90
12	50th	101	102	104	106	108	109	110	59	60	61	62	63	63	64
	90th	115	116	118	120	121	123	123	74	75	75	76	77	78	79
	95th	119	120	122	123	125	127	127	78	79	80	81	82	82	83
	99th	126	127	129	131	133	134	135	86	87	88	89	90	90	91
13	50th	104	105	106	108	110	111	112	60	60	61	62	63	64	64
	90th	117	118	120	122	124	125	126	75	75	76	77	78	79	79
	95th	121	122	124	126	128	129	130	79	79	80	81	82	83	83
	99th	128	130	131	133	135	136	137	87	87	88	89	90	91	91
14	50th	106	107	109	111	113	114	115	60	61	62	63	64	65	65
	90th	120	121	123	125	126	128	128	75	76	77	78	79	79	80
	95th	124	125	127	128	130	132	132	80	80	81	82	83	84	84
	99th	131	132	134	136	138	139	140	87	88	89	90	91	92	92
15	50th	109	110	112	113	115	117	117	61	62	63	64	65	66	66
	90th	122	124	125	127	129	130	131	76	77	78	79	80	80	81
	95th	126	127	129	131	133	134	135	81	81	82	83	84	85	85
	99th	134	135	136	138	140	142	142	88	89	90	91	92	93	93
16	50th	111	112	114	116	118	119	120	63	63	64	65	66	67	67
	90th	125	126	128	130	131	133	134	78	78	79	80	81	82	82
	95th	129	130	132	134	135	137	137	82	83	83	84	85	86	87
	99th	136	137	139	141	143	144	145	90	90	91	92	93	94	94
17	50th	114	115	116	118	120	121	122	65	66	66	67	68	69	70
	90th	127	128	130	132	134	135	136	80	80	81	82	83	84	84
	95th	131	132	134	136	138	139	140	84	85	86	87	87	88	89
	99th	139	140	141	143	145	146	147	92	93	93	94	95	96	97

BP, blood pressure

\* The 90th percentile is 1.28 SD, 95th percentile is 1.645 SD, and the 99th percentile is 2.326 SD over the mean. For research purposes, the standard deviations in appendix table B-1 allow one to compute BP Z-scores and percentiles for boys with height percentiles given in table 3 (i.e., the 5th, 10th, 25th, 50th, 75th, 90th, and 95th percentiles). These height percentiles must be converted to height Z-scores given by (5% = -1.645; 10% = -1.28; 25% = -0.68; 50% = 0; 75% = 0.68; 90% = 1.28; 95% = 1.645) and then computed according to the methodology in steps 2-4 described in appendix B. For children with height percentiles other than these, follow steps 1-4 as described in appendix B.

