



HAL
open science

Mise au point et étude de stabilité de gélules et d'une forme orale liquide de riboflavine

Pauline Gohier

► **To cite this version:**

Pauline Gohier. Mise au point et étude de stabilité de gélules et d'une forme orale liquide de riboflavine. Sciences du Vivant [q-bio]. 2020. dumas-02988282

HAL Id: dumas-02988282

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02988282>

Submitted on 4 Nov 2020

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.

Université de Bordeaux
U.F.R DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 2020

Thèse n° 106

THESE POUR L'OBTENTION DU
DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement

Le 16 Octobre 2020 par

Pauline GOHIER

Née le 15/03/1992 à Ivry sur Seine (94)

<p>MISE AU POINT ET ETUDE DE STABILITE DE GELULES ET D'UNE FORME ORALE LIQUIDE DE RIBOFLAVINE</p>
--

Directeur de thèse :

Monsieur le Dr. Arnaud VENET, Praticien Hospitalier

Membres du Jury

Pr S. CRAUSTE-MANCIET	Professeur des Universités, Praticien hospitalier	Présidente
Pr M. VIANA	Professeur des Universités	Jury
Dr H. BOULESTREAU	Praticien Hospitalier	Jury
Dr C. MERIENNE	Assistant Spécialiste	Jury

SOMMAIRE

LISTE DES TABLEAUX	4
LISTE DES FIGURES	5
LISTE DES ABBREVIATIONS	6
I. Introduction	7
II. Généralités.....	9
A. Les préparations.....	9
1. <i>Législation et définitions des préparations réalisées en milieu hospitalier.....</i>	<i>9</i>
2. <i>Les Bonnes Pratiques de Préparation (BPP).....</i>	<i>10</i>
1. <i>Cadre réglementaire des médicaments pédiatriques et initiatives.....</i>	<i>10</i>
2. <i>Cadre réglementaire des médicaments pédiatriques et initiatives.....</i>	<i>11</i>
3. <i>Cas particulier des maladies rares et des médicaments orphelins.....</i>	<i>14</i>
B. Les maladies héréditaires du métabolisme	16
1. <i>Généralités</i>	<i>16</i>
2. <i>L'acidurie glutarique de type I.....</i>	<i>18</i>
3. <i>L'acidurie glutarique de type II</i>	<i>20</i>
C. La riboflavine	21
1. <i>Sources et besoins en riboflavine</i>	<i>21</i>
2. <i>Métabolisme et propriétés pharmacocinétiques.....</i>	<i>23</i>
3. <i>Rôle physiologique.....</i>	<i>24</i>
4. <i>Indications</i>	<i>25</i>
5. <i>Propriétés physico-chimiques de la riboflavine.....</i>	<i>27</i>
III. Matériels et méthodes	31
A. Formulation galénique et procédé de fabrication	31
1. <i>Choix de la concentration et du conditionnement.....</i>	<i>31</i>
2. <i>Excipients disponibles</i>	<i>31</i>
3. <i>Réactifs, substances de références et matériels.....</i>	<i>34</i>
4. <i>Etudes de pré-formulation et choix des concentrations</i>	<i>34</i>
B. Mise au point et validation de la méthode de dosage par HPLC.....	35
1. <i>Conditions générales et choix de la méthode de dosage.....</i>	<i>35</i>
2. <i>Réactifs, substances de références et matériels.....</i>	<i>38</i>
3. <i>Préparation des solutions de calibration, de contrôle et des échantillons</i>	<i>39</i>
4. <i>Validation de la méthode de dosage physicochimique.....</i>	<i>40</i>
C. Validation des méthodes pour l'étude de stabilité microbiologique	46
1. <i>Conditions générales et critères de validation de la méthode</i>	<i>46</i>
2. <i>Réactifs, substances de références et matériels.....</i>	<i>47</i>
3. <i>Protocole de la validation des méthodes microbiologiques</i>	<i>48</i>
D. Etude de stabilité	52
1. <i>Etude de stabilité des sirops de riboflavine</i>	<i>52</i>
2. <i>Etude de stabilité des gélules de riboflavine</i>	<i>54</i>
IV. Résultats	56
A. Formulation galénique et procédé de fabrication	56
1. <i>Choix des excipients</i>	<i>56</i>

2. <i>Formulation</i>	59
B. Validation de la méthode de dosage par HPLC	59
1. <i>Spécificité</i>	59
2. <i>Linéarité</i>	63
3. <i>Fidélité</i>	64
4. <i>Exactitude</i>	66
C. Validation de l'essai de dénombrement microbien et de la recherche de microorganismes spécifiés	67
D. Etude de stabilité physico-chimique	68
1. <i>Sirop de riboflavine</i>	68
2. <i>Gélules de riboflavine</i>	72
E. Etude de stabilité microbiologique	72
V. Discussion	74
A. Intérêt thérapeutique des formes développées.....	74
B. Formulation galénique	74
C. Stabilité physico-chimique.....	75
D. Etude de stabilité microbiologique.....	76
VI. Conclusion.....	78
VII. Références	79
Serment de Galien	101

LISTE DES TABLEAUX

<u>Tableau I.</u> sommaires des BPP de 2007 et des BPP nouveau format.....	11
<u>Tableau II.</u> Sources de vitamine B2.....	22
<u>Tableau III.</u> Apports journaliers recommandés en riboflavine selon l'âge et le sexe.....	22
<u>Tableau IV.</u> Comparaison de la composition et des caractéristiques physico-chimiques des différents excipients.....	32
<u>Tableau V.</u> Avantages et inconvénients des diluants utilisés pour la formulation de gélules.....	33
<u>Tableau VI.</u> Analyse bibliographie des méthodes de dosage de la riboflavine par HPLC.	37
<u>Tableau VII.</u> Préparation de la gamme d'étalonnage de riboflavine	39
<u>Tableau VIII.</u> Préparation de la gamme d'étalonnage de riboflavine.....	40
<u>Tableau IX.</u> Méthode de dégradation forcée par acide, base et chaleur selon le guide GERPAC/SFPC (HCl : acide chlorhydrique, NaOH : hydroxyde de sodium)	41
<u>Tableau X.</u> Paramètres nécessaires au calcul de l'écart-type	45
<u>Tableau XI.</u> Excipients à effets notoires par véhicule de suspension.....	57
<u>Tableau XII.</u> Conditions de dégradations de la riboflavine.....	61
<u>Tableau XIII.</u> Paramètres de la droite de calibration du dosage de la riboflavine.....	64
<u>Tableau XIV.</u> Données et résultats statistiques nécessaires à la validation de la fidélité de la méthode	64
<u>Tableau XV.</u> Résultats des calculs de l'écart-type relatif pour la répétabilité et la reproductibilité.....	65
<u>Tableau XVI.</u> Données et résultats statistiques nécessaires à la validation de l'exactitude de la méthode	66
<u>Tableau XVII.</u> Résultats de la validation de l'essai de dénombrement microbien et de la recherche de microorganismes spécifiés	68
<u>Tableau XVIII.</u> Résultats de l'étude de stabilité microbiologique	73

LISTE DES FIGURES

<u>Figure 1.</u> Nombre d'autorisation de mise sur le marché dans des indications pédiatriques par année (10).....	14
<u>Figure 2.</u> Catabolisme de la lysine, du tryptophane et de l'hydroxylysine (18).....	18
<u>Figure 3.</u> Métabolisme intestinal de la riboflavine.....	23
<u>Figure 4.</u> Structure chimique de la riboflavine.....	27
<u>Figure 5.</u> Structures chimiques de la FMN (à gauche) et de la FAD (à droite).....	28
<u>Figure 6.</u> Photo-dégradation de la riboflavine en solution aqueuse.....	29
<u>Figure 7.</u> Schéma du système chromatographique.....	36
<u>Figure 8.</u> Protocole de validation de l'essai de dénombrement microbien.....	50
<u>Figure 9.</u> Protocole de validation de la recherche de microorganismes spécifiés.....	51
<u>Figure 10.</u> Schéma de la constitution d'un lot de forme buvable pour l'étude de stabilité physico-chimique.....	52
<u>Figure 11.</u> Essais de pré-formulation à 10 mg/ml de riboflavine à partir de Syrspond® (S), sirop simple (SS), Ora-Sweet/Ora-Plus® (O) et Inorpha® (I).....	57
<u>Figure 12.</u> Chromatogramme de la riboflavine.....	60
<u>Figure 13.</u> Chromatogramme de l'Inorpha®.....	60
<u>Figure 14.</u> Chromatogramme d'un mélange riboflavine – Inorpha®.....	60
<u>Figure 15.</u> Chromatogrammes et spectres de la riboflavine et de ses produits de dégradation.....	62
<u>Figure 16.</u> Spectre UV-visible de la molécule de riboflavine.....	63
<u>Figure 17.</u> Exemple de gélosesensemencées dans le cadre de l'essai de dénombrement microbien et de la recherche de microorganismes spécifiés.....	67
<u>Figure 18.</u> Evolution du pourcentage de riboflavine au cours du temps en fonction de la température de conservation.....	69
<u>Figure 19.</u> Evolution du pH des flacons en fonction du temps et des conditions de conservation.....	70
<u>Figure 20.</u> Evolution de l'osmolarité des flacons en fonction du temps et des conditions de conservation.....	71
<u>Figure 22 :</u> Evolution de la concentration moyenne en riboflavine des gélules par rapport à la concentration initiale (%) en fonction du temps.....	72

LISTE DES ABBREVIATIONS

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché
ANSM : Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé
BCP : Bromocrésol Pourpre
BPP : Bonnes Pratiques de Préparation
CHMP : Committee for Human Medicinal Products
COMP : Committee for Orphan Medicinal Products
CPP : Certificat Complémentaire de Protection
CSP : Code de la Santé Publique
DGAT : Dénombrement des Germes Aérobieux Totaux
DMAD : Déficit Multiple en Acyl-CoA Déshydrogénase
DMLT : Dénombrement des Moisissures et Levures Totales
EMA : European Medicines Agency
FAD : Flavine Adénine Dinucléotide
FMN : Flavine Mononucléotide
GAT : Germes Aérobieux Totaux
GCDH : Glutaryl CoA Deshydrogénase
Gerpac : Groupe d'Evaluation et de Recherche sur la Protection en Atmosphère Contrôlée
HPLC : High Performance Liquid Chromatography
ICH : International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use
MHM : Maladie Héritaire du Métabolisme
MLT : Moisissures et Levures Totales
MPUP : Matière première à Usage Pharmaceutique
NPP : Nombre le Plus Probable
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
PDCO : Pediatric Committee
PIP : Plan d'Investigation Pédiatrique
PUI : Pharmacie à Usage Intérieur
PUMA : Pediatric Use Marketing Authorization
SFPC : Société Française de Pharmacie Clinique
TCS : Trypto-caséine soja
UFC : Unité Formant Colonie
USP : United States Pharmacopeia

I. Introduction

Les maladies héréditaires du métabolisme constituent un groupe de maladies rares, pour lesquelles peu de traitements sont disponibles sur le marché. La riboflavine fait notamment partie des molécules recommandées au long cours dans la prise en charge de l'acidurie glutarique. Une spécialité est actuellement disponible sur le marché, la Béflavine® commercialisée par le laboratoire Bayer. Cependant, il s'agit de comprimés dosés à 10mg, non adaptés à une utilisation en pédiatrie (enfant < 6 ans ne pouvant pas avaler) et le laboratoire a annoncé la fin de commercialisation de son produit à courte échéance.

Depuis 2014, cinq patients sont traités par des préparations magistrales de riboflavine : deux à la dose de 50 mg, deux à 100mg et un à 150 mg. Une consommation intra-hospitalière de Béflavine® à 10mg a également été observée pour plusieurs patients.

L'objectif de ce travail est de développer des formes orales de riboflavine afin de pouvoir assurer la continuité du traitement des maladies métaboliques pour donner suite à l'arrêt de commercialisation annoncé de la Béflavine®. Le diagnostic des maladies héréditaires du métabolisme a généralement lieu pendant l'enfance et le traitement se poursuit à vie. Le CHU de Bordeaux bénéficiant d'un centre de compétence dans le diagnostic et la prise en charge des maladies métaboliques pédiatriques, le développement d'une forme orale liquide adaptée à la pédiatrie a été envisagée. Cette nouvelle formulation a été développée pour répondre au besoin formulé il y a moins d'un an par les cliniciens et en concertation avec eux pour répondre au mieux au besoin de traitements des patients.

La production d'une dose unique a aussi l'avantage de simplifier et sécuriser la production pour l'équipe de pharmacotechnie tout en permettant de moduler la dose administrée à partir d'une seule préparation. La forme orale liquide est cependant moins adaptée chez l'adulte. Nous avons donc également étudié la réalisation et développé des gélules de riboflavine afin de traiter des patients de tout âge.

L'objectif principal de ce travail est donc de mettre au point deux formes pharmaceutiques adaptées à un usage à la fois pédiatrique et adulte pour assurer un traitement au long cours des maladies métaboliques. Pour assurer la qualité des préparations ainsi que la sécurité des patients, la réalisation d'un contrôle libérateur et d'études de stabilité est nécessaire. Pour répondre à ce besoin, la mise au point et la validation d'une méthode de dosage répondant aux recommandations des normes ICH et compatible avec les équipements disponibles au sein du laboratoire de contrôle de la PUI sera réalisée.

Enfin, des études de stabilité physico-chimique et microbiologique seront mises en place afin d'avoir une date limite d'utilisation permettant d'assurer l'administration d'une dose efficace en toute sécurité. Ces différentes études nous permettent également d'envisager à terme la demande du statut de préparation hospitalière pour formes pharmaceutiques choisies.

II. Généralités

A. Les préparations

1. Législation et définitions des préparations réalisées en milieu hospitalier

Le décret n° 2019-489 du 21 mai 2019 est le dernier texte réglementaire en date définissant les missions des PUI. Il indique que les PUI doivent disposer de locaux, de moyens en personnel, en équipement et d'un système informatique permettant notamment la réalisation de préparations magistrales ou hospitalières à partir de matières premières ou de spécialités pharmaceutiques (1).

La définition des préparations magistrales et hospitalières est donnée par l'article L5121-1 du Code de la Santé Publique (CSP) (2). Les préparations magistrales sont définies comme « 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. 5126-6 ».

Les préparations hospitalières 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. 5126-6. Les préparations hospitalières sont dispensées sur prescription médicale à un ou plusieurs patients par une pharmacie à usage intérieur dudit établissement. Elles font l'objet d'une déclaration auprès de l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé, dans des conditions définies par arrêté du ministre chargé de la santé ».

Les activités de production et de préparations, qu'elles soient magistrales ou hospitalières, sont encadrées par le guide des Bonnes Pratiques de Préparation (BPP).

2. Les Bonnes Pratiques de Préparation (BPP)

Les préparations pharmaceutiques sont une activité importante des pharmacies hospitalières. La mise à disposition de formes galéniques adaptées est un enjeu important, que ce soit pour les professionnels de santé ou les patients. La maîtrise de leur qualité est un enjeu de santé publique.

En France, les activités de production des pharmacies d'officine et Pharmacie à Usage Intérieur (PUI) sont encadrées par les Bonnes Pratiques de Préparation (BPP) de 2007 (3). Ce texte de référence opposable est destiné à garantir la qualité des préparations pharmaceutiques, en encadrant les activités de préparation, de contrôle ainsi que l'amélioration de la qualité et la traçabilité des médicaments préparés.

Des révisions du texte ont eu lieu en 2016 et 2019. La dernière révision des BPP était en consultation publique durant les années 2019 et 2020, la version définitive n'a à ce jour pas encore été publiée par l'ANSM (4). De nouveaux éléments sont cependant à noter : les BPP de 2007 étaient divisées en 5 chapitres, pour 9 chapitres dans la version en consultation publique de 2019, comme illustré dans le tableau I.

Des aides à la prise de décision tels que des logigrammes ou des check-lists ainsi que des fiches types de fabrication, de conditionnement et de contrôle ont également été ajoutés afin de donner les outils nécessaires aux PUI (5).

Des lignes directrices concernant les préparations à risque vont également être ajoutées, telles que la préparation des médicaments stériles, contenant des substances pouvant présenter un risque pour la santé du personnel ou l'environnement, les médicaments expérimentaux ou radiopharmaceutiques.

L'objectif de la révision est donc d'intégrer la notion d'analyse de risque et un renforcement des exigences dans la qualité minimum attendue pour chaque type de préparation tenant compte de l'état des connaissances et organisations actuelles.

1. Cadre réglementaire des médicaments pédiatriques et initiatives

En Europe, plus de 50% des médicaments prescrits aux enfants et aux adolescents n'ont pas fait l'objet d'une évaluation et d'une autorisation d'administration spécifiques à ces

BPP 2007	BPP nouveau format
Chap.1 : Préparation	Chap. 1 : Système qualité pharmaceutique
Chap.2 : Contrôle	Chap. 2 : Personnel
Chap.3 : Gestion de la qualité et documentation	Chap. 3 : Locaux et matériel
Chap.4 : Gestion des anomalies, retours, réclamations et rappels de lots	Chap. 4 : Documentation
Chap.5 : Condition de sous-traitance des préparations, des contrôles et du transport	Chap. 5 : Préparation
	Chap. 6 : Contrôle
	Chap. 7 : Activités externalisées : activités de sous-traitance
	Chap. 8 : Réclamation et rappel de la préparation
	Chap. 9 : Auto-inspection

Tableau I. sommaires des BPP de 2007 et des BPP nouveau format

classes d'âge. L'étroitesse du marché visé et la difficulté à mener des travaux de recherche chez l'enfant sont des freins à la mise en place d'essais cliniques pour les entreprises pharmaceutiques (6). Une liste des besoins en médecine pédiatrique a notamment été publiée par l'agence européenne des médicaments (EMA) afin d'aider les industriels à identifier les opportunités et à pallier des manques de traitement dans certaines pathologies (7).

2. Cadre réglementaire des médicaments pédiatriques et initiatives

En Europe, plus de 50% des médicaments prescrits aux enfants et aux adolescents n'ont pas fait l'objet d'une évaluation et d'une autorisation d'administration spécifiques à ces classes d'âge. L'étroitesse du marché visé et la difficulté à mener des travaux de

recherche chez l'enfant sont des freins à la mise en place d'essais cliniques pour les entreprises pharmaceutiques (6). Une liste des besoins en médecine pédiatrique a notamment été publiée par l'agence européenne des médicaments (EMA) afin d'aider les industriels à identifier les opportunités et à pallier des manques de traitement dans certaines pathologies (7).

Dans ce but, l'ICH a publié en 2000 une ligne directrice E11 dont l'objectif est de promouvoir et de faciliter le développement de médicaments pédiatriques (8). C'est également dans cette optique qu'a été adopté le règlement européen (CE) n°1901/2006 relatif aux médicaments à usage pédiatrique.

2.1 Le règlement pédiatrique

Le règlement CE n°1901/2006 du Parlement Européen et du Conseil renforce la législation en vigueur en s'inspirant de la législation américaine, notamment avec un système associant obligations, récompenses et incitations financières (9). Il a pour principaux objectifs :

- de faciliter le développement et l'accès aux médicaments pour la population pédiatrique,
- d'assurer un haut degré de qualité quant à la recherche, l'évaluation et à l'autorisation de mise sur le marché des médicaments à usage pédiatrique,
- d'améliorer la mise à disposition d'informations sur l'utilisation des médicaments chez l'enfant.