**Blood Pressure Levels for Girls by Age and Height Percentile\***

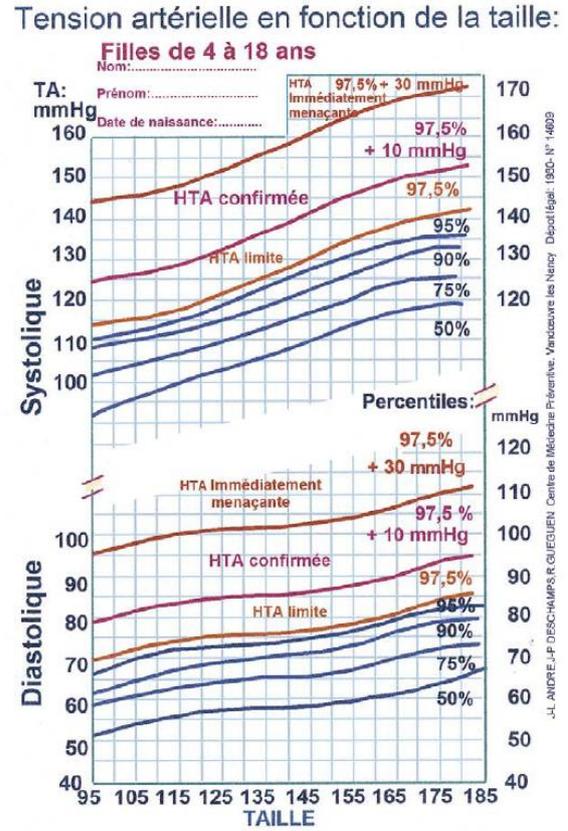
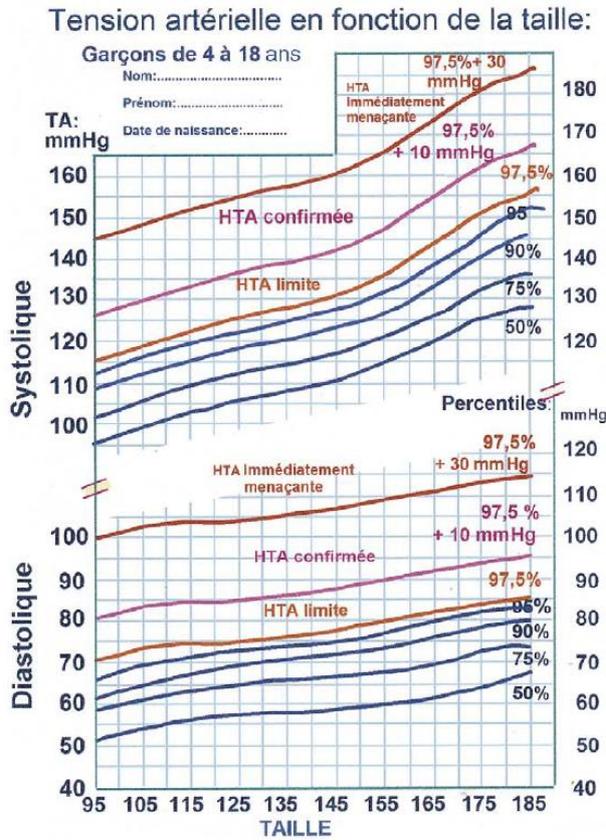
Age (Year)	BP Percentile ↓	Systolic BP (mmHg)							Diastolic BP (mmHg)						
		← Percentile of Height →							← Percentile of Height →						
		5th	10th	25th	50th	75th	90th	95th	5th	10th	25th	50th	75th	90th	95th
1	50th	83	84	85	86	88	89	90	38	39	39	40	41	41	42
	90th	97	97	98	100	101	102	103	52	53	53	54	55	55	56
	95th	100	101	102	104	105	106	107	56	57	57	58	59	59	60
	99th	108	108	109	111	112	113	114	64	64	65	65	66	67	67
2	50th	85	85	87	88	89	91	91	43	44	44	45	46	46	47
	90th	98	99	100	101	103	104	105	57	58	58	59	60	61	61
	95th	102	103	104	105	107	108	109	61	62	62	63	64	65	65
	99th	109	110	111	112	114	115	116	69	69	70	70	71	72	72
3	50th	86	87	88	89	91	92	93	47	48	48	49	50	50	51
	90th	100	100	102	103	104	106	106	61	62	62	63	64	64	65
	95th	104	104	105	107	108	109	110	65	66	66	67	68	68	69
	99th	111	111	113	114	115	116	117	73	73	74	74	75	76	76
4	50th	88	88	90	91	92	94	94	50	50	51	52	52	53	54
	90th	101	102	103	104	106	107	108	64	64	65	66	67	67	68
	95th	105	106	107	108	110	111	112	68	68	69	70	71	71	72
	99th	112	113	114	115	117	118	119	76	76	76	77	78	79	79
5	50th	89	90	91	93	94	95	96	52	53	53	54	55	55	56
	90th	103	103	105	106	107	109	109	66	67	67	68	69	69	70
	95th	107	107	108	110	111	112	113	70	71	71	72	73	73	74
	99th	114	114	116	117	118	120	120	78	78	79	79	80	81	81
6	50th	91	92	93	94	96	97	98	54	54	55	56	56	57	58
	90th	104	105	106	108	109	110	111	68	68	69	70	70	71	72
	95th	108	109	110	111	113	114	115	72	72	73	74	74	75	76
	99th	115	116	117	119	120	121	122	80	80	80	81	82	83	83
7	50th	93	93	95	96	97	99	99	55	56	56	57	58	58	59
	90th	106	107	108	109	111	112	113	69	70	70	71	72	72	73
	95th	110	111	112	113	115	116	116	73	74	74	75	76	76	77
	99th	117	118	119	120	122	123	124	81	81	82	82	83	84	84
8	50th	95	95	96	98	99	100	101	57	57	57	58	59	60	60
	90th	108	109	110	111	113	114	114	71	71	71	72	73	74	74
	95th	112	112	114	115	116	118	118	75	75	75	76	77	78	78
	99th	119	120	121	122	123	125	125	82	82	83	83	84	85	86
9	50th	96	97	98	100	101	102	103	58	58	58	59	60	61	61
	90th	110	110	112	113	114	116	116	72	72	72	73	74	75	75
	95th	114	114	115	117	118	119	120	76	76	76	77	78	79	79
	99th	121	121	123	124	125	127	127	83	83	84	84	85	86	87
10	50th	98	99	100	102	103	104	105	59	59	59	60	61	62	62
	90th	112	112	114	115	116	118	118	73	73	73	74	75	76	76
	95th	116	116	117	119	120	121	122	77	77	77	78	79	80	80
	99th	123	123	125	126	127	129	129	84	84	85	86	86	87	88

Age (Year)	BP Percentile ↓	Systolic BP (mmHg)							Diastolic BP (mmHg)						
		← Percentile of Height →							← Percentile of Height →						
		5th	10th	25th	50th	75th	90th	95th	5th	10th	25th	50th	75th	90th	95th
11	50th	100	101	102	103	105	106	107	60	60	60	61	62	63	63
	90th	114	114	116	117	118	119	120	74	74	74	75	76	77	77
	95th	118	118	119	121	122	123	124	78	78	78	79	80	81	81
	99th	125	125	126	128	129	130	131	85	85	86	87	87	88	89
12	50th	102	103	104	105	107	108	109	61	61	61	62	63	64	64
	90th	116	116	117	119	120	121	122	75	75	75	76	77	78	78
	95th	119	120	121	123	124	125	126	79	79	79	80	81	82	82
	99th	127	127	128	130	131	132	133	86	86	87	88	88	89	90
13	50th	104	105	106	107	109	110	110	62	62	62	63	64	65	65
	90th	117	118	119	121	122	123	124	76	76	76	77	78	79	79
	95th	121	122	123	124	126	127	128	80	80	80	81	82	83	83
	99th	128	129	130	132	133	134	135	87	87	88	89	89	90	91
14	50th	106	106	107	109	110	111	112	63	63	63	64	65	66	66
	90th	119	120	121	122	124	125	125	77	77	77	78	79	80	80
	95th	123	123	125	126	127	129	129	81	81	81	82	83	84	84
	99th	130	131	132	133	135	136	136	88	88	89	90	90	91	92
15	50th	107	108	109	110	111	113	113	64	64	64	65	66	67	67
	90th	120	121	122	123	125	126	127	78	78	78	79	80	81	81
	95th	124	125	126	127	129	130	131	82	82	82	83	84	85	85
	99th	131	132	133	134	136	137	138	89	89	90	91	91	92	93
16	50th	108	108	110	111	112	114	114	64	64	65	66	66	67	68
	90th	121	122	123	124	126	127	128	78	78	79	80	81	81	82
	95th	125	126	127	128	130	131	132	82	82	83	84	85	85	86
	99th	132	133	134	135	137	138	139	90	90	90	91	92	93	93
17	50th	108	109	110	111	113	114	115	64	65	65	66	67	67	68
	90th	122	122	123	125	126	127	128	78	79	79	80	81	81	82
	95th	125	126	127	129	130	131	132	82	83	83	84	85	85	86
	99th	133	133	134	136	137	138	139	90	90	91	91	92	93	93

BP, blood pressure

\* The 90th percentile is 1.28 SD, 95th percentile is 1.645 SD, and the 99th percentile is 2.326 SD over the mean. For research purposes, the standard deviations in appendix table B-1 allow one to compute BP Z-scores and percentiles for girls with height percentiles given in table 4 (i.e., the 5th, 10th, 25th, 50th, 75th, 90th, and 95th percentiles). These height percentiles must be converted to height Z-scores given by (5% = -1.645; 10% = -1.28; 25% = -0.68; 50% = 0; 75% = 0.68; 90% = 1.28; 95% = 1.645) and then computed according to the methodology in steps 2-4 described in appendix B. For children with height percentiles other than these, follow steps 1-4 as described in appendix B.