La réalisation de ces objectifs passe notamment par la mise en place du Plan d'Investigation Pédiatrique (PIP), par le soutien au développement d'un Réseau Européen (European Paediatric Network) d'investigation clinique et par l'instauration d'un comité scientifique pédiatrique au sein de l'EMA.

Deux bases de données ont également été mises en place pour améliorer l'accès à une information de référence :

- La Base européenne des essais cliniques en pédiatrie (EUDRACT),
- La Base des médicaments autorisés en pédiatrie en Europe (Eudrapharm).

2.2 Le Comité européen pédiatrique (PDCO)

Le PDCO est une branche siégeant au sein de l'EMA et disposant du savoir-faire et des compétences nécessaires pour développer et évaluer tous les aspects des médicaments destinés aux populations pédiatriques. Il est composé de membres du Committee for Human Medicinal Products (CHMP), d'experts en pédiatrie des états membres, de spécialistes dans le domaine de la santé publique et de représentants d'associations de parents. La mission principale du PDCO est l'évaluation et l'approbation des plans d'investigations pédiatriques.

2.3 Le plan d'investigation pédiatrique (PIP) et la Paediatric Use Marketing Authorization (PUMA)

Le PIP a été rendu obligatoire par le Règlement Européen CE n°1901/2006 pour tout nouveau médicament. Il propose également un système de récompenses financières pour les firmes pharmaceutiques s'engageant à développer des médicaments adaptés à la population pédiatrique.

La firme pharmaceutique doit y décrire l'ensemble des mesures et des études pharmaceutiques (formulation adaptée), précliniques et cliniques (dose, efficacité et sécurité) à réaliser pour développer des médicaments en pédiatrie, pour différentes catégories d'âge. Le but est d'adapter la formulation pour rendre son utilisation plus facile et plus sûre selon l'âge du patient.

Il est obligatoire :

- 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 ou un Certificat Complémentaire de Protection (CPP),
- lors d'une demande d'un paediatric-use marketin authorisation (PUMA), en vue d'un usage pédiatrique (indication, dosage, forme pharmaceutique ou voie d'administration appropriée).

Le comité pédiatrique est responsable de la vérification du respect des études et mesures décidées dans le cadre du PIP. En contrepartie, les entités responsables du développement bénéficient de mesures de protection accrues après la mise-en-œuvre du développement approuvé dans le cadre d'un PIP, telles que l'extension de 6 mois des droits de propriété intellectuelle pour le titulaire du brevet ou du CPP.

Le PUMA est une autorisation de mise sur le marché accordée aux médicaments développés exclusivement en vue d'un usage pédiatrique et contenant une substance n'étant plus couverte par des droits de brevet ou du CPP. Le dosage, la forme pharmaceutique et la voie d'administration doivent être adaptés à un usage pédiatrique. Le laboratoire fabricant bénéficie en contrepartie d'une protection de mise sur le marché de 10 ans dans l'indication pédiatrique déposée.

Un rapport a été publié en 2017, 10 ans après l'adoption du Règlement Européen CE n°1901/2006. Entre 2007 et 2016, plus de 260 nouveaux médicaments à usage pédiatrique ont été autorisés et le nombre de PIP acceptés a dépassé les 1000 en 2017, comme illustré figure 1. Ces chiffres montrent un effet positif de la mise en place des

mesures du règlement. Sur le terrain, cette augmentation des demandes et des autorisations s'est cependant traduite par une hausse de seulement 5 à 10% de l'offre de traitements pédiatriques (10).

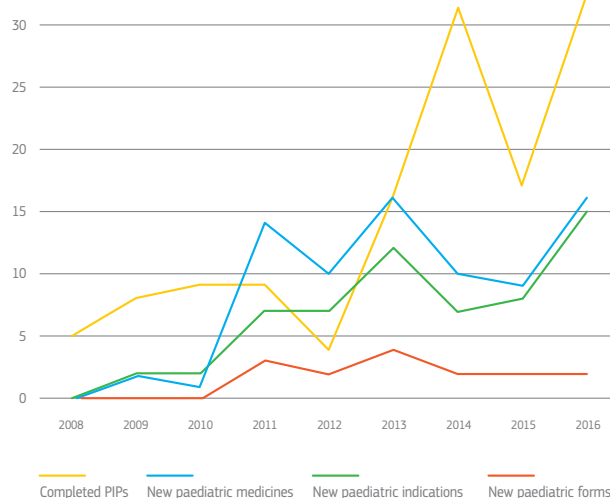


Figure 1. Nombre d'autorisation de mise sur le marché dans des indications pédiatriques par année (10)

Malgré les initiatives des autorités compétentes, le manque de données et de thérapeutiques adaptées à la population pédiatrique reste toujours aussi important. Pour pallier ce manque, différentes alternatives existent : changer la prise en charge thérapeutique si une alternative est possible ou réaliser des préparations pharmaceutiques permettant d'adapter les principes actifs disponibles à la population pédiatrique.

3. Cas particulier des maladies rares et des médicaments orphelins

3.1 Définitions et cadre réglementaire

Le concept de maladie rare repose sur une définition épidémiologique statistique de prévalence donnée par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) en 1966. Une maladie est donc dite rare quand elle touche moins d'1 personne/2000 dans la population générale. Plus de 7000 maladies rares sont identifiées à ce jour, dont plus de 80% d'origine génétique. Collectivement, ce chiffre représente 8 à 10% de la population mondiale soit environ 3 millions de personnes en France et 30 000 personnes pour une maladie donnée.

Dans ces conditions, des mesures européennes telles que le règlement (CE) n° 141/2000 du Parlement européen permettant l'encouragement de la recherche, du développement et de la mise sur le marché de médicaments orphelins ont été adoptées

afin d'inciter l'industrie pharmaceutique à commercialiser des traitements adéquats (11).

Ce règlement propose également une définition des médicaments orphelins, qui peuvent être désignés comme tel lorsqu'ils sont destinés d'une part :

- soit, au diagnostic, à la prévention ou au traitement d'une affection entraînant une menace pour la vie ou une invalidité chronique ne touchant pas plus de cinq personnes sur 10 000 dans la Communauté, au moment où la demande de désignation d'un médicament comme médicament orphelin est introduite,
- soit, au diagnostic, à la prévention ou au traitement, dans la Communauté, d'une maladie mettant la vie en danger, d'une maladie très invalidante ou d'une affection grave et chronique, et qu'il est peu probable que, en l'absence de mesures d'incitation, la commercialisation de ce médicament dans la Communauté génère des bénéfices suffisants pour justifier l'investissement nécessaire.

Et, d'autre part, il n'existe pas de méthode satisfaisante de diagnostic, de prévention ou de traitement de cette affection ayant été autorisée dans la Communauté, ou, s'il en existe, que le médicament en question procurera un bénéfice notable à ceux atteints de cette affection.

Un médicament peut être désigné orphelin à n'importe quel moment de son développement.

3.2 Le Comité des médicaments orphelins (COMP)

Le Comité pour les médicaments orphelins (COMP) est une des commissions de l'EMA. Il examine les demandes de désignation de médicament orphelin soumises par les laboratoires, à tout stade du développement du médicament avant le dépôt de la demande d'autorisation de mise sur le marché. La demande d'autorisation de mise sur le marché est ensuite adressée, comme pour tous les médicaments, au Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP)(12). Le COMP conseille également la commission européenne sur la politique des médicaments orphelins et assiste la commission pour la rédaction de lignes directrices dans ce domaine.

Le COMP est composé d'un membre désigné de chacun des états membres, de trois représentants des associations de patients et de trois membres nommés par la commission sur recommandation de l'EMA.

3.3 Initiatives pour le développement de médicaments orphelins

En mai 2012, la Commission a procédé à la millième désignation de médicament orphelin, attestant du caractère incitatif du dispositif mis en place en 2000.

Le règlement (CE) n° 141/2000 accorde notamment des crédits aux structures développant des médicaments orphelins pour encourager la recherche et le développement. Les médicaments désignés comme orphelins peuvent également bénéficier d'une assistance à l'élaboration de protocoles : l'EMA émet un avis sur les différents tests et essais à réaliser pour démontrer la qualité, la sécurité et l'efficacité du médicament. Enfin, tout médicament désigné comme orphelin qui obtient une AMM bénéficie d'une exclusivité commerciale de dix ans (11).

L'adoption de l'Orphan Drug Act aux Etats-Unis a montré le succès de ce type de dispositif. Avant l'entrée en vigueur de la nouvelle réglementation, il y avait seulement 8 médicaments aux États-Unis correspondant à la définition d'un médicament orphelin contre 403 en 2012. En Europe, 105 médicaments disposaient de l'AMM avec la désignation orpheline en mars 2018(13).

Le succès de la mise en place de cette législation peut être mesuré par le nombre de médicaments orphelins ayant obtenu une AMM. Le nombre de désignations de « médicaments orphelins » accordées par le COMP ne garantit en effet pas que le produit ira jusqu'à l'étape de mise sur le marché (13). L'EMA indique que 66% des demandes de désignations orphelines sont acceptées, mais seulement 8% des médicaments obtiennent effectivement l'AMM en tant que médicaments orphelins (12).

Malgré les incitations mises en place tant au niveau de l'Union européenne qu'au niveau national, de nombreux besoins thérapeutiques restent aujourd'hui non couverts par les traitements médicamenteux autorisés pour le traitement des maladies rares. Dans ce contexte, des pratiques de prescription hors AMM se sont développées sur le terrain. Elles ne sont pas recensées de manière exhaustive et les malades traités ne font pas l'objet d'un suivi systématique qui permettrait de mettre en évidence ces pratiques, d'étudier leur pertinence et de les encadrer par une recommandation temporaire d'utilisation (RTU) accordée par l'ANSM.

B. Les maladies héréditaires du métabolisme

1. Généralités

Les maladies héréditaires du métabolisme (MHM) correspondent à une famille hétérogène d'affections où chaque entité est rare. Plus de 500 formes sont actuellement dénombrées sur les 4000 à 6000 potentielles (estimées sur le nombre de gènes codant pour des enzymes et transporteurs métaboliques), avec une incidence globale comprise

entre 1:2000 et 1:4000. Elles ont en commun le déficit de fonctionnement d'enzymes ou de transporteurs secondaire à la mutation d'un ou plusieurs gènes. Le dépistage de nouvelles anomalies génétiques augmente grâce aux progrès des techniques d'identification biochimique, mais les MHM restent largement sous diagnostiquées.

Le diagnostic est généralement posé grâce à un test de dépistage néonatal de routine ou dans l'enfance. Certaines pathologies telles que la phénylcétonurie ou les lipidoses peuvent même être diagnostiquées en prénatal par amniocentèse. Cependant, le dépistage de formes moins graves se révélant plus tardivement, à partir de l'adolescence, est en cours d'augmentation. Le diagnostic de MHM de l'adulte doit être évoqué en cas de troubles neuropsychiatriques et digestifs d'apparence inexplicée. Il est confirmé par des techniques de biologie moléculaire ou la mesure d'activités enzymatiques. La prévalence des MHM étant faible, ce diagnostic est rarement évoqué, pouvant conduire à des décompensations métaboliques ayant des conséquences graves pour le patient (14).

Les maladies métaboliques sont regroupées en 3 groupes : les maladies par intoxication, les maladies par déficit énergétique et les maladies par déficit de la synthèse ou du catabolisme des molécules complexes.

Dans les maladies métaboliques par intoxication, l'apparition de symptômes est causée par l'accumulation des dérivés toxiques produits en amont du blocage métabolique, causant des intoxications endogènes. Elles peuvent également être classées selon l'agent toxique accumulé : acides aminés, ammoniacque (déficit du cycle de l'urée) ou acide organique (acidurie organique). En plus de signes cliniques chroniques, certaines de ces pathologies peuvent être à l'origine de décompensations aiguës nécessitant une prise en charge en service de réanimation. Le traitement a pour objectif d'éviter les apports exogènes de précurseurs toxiques avec un régime alimentaire adapté et de freiner le catabolisme tout en relançant l'anabolisme protéique pour épurer l'organisme des composés toxiques accumulés.

Les maladies métaboliques par carence énergétique sont secondaires au défaut de production d'énergie en aval du blocage, causant des carences énergétiques lorsque la voie métabolique concernée est productrice d'énergie. Elles concernent les cycles de Krebs, de la chaîne respiratoire, le métabolisme des acides gras et des glucides. Le but du traitement est de corriger les carences énergétiques et l'accumulation de dérivés toxiques.

Enfin, les maladies du métabolisme des molécules complexes regroupent les déficits de synthèse ou de catabolisme des molécules complexes dans les organites intracellulaires. Elles comprennent par exemple les maladies par anomalie de la glycosylation des protéines, les maladies des lysosomes ou les anomalies de synthèse du cholestérol.

Les vitamines sont les cofacteurs de nombreuses réactions enzymatiques. A des dosages pharmacologiques, elles peuvent stimuler l'activité enzymatique résiduelle ou la normaliser en cas de déficit en cofacteur. Les principales vitamines recommandées en cas d'anomalie héréditaire du métabolisme sont les vitamines B1 (thiamine), B2 (riboflavine), B6 (pyridoxine), B9 (acide folinique), B12 (cobalamine), H (biotine) et la L-carnitine (15,16).

La vitamine B2 ou riboflavine est utilisée principalement pour le traitement de l'acidurie glutarique de type I et II.

2. L'acidurie glutarique de type I

2.1 Définition, étiologie et épidémiologie

L'acidurie glutarique de type 1 correspond à un déficit en glutaryl-CoA déshydrogénase (GCDH). Il s'agit d'une maladie neuro-héréditaire dont l'incidence est de 1/50 000 naissances (17).

La GCDH est impliquée dans le catabolisme de la lysine et du tryptophane. Le métabolisme de ces acides aminés est illustré dans la figure 2. Selon la classification des maladies héréditaires du métabolisme, l'acidurie glutarique est à la fois une maladie par intoxication (accumulation d'acide glutarique) et par déficit énergétique (diminution des corps cétoniques).

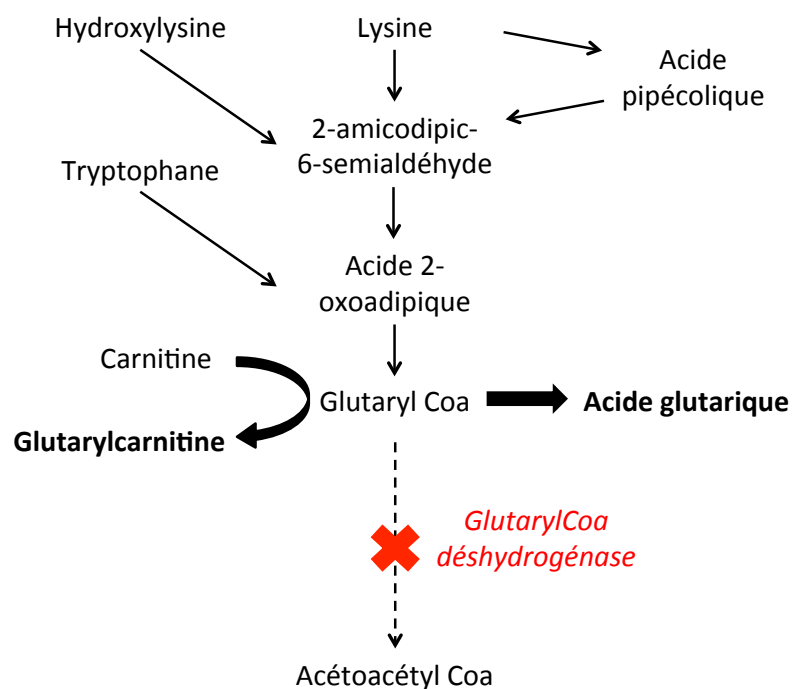


Figure 2. Catabolisme de la lysine, du tryptophane et de l'hydroxylysine (18)

2.2 Présentation clinique

Les nouveau-nés sont généralement asymptomatiques, bien que 75% d'entre eux présentent une macrocéphalie et peuvent montrer une hypotonie et une irritabilité. Si elle n'est pas diagnostiquée, une crise encéphalopathique aiguë initiale survient entre 3 et 36 mois. Elle est généralement provoquée par une maladie fébrile intercurrente, une vaccination ou une intervention chirurgicale.

Elle est caractérisée par une hypotonie, une perte des capacités motrices et des convulsions accompagnées par une lésion striatale bilatérale avec une dystonie secondaire sévère et parfois, une hémorragie rétinienne et sous-durale. Des convulsions ou des mouvements anormaux peuvent également être observés.

Le risque de développer une crise encéphalopathique diminue avec l'âge (> 6 ans) et un traitement approprié (19).

2.3 Diagnostic

Le diagnostic biologique repose sur le dosage de deux métabolites, l'acide 3-OH-glutarique et l'acide glutarique, détectable sur la chromatographie des acides organiques urinaires. Ils sont situés en amont du déficit enzymatique et sont donc augmentés en cas de déficit en GCDH. Il peut être complété par une IRM cérébrale qui peut mettre en évidence un élargissement des vallées sylviennes et des espaces sous-arachnoïdiens prétemporaires. Enfin, la confirmation du diagnostic nécessite un dosage enzymatique et des analyses de biologie moléculaire.

2.4 Prise en charge

Le traitement en cas de décompensation aiguë nécessite une hospitalisation pour l'initiation d'un protocole d'urgence. Kolker *et al* ont émis des recommandations en 2011 sur la prise en charge de ces patients. Le but du traitement est de relancer l'anabolisme grâce à un apport de glucides et de lipides, de réduire l'acide glutarique et l'acide 3-hydroxyglutarique accumulés grâce à un régime sans protéine pendant 24 à 48 heures, d'amplifier l'élimination physiologique et de prévenir le déficit en carnitine secondaire (20).

Le traitement médicamenteux au long cours repose sur la prescription de l-carnitine à la posologie de 100 mg/kg en 2 à 3 prises orales. Elle permet d'épurer l'acide glutarique toxique. La riboflavine peut également être associée à la posologie de 50-100 mg/j pendant au moins 6 mois. Il s'agit d'un cofacteur de l'enzyme déficitaire, une réponse sur le plan biochimique (diminution de la concentration d'acide glutarique et acide 3-OH-glutarique) peut être mise en évidence chez les patients produisant des taux très élevés de composés toxiques (21).

3. L'acidurie glutarique de type II

3.1 Définition, étiologie et épidémiologie

L'acidurie glutarique de type 2 ou déficit multiple en acyl-CoA déshydrogénase (DMAD) est une cytopathie mitochondriale due à un trouble de la β -oxydation des acides gras. Le défaut d'oxydation est dû à l'apparition de mutations dans les gènes codant pour l'un des deux transporteurs d'électrons, l'ETF (electron transfer flavoprotéine) et l'ETF-coenzyme Q oxidoreductase. Ces transporteurs transfèrent les électrons des acyl-CoA déshydrogénases FAD-dépendantes vers le coenzyme Q au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale.

La prévalence à la naissance est estimée à 1/200 000, cependant une grande variation est observée entre les pays et appartenances ethniques. Il s'agit d'une maladie héréditaire de transmission autosomique récessive (22).