**Annexe 2 : Pression artérielle des garçons et des filles de 4 à 18 ans en fonction de la taille. Étude de Nancy et seuils de l'hypertension artérielle**



J.-L. ANDRE, J.-P. DESCHAMPS, R. GUEGUEN, Centre de Médecine Préventive, Vandœuvre les Nancy, Diabot'Espal, 1900 - N° 14609

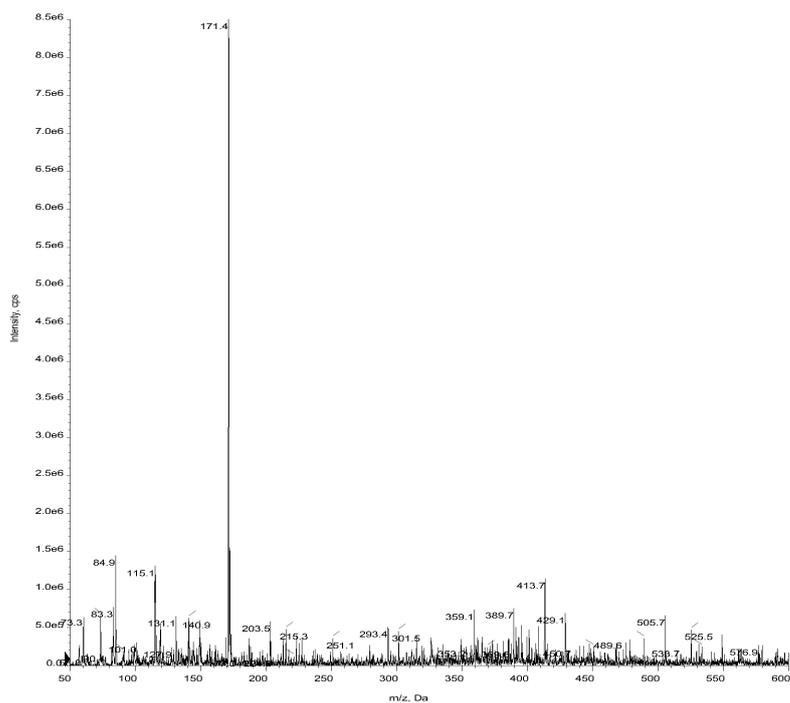
### Annexe 3 : Recherche d'un effet matrice

GAMME SANS MATRICE				
Niveaux	Concentration des échantillons de calibration X	Séries (jours)	Mesurages (Réponses instrumentales) Y	
			Répétition 1	Répétition 2
1	85	1	0,508	0,511
		2	0,51	0,509
		3	0,502	0,501
2	92,5	1	0,557	0,556
		2	0,561	0,56
		3	0,548	0,547
3	100	1	0,605	0,603
		2	0,612	0,607
		3	0,596	0,593
4	107,5	1	0,651	0,647
		2	0,661	0,664
		3	0,643	0,646
5	115	1	0,699	0,698
		2	0,705	0,703
		3	0,669	0,691
GAMME AVEC MATRICE				
Niveaux	Concentration des échantillons de calibration (CIQ) X	Séries (jours)	Mesurages (Réponses instrumentales) Y	
			Répétition 1	Répétition 2
1	85	1	0,51	0,509
		2	0,504	0,522
		3	0,499	0,501
2	92,5	1	0,561	0,553
		2	0,547	0,559
		3	0,546	0,54
3	100	1	0,602	0,604
		2	0,602	0,61
		3	0,604	0,587
4	107,5	1	0,649	0,649
		2	0,657	0,653
		3	0,635	0,647
5	115	1	0,692	0,697
		2	0,708	0,707
		3	0,701	0,698