3.2 Présentation clinique

Il s'agit d'une maladie cliniquement hétérogène, se divisant en trois phénotypes cliniques :

- Type I, phénotype d'apparition néonatale avec des anomalies congénitales : les patients naissent généralement prématurés et développent des signes d'hypoglycémie non-cétosique sévère, une hypotonie, une hépatomégalie et une acidose métabolique sévère au cours des premières 24 heures de vie. Ils ont habituellement des reins dysplasiques à multiples kystes et peuvent également présenter une dysmorphie faciale, des pieds plats en piolet et des anomalies au niveau des organes génitaux externes. La maladie est généralement fatale au cours de la première semaine de vie.

- Type II, phénotype d'apparition néonatale sans anomalie : les patients développent généralement au cours des premières 24 à 48 heures de vie une hypotonie, une tachypnée, une hépatomégalie, une acidose métabolique et une hypoglycémie hypocétosique. La plupart des patients décèdent au cours des premières semaines de vie. Une survie de quelques mois est parfois observée. La survenue d'une cardiopathie sévère est souvent la cause du décès.

- Type III, phénotype modéré et/ou à début tardif : les patients atteints de DMAD modérée ont des signes cliniques très hétérogènes, allant d'épisodes intermittents de vomissements, d'une acidose métabolique et d'une hypoglycémie hypocétosique possiblement accompagnés d'une atteinte cardiaque durant les premiers mois de vie à la survenue pendant l'adolescence ou l'âge adulte d'une maladie qui se caractérise par une acidocétose et une myopathie de stockage des lipides. Ce dernier groupe répond souvent à des doses pharmacologiques de riboflavine (22).

3.3 Diagnostic

Le diagnostic biologique repose sur l'analyse des acides organiques urinaires et des acyl-carnitines plasmatiques. La confirmation finale se fait par analyse mutationnelle.

Le diagnostic prénatal est possible lorsque deux mutations pathogènes ont été identifiées au préalable au sein de la famille. Un conseil génétique aux familles est également mis en place lors de l'apparition de cas. Des programmes de dépistage néonatal sont disponibles dans plusieurs pays d'Europe, mais cette stratégie n'est pas encore développée en France (22,23).

3.4 Prise en charge

Le traitement des formes les plus sévères implique la restriction des apports de graisse et de protide et le recours à un régime riche en carbohydrates. Il est essentiel d'éviter le jeûne et les autres facteurs déclencheurs. Des mesures d'urgence doivent être disponibles en cas de décompensation métabolique.

La supplémentation en riboflavine à raison de 100 à 400 mg par jour est très efficace pour les patients atteints de DMAD (22–27). Des suppléments en carnitine ou co-enzyme Q₁₀ sont également utilisés chez les patients répondeurs. Pour les cas modérément sévères, le 3-hydroxybutyrate a été utilisé avec succès, mais des études additionnelles sont encore nécessaires.

C. La riboflavine

1. Sources et besoins en riboflavine

La riboflavine ou vitamine B2 est une vitamine hydrosoluble, jaune et fluorescente. Elle est présente dans l'alimentation, principalement dans les produits laitiers, les céréales et les abats. Une étude du National dietary surveys au Royaume-Uni a rapporté que le lait et les produits laitiers contribuaient pour 51% des apports journaliers en riboflavine chez les enfants avant l'entrée à l'école, 35% chez les écoliers, 27% chez les adultes et 36% chez les personnes âgées (28).

La forme alimentaire se présente majoritairement sous la forme d'un complexe protéique qui sera scindé dans le tractus digestif grâce à l'acidification gastrique. Les sources alimentaires de riboflavine et leurs teneurs sont présentées dans le tableau II.

Les apports moyens dans une alimentation équilibrée sont de 2 mg/jour chez l'homme et 1,5 mg/jour chez la femme. La teneur en riboflavine dans le lait maternel est faible (0,03 – 0,04 mg/100g) mais est suffisante pour assurer les besoins nutritionnels du nourrisson. Les apports journaliers recommandés (AJR) en riboflavine chez l'enfant et l'adulte sont résumés dans le tableau III (29).

Aliment	Teneur en vitamine B2 (mg/100g)
Foie d'agneau, cuit	4,31
Fromage à pâte molle et croûte mixte colorée	4,2
Levure de boulanger, déshydratée	4
Spiruline, séchée ou déshydratée	3,67
Foie de porc, cru	2,98
Rognon de bœuf, cuit	2,97
Blanc d'œuf, en poudre	2,53
Foie de poulet, cru	2,36
Persil, séché	2,32
Œuf, en poudre	1,76
Foie de veau, cuit	1,72

Tableau II. Sources de vitamine B2

Sexe et tranche d'âge	Apports journaliers recommandés (AJR)	
Enfants de 1 à 8 ans	1 – 3 ans	0,5 mg/jour
	4 – 8 ans	0,6 mg/jour
Garçons de 9 ans à 17 ans	9 – 13 ans	0,9 mg/jour
	14 – 18 ans	1,3 mg/jour
Filles de 9 ans à 17 ans	9 – 13 ans	0,9 mg/jour
	14 – 18 ans	1,0 mg/jour
Homme à partir de 18 ans		1,3 mg/jour
Femme à partir de 18 ans		1,1 mg/jour
Femme enceinte		1,4 mg/jour
Femme allaitante		1,6 mg/jour

Tableau III. Apports journaliers recommandés en riboflavine selon l'âge et le sexe

2. Métabolisme et propriétés pharmacocinétiques

2.1 Absorption :

Dans l'alimentation, on retrouve une faible quantité de riboflavine libre. Les apports se font majoritairement par les flavine dinucléotide (FAD) et flavine mononucléotide (FMN), qui sont hydrolysés en riboflavine grâce à l'activité de phosphatases non spécifiques au niveau de la barrière en brosse des entérocytes (28).

La riboflavine libre est rapidement absorbée au niveau de l'intestin grêle, avec une demi-vie d'absorption de 1,1 heure et une biodisponibilité de 95%. L'absorption se fait par un système de transport actif et saturable à partir d'environ 30 mg par prise. Le taux d'absorption est compris entre 36 et 75% et est augmenté lors de la prise concomitante d'aliment. Une faible proportion de la riboflavine subit un effet de premier passage hépatique (29,30).

2.2 Métabolisation et distribution :

La riboflavine est ensuite métabolisée en FMN sous l'influence de la flavokinase et en présence d'adénosine triphosphate dans les cellules intestinales. Une partie de la FMN formée est complexée à des apoenzymes pour former des flavoprotéines, mais la majorité est transformée en FAD par l'intermédiaire de la FAD synthétase (29,30). Cette métabolisation est illustrée dans la figure 3.

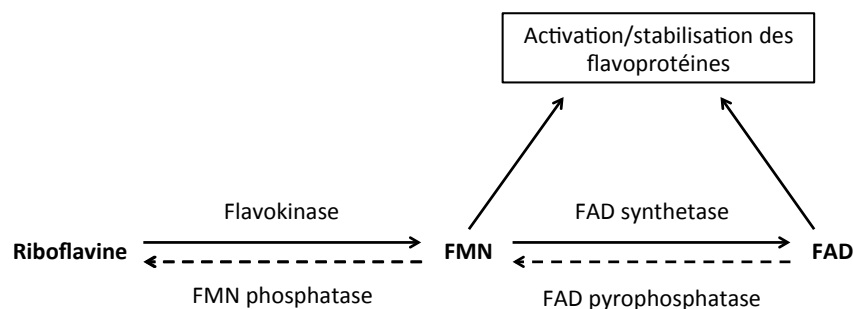


Figure 3. Métabolisme intestinal de la riboflavine

La FMN et la FAD passent ensuite dans le plasma où elles sont liées aux protéines plasmatiques. La FAD se trouve également de façon importante au niveau des globules rouges. Elle est ensuite distribuée de manière large, majoritairement au niveau de l'intestin grêle, du foie, du cœur et des reins (29,30).

2.3 Élimination :

La riboflavine en excès est très peu stockée dans les tissus. Les réserves de l'organisme sont faibles et n'assurent les besoins que pour une période comprise entre 2 et 6 semaines (17). La riboflavine et ses métabolites, tels que la 7-hydroxyméthylriboflavine

et la lumiflavine, sont excrétés dans les urines. La demi-vie d'élimination est comprise entre 66 et 84 minutes (29,30).

3. Rôle physiologique

La riboflavine est nécessaire à la synthèse des coenzymes flaviniques : la flavine dinucléotide et la flavine mononucléotide. Elle intervient dans des réactions d'oxydo-réduction par transfert d'électrons ou d'hydrogène lors de réactions catalysées par des enzymes dépendantes de la flavine. En effet, la FMN et la FAD sont utilisées par les flavoprotéines de la chaîne respiratoire mitochondriale (glycérol 3-phosphate deshydrogénase, acylCoA déshydrogénase et succinate deshydrogénase).

Elles participent à des réactions d'oxydoréduction permettant la formation d'ATP ainsi que dans la β -oxydation des acides gras. Elles sont donc capitales pour le métabolisme des graisses, des hydrates de carbone et des protéines, et pour leur transformation en énergie.

Les 2 cofacteurs de la riboflavine sont des coenzymes impliquées dans les réactions d'oxydo-réduction cellulaires dont le transfert d'électrons vers la chaîne respiratoire mitochondriale.

Un déficit en riboflavine est donc susceptible d'avoir un impact sur les différentes enzymes mitochondriales, dont par exemple :

- la glutathion réductase érythrocytaire qui permet la formation de glutathion réduit pour lutter contre les réactions de peroxydation,
- les acyl-coenzymes A déshydrogénases (Acyl-CoA DH) et les oxydases qui permettent l'oxydation des acyl-CoA dérivant des acides gras et de certains acides aminés (Acyl-CoA à courte chaîne),
- la déshydrogénase des protéines de transfert d'électrons (electron transfer flavoprotein dehydrogenase ou ETF dehydrogenase) qui intervient dans le transport d'électrons des coenzymes réduits vers la chaîne respiratoire mitochondriale,
- la pyridoxine phosphate oxydase dont le cofacteur est le FMN et qui est impliquée dans la biosynthèse de certains neurotransmetteurs (31).

La FMN et la FAD sont donc indispensables non seulement aux réactions d'oxydoréduction de l'organisme permettant le métabolisme des glucides, lipides et protides, mais aussi au métabolisme de certains neurotransmetteurs (32,33).

4. Indications

La Béflavine® (Riboflavine) 10 mg est un traitement commercialisé par le laboratoire Bayer indiqué dans le traitement des carences en vitamine B2, à la dose de 2 à 3 comprimés par jour (34). Il s'agit du seul traitement bénéficiant d'une AMM dans cette indication. Un arrêt de commercialisation par le laboratoire a été annoncé en 2020, notamment par les associations de patients. La riboflavine fait cependant partie depuis 2013 de la liste des médicaments essentiels de l'Organisation mondiale de la santé (OMS) dans la catégorie vitamines et minéraux (35). La riboflavine est également présente dans des spécialités telles que Becozyme® ou Berocca® mais associée à d'autres vitamines donc non utilisable pour traiter un déficit isolé.

Plusieurs études sont en cours dans la prévention d'un large éventail de maladies telles que la migraine, l'anémie, le cancer, l'hyperglycémie, l'hypertension, le diabète sucré ou le stress oxydatif (36). Nous allons détailler les indications validées à ce jour de la riboflavine.

4.1 Apports inadéquats en riboflavine

Les carences en riboflavine peuvent survenir en cas d'apport insuffisant ou en cas de malnutrition (consommation insuffisante de viande, céréales enrichies ou produits laitiers).

Le risque de carence en riboflavine est augmenté par les maladies chroniques (diarrhée récurrente, troubles hépatiques, alcoolisme chronique), l'altération de l'absorption des aliments (troubles de malabsorption), la dialyse et l'utilisation de barbituriques au long cours. Ces carences sont endémiques dans les pays dont le régime alimentaire comporte peu de viande ou de produit laitier (28).

Le déficit en riboflavine se manifeste par des signes cliniques souvent frustrés, non spécifiques et associés aux symptômes des carences habituellement associées (carence en autres vitamines, carence protéique). En cas de carence par apport insuffisant, les premiers signes apparaissent au bout de 3 à 4 mois de régime carencé.

Les signes suivants apparaissent dans un premier temps :

- des signes cutanés : dermatite séborrhéique de la face,
- des lésions des muqueuses : stomatite angulaire (fissures de la peau partant des coins de la bouche), chéilite (fissures) des lèvres, glossite, atrophie des papilles,
- des signes oculaires : photophobie, larmoiement, opacifications cornéennes voire cataracte.

Le diagnostic repose sur la quantification de la riboflavine urinaire et sur l'amélioration clinique lors de la prise d'une supplémentation orale en riboflavine.

Le traitement consiste en l'administration orale de riboflavine à 10 mg deux fois par jour pendant une semaine puis 4 mg pendant plusieurs semaines selon la gravité de la carence initiale. Un régime alimentaire adapté afin d'avoir des apports de l'ordre de 1 à 1,5 mg de riboflavine par jour doit également être mis en place (31).

4.2 Les maladies héréditaires du métabolisme

La riboflavine a été utilisée pour le traitement de différentes erreurs innées du métabolisme, notamment pour les troubles résultants soit du défaut de protéines impliquées dans le métabolisme et/ou le transport de la riboflavine (syndrome de Brown-Vialetto-Van Laere ou syndrome de Fazio-Londe), soit en cas de défaut des flavoenzymes (déficit en acyl-coenzyme A déshydrogénase des acides gras à chaîne courte SCADD, déficit en acyl-CoA déshydrogénase des acides gras à chaîne moyenne MCADD, acidurie glutarique de type I et II) (37).

Il n'existe pas de consensus concernant l'utilisation de la riboflavine dans l'acidurie glutarique de type I. Les recommandations émises en 2011 par S. Kölker *et al* indiquent que bien qu'une amélioration des paramètres biochimiques ait été suggérée chez certains patients, rien ne prouve avec certitude que la riboflavine améliore les résultats neurologiques de cette maladie. La réactivité à la riboflavine chez les patients atteints d'acidurie glutarique de type 1 semble être extrêmement rare. De plus, il n'existe aucun protocole normalisé permettant d'évaluer la sensibilité à la riboflavine ni aucun moyen de la prédire à partir d'une analyse de la mutation du gène GCDH (20).

L'apport de la riboflavine en cas d'acidurie glutarique de type II a été démontré dans la littérature (24–27). La durée de traitement dans les articles publiés est d'un mois uniquement, mais permet une récupération de la force musculaire et une normalisation des taux d'enzymes musculaires. Malgré le manque de données sur l'utilisation au long cours, la riboflavine fait partie des recommandations en cas de forme modérée (22).

Elle a également montré un intérêt pour le traitement de déficit isolé en acyl-coa déshydrogénase 9. Cette dernière intervient dans le métabolisme du palmitoyl-CoA, dans celui des acides gras à longue chaîne et fait partie des enzymes mitochondriales. Il s'agit d'une pathologie rare avec très peu de cas décrits, cependant l'apport d'un traitement par riboflavine à haute dose (200 mg/jour) a été rapporté dans plusieurs articles, avec une augmentation statistiquement significative de la survie pour les patients de moins de un an (38,39).

4.3 La migraine

La riboflavine semble être une molécule prometteuse pour le traitement prophylactique de la migraine chez l'adulte et l'enfant. Les dernières recommandations de la Canadian Headache Society indiquent que l'utilisation de 400 mg/jour de riboflavine serait

probablement efficace (40). De nombreuses études ont été publiées à ce sujet, notamment une étude randomisée en double aveugle contre placebo qui a montré une diminution significative du nombre et de la durée des crises de migraine lors de la prise de fortes doses de riboflavine (200 mg/jour) sur une durée de 12 semaines chez les enfants (41). Concernant les adultes, une étude randomisée et contrôlée portant sur une cohorte de 55 patients a montré une différence de réponse significative entre le groupe qui avait reçu la riboflavine à 400mg par jour (59% de réponses favorables) et celui qui avait reçu un placebo (15% de réponses favorables). Cette étude démontrait la sécurité thérapeutique de ce traitement et l'intérêt économique du traitement prophylactique par riboflavine par rapport aux autres traitements habituellement proposés (42).

5. Propriétés physico-chimiques de la riboflavine

5.1 Structures de la riboflavine et de ses dérivés

La formule chimique de la riboflavine est 7,8-diméthyl-10-ribityl-isoalloxazine comme illustrée dans la figure 4. Elle est issue de la combinaison d'une flavine, soit un noyau hétérocycle azoté à trois noyaux (la partie isoalloxazine) et d'un sucre à 5 carbones (le ribose). L'association ribose-flavine est à l'origine de son nom.

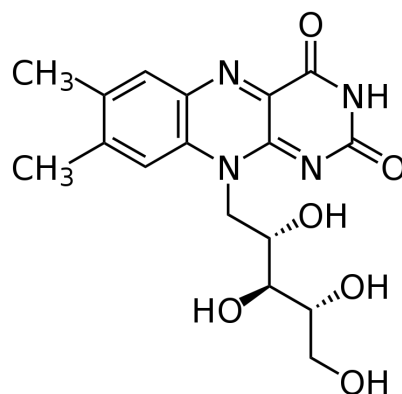


Figure 4. Structure chimique de la riboflavine

Comme vu précédemment, la riboflavine est métabolisée en deux dérivés particulièrement importants sur le plan métabolique. Le FMN comporte un groupement phosphate provenant de l'adénosine triphosphate en position 5' et le FAD est formé à partir de ce dernier par combinaison avec une molécule d'AMP, comme le montre la figure 5.

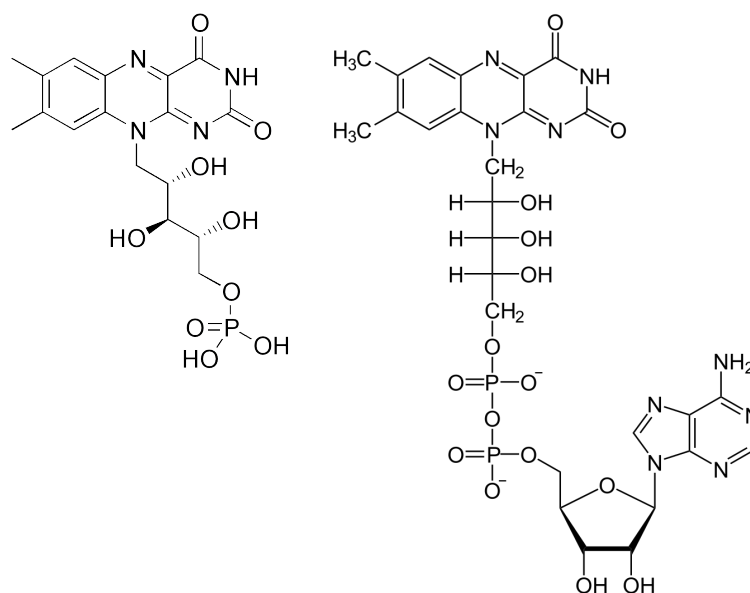


Figure 5. Structures chimiques de la FMN (à gauche) et de la FAD (à droite)

5.2 Dégradation photochimique de la riboflavine

La riboflavine purifiée est une substance cristalline qui se présente en fines aiguilles de couleur jaune orange au goût amer. Elle est peu soluble dans l'eau mais lui donne une fluorescence d'un jaune vert intense. Elle est très sensible à la lumière et aux rayons ultraviolets mais elle est stable à la chaleur et ne s'oxyde pas à l'air. Nous allons détailler les différentes conditions de dégradation de la riboflavine (31,43).