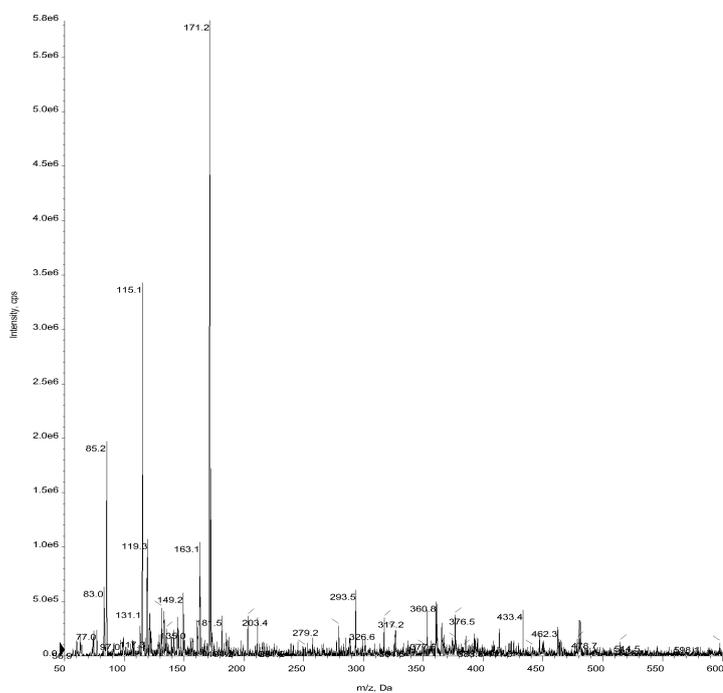
GAMME SANS MATRICE			
	Pente droite de régression		ordonnée à l'origine
Gamme 1 (série 1, rép 1)	0,006346667	Gamme 1 (série 1, rép 1)	-0,030666667
Gamme 2 (série 2, rép 1)	0,006533333	Gamme 2 (série 2, rép 1)	-0,043533333
Gamme 3 (série 3, rép 1)	0,00572	Gamme 3 (série 3, rép 1)	0,0196
Gamme 4 (série 1, rép 2)	0,0062	Gamme 4 (série 1, rép 2)	-0,017
Gamme 5 (série 2, rép 2)	0,00656	Gamme 5 (série 2, rép 2)	-0,0474
Gamme 6 (série 3, rép 2)	0,006386667	Gamme 6 (série 3, rép 2)	-0,043066667
GAMME AVEC MATRICE			
	Pente droite de régression		ordonnée à l'origine
Gamme 1 (série 1, rép 1)	0,006026667	Gamme 1 (série 1, rép 1)	0,000133333
Gamme 2 (série 2, rép 1)	0,006906667	Gamme 2 (série 2, rép 1)	-0,087066667
Gamme 3 (série 3, rép 1)	0,006573333	Gamme 3 (série 3, rép 1)	-0,060333333
Gamme 4 (série 1, rép 2)	0,006293333	Gamme 4 (série 1, rép 2)	-0,026933333
Gamme 5 (série 2, rép 2)	0,006186667	Gamme 5 (série 2, rép 2)	-0,008466667
Gamme 6 (série 3, rép 2)	0,00668	Gamme 6 (série 3, rép 2)	-0,0734

<b>Comparaison des pentes</b>		
<b>Test de comparaison des moyennes (séries indépendantes)</b>		
	<b>penne (sans matrice)</b>	<b>penne (avec matrice)</b>
<b>Effectif</b>	6	6
<b>Moyenne</b>	0,006291111	0,006444444
<b>Ecart-type</b>	0,000309082	0,000331533
<b>Variance</b>	9,55319E-08	1,09914E-07
<b>degrés de liberté (ddl)</b>	5	5
<b>Test de comparaison des variances (Fisher)</b>		
<b>Rapport des variances F</b>	1,150548973	
<b>ddl (num)</b>	5	
<b>ddl (den)</b>	5	
<b>Seuil (5 %)</b>	7,146381829	
<b>Degré de signification</b>	0,881446979	
<b>Conclusion :</b>		
<b>Pas de différence significative entre les variances des 2 groupes ; degré de signification p = 0.88145</b>		
<b>Test de student (variances égales)</b>		
<b>Variance commune</b>	1,02723E-07	
<b>ddl</b>	10	
<b>t</b>	0,82863531	
<b>Seuil (5%)</b>	2,228138852	
<b>Degré de signification</b>	0,426645983	
<b>Conclusion :</b>		
<b>Pas de différence significative entre les moyennes des 2 groupes; degré de signification p = 0.42665</b>		
<b>PAS D'EFFET MATRICE</b>		

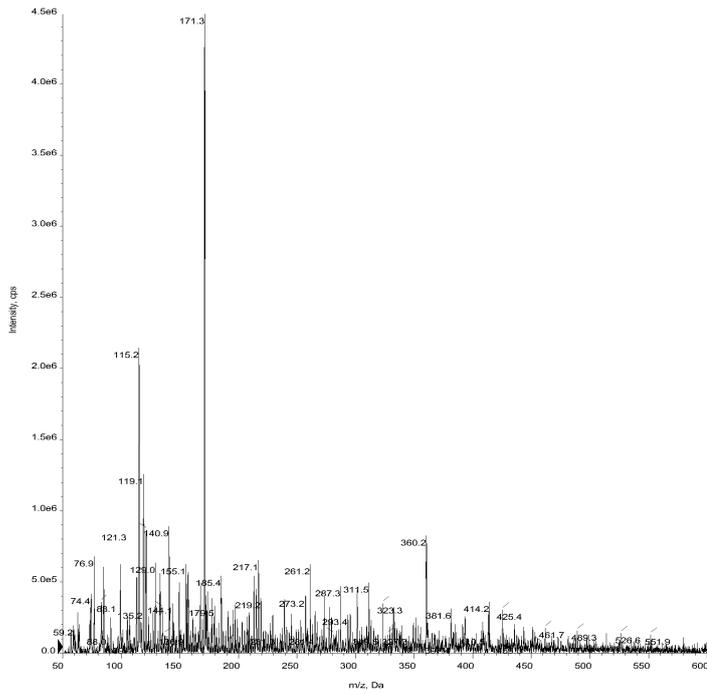
#### Annexe 4 : Spectre de masse des témoins pour la dégradation forcée



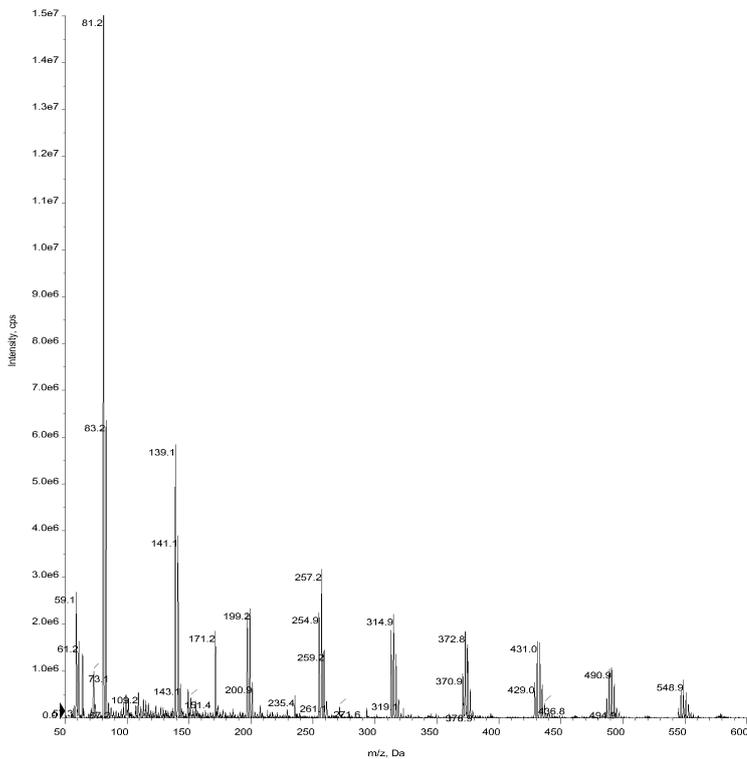
↳ Solvant non exposé à la lumière (non dégradé)



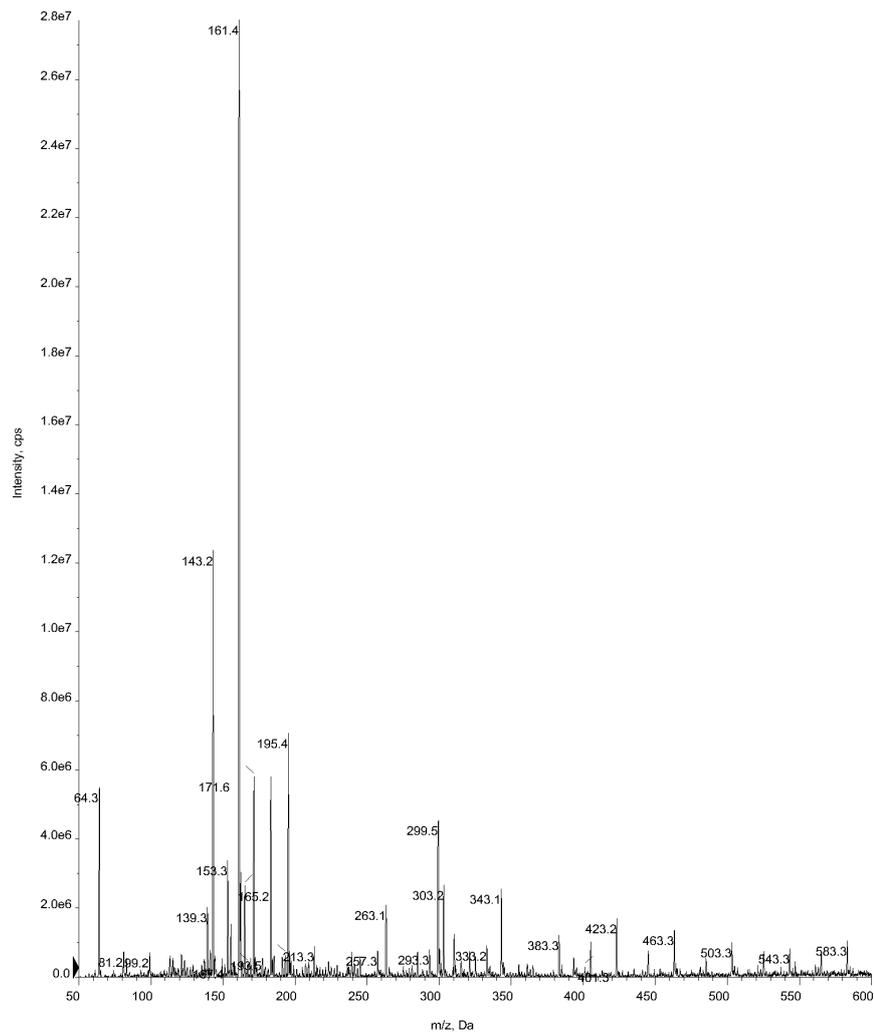
↳ Solvant exposé à la lumière (dégradé)