▪ Effet de la lumière et des UV

Des réactions de photo-réduction, photo-addition et photo-déalkylation peuvent être impliquées dans la dégradation photochimique de la riboflavine (44,45). Différents produits de dégradation sont formés selon les conditions de pH, la longueur d'onde et l'intensité de l'exposition :

- lumiflavine (LF),
- lumichrome (LC),
- formylmethylflavine (FMF),
- carboxymethylflavine (CMF)
- cyclodehydroriboflavine (CDRF).

La formation des dérivés de la riboflavine en fonction des conditions est illustrée dans la figure 6.

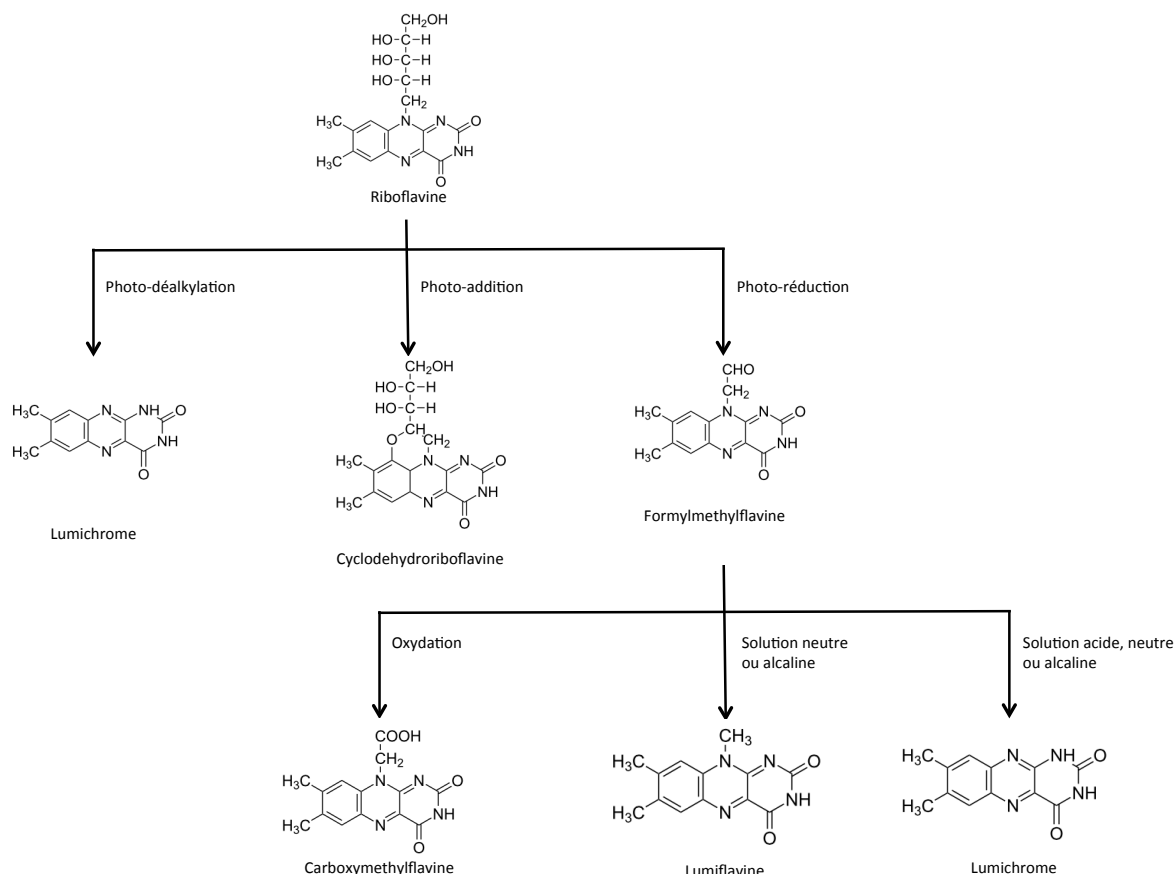


Figure 6. Photo-dégradation de la riboflavine en solution aqueuse

▪ Effet du pH

Le pH a un effet sur la photo-dégradation de la riboflavine, qui est dégradée à partir de la formylmethylflavin en lumichrome en conditions acide ou neutre et en un mélange de lumichrome et lumiflavin en condition alcaline comme décrit sur la figure 6. Ces produits de dégradation sont biologiquement inactifs.

La cinétique de la réaction de photolyse de la riboflavine est aussi influencée par le pH : elle est plus lente à un pH compris entre 5 et 6 alors qu'elle atteint un maximum à pH 10 (44,45).

▪ Effet de l'environnement anaérobie

En condition anaérobie, l'irradiation de la riboflavine provoque une photo-réduction du cycle isoalloxazine qui provoque une décoloration de la solution. Cependant, si on la remet en contact avec de l'air, la couleur jaune peut réapparaître suite à la ré-oxydation du cycle (44,45).

- **Effet des tampons**

Les tampons phosphate, sulfate, carbonate et acétate ont un effet catalytique sur la riboflavine, alors que les tampons borate et citrate sont stabilisants (44,45).

- **Effet de la température**

La riboflavine est une substance cristalline qui fond à des températures comprises entre 278 et 282 °C. Le chauffage à 100, 120 et 150°C d'une solution aqueuse de riboflavine pendant 40 minutes a provoqué une dégradation de 4, 7 et >20% respectivement. Il s'agit donc d'une molécule thermostable (44,45).

III. Matériels et méthodes

A. Formulation galénique et procédé de fabrication

1. Choix de la concentration et du conditionnement

Le choix de la concentration en principe actif dépend de l'utilisation thérapeutique de celui-ci. L'analyse rétrospective des préparations magistrales de riboflavine depuis 2014 nous a permis d'avoir un aperçu des doses prescrites au sein de notre établissement.

La stabilité du principe actif et la formation de produits de dégradation potentiellement toxiques sont à prendre en compte pour déterminer les conditions de stockage, de manipulation et d'étiquetage. Comme vu précédemment, la riboflavine semble sensible aux UV. Il conviendra donc de conditionner le sirop dans des flacons en verre teintés et les gélules dans des blisters opaques afin de limiter le risque de dégradation par l'action de lumière au cours du temps.

2. Excipients disponibles

- Formule buvable de riboflavine

Nous avons pris le parti d'utiliser un véhicule prêt à l'emploi pour la formulation de la forme orale liquide. Trois gammes de véhicules de suspension sont disponibles dans notre établissement : Ora® (Perrigo), Syrspend SF PH4 liquide® (Fagron) et Inorpha® (Inresa) dont les compositions sont présentées dans le tableau IV. Nous avons également étudié le sirop simple. Il s'agit d'un mélange d'eau et de sucre purifié (tableau IV) utilisé comme base pour la réalisation de préparation magistrale telle que les sirops de morphine ou de codéine par exemple.

Nous avons comparé la composition et les caractéristiques physico-chimiques des différents excipients disponibles ainsi que la présence d'excipients à effet notoire afin d'orienter le choix du véhicule final.

Véhicule	Inorpha®	Ora-Plus®	Ora-Sweet®	Syrspend SF PH 4® liquide	Sirop simple
Qualification	Excipient liquide	Agent de suspension	Agent de suspension	Agent de suspension	Excipient pour préparation magistrale
Phase liquide	Eau purifiée	Eau purifiée	Eau purifiée	Eau purifiée	Eau purifiée
Agents épaississants	Hydroxyéthyl-cellulose	Cellulose microcristalline, sodium carboxyméthyl-cellulose, gomme xanthane, carraghenane		Amidon de maïs modifié	
Anti-cristallisation	Glycérol		Glycérol		
Edulcorant	Sucralose		Sucrose, sorbitol	Sucralose	Saccharose
Agent masquant l'amertume	Oui				
Aromatisant	Arôme caramel		Arômes de fruit	Arome cerise	
Tampon	Acide citrique, citrate de sodium	Sodium triphosphate, acide citrique	Sodium phosphate, acide citrique	Acide citrique, citrate de sodium, acide malique	
Agent anti-mousse		Simeticone		Simeticone	
Conservateur	Sorbate de potassium	Sorbate de potassium, méthylparabene	Sorbate de potassium, méthylparabene	Benzoate de sodium (< 0,1%)	Méthyl et propyl-parabene
pH	4,2 – 5,0	4,0 – 4,5	4,0 – 4,5	4,0 – 5,0	
Osmolarité	170 mOsm/kg	230 mOsm/kg	3240 mOsm/kg	<50 mOsmol/kg	
Viscosité	100 mPa/s	1300 - 6700 mPa/s		3000 – 6000 mPa/s	

Tableau IV. Comparaison de la composition et des caractéristiques physico-chimiques des différents excipients

Ces véhicules commercialisés sont une solution rapide, permettant l'incorporation de nombreux principes actifs, simple pour la fabrication et l'administration. Leur utilisation est courante en cas d'absence de forme pédiatrique commercialisée car ils permettent de masquer le goût des principes actifs et d'augmenter l'acceptabilité.

- Gélules de riboflavine

La formulation la plus simple de gélule lors de préparation magistrale est un mélange de principe actif et de diluant. Parmi les diluants les plus couramment utilisés, on retrouve le lactose monohydraté, le mannitol ou la cellulose microcristalline. Les avantages et inconvénients des différents diluants utilisés en routine sont présentés dans le tableau V (60-62).

Diluants	Avantages	Inconvénients
Lactose	- Non hygroscopique	- Réaction de Maillard avec les substances à fonction amine - Excipient à effet notoire : contre-indiqué en cas d'intolérance au lactose
Mannitol	- Non hygroscopique - Peu réactionnel avec les principes actifs	- Osmotiquement actif : peut donner des troubles gastro-intestinaux si > 1g par prise ou > 3g/24h
Cellulose	- Relativement inerte - Déformation importante, compatible avec des poudres peu compressibles	- Risque d'adsorption du PA

Tableau V. Avantages et inconvénients des diluants utilisés pour la formulation de gélules

Une analyse des avantages et inconvénients de chaque diluant a été réalisée afin d'orienter notre choix.

3. Réactifs, substances de références et matériels

Les matériels, substances de références et réactifs utilisés pour l'étude de pré-formulation de la forme buvable de riboflavine sont les suivants :

- Riboflavine, ref 1862110, lot 18070042/A - Cooper
- Syrspend, ref 700726, lot 1906125/1 - Fagron
- Ora-Sweet ref P10, lot 8516244 - Inresa
- Ora-Plus, ref P20, lot 8425575 - Inresa
- Inorpha, ref 9919762, lot 201909111 - Inresa
- Sirop simple, ref 0902-576B-V01, lot 18B2089982 - Cooper
- Flacon col étroit à vis ambré de 60ml, ref 215-2626 – VWR international
- Bouchon 18 mm ref 2152681 – VWR international
- Eprouvettes graduées 20ml et 100ml - FisherBrand
- Mortier et pilon en porcelaine - Cooper
- Balance (précision 0,001g), ref QUINTIX221-1CFR - Sartorius
- Agitateur magnétique RET-basic, ref 836692 – IKA Laborstechnik
- Bain à ultrasons 89878 – BioblockScientific

Des matières première à usage pharmaceutique (MPUP) ont été utilisées au cours de cette étude comme recommandé par les BPP (46).

4. Etudes de pré-formulation et choix des concentrations

4.1 Forme buvable

Deux concentrations ont été étudiées pour la forme buvable : 10 mg/ml car elle correspond au dosage de la spécialité Béflavine® ainsi qu'une concentration à 20 mg/ml.

Les quatre véhicules de suspension disponibles ont été étudiés en ajoutant la riboflavine aux deux concentrations choisies. Une petite quantité de véhicule était mélangée avec la quantité de poudre nécessaire jusqu'à l'obtention du liquide le plus homogène possible. La quantité restant de véhicule était ensuite ajoutée.

Des caractéristiques physicochimiques telles que l'aspect, la texture et l'homogénéité ont été prises en compte pour choisir le véhicule approprié à une utilisation pédiatrique. Un test de palatabilité a également été mené sur six individus.

4.2 Gélules

Pour les gélules, un seul dosage a été étudié : 50 mg. Les gélules de riboflavine faisant partie des préparations magistrales réalisées couramment par le préparatoire de notre établissement, aucun lot test n'a été produit avant le début de l'étude de stabilité.

B. Mise au point et validation de la méthode de dosage par HPLC

1. Conditions générales et choix de la méthode de dosage

La majorité des publications se rapportant à des méthodes de dosage de la riboflavine utilise la Chromatographie Liquide Haute Performance (ou High Performance Liquid Chromatography, HPLC) pour quantifier le principe actif. Une revue des différentes méthodes d'analyse de la vitamine B2 décrit les conditions d'analyse de 15 publications : la chromatographie liquide était utilisée 2 fois, l'électrophorèse capillaire de zone 1 fois et l'HPLC 12 fois (47). La pharmacie du CHU de Bordeaux possède une HPLC couplée à une détection Ultra-Violette (HPLC-UV) à barette de diode (Dionex Ultimate 3000, Thermo Scientific) ayant déjà été utilisée pour le développement de nombreuses méthodes de dosage aujourd'hui utilisées en routine. Il s'agit d'une analyse séparative et donc adaptée à une étude de stabilité réalisée selon les recommandations des normes ICH car elle permet de différencier le principe actif de ses produits de dégradation. Nous avons donc décidé de développer une méthode de dosage de la riboflavine en utilisant l'HPLC-UV dont dispose la pharmacie.

1.1 Principe et description de l'HPLC-UV

L'HPLC est une technique permettant la séparation, l'identification et la quantification des composés organiques d'un mélange. L'échantillon à analyser est introduit grâce à un système d'injection dans une colonne remplie d'une phase stationnaire parcourue par une phase mobile. La séparation des différents composés est possible grâce à la différence de distribution des solutés entre les phases stationnaires et mobiles, non miscibles entre elles.

Le choix de la phase mobile et de la phase stationnaire est primordial pour assurer la rétention et l'élution des composés à étudier. La phase stationnaire peut être composée de silice polaire en phase normale ou de silice greffée par des chaînes linéaires d'atomes de carbone en phase inverse. L'ajout des groupements carbone rend la phase stationnaire apolaire, elle nécessitera l'utilisation d'un solvant polaire pour éluer les composés retenus. La phase mobile est constituée principalement d'eau et/ou de solvants organiques polaires (acétonitrile, méthanol) et elle peut être ajustée à un pH déterminé par l'ajout de tampon. Sa composition peut être identique pendant toute la durée de l'analyse (mode isocratique) ou la proportion des différents solvants peut varier (mode gradient de solvant).

Le système chromatographique est composé d'une chaîne HPLC Dionex Ultimate 3000 (Thermo Scientific) comprenant un injecteur, un dégazeur, une pompe binaire haute pression, un passeur d'échantillon réfrigéré, un four thermostaté contenant les colonnes et d'un détecteur à barrettes de diode UV/visible. Les différents éléments composants le système sont schématisés dans la figure 7.

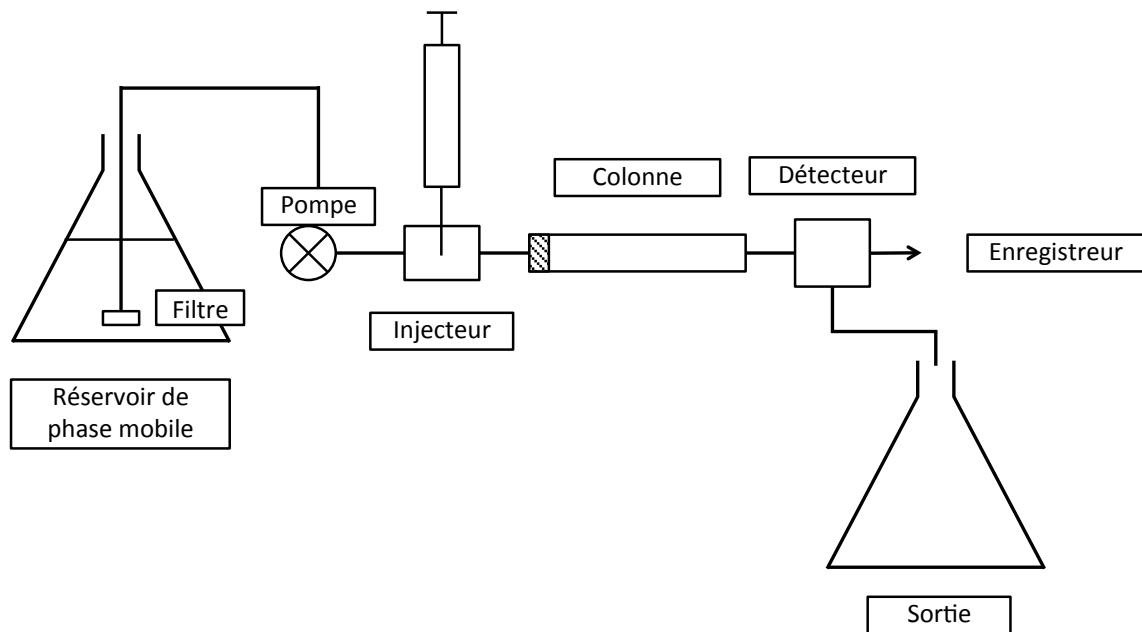


Figure 7. Schéma du système chromatographique

1.2 Instrumentation et conditions chromatographiques

De nombreuses méthodes de dosage ont été développées pour répondre au besoin de l'industrie agro-alimentaire. Suite à une recherche bibliographique, nous n'avons trouvé que quatre descriptions de méthodes de dosage entrant dans le cadre pharmaceutique : deux études permettent de doser la riboflavine dans des sirops (48,49), une dans poches de nutrition parentérale (50) et une dans des comprimés multi vitaminiques (51). La monographie de la riboflavine de l'USP (United States Pharmacopeia) ne décrit pas de méthode de dosage de la riboflavine (52). La monographie de la pharmacopée européenne propose une méthode de dosage par spectrophotomètre nécessitant la préparation d'un mélange d'acide acétique glacial, d'acétate de sodium et d'hydroxyde de sodium, soit peu utilisable en routine dans un laboratoire de contrôle hospitalier (53). Concernant les études de stabilité, une seule étude concernant la riboflavine sous forme de suspension dans le véhicule Syspend® a été publiée (48) et aucune étude de stabilité concernant une forme solide de riboflavine n'a été publiée à ce jour. Nous avons donc fait une étude comparative des différentes conditions chromatographique décrites dans ces articles, présentés dans le tableau VI.