↳ Solvant utilisé pour la dégradation acido-basique non chauffé (non dégradé)



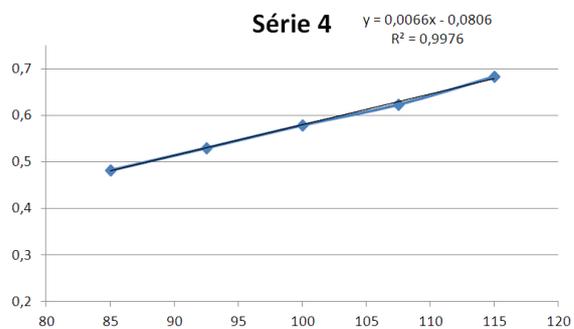
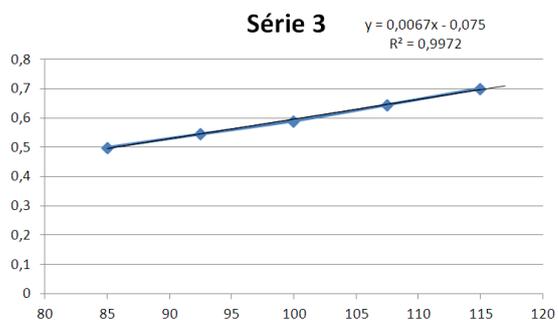
↳ Solvant utilisé pour la dégradation acido-basique chauffé (dégradé)

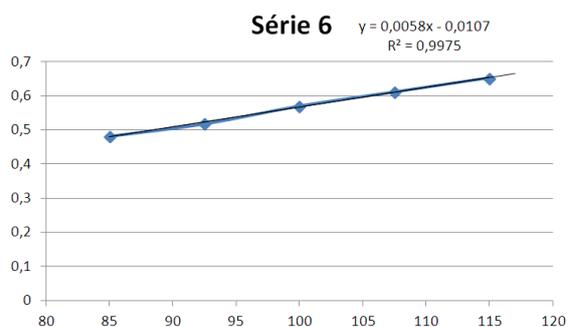
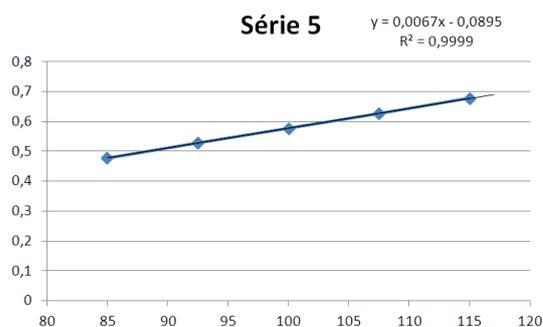


↳ Solvant utilisé pour la dégradation oxydative (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

## Annexe 5 : Fonction de réponse et gamme de calibration

Niveaux	Concentration des échantillons de calibration (CIQ) X	Séries (jours)	Mesurages (Réponses instrumentales) Y
1	85	1	0,498
		2	0,502
		3	0,5
		4	0,482
		5	0,477
		6	0,482
2	92,5	1	0,551
		2	0,546
		3	0,546
		4	0,53
		5	0,528
		6	0,518
3	100	1	0,606
		2	0,601
		3	0,591
		4	0,579
		5	0,577
		6	0,57
4	107,5	1	0,65
		2	0,654
		3	0,646
		4	0,623
		5	0,626
		6	0,611
5	115	1	0,7
		2	0,704
		3	0,702
		4	0,683
		5	0,678
		6	0,652