Ref.	Colonne	Phase mobile	Débit (ml/min)	λ (nm)	t_r (min)	Détection des produits de dégradation	Commentaire
(49)	Zorbax SB-Aq C ₁₈ (250mm x 4,6mm, 5 μ m)	Solvant A : 0.0125M acide hexane-1- sulfonique dans acide o-phosphorique 0.1% (m/v) à pH 2,4-2,5 Solvant B : acétonitrile	1	254	32,5	- température (40°C et 75% d'humidité relative pendant 3 mois) : dégradation de 4,4% - UV (10 heures à 24-26 °C) : produits de dégradation non détectés - pH : sur une gamme de 1 à 11 - oxydation (peroxyde d'hydrogène 3% pendant 6 h) : dégradation de 3,5%	Gradient d'élution Détermination simultanée de 6 vitamines hydrosolubles dans un sirop
(48)	Zorbax Eclipse XDB C ₁₈ (150mm x 4,6mm, 5 μ m)	Méthanol, acide acétique glacial, H ₂ O (27:1:73) contenant 1,40 mg/ml de sodium-1- hexanesulfonate	1	280		- température (70°C) : 3,76% de dégradation - UV : 13,99% de dégradation - pH (0,1M NaOH ou HCl) : 5,03% de dégradation en milieu acide, non interprétable en milieu basique - oxydation (peroxyde d'hydrogène 35%) : 84,83% de dégradation	Etude de stabilité de la riboflavine dans du Syrspond®
(50)	Bondapak C ₁₈ (300mm x 13mm, 10 μ m)	Méthanol/eau (27:73; v/v) et 1,4% de sodium 1- hexanesulfonate	0,5	250/ 295		- oxydation : peroxyde d'hydrogène 3% et 10% pendant 24 h à température ambiante Résultats : - 20 % - H ₂ O ₂ à 3% pendant 6h - 40 % - H ₂ O ₂ à 10% pendant 6h - 60 % - H ₂ O ₂ à 10% pendant 24h - température : 150°C pendant 4 heures - UV : 4 heures - pH : 1N NaOH ou HCl - oxydation : peroxyde d'hydrogène 3% pendant 24 heures	Détermination simultanée de 4 vitamines dans des poches de nutrition parentérale Détection de la riboflavine par émission de fluorescence
(51)	Alimta C ₁₈ (250mm x 4,6mm, 5 μ m)	Méthanol/eau (27:73; v/v) et 1,4% de sodium 1- hexanesulfonate	0,35	282	18,85	Produits de dégradation non décrits	Détermination simultanée de 7 vitamines dans des comprimés

Tableau VI. Analyse bibliographique des méthodes de dosage de la riboflavine par HPLC

La publication de A. de Oliveira Ferreira (48) a plusieurs avantages : il s'agit de la seule publication décrivant une méthode de dosage de la riboflavine seule (les autres publications permettent le dosage simultané d'autres vitamines hydrosolubles) et la forme dosée est une suspension orale de riboflavine dans du Syrspend®.

La phase stationnaire finalement sélectionnée pour le développement de la méthode est de type C18 (apolaire). Il s'agit d'une colonne Prontosil C18 120 AQ 3µm 125 x 4 mm (Knauer) thermostatée à 30°C. La phase mobile est un mélange composé de 65% de solution d'heptane sulfonate à 1,494 g/l dans de l'eau, à 34% de méthanol et à 1% d'acide acétique glacial. Le pompage est en mode isocratique à 0,7 ml/min et le passeur d'échantillon est thermostaté à 20°C. Les mesures sont réalisées à 290 nm.

La technique de chromatographie sélectionnée est l'appariement d'ions, aussi appelé paire d'ions. C'est une méthode de chromatographie en phase inverse : un contre-ion ayant une partie apolaire est additionné à la phase mobile pour former une paire d'ions avec la substance à analyser. La rétention de la substance à analyser est augmentée par deux mécanismes : l'échange d'ions et la rétention en phase inverse en diminuant la polarité. La chromatographie par paire d'ions est utilisée pour augmenter la rétention de composés très polaires tels que la riboflavine.

2. Réactifs, substances de références et matériels

Les matériels, substances de références et réactifs utilisés pour le dosage et l'étude de stabilité de la riboflavine sont les suivants :

- Riboflavine, ref 1862110, lots 18070042/A et 19060102/A - Cooper
- Inorpha, ref 9919762, lot 201909111 - Inresa
- Mannitol, ref 1493028, lot 17258808 - Cooper
- Gélules taille 4 ivoires, ref 1400422, lot 34748131-B - Cooper
- Gélules taille 4 bleues, ref A2323, lot 34807181 - LGA
- Gélules taille 4 roses, ref A2280, lot 34796421 - LGA
- Gélulier à chargeur pour 300 gélules QB300 avec plaque taille 4, ref A1165 - LGA
- Flacons col étroit à vis ambré 60 ml, ref 215-2613, lot - VWR international
- Flacon col étroit à vis ambré de 15 ml, ref 2506529 - Cooper
- Bouchon 18 mm ref 2152681 - VWR international
- Fioles jaugées de 250 ml, 500 ml et 1000 ml - Schott Durant
- Spatule métallique
- Balance (précision 0,001g), ref QUINTIX221-1CFR - Sartorius
- Agitateur vibrant TopMix FB14024 - Fisher Scientific
- Agitateur magnétique RET-basic, ref 836692 - IKA Laborstechnik

- Matériels pour injecteur automatique : flacons en verre transparent classe 1, ref 11 09 0500, et bouchons étanches avec septa en silicone/polytétrafluoroéthylène pré-percés, ref 09 04 2992, Chromoptic
- Méthanol LC-MS CHORMASOLV, ref 603-001-00X, lot K0830, Riedel de Haën
- Sodium-1-heptane sulfonate, ref H2766-256, lot 026K5437, Sigma
- Acide acétique glacial, ref 20104.298, lot 14D080502, VWR Chemicals Prolabo
- Micropipettes à volume réglable, Thermo Scientific
- pH-mètre référence CG818 version 1x9 – Schott Gerate
- Micro-osmomètre automatique type 15, numéro de série 0110010 – Löser

3. Préparation des solutions de calibration, de contrôle et des échantillons

Préparation d'une gamme d'étalonnage en cinq points à partir de poudre de riboflavine (matière première à usage pharmaceutique, MPUP) diluée dans de l'eau filtrée selon le tableau VII.

Points de gamme	C1	C2	C3	C4	C5
Prise d'essai théorique (mg)	24	32	40	24	28
Volume fiole (ml)	1000	1000	1000	500	500
Concentration théorique (µg/ml)	24	32	40	48	56

Tableau VII. Préparation de la gamme d'étalonnage de riboflavine

Homogénéisation de chaque fiole par retournement puis passage aux ultrasons pendant cinq minutes.

Préparation de trois contrôles qualité interne à partir d'un lot différent de la MPUP diluée dans de l'eau filtrée selon le tableau VIII.

Points de contrôle	QC1	QC2	QC3
Prise d'essai théorique (mg)	25	38 - 42	26
Volume fiole (ml)	1000	1000	500
Concentration théorique (µg/ml)	25	38-42	52

Tableau VIII. Préparation de la gamme d'étalonnage de riboflavine

Homogénéisation de chaque fiole par retournement et passage aux ultrasons pendant cinq minutes.

Préparation des échantillons :

- Dosage des sirops : Homogénéisation des sirops par retournement. Dilution au 250^{ème} dans de l'eau filtrée. Homogénéisation de chaque fiole par retournement et passage aux ultrasons pendant cinq minutes.
- Dosage des gélules : Pesée de l'équivalent du poids moyen d'une gélule à partir de la poudre issue de l'ouverture de cinq gélules par lot. Dilution au 1000^{ème} de la prise d'essai dans de l'eau filtrée. Homogénéisation de chaque fiole par retournement et passage aux ultrasons pendant cinq minutes.

4. Validation de la méthode de dosage physicochimique

La validation d'une méthode est la procédure qui démontre qu'une méthode particulière utilisée pour le dosage d'un analyte (médicaments ou autres composés) dans une matrice donnée est fiable et répétable pour l'usage qui en est fait. La validation a été réalisée selon les recommandations de ICH Q2 (R1) (54) et le Guide méthodologique des études de stabilités des préparations développé par le GERPAC et la SFPC (55).

4.1 Plan expérimental

▪ **Spécificité**

La spécificité est la capacité d'une méthode à établir de manière univoque l'existence de la substance à analyser en présence d'autres composants. La spécificité doit être démontrée par rapport aux excipients et par rapport aux produits de dégradation.

Dans un premier temps, la spécificité de la préparation a été démontrée en comparant les chromatogrammes de la riboflavine seule, des excipients (Inorpha® et mannitol) et du mélange principe actif – excipients.

Des essais de dégradation forcée ont ensuite été menés sur deux jours consécutifs en se basant sur le protocole du Guide méthodologique des études de stabilités des préparations développé par le GERPAC et la SFPC, résumée dans le tableau IX (55). Le but est d'obtenir une dégradation intentionnelle de 20 à 30% de la molécule en faisant varier des paramètres de pH, de température ou en provoquant des réactions d'oxydation et de photolyse.

La détection de produit de dégradation nous permettra de qualifier la méthode comme « indicatrice de stabilité » (stability-indicating method), ce qui assure que la procédure analytique est capable de distinguer le principe actif à analyser de ses produits de dégradation formés durant l'étude de stabilité dans des conditions de stockage définies.

Préparation de la solution mère							
Solution n°	1	2	3	4	5	6	7
Solution de riboflavine	1 ml	1 ml	1 ml		1 ml	1 ml	1 ml
HCl 0,1 N	1 ml				NaOH 0,1N	1 ml	
HCl 0,5 N		1 ml			NaOH 0,5N		1 ml
HCl 1 N			1 ml	1 ml	NaOH 1 N		1 ml
Chauffer à 80°C pendant 1 heure puis neutraliser avec :							
NaOH 0,1N	1 ml				HCl 0,1 N	1 ml	
NaOH 0,5N		1 ml			HCl 0,5 N		1 ml
NaOH 1 N			1 ml	1 ml	HCl 1 N		1 ml
Eau déminéralisée	1 ml	1 ml	1 ml	2 ml		1 ml	1 ml

Tableau IX. Méthode de dégradation forcée par acide, base et chaleur selon le guide GERPAC/SFPC (HCl : acide chlorhydrique, NaOH : hydroxyde de sodium)

▪ Linéarité

La linéarité est définie comme la capacité d'une méthode d'analyse à obtenir des résultats directement proportionnels à la concentration en analyte dans l'échantillon à l'intérieur d'un intervalle défini.

La linéarité de la réponse a été évaluée sur une gamme en cinq points allant de 24 à 56 µg/ml. L'intervalle de dosage a été choisi pour être compris dans l'intervalle de solubilité de la riboflavine dans l'eau, soit entre 3 mg/100ml et 6 mg/100ml. Chaque gamme est répétée 3 fois.

Afin de mesurer l'influence éventuelle des excipients sur la méthode de dosage, la gamme réalisée à partir de riboflavine pure a été comparée à celles réalisées en présence d'Inorpha® et de mannitol.

▪ Fidélité

La fidélité est l'étroitesse de l'accord (le degré de dispersion) entre une série de mesures obtenues à partir d'un échantillonnage multiple à partir d'un même échantillon homogène dans des conditions déterminées. Elle est évaluée à trois niveaux :

- La répétabilité est l'expression de la fidélité obtenue lors d'essais réalisés dans un intervalle de temps court et avec les mêmes conditions opératoires.
- La fidélité intermédiaire exprime les variations intra-laboratoires. Elle concerne des résultats d'essais indépendants obtenus au sein d'un même laboratoire, avec une méthode d'analyse fixée et des échantillons d'essai identiques, mais les opérateurs, les jours et l'appareillage sont différents.
- La reproductibilité concerne des résultats d'essais indépendants obtenus avec une méthode d'analyse fixée et des échantillons d'essai identiques, mais les opérateurs, les appareillages et les laboratoires sont différents.

La fidélité a été déterminée à 3 niveaux de concentration différents, correspondant aux contrôles qualités à 25 µg/ml, 40 µg/ml et 52 µg/ml.

La répétabilité (intra-jour) a été étudiée par six injections répliquées de trois niveaux de contrôles différents, par le même opérateur avec une même gamme d'étalonnage au cours d'une même journée.

La précision intermédiaire (inter-jour) a été étudiée par six injections répliquées de trois niveaux de contrôles différents lors de trois jours différents, avec des gammes d'étalonnages différentes.

La reproductibilité n'a pas été déterminée.

- **Exactitude**

L'exactitude est l'étroitesse de l'accord entre la valeur moyenne obtenue à partir d'une série de résultats d'essais et une valeur théorique considérée comme vraie. Elle traduit l'erreur systématique d'une méthode de dosages. Elle a été calculée à partir des résultats obtenus pour la fidélité.

4.2 Analyse statistique des résultats

- **Linéarité**

Une méthode de dosage est linéaire si elle suit une équation de type $y = ax + b$, où x représente le signal mesuré (soit la surface du pic en HPLC) et y la variable (soit la concentration). La pente, l'ordonnée à l'origine et le coefficient de corrélation ont donc été déterminés à partir des droites d'étalonnage. Le coefficient de corrélation r^2 doit être voisin de 1.

- **Spécificité**

La spécificité est démontrée en prouvant que la droite de régression obtenue avec le principe actif seul et celles obtenues avec les excipients sont similaires. Il faut donc réaliser les tests statistiques suivants :

- Comparaison des pentes par un test de Student: la pente de la gamme de riboflavine seule (pente b_1 de variance S^2b_1) est comparée à celles obtenues avec les gammes reconstituées (pente b_2 de variance S^2b_2 et pente b_3 de variance S^2b_3) par un test de Student :

$$t = \frac{|b_1 - b_n|}{\sqrt{S^2b_1 - S^2b_n}}$$

Les pentes ne sont pas significativement différentes au risque α si la valeur obtenue « t » est inférieur à $t(\alpha; N1+N2-4 \text{ ddl})$, soit $t(0,05 ; 26 \text{ ddl})$.

- Comparaison des ordonnées à l'origine par un test de Student: l'ordonnée à l'origine de la gamme de riboflavine seule (ordonnée à l'origine a_1 de variance S^2a_1) est comparée à celles obtenues avec les gammes reconstituées (ordonnée à

l'origine a_2 de variance $S^2_{a_2}$ et ordonnée à l'origine a_3 de variance $S^2_{a_3}$) par un test de Student :

$$t = \frac{|a_1 - a_n|}{\sqrt{S^2_{a_1} - S^2_{a_n}}}$$

Les ordonnées à l'origine ne sont pas significativement différentes au risque α si la valeur obtenue « t » est inférieure à $t(\alpha; N_1+N_2-4 \text{ ddl})$, soit $t(0,05 ; 26 \text{ ddl})$.

- Comparaison des ordonnées à l'origine avec 0 par un test de Student : on réalise un test de Student dont la formule est :

$$t = \frac{a}{S_a}$$

avec « a » l'ordonnée à l'origine et « S_a » l'écart-type de l'ordonnée à l'origine.

Si la valeur de « t » obtenue est inférieure à celle lue dans la table de Student pour $t(\alpha; N-2 \text{ ddl})$, soit $t(0,05 ; 13 \text{ ddl})$, le système de référence utilisé pour le dosage pourra se limiter au point 100%. Sinon, chaque dosage devra se faire après avoir effectué une nouvelle gamme d'étalonnage.

▪ **Fidélité**

Les données issues des essais de fidélité sont trois séries de valeurs, chaque série étant constituée de 6 valeurs dont nous connaissons la valeur théorique et la valeur observée suite à l'analyse de l'aire sous la courbe grâce à la gamme. Ceci nous permet de calculer un pourcentage de recouvrement, soit le rapport entre la valeur observée et la valeur théorique.

Les tests suivants sont ensuite réalisés :

- Homogénéité des variances intergroupes par un test de Cochran, décrit précédemment.
- Calcul de l'écart-type relatif pour la répétabilité et la reproductibilité respectivement par les calculs suivants :

Paramètres	Abréviations	Calcul ou valeur
Nombre de groupe	k	3
Sommes des moyennes	T_1	Somme des $n_j \times m_j$ (= somme des taux de recouvrement)
Sommes des carrés des moyennes	T_2	Somme des $n_j \times m_j^2$

Nombre total de mesures	T_3	18
Sommes des carrés des mesures	T_4	Somme des n_j^2
Somme des variances	T_5	Somme $[(n_j-1)S_j^2]$ avec S_j^2 la variance intergroupe
Variance de répétabilité	S_r^2	$\frac{T_5}{T_3 - k}$
Variance intergroupe	S_g^2	$\left[\frac{(T_2 \times T_3) - T_1^2}{T_3(k-1)} - S_r^2 \right] \times \frac{T_3(k-1)}{T_3^2 - T_4}$
Variance de fidélité intermédiaire	S_R^2	$S_r^2 + S_g^2$

Tableau X. Paramètres nécessaires au calcul de l'écart-type

▪ **Exactitude**

La validation statistique de la spécificité permettant de valider l'absence d'effet matrice, l'exactitude est calculée à partir des données des dosages de la riboflavine seule. Les taux de recouvrement sont donc calculés pour chaque point de gamme. Les tests suivants sont ensuite réalisés :

- Homogénéité des variances intergroupes par un test de Cochran dont la formule est la suivante :

$$C = \frac{S^2_{\max}}{\sum_{j=1}^k S^2_j} < C_{(\alpha, k, n-1)}$$

avec :

- k = nombre de fois où l'essai est réalisé
- N = nombre d'essais
- S^2_{\max} = variance la plus élevée
- S^2_j = variance de chaque groupe j

- Test de validité des moyennes par un test de Fisher : on démontre que les variances inter et intra-groupes ne sont pas significativement différentes en calculant le F :

$$F = \frac{S^2_C}{S^2_E} < F_{(\alpha, k-1, N-k)}$$

Avec S^2_C la variance intergroupe et S^2_E la variance intragroupe.

- Taux de recouvrement moyen et intervalle de confiance associé : la valeur 100% doit être incluse dans cet intervalle.

Intervalle de recouvrement moyen = moyenne des taux de recouvrement $\pm \frac{t_{(\alpha, N-1)} \times S_T}{\sqrt{N}}$

Avec S_T l'écart-type de l'ensemble des taux de recouvrement.

C. Validation des méthodes pour l'étude de stabilité microbiologique

1. Conditions générales et critères de validation de la méthode

Selon le chapitre 5.1.4. de la pharmacopée européenne (qualité microbiologique des préparations pharmaceutiques et des substances pour usage pharmaceutique non stérile), les préparations aqueuses destinées à la voie orale doivent respecter les critères suivants :

- Germes aérobies totaux (GAT) < 10² UFC/ml
- Moisissures/levures totales (MLT) < 10¹ UFC/ml
- Absence d'*Escherichia coli*

Ces critères s'appliquent donc pour la forme orale buvable de riboflavine.

Les normes microbiologiques sont moins exigeantes pour les préparations non aqueuses destinées à la voie orale (GAT < 10³ UFC/ml, MLT < 10² UFC/ et absence d'*Escherichia coli*) et les excipients utilisés pour la production des gélules sont moins favorables à la croissance bactérienne. De plus, la préparation est réalisée dans une zone à atmosphère contrôlée de classe D, à partir de MPUP et d'excipients répondant à des exigences de contamination microbienne testées et garanties par le certificat d'analyse du fournisseur. L'étude de stabilité microbiologique n'a donc été effectuée que sur la forme buvable de riboflavine et a été considérée non obligatoire pour la réalisation des gélules.

Le contrôle microbiologique doit être réalisé selon les méthodes décrites dans les monographies 2.6.12 (essai de dénombrement microbien) et 2.6.13 (recherche de micro-organismes spécifiés) (56).

Avant de débiter l'étude de stabilité microbiologique, il convient de valider les essais de fertilité des milieux et l'applicabilité de la méthode de dénombrement.

L'essai de fertilité des milieux permet de prouver l'aptitude du milieu à permettre la pousse du micro-organisme recherché. Il consiste en l'ensemencement des milieux par un inoculum < 100 unités formant colonies (UFC) suivi du dénombrement des colonies après incubation selon les caractéristiques de chaque milieu. L'essai est valide lorsque le

dénombrement de la souche en présence du produit ne diffère pas de plus d'un facteur 2 de la valeur calculée pour un inoculum standardisé.