## Annexe 6 : Plan de validation

Niveaux	Concentration des échantillons de validation (CIQ) X	Séries (jours)	Mesurages (Réponses instrumentales) Y					
			1	2	3	4	5	6
1	85	1	0,502	0,501	0,502	0,501	0,5	0,502
		2	0,503	0,503				
		3	0,501	0,501				
		4	0,488	0,489				
		5	0,484	0,477				
		6	0,483	0,483				
2	100	1	0,605	0,605	0,599	0,594	0,609	0,605
		2	0,606	0,601				
		3	0,601	0,598				
		4	0,582	0,584				
		5	0,578	0,578				
		6	0,582	0,57				
3	115	1	0,701	0,7	0,702	0,705	0,701	0,704
		2	0,706	0,699				
		3	0,696	0,696				
		4	0,688	0,682				
		5	0,667	0,669				
		6	0,655	0,648				

## SERMENT DE GALIEN

Je jure d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement,

D'exercer dans l'intérêt de la Santé publique ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur mais aussi les règles de l'Honneur, de la Probité et du Désintéressement,

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine,

De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma Profession,

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

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

Que je sois méprisé de mes Confrères si je manque à mes engagements,



**Nom – Prénom de l'étudiant :**.....

**Nom du Président de Jury :** .....

**Date de soutenance de la thèse :**.....

**Mention :**.....

**VU, le Président de Jury,**

**VU, le Directeur de la Section Pharmacie**  
de l'U.F.R. Médecine-Pharmacie de Rouen,

## **FUSS Damien**

### **Mise au point et étude de stabilité physico-chimique et microbiologique d'une forme orale liquide de nicardipine à visée pédiatrique.**

Th. D. Pharm., Rouen, 2016, 137p.

---

#### **RESUME**

La nicardipine fait partie des traitements antihypertenseurs de première intention chez l'enfant du fait de sa bonne tolérance et de sa maniabilité. Les spécialités disponibles, inadaptées à l'usage pédiatrique, obligent la pharmacie à préparer de nombreuses séries de gélules pour répondre aux prescriptions des pédiatres. Leur fabrication est chronophage et contraignante du fait de la multitude des dosages à préparer lors des adaptations posologiques et la forme gélule pose des problèmes d'administration chez les jeunes enfants. Pour pallier à ces difficultés, une préparation hospitalière de nicardipine sous forme buvable a été développée. La stabilité chimique de la formulation a été déterminée par une méthode de chromatographie liquide haute performance couplée à un spectromètre de masse en tandem préalablement validée. La stabilité physique a été conduite par l'évaluation du pH, de la viscosité, de l'osmolalité et de la densité de la préparation. La stabilité microbiologique a été menée conformément aux recommandations de la Pharmacopée européenne. Au préalable une étude a été réalisée afin de déterminer les excipients les plus appropriés à la formulation de la nicardipine et à son utilisation en pédiatrie. L'excipient liquide Inorpha® associé à du polysorbate 80 a permis le développement d'une solution buvable de nicardipine dosée à 2 mg/ml. Notre étude a montré une stabilité physico-chimique et microbiologique de la formulation pendant 90 jours à 25°C comme à 4°C. La préparation hospitalière développée nous permet de fabriquer un ou plusieurs lots à l'avance et ainsi de répondre plus rapidement aux demandes des services de pédiatrie.

---

**MOTS CLES** : Nicardipine – Forme Buvable – Préparation – Pédiatrie

---

#### **JURY**

Président :

Pr Rémi VARIN, Pharmacien, PU-PH, CHU de Rouen

Directeur de thèse :

Dr Charles HERVOUËT, Pharmacien, Praticien Hospitalier, CHU de Rouen

Membres :

Dr Aude COQUARD, Pharmacien, Praticien Hospitalier, CHU de Roue

Dr Mikael DAOUPHARS, Pharmacien, Praticien Spécialiste, CRLCC Henri Becquerel, Rouen

Dr Damien LANNOY, Pharmacien, MCU-PH, CHU de Lille

---

**DATE DE SOUTENANCE** : 14 octobre 2016