L'applicabilité de la méthode de dénombrement correspond à l'aptitude de l'essai à permettre la détection des microorganismes demandés en présence du produit à tester. Ces essais sont effectués avec cinq micro-organismes définis par la pharmacopée : *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* pour les GAT ainsi que *Candida albicans* et *Aspergillus brasiliensis* pour les MLT.

Le but des essais d'applicabilité est de montrer que l'ajout d'un inoculum < 100 UFC n'est pas inhibé par le produit. Le sirop est délibérément contaminé avec les souches de référence et le dénombrement est effectué contre un témoin sans produit contaminé.

Un contrôle négatif, sans produit et non contaminé, est réalisé pour valider les conditions opératoires. Aucune croissance microbienne ne doit être détectée.

L'essai est validé si le nombre moyen obtenu pour chacun des microorganismes de référence ne diffère pas de plus d'un facteur 2 de la valeur obtenue en l'absence du produit pour le témoin positif.

Trois méthodes sont proposées dans la monographie 2.6.12 de la pharmacopée européenne :

- la filtration sur membrane,
- le dénombrement sur plaque, après ensemencement en profondeur ou étalement en surface,
- la méthode du Nombre le Plus Probable (NPP).

La filtration sur membrane ou le dénombrement sur plaque après ensemencement en profondeur sont les méthodes les plus sensibles mais également les plus lourdes à mettre en place. En effet, la viscosité du sirop pose des problèmes techniques pour la filtration sur membrane et l'ensemencement en profondeur nécessite de couler des géloses.

La méthode du NPP a une fidélité et une exactitude inférieure aux autres méthodes. Elle donne des résultats peu fiables pour le dénombrement des moisissures et ne doit être utilisée que si le recours aux autres méthodes est impossible.

En accord et avec l'aide du service d'hygiène hospitalière, nous avons donc choisi la méthode du dénombrement sur plaque après étalement en surface.

2. Réactifs, substances de références et matériels

Les matériels, réactifs et souches de références utilisées sont les suivants :

- Riboflavine, ref 1862110, lot 19060102/A - Cooper
- Inorpha, ref 9919762, lot 201909111 - Inresa

- Eau pour préparation injectable, lot 1905391, ref 9333140 – Lavoisier
- Flacon col étroit à vis ambré 125 ml, ref 215-2617 – VWR international
- Bouchon 18 mm, ref 2152681 – VWR international
- Eau stérile 9 ml, ref 54154 – Bio-Rad
- Balance (précision 0,001g), ref QUINTIX221-1CFR - Sartorius
- Agitateur magnétique RET-basic, ref 836692 – IKA Laborstechnik
- Bain à ultrasons 89878 - BioblockScientific
- Quanti-Cult Plus *Staphylococcus aureus* ATCC 6538®, référence R4737016, lot 839689– Thermo Fisher Scientific
- Quanti-Cult Plus *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027®, référence R4715210, lot 839689– Thermo Fisher Scientific
- Quanti-Cult Plus *Bacillus subtilis* ATCC 6633®, référence R4711221, lot 83968 – Thermo Fisher Scientific
- Quanti-Cult Plus *Candida albicans* ATCC 10231®, référence R4711503, lot 839689 – Thermo Fisher Scientific
- Quanti-Cult Plus *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404®, référence R4711100, lot 839689 – Thermo Fisher Scientific
- Quanti-Cult Plus *Escherichia coli* ATCC 8739®, référence R4717085, lot 839689 – Thermo Fisher Scientific
- Géloses Trypto-caseine soja (TSA), référence BM05008, lot 0044706 – Biokar diagnostics
- Géloses Sabouraud, référence 254091, lot 0140744 – BD
- Géloses BCP, référence P0511SA, lot 4263587 – Biomérieux
- Pointes stériles 100 - 1000 µl pour micropipette, ref 70.762.211, Sarstedt

3. Protocole de la validation des méthodes microbiologiques

3.1 Validation de l'essai de dénombrement microbien

Les suspensions mères sont préparées à partir d'un échantillon d'au moins 1 ml de sirop selon les recommandations de la pharmacopée. Le temps écoulé entre la fin de la préparation des échantillons et le moment où l'inoculum entre en contact avec le milieu de culture ne dépasse pas 45 minutes.

Nous avons travaillé à partir de suspensions de souches de référence calibrées (Quanti-Cult Plus, Thermo Fisher®) permettant d'avoir le nombre d'UFC requis par la pharmacopée sans avoir besoin de réaliser des dilutions successives. Les microorganismes sont conservés sous forme de film à l'intérieur du bouchon d'un tube en plastique. Ils sont remis en suspension par l'ajout d'1,2 ml de milieu de culture.

Des échantillons de produit pur (10 mg/ml), dilué au 1/10^{ème} (1 mg/ml) et au 1/100^{ème} (0,1 mg/ml) dans de l'eau stérile ont été contaminés avec 100 µl de suspension microbienne, soit < 100 UFC. 1 ml de chaque niveau de dilution est étalé au râteau sur les différents milieux de culture.

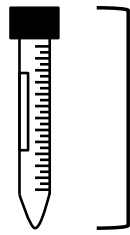
Deux témoins ont été préparés : un témoin positif sans produit contaminé et un témoin négatif sans produit non contaminé. Comme vu précédemment, la préparation d'un témoin positif permet de réaliser l'essai de fertilité des milieux. Il est valide si le nombre d'UFC comptées ne diffère pas de plus d'un facteur 2 avec les échantillons de sirop. Le témoin négatif permet de valider la technique employée.

Les milieux utilisés sont Trypto-caséine soja (TCS) pour le DGAT et Sabouraud pour le DMLT selon les recommandations de la pharmacopée.

Le protocole de validation est résumé dans la figure 8.

Protocole de validation de l'essai de dénombrement microbien

1. Préparation des suspensions microbiennes



Préparation de suspensions microbiennes
(concentration : < 100 UFC/100 μ l)
Volume total : 1,2 ml

- *Staphylococcus aureus*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Bacillus subtilis*
- *Candida albicans*
- *Aspergillus brasiliensis*

2. Préparation des échantillons et ensemencements

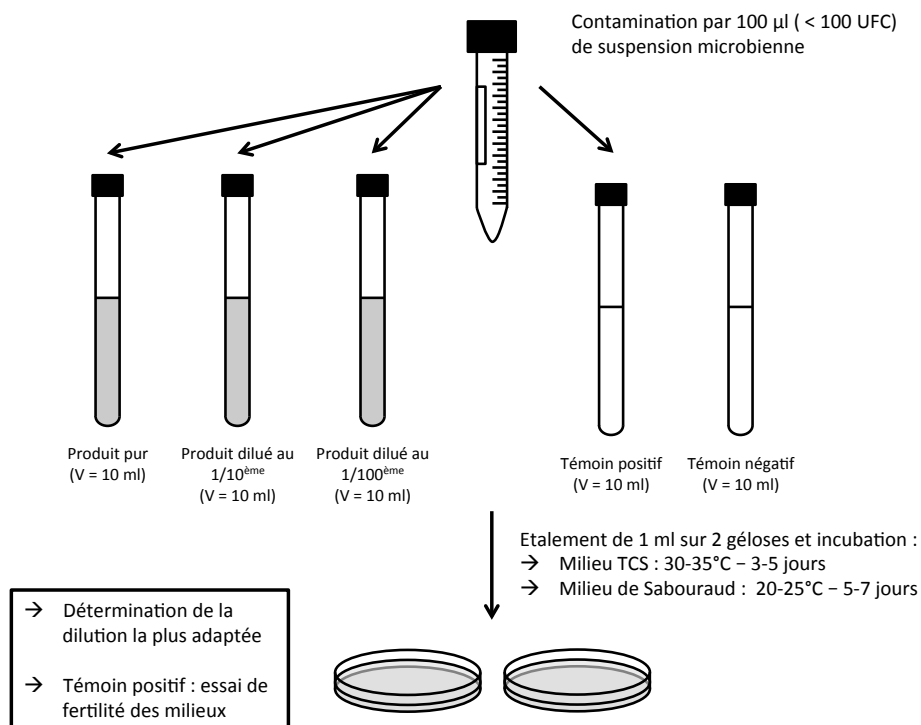


Figure 8. Protocole de validation de l'essai de dénombrement microbien.

3.1 Validation de la recherche de micro-organismes spécifiés (*Escherichia coli*)

Comme pour l'essai de dénombrement microbien, le sirop pur et deux niveaux de dilutions (1/10^{ème} et 1/100^{ème}) ont été contaminés avec 100 μ l de suspension bactérienne, soit < 100 UFC. Un témoin positif sans produit contaminé et un témoin négatif sans produit non contaminé ont également été préparés. La recherche d'*Escherichia coli* est qualitative, elle est validée si les échantillons contaminés

présentent des colonies caractéristiques et si on n'observe aucune colonie sur le témoin négatif. Le protocole est résumé sur la figure 9.

La pharmacopée recommande l'utilisation d'un milieu Mac Conkey, sélectif des bacilles à Gram négatifs non exigeants. *Escherichia coli* fermente le lactose présent dans le milieu et prend une couleur caractéristique rose/rouge en acidifiant le milieu. En accord avec l'équipe d'hygiène, nous avons utilisé des géloses BCP (gélose lactosée au Bromocrésol Pourpre). Ce milieu permet de visualiser les germes lactoses (+) qui donnent des colonies jaunes par acidification du milieu. Il n'est cependant pas sélectif et peut nécessiter l'identification des colonies jaunes observées.

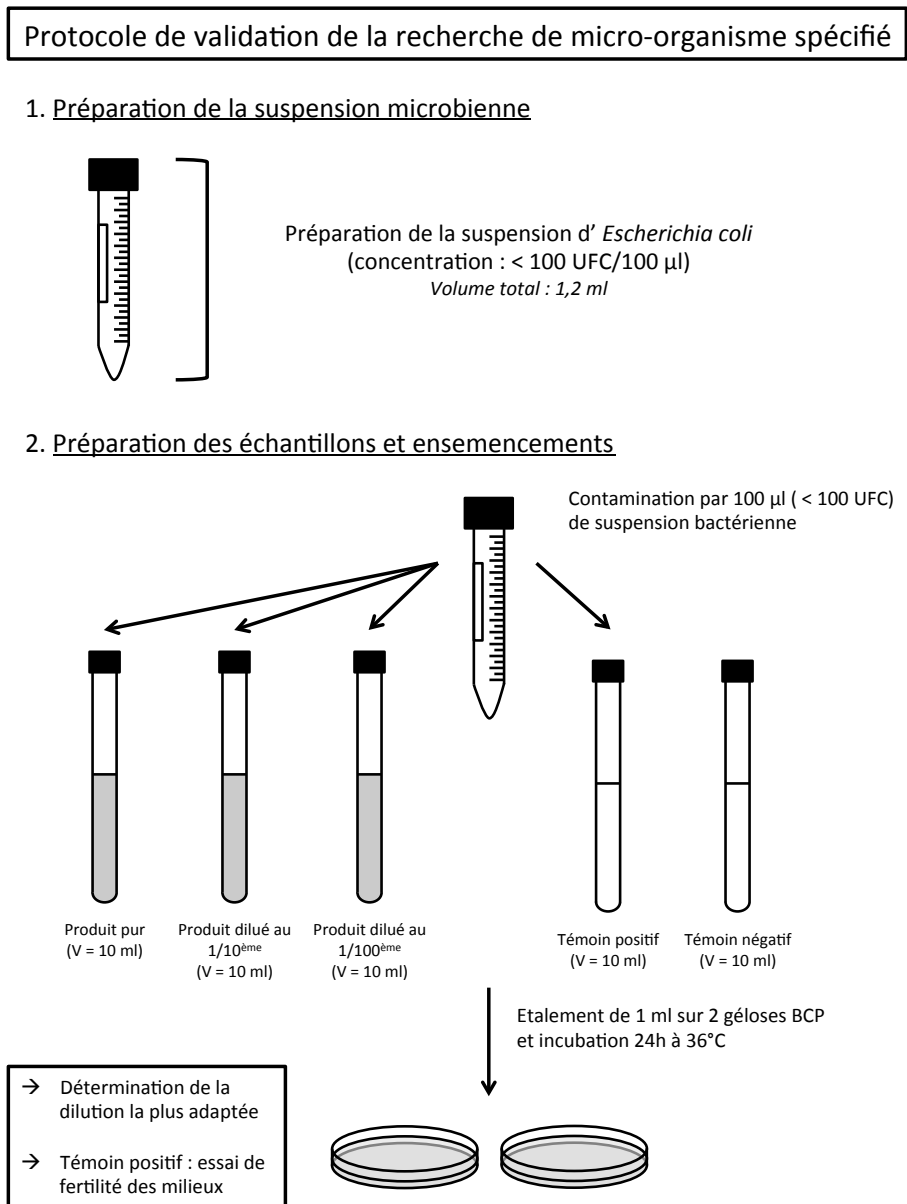


Figure 9. Protocole de validation de la recherche de microorganismes spécifiés

D. Etude de stabilité

1. Etude de stabilité des sirops de riboflavine

1.1 Etude de stabilité chimique

L'étude de stabilité chimique permet d'identifier et de quantifier le principe actif ainsi que d'évaluer son intégrité chimique au cours du temps. Elle permet aussi de suivre l'apparition des produits de dégradation.

Dans les publications internationales, la stabilité d'une préparation est définie comme le maintien d'au moins de 90% de la concentration initiale. La notion de concentration en substance active exprimée en pourcentage de la concentration initiale constitue effectivement une approche de la stabilité. Cette limite de $\pm 10\%$ peut cependant être remise en question car elle ne prend pas en compte les traitements à marge thérapeutique étroite ou l'apparition d'éventuels produits de dégradation toxiques. Dans notre cas, les produits de dégradation de la riboflavine étant connus et non toxique, cette valeur limite peut être utilisée.

A J0, trois lots constitués chacun de 40 flacons unidose de 3 ml et de 2 flacons multidose de 60 ml de sirop ont été produits. La moitié du lot produit a été stocké à une température $< 25^{\circ}\text{C}$ et l'autre entre 4 et 8°C . Un flacon de solution mère de chaque lot a été dosé à J0 et a servi de valeur de référence.

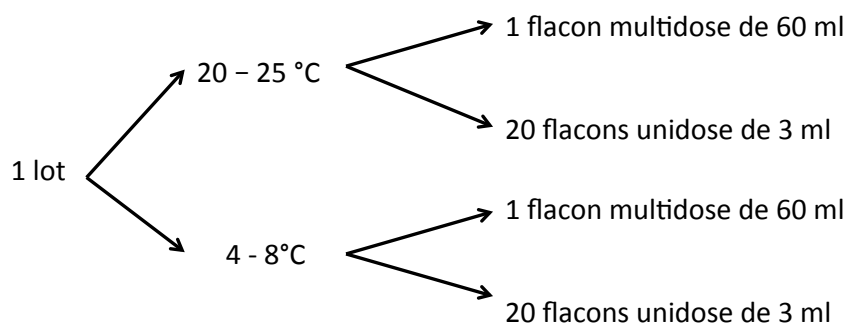


Figure 10. Schéma de la constitution d'un lot de forme buvable pour l'étude de stabilité physico-chimique

L'étude de stabilité a eu lieu sur 7 temps différents (J0, J3, J7, J14, J28, J56, J84). Pour chaque lot et pour chaque condition de conservation, le flacon multidose et 3 flacons unidose sont dosés en triplicata. Afin de s'assurer de la spécificité de l'analyse, le point de contrôle correspondant à la concentration cible (QC2 = 40 mg/ml) est préparé extemporanément et dosé également.

1.2 Etude de stabilité physique

Les échantillons utilisés pour l'étude de stabilité physique sont les mêmes que ceux employés pour la stabilité chimique. Les paramètres évalués sont :

- Les caractères organoleptiques (couleur, odeur, aspect) : ces caractères doivent rester stables tout au long de la conservation du traitement, un changement pouvant indiquer une modification de composition. L'appréciation de la couleur et de l'aspect par une observation à l'œil nu a eu lieu chaque jour d'analyse. La préparation n'étant pas toxique, un contrôle olfactif a aussi été réalisé.
- Le pH : une modification du pH est le témoin d'une modification de la formulation initialement préparée. Sa détermination se fait par mesure de la différence du potentiel entre deux électrodes baignant dans la solution à analyser. Il n'existe pas de critère d'acceptabilité concernant les paramètres physiques des études de stabilité. Le guide GERPAC/SFPC indique cependant qu'une variation d'une unité de pH ne peut être considérée comme négligeable car elle est témoin d'une modification de la concentration en protons d'un facteur 10 dans la solution (55). La sonde utilisée pour la mesure est un pH-mètre CG818 version 1x9 (Schott Geräte). Les mesures ont été réalisées à chaque jour d'analyse après calibration de la sonde de mesure.
- L'osmolarité : cette mesure indique le nombre de moles effectives en solution et leur participation à la pression osmotique de la solution. Elle peut être définie comme le nombre de molécules osmotiquement actives par litre de solution et est exprimée en mOsm/kg. Cette donnée est importante pour prédire la tolérance digestive de la préparation : l'osmolarité des sécrétions gastro-intestinales est d'environ 300 mOsm/kg et une solution ayant une osmolarité supérieur à 600 mOsm/kg doit être diluée pour éviter une intolérance (57). L'osmomètre utilisé est un micro-osmomètre automatique (Löser). Les analyses ont eu lieu à chaque jour de dosage après calibration de l'osmomètre.

1.3 Etude de stabilité microbiologique

Les préparations aqueuses destinées à la voie orale sont considérées comme stables si le dénombrement des GAT est $< 10^2$ UFC/ml, le dénombrement des MLT est $< 10^1$ UFC/ml et si elles ne contiennent pas d'*Escherichia coli*.

L'étude de stabilité microbiologique a eu lieu sur 5 jours d'analyse : J0, J14, J28, J56 et J84.

A J0, 3 lots de 120 ml de sirop de riboflavine à 10 mg/ml ont été produits. Les lots ont été conditionnés dans 2 flacons multidoses de 60 ml stockés respectivement à des températures comprises entre 2 et 8°C ou à < 25°C.

Dans le cas où la taille de lot est extrêmement petite, soit < 1000 ml, la pharmacopée autorise une prise d'essai équivalent à 1% du lot. Un volume d'au moins 10 ml à la dilution retenue lors de l'étape de validation est préparé à partir d'au moins 1,2 ml de sirop pour chacun des 6 flacons (3 flacons stockés entre 2 et 8°C ou entre < 25°C). Chaque type de gélose (TCS, Sabouraud et BPC) est ensemencé par 1 ml de la dilution retenue en triplicata puis incubé selon les conditions recommandées pour chaque milieu.

Lors du dénombrement, le nombre de GAT est considéré comme le nombre d'UFC obtenu avec le milieu TCS : si des moisissures ou levures sont détectées sur ce milieu, elles sont comptabilisées dans les GAT et inversement. Les critères d'acceptabilités sont interprétés de la manière suivante :

- Germes aérobies totaux : le maximum acceptable est 200 UFC/ml,
- Moisissures/levures totales : le maximum acceptable est 20 UFC/ml,
- Absence d'Escherichia coli.

2. Etude de stabilité des gélules de riboflavine

Nous avons réalisé les essais d'uniformité des préparations unidoses recommandés par la pharmacopée européenne afin de libérer les lots produits pour l'étude de stabilité. Ces essais permettent de garantir le degré d'uniformité de la quantité de substance active sur l'ensemble des préparations unidoses (56).

L'uniformité des préparations unidoses a été démontrée par deux méthodes :

L'uniformité de masse : La Pharmacopée Européenne propose de peser individuellement 20 gélules prises au hasard et de déterminer la masse moyenne. La masse individuelle de deux au plus des 20 gélules peut s'écarter de la masse moyenne de 10 % (si la masse moyenne est inférieure à 300 mg) ou de 7,5 % (si la masse moyenne est supérieure ou égale à 300 mg), mais la masse d'aucune gélule ne peut s'écarter de plus du double de ce pourcentage.

L'essai consiste à peser une gélule pleine, à vider le contenu puis à peser l'enveloppe pour calculer la masse du contenu par différence. Il doit être répété sur 20 gélules. Ce type de contrôle qualité est difficilement réalisable en pratique pour une pharmacie hospitalière étant donné les petites quantités produites, la destruction d'une partie du lot et la lourdeur du protocole.

Nous avons donc appliqué le test réalisé en routine au laboratoire de contrôle, qui consiste à peser 20 gélules pleines dès qu'elles sont fabriquées. La masse de poudre est

ensuite déduite à partir des masses moyennes des gélules vides préalablement mesurées. Les critères d'acceptabilité de la pharmacopée européenne permettent ensuite de valider ou non l'essai d'uniformité.

L'uniformité de teneur est basée sur la détermination de la teneur individuelle en principe actif des gélules composant l'échantillon. Elle est validée par le dosage individuel de 10 unités par une méthode d'analyse appropriée, soit la méthode développée pour cette étude puisqu'aucune n'existait auparavant dans notre centre.

La préparation est validée si la teneur individuelle d'une seule gélule s'écarte des limites de 85 à 115 % de la teneur moyenne tout en ne s'écartant pas des limites de 75 à 125 % de la teneur moyenne.

Si la teneur individuelle de trois gélules au plus s'écarte des limites de 85 à 115 % de la teneur moyenne, et si aucune teneur individuelle ne s'écarte des limites de 75 à 125 % de la teneur moyenne, la Pharmacopée préconise de prélever au hasard vingt autres gélules et de les doser individuellement.

Il n'existe pas de référentiel concernant les critères d'acceptabilité lors des études de stabilité de gélule. Comme pour la forme buvable, le maintien d'au moins 90% de la concentration initiale de principe actif au cours du temps est utilisé pour garantir la stabilité de la préparation. Nous avons donc fixé le seuil d'acceptabilité de notre étude à $\pm 10\%$ de teneur en principe actif.

Trois lots de 100 gélules ont été produits à J0. La teneur en riboflavine a été mesurée à J0, J3, J7, J14, J28, J56 et J84. Afin de s'assurer de la spécificité de l'analyse, le point de contrôle correspondant à la concentration cible ($QC_2 = 40 \text{ mg/ml}$) est préparé extemporanément et dosé également. Pour effectuer le dosage, le contenu de cinq gélules de chaque lot a été vidé puis l'équivalent de la masse moyenne en poudre d'une gélule a été pesé et dosé par HPLC-UV deux fois. Cette opération est réalisée deux fois par lot et par jour d'analyse.

IV. Résultats

A. Formulation galénique et procédé de fabrication

1. Choix des excipients

1.1 Forme buvable de riboflavine

▪ **Analyse de la composition et des caractéristiques des véhicules disponibles**

Les excipients présents dans les différentes formulations ont été confrontés à la liste des excipients à effet notoire de l'EMA (59). Les composés suivants y sont cités :

- Glycérol : le glycérol est utilisé comme agent anti-cristallisation dans l'Inorpha® et l'Ora-Sweet®. Il est à effet notoire si sa présence excède 10g par dose et peut provoquer des maux de tête, des maux d'estomac ou des diarrhées.
- Parahydroxybenzoates et leurs esters : les dérivés méthylés et propylés sont utilisés comme conservateurs dans la gamme Ora® et dans le sirop simple. Ils peuvent provoquer des réactions allergiques, parfois retardées. Ces composés de la famille des parabènes sont également identifiés comme potentiellement perturbateurs endocriniens.
- Sorbitol : le sorbitol est utilisé comme édulcorant dans l'Ora-Sweet®. Il est contre-indiqué chez les personnes souffrant d'intolérance héréditaire au fructose et peut avoir un léger effet laxatif (diarrhée osmotique). De plus, la teneur en sorbitol peut affecter la biodisponibilité des traitements administrés de manière concomitante.
- Acide benzoïque et benzoates : le benzoate de sodium est utilisé comme conservateur dans le Syrspend® SF liquide. Il peut provoquer des ictères nucléaires chez le nouveau-né du fait de sa fixation à l'albumine.

Tous les véhicules disponibles sur le marché contiennent un ou plusieurs excipients à effet notoire dans leur formulation, comme résumé dans le tableau XI.

Véhicules	Inorpha®	Ora-Plus®	Ora-Sweet®	Syrspend SF PH 4® liquide	Sirop simple
Excipients à effets notoires	Glycérol	Méthylparabene	Glycérol, sorbitol, méthylparabene	Benzoate de sodium	Propylparabene

Tableau XI. Excipients à effets notoires par véhicule de suspension

Les caractéristiques physicochimiques des différents véhicules ont ensuite été comparées :

- Osmolalité : la gamme Ora® a une osmolalité élevée (3240 mOsm/kg pour l'Ora-Sweet®) pouvant entraîner des risques d'intolérance digestive et de diarrhée.
- Viscosité : le Syrspend® a une viscosité beaucoup plus importante que les autres véhicules. Bien que cette propriété évite la sédimentation du principe actif, elle rend la préparation formulée difficile à manipuler et entraîne des risques de sur ou sous-dosage.
- pH : la riboflavine est plus soluble et plus stable en milieu acide. Les 3 véhicules dont le pH est connu étant acide, ce critère n'est pas discriminant.

▪ Etude de pré-formulation

En parallèle de l'analyse des caractéristiques physico-chimique et de la composition des différents véhicules, des essais de pré-formulation ont été réalisés pour la forme buvable. Des préparations à 10mg/ml et à 20 mg/ml de riboflavine ont été réalisées avec du Syrspend®, du sirop simple, de l'Ora-Sweet® mélangé à dose égale avec de l'Ora-Plus® et de l'Inorpha®.

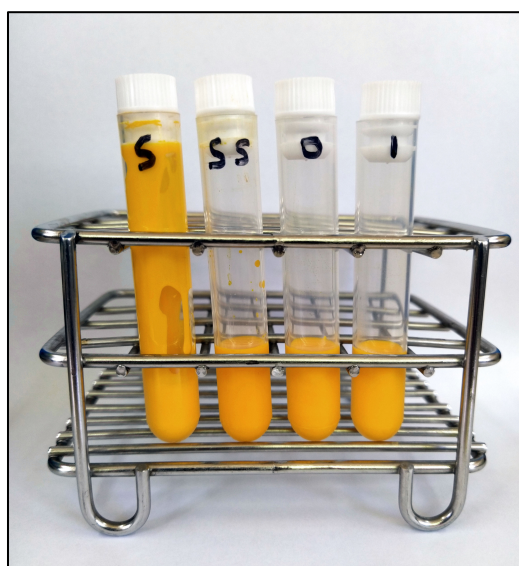


Figure 11. Essais de pré-formulation à 10 mg/ml de riboflavine à partir de Syrspend® (S), sirop simple (SS), Ora-Sweet/Ora-Plus® (O) et Inorpha® (I)

Le procédé de préparation est simple avec l'Inorpha[®], l'Ora-Sweet/Ora-Plus[®] et le sirop simple. Le Syrspend[®] a une viscosité trop importante (3000 – 6000 mPa/s), le rendant difficile à manipuler lors de la préparation. Ceci est visible sur la figure 11 : même après un temps de repos important, le Syrspend[®] adhère toujours aux parois du tube alors que ce n'est pas le cas pour les autres véhicules. La viscosité importante rend également difficile le prélèvement de volumes précis, exposant les patients à des risques de sur ou sous-dosage lors de la préparation des doses à administrer. Le Syrspend[®] n'a donc pas été retenu lors de cette étape de pré-formulation.

Les caractéristiques organoleptiques des formes préparées ont également été prises en compte. La riboflavine a un goût très amer, qui n'est pas contrebalancé par le goût sucré du sirop simple. L'amertume est masquée partiellement par l'arôme de fruit de l'Ora-Sweet/Ora-Plus[®] et par l'arôme caramel de l'Inorpha[®].

▪ **Choix du véhicule de suspension**

Nous avons donc choisi l'Inorpha[®] comme véhicule car même si il contient un excipient à effet notoire, celui-ci ne provoque des effets qu'à une dose très élevée. La gamme Ora présente l'inconvénient majeur d'être hyperosmolaire pouvant provoquer des effets indésirables graves chez les populations néonatales. Le sirop simple a été éliminé également à cause de la présence de parabène dans sa composition.

Nous avons par la suite essayé de masquer l'amertume de la riboflavine en utilisant des arômes supplémentaires : des aromatisants goût framboise et fraise ont été ajoutés à la formulation à base d'Inorpha[®] et une dégustation à l'aveugle a été réalisée pour choisir la préparation ayant le moins d'amertume rémanente. Il s'avère que les goûts fraise et framboise accentuent le goût sucré qui arrive dans un premier temps mais n'ont pas d'impact sur l'amertume ressentie dans un second temps. Il ne nous a donc pas semblé pertinent de les ajouter à la formulation car l'Inorpha[®] contient déjà un agent masquant l'amertume dans sa composition.

Enfin, les essais de palatabilité ont permis d'éliminer la préparation de riboflavine à 20 mg/ml à cause de son amertume rémanente. Le concentration choisie est donc 10 mg/ml.

1.2 Gélules de riboflavine

Le mannitol a été choisi en raison de sa tolérance, de sa faible hygroscopie et de son inertie vis-à-vis des principes actifs. La riboflavine est une poudre peu volatile et de couleur orange vif. L'emploi d'un épaississant tel que la silice colloïdale pour permettre une meilleure l'homogénéisation du mélange avec le principe actif n'est donc pas nécessaire.

2. Formulation

▪ **Forme buvable**

A partir de ces différents résultats, la formulation retenue a permis la production d'un lot de 250 ml de suspension buvable conditionné en flacons de 60 ml, équivalent à la quantité nécessaire par lot pour l'étude de stabilité.

2,5 grammes de poudre de riboflavine ont été pesés à l'aide d'une balance de précision puis transférés dans un mortier. 15 ml d'eau versable sont utilisés pour rincer la nacelle de pesée. Une faible quantité d'Inorpha® est ensuite ajoutée dans le mortier. La poudre et les liquides sont triturés avec un pilon jusqu'à dissolution complète de la poudre, puis le mélange est homogénéisé 10 minutes à l'aide d'un agitateur magnétique. Il est ensuite transféré dans une fiole jaugée de 250 ml complétée jusqu'au trait de jauge avec l'Inorpha® et passé aux ultrasons pendant 15 minutes. La suspension obtenue est conditionnée dans des flacons en verre ambré de 60 ml.

Les fiche de fabrication et de faisabilité sont disponibles en annexes 1 et 2.

▪ **Gélules**

Des lots de 100 gélules ont été produits, soit une quantité suffisante pour pouvoir mener à bien l'étude de stabilité. 5 grammes de poudre de riboflavine ont été pesés à l'aide d'une balance de précision puis transférés dans une éprouvette. Le mannitol a été ajouté de manière à avoir un volume final de 21 ml, permettant le remplissage de gélule de taille 4. Le mélange riboflavine et mannitol a été transféré dans un mortier et trituré avec un pilon jusqu'à homogénéisation. Il a ensuite été réparti dans les gélules.

Les fiche de fabrication et de faisabilité sont disponibles en annexes 3 et 4.

B. Validation de la méthode de dosage par HPLC

1. Spécificité

Les chromatogrammes obtenus avec la riboflavine seule, l'Inorpha® seul et le mélange riboflavine et Inorpha® sont illustrés sur les figures 12, 13 et 14.

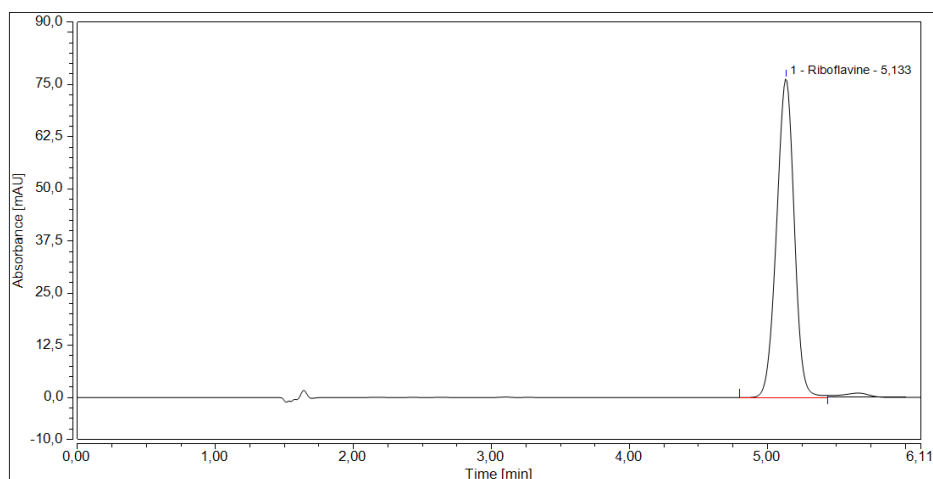


Figure 12. Chromatogramme de la riboflavine

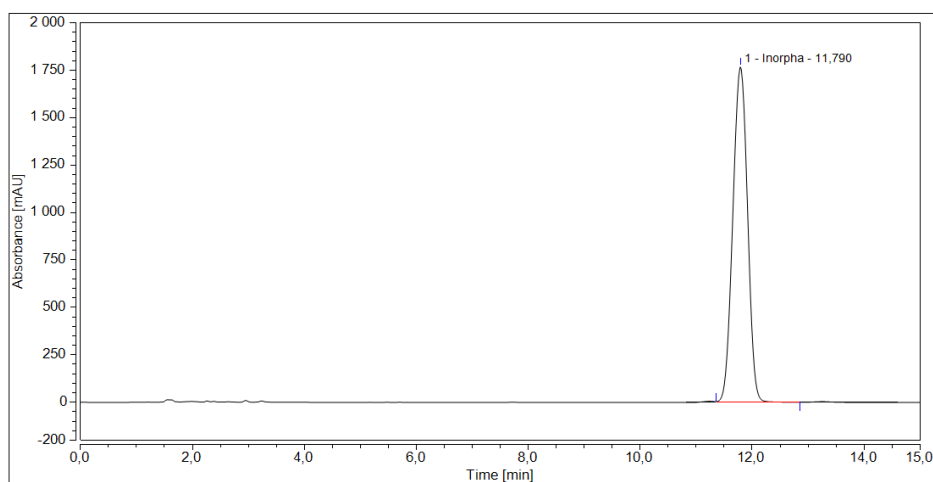


Figure 13. Chromatogramme de l'Inorpha®

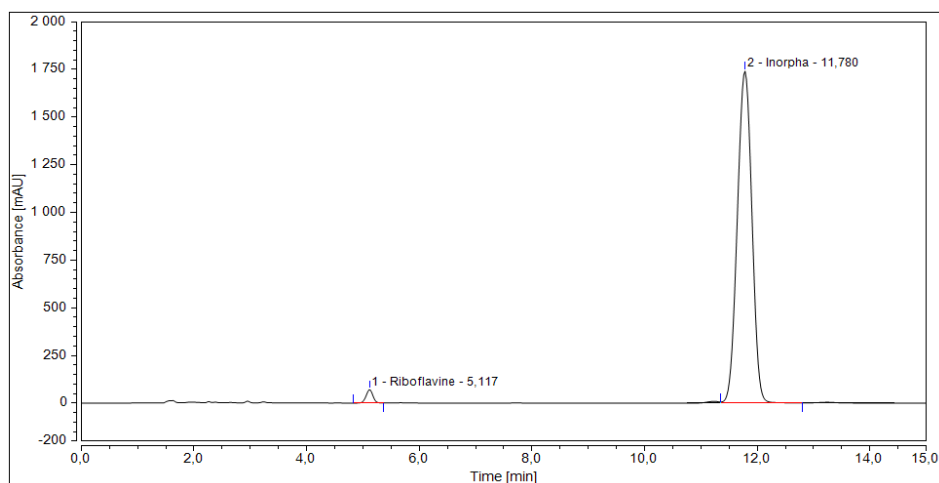


Figure 14. Chromatogramme d'un mélange riboflavine – Inorpha®

Les temps de rétention (t_R) respectifs de la riboflavine et de l'Inorpha[®] sont de 5,1 et 11,7 minutes. Les deux pics sont suffisamment séparés pour garantir la spécificité de la méthode de dosage.

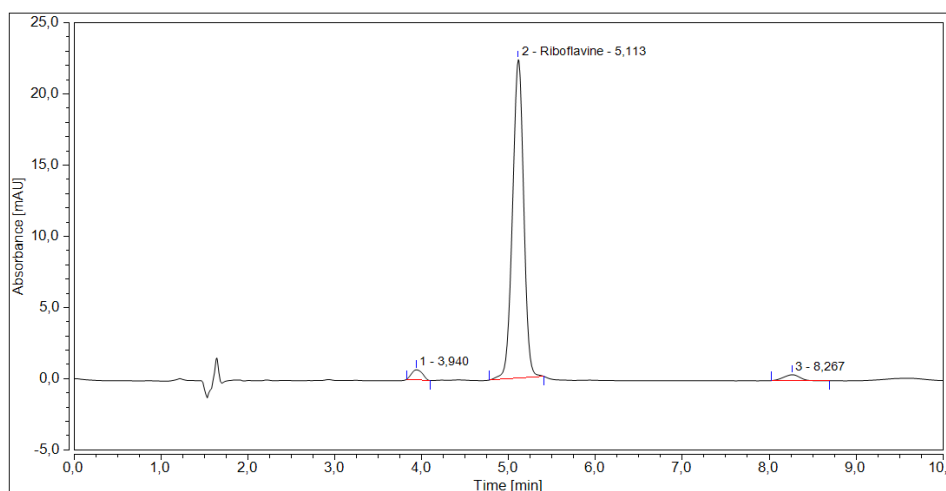
Le mannitol n'absorbe pas à la longueur d'onde choisie, soit 290 nm.

Les études de dégradation forcée ont permis d'obtenir des produits de dégradation en condition basique et lors d'une exposition à des rayons UV. Ces résultats sont conformes aux résultats attendus selon la pharmacopée européenne, qui indique que les solutions s'altèrent à la lumière, particulièrement si elles sont alcalines (53). Les conditions de dégradation testées sont résumées dans le tableau XII.

Conditions de dégradation	Dégradation moyenne	Produits de dégradation observés ?
UV - 10 minutes	22,01%	Oui
NaOH 0,05N - 3 minutes à 80°C	25,79%	Oui
HCl 0,5N - 6 heures à 80°C	Pas de dégradation	Pas de dégradation
H ₂ O ₂ 15% - 6 heures à 80°C	Pas de dégradation	Pas de dégradation

Tableau XII. Conditions de dégradations de la riboflavine

Deux produits de dégradation sont observés en cas de photolyse avec des temps de rétention de 3,09 minutes et 5,63 minutes.



A

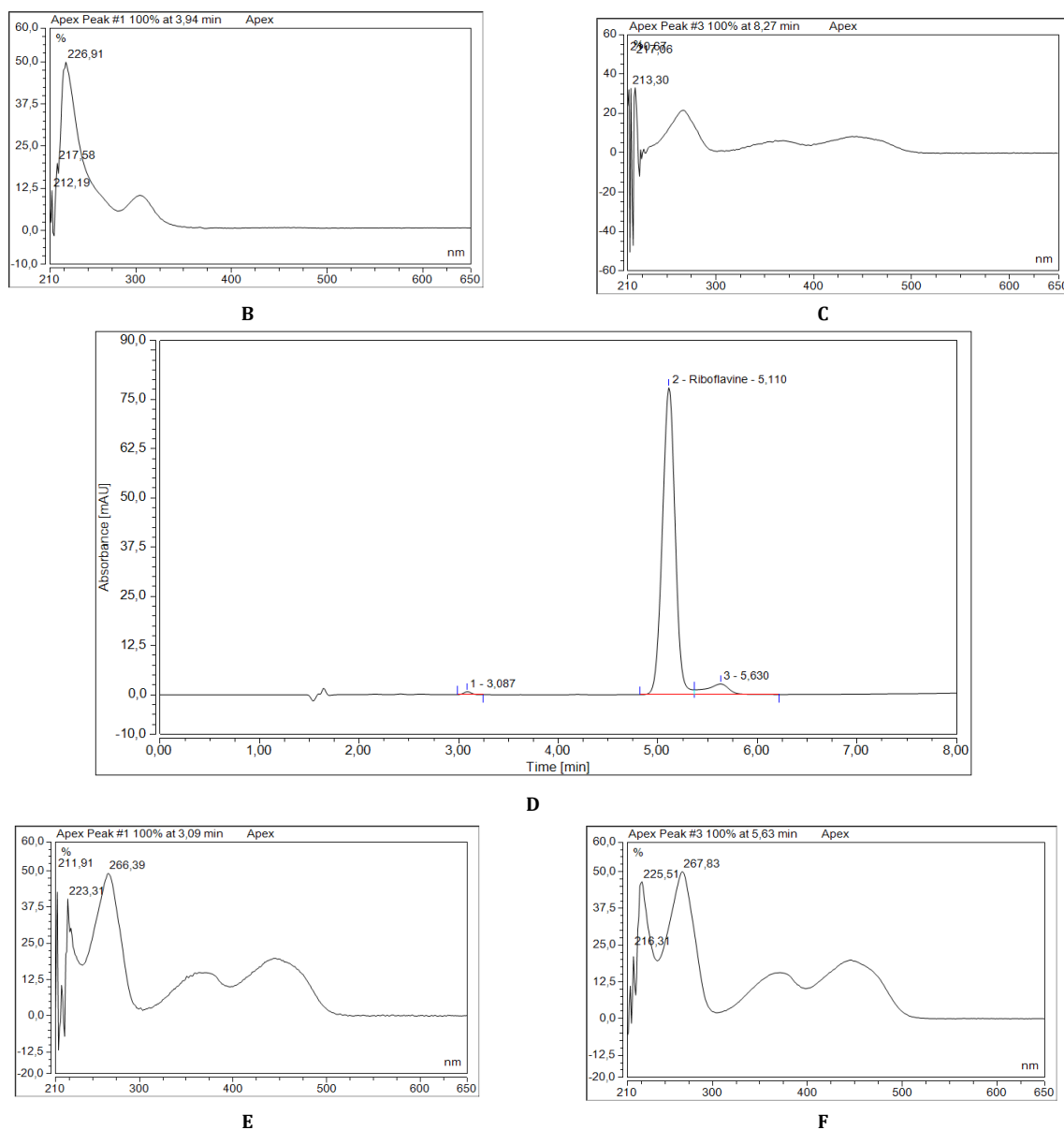


Figure 15. Chromatogrammes et spectres de la riboflavine et de ses produits de dégradation

Légende : A = chromatographe de la riboflavine et de ses produits de dégradation en conditions basiques - B = spectre du produit de dégradation basique 1 - C = spectre du produit de dégradation basique 2 - D = chromatographe de la riboflavine et de ses produits de dégradation après expositions aux UV - E = spectre du produit de dégradation aux UV 1 - F = spectre du produit de dégradation aux UV 2

Deux produits de dégradation sont observés en condition basique avec des temps de rétention de 3,94 minutes et 8,27 minutes. Les chromatogrammes dans les conditions de dégradation testées et les spectres des produits de dégradation sont présentés à la figure 15.

Pour comparaison avec celui des produits de dégradation, le spectre de la riboflavine est présenté dans la figure 16.

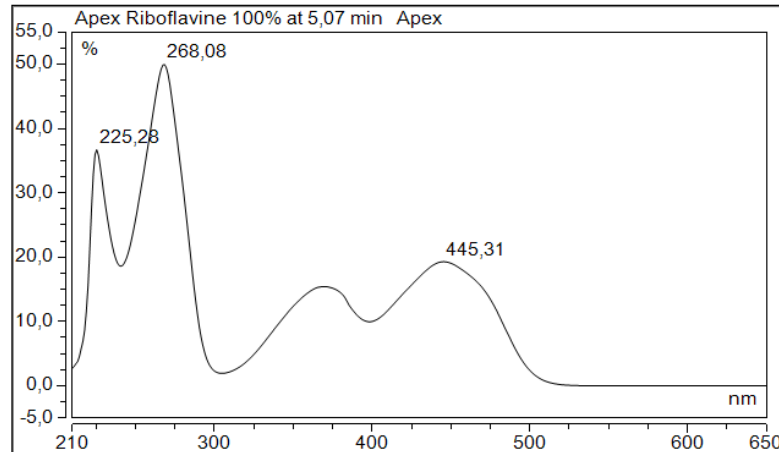


Figure 16. Spectre UV-visible de la molécule de riboflavine.

Les droites des gammes d'étalonnage obtenues à partir de la riboflavine seule et associée aux excipients ont été utilisées pour les tests statistiques nécessaires pour démontrer la spécificité de la méthode :

- Les pentes des gammes de riboflavine, de riboflavine avec Inorpha® et de riboflavine avec mannitol ne sont pas significativement différentes ($t = 0,008$ avec l'Inorpha® et $t = 0,308$ avec le mannitol, pour un $t_{théo}(0,05 ; 26) = 2,06$).
- Les ordonnées à l'origine des gammes de riboflavine, de riboflavine avec Inorpha® et de riboflavine avec mannitol ne sont pas significativement différentes ($t = 0,556$ avec l'Inorpha® et $t = 0,125$ avec le mannitol, pour un $t_{théo}(0,05 ; 26) = 2,06$).
- Les ordonnées à l'origine des différentes gammes ne sont pas significativement différentes de 0 : $t = 0,987$ pour la riboflavine ($t = 0,649$ avec l'Inorpha® et $t = 0,396$ avec le mannitol, pour un $t_{théo}(0,05 ; 13) = 2,16$).

Il n'y a donc pas d'effet matrice ni d'erreur systématique, on pourra s'affranchir des excipients pour la préparation des standards de calibration lors de la validation.

2. Linéarité

Pour chaque jour de validation, cinq points de gamme ont été mesurés deux fois sur trois jours consécutifs. Les caractéristiques de la droite d'étalonnage sont présentées dans le tableau XIII.

Paramètre	Valeur
Intervalle de dosage	0,24 – 0,56 µg/ml
Pente moyenne (a)	701,74
Ordonnée à l'origine moyenne (b)	0,0123
Coefficient de détermination (r ²)	0,99947

Tableau XIII. Paramètres de la droite de calibration du dosage de la riboflavine

Plus le coefficient de détermination r² est proche de 1, meilleure est la corrélation. La linéarité sur la gamme choisie est donc satisfaisante.

3. Fidélité

Le point correspondant au milieu de gamme a été dosé 6 fois pendant 3 jours consécutifs. Les données et les résultats des calculs nécessaires aux tests statistiques permettant de prouver la fidélité de la méthode sont disponibles dans les tableaux XIV et XV.

	[i] (mg/ml)	Aire sous la courbe y _i	x _i * (mg/ml)	Recouvrements 100x _i */x _i (%)	Variances par jour
J1	0,0386	26,878	0,0382	98,87	0,00514475
	0,0386	26,926	0,0383	99,05	
	0,0386	26,873	0,0382	98,85	
	0,0386	26,903	0,0382	98,96	
	0,0386	26,887	0,0382	98,90	
	0,0386	26,890	0,0382	98,91	
J2	0,0384	26,387	0,0378	98,27	0,002201969
	0,0384	26,371	0,0378	98,21	
	0,0384	26,397	0,0378	98,31	
	0,0384	26,378	0,0378	98,24	
	0,0384	26,363	0,0377	98,18	
	0,0384	26,368	0,0378	98,20	
J3	0,0399	27,853	0,0399	99,79	0,004965415
	0,0399	27,813	0,0398	99,65	
	0,0399	27,797	0,0398	99,60	
	0,0399	27,815	0,0398	99,66	
	0,0399	27,801	0,0398	99,61	
	0,0399	27,810	0,0398	99,64	
				Somme des variances	0,01231
				Variance maximale	0,00514
				C	0,41786
				C° (0,05 ; 3 ; 5)	0,70710

Tableau XIV. Données et résultats statistiques nécessaires à la validation de la fidélité de la méthode

Le test d'homogénéité des variances de Cochran a été calculé à partir du point de milieu de gamme, soit 40 mg/ml (QC₂). Le paramètre calculé C est inférieur au paramètre C° théorique. Le test est donc validé.

Paramètre calculé	QC ₁	QC ₂	QC ₃
Nombre de groupe (k)	3	3	3
Sommes des moyennes (T₁)	1789,39	1780,89	1795,38
Sommes des carrés des moyennes (T₂)	177888,41	176205,59	179107,84
Nombre total de mesures (T₃)	18	18	18
Sommes des carrés des mesures (T₄)	108	108	108
Somme des variances (T₅)	0,050	0,061	0,071
Variance de répétabilité (S²_r)	0,003	0,004	0,004
Variance intergroupe (S²_g)	0,33	0,50	2,42
Variance de fidélité intermédiaire (S²_R)	0,33	0,51	2,43
Coefficient de variation de la répétabilité (%)	0,06	0,06	0,07
Coefficient de variation de la fidélité intermédiaire (%)	0,58	0,72	1,56

Tableau XV. Résultats des calculs de l'écart-type relatif pour la répétabilité et la reproductibilité

Les coefficients de variations de la répétabilité, qui représente la fidélité intra-jour pour chaque niveau de concentration ne dépassent pas 0,07 %. Les coefficients de variation de la fidélité intermédiaire, soit inter-jour, ne dépasse pas 1,56 %. Ces résultats sont inférieurs à la valeur d'acceptabilité que nous nous étions fixée, soit 2%.

4. Exactitude

Les données et résultats des calculs nécessaires aux tests statistiques permettant de prouver l'exactitude de la méthode sont disponibles dans le tableau XVI.

		[i (mg/ml)	Aire sous la courbe yi	$X_i^* =$ (yi/a)-b	% recouvrement	Variances	Recouvrement moyen par point de gamme
C1	J1	24,11	16,94	24,13	100,09	1,84	99,32
	J2	24,11	16,55	23,57	97,76		
	J3	24,21	17,01	24,23	100,12		
C2	J1	31,78	22,58	32,16	101,18	0,23	100,62
	J2	31,49	22,18	31,60	100,36		
	J3	31,59	22,25	31,69	100,33		
C3	J1	39,75	27,88	39,71	99,90	0,42	100,35
	J2	39,85	27,99	39,87	100,05		
	J3	39,16	27,79	39,59	101,09		
C4	J1	47,82	33,78	48,12	100,63	0,79	99,63
	J2	47,82	33,20	47,30	98,92		
	J3	47,62	33,21	47,32	99,35		
C5	J1	55,69	38,87	55,38	99,43	0,39	100,06
	J2	55,30	38,84	55,33	100,06		
	J3	55,69	39,36	56,07	100,68		
						Somme des variances	3,67
						Variance maximale	1,84
						C	0,50
						C° (0,05 ; 5 ; 2)	0,68
						Variance intergroupe	1,92
						Variance intragroupe	17,25
						F	0,11
						F° (0,05 ; 4 ; 10)	3,48
						Taux de recouvrement moyen	99,997
						Intervalle de confiance	0,43

Tableau XVI. Données et résultats statistiques nécessaires à la validation de l'exactitude de la méthode

Le paramètre calculé C est inférieur au paramètre C° théorique. Le test de Cochran d'homogénéité des variances intergroupes est donc validé.

Le paramètre calculé F est inférieur au paramètre F° théorique. Le test de Fisher de validité des moyennes est donc validé.

L'intervalle de confiance du taux de recouvrement moyen est $99,997 \pm 0,43$. La valeur 100% est bien incluse dans cet intervalle.

C. Validation de l'essai de dénombrement microbien et de la recherche de microorganismes spécifiés

Les échantillons contaminés ont montré une croissance microbienne en présence et en l'absence de riboflavine : ni la riboflavine ni le conservateur contenu dans l'Inorpha® (sorbate de potassium) n'ont eu un effet inhibiteur sur le développement des microorganismes. La présence de colonies caractéristiques de chaque espèce a montré que les géloses et les conditions d'incubation étaient appropriées pour l'étude de stabilité. Enfin, l'absence de croissance microbienne sur les témoins négatifs a permis de valider les conditions opératoires. Des exemples de géloses ensemencées sont présentés dans la figure 17. Les résultats sont présentés dans le tableau XVII.

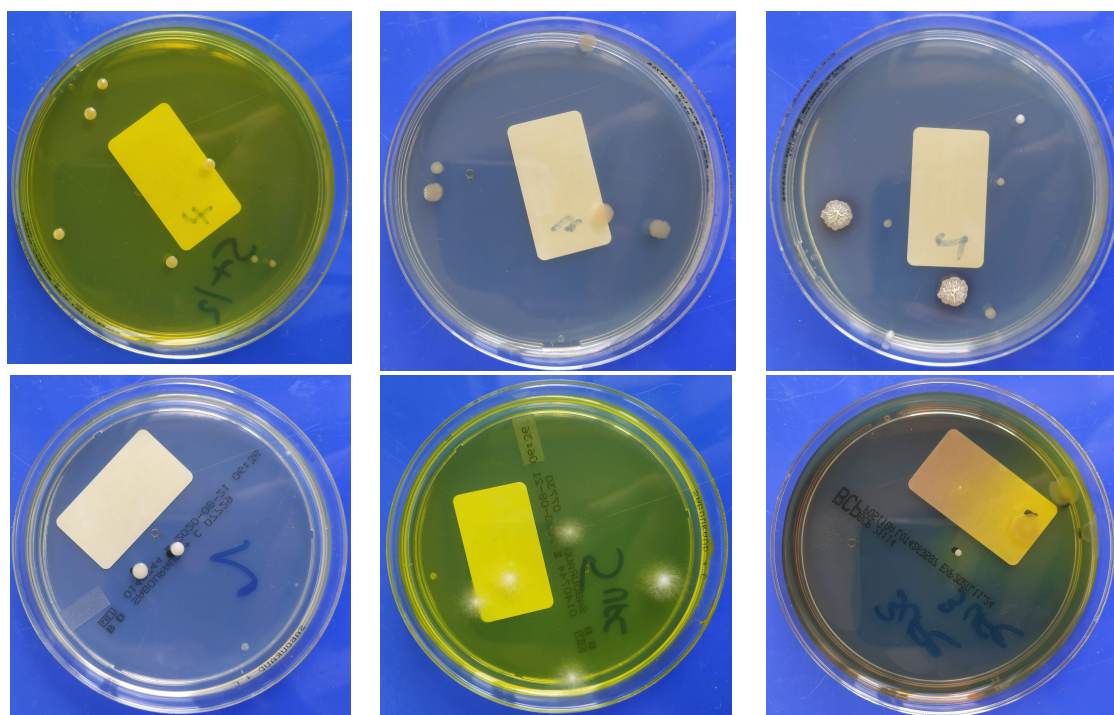


Figure 17. Exemple de géloses ensemencées dans le cadre de l'essai de dénombrement microbien et de la recherche de microorganismes spécifiés

1 : Gélose TSA, *Staphylococcus aureus*, dilution 1/10^{ème} – 2 : Gélose TSA, *Pseudomonas aeruginosa*, dilution 1/100^{ème} – 3 : Gélose TSA, *Bacillus subtilis*, dilution 1/100^{ème} – 4 : Gélose SAB, *Candida albicans*, dilution 1/100^{ème} – 5 : Gélose SAB, *Aspergillus Brasiliensis*, dilution 1/10^{ème} – 6 : Gélose BCP, *Escherichia coli*, dilution 1/10^{ème}

Micro-organisme	10 mg/ml	1 mg/ml (dilution 1/10 ^{ème})	0,1 mg/ml (dilution 1/100 ^{ème})	Témoin positif	Témoin négatif
<i>Staphylococcus aureus</i>	+ moyenne = 1 UFC/ml	+ moyenne = 4,5 UFC/ml	+ moyenne = 1 UFC/ml	+ moyenne = 2,5 UFC/ml	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+ moyenne = 0,5 UFC/ml	+ moyenne = 1,5 UFC/ml	+ moyenne = 3,5 UFC/ml	+ moyenne = 2,5 UFC/ml	-
<i>Bacillus subtilis</i>	+ moyenne = 5 UFC/ml	+ moyenne = 6,5 UFC/ml	+ moyenne = 7,5 UFC/ml	+ moyenne = 6,5 UFC/ml	-
<i>Candida albicans</i>	+ moyenne = 3,5 UFC/ml	+ moyenne = 5 UFC/ml	+ moyenne = 3 UFC/ml	+ moyenne = 4 UFC/ml	-
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	+ moyenne = 5 UFC/ml	+ moyenne = 8,5 UFC/ml	+ moyenne = 6,5 UFC/ml	+ moyenne = 7 UFC/ml	-
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	+	-

Tableau XVII. Résultats de la validation de l'essai de dénombrement microbien et de la recherche de microorganismes spécifiés

On n'observe pas de différence de plus d'un facteur 2 entre les témoins positifs et les échantillons de sirop de riboflavine contaminés aux dilutions 1/10^{ème} et 1/100^{ème}. La dilution 1/10^{ème} est donc retenue pour l'étude de stabilité.

D. Etude de stabilité physico-chimique

1. Sirop de riboflavine

L'Inorpha® a une stabilité de 3 mois après ouverture selon les indications du fabricant. Nous avons donc choisi cette durée comme limite pour l'étude de stabilité de la forme buvable développée.

1.1 Stabilité chimique

Les échantillons ont été préparés et dilués selon le protocole validé précédemment. A J0, la concentration moyenne en riboflavine des trois lots était de $10,105 \pm 0,11$ mg. Ce résultat assure la validité des lots fabriqués qui pourront être utilisés pour l'étude de stabilité. Les concentrations ont été mesurées par la suite aux temps d'analyse définis. Les résultats sont présentés en annexes 5 et 6.

La figure 18 illustre l'évolution du pourcentage restant de riboflavine au cours du temps en fonction de la température de conservation.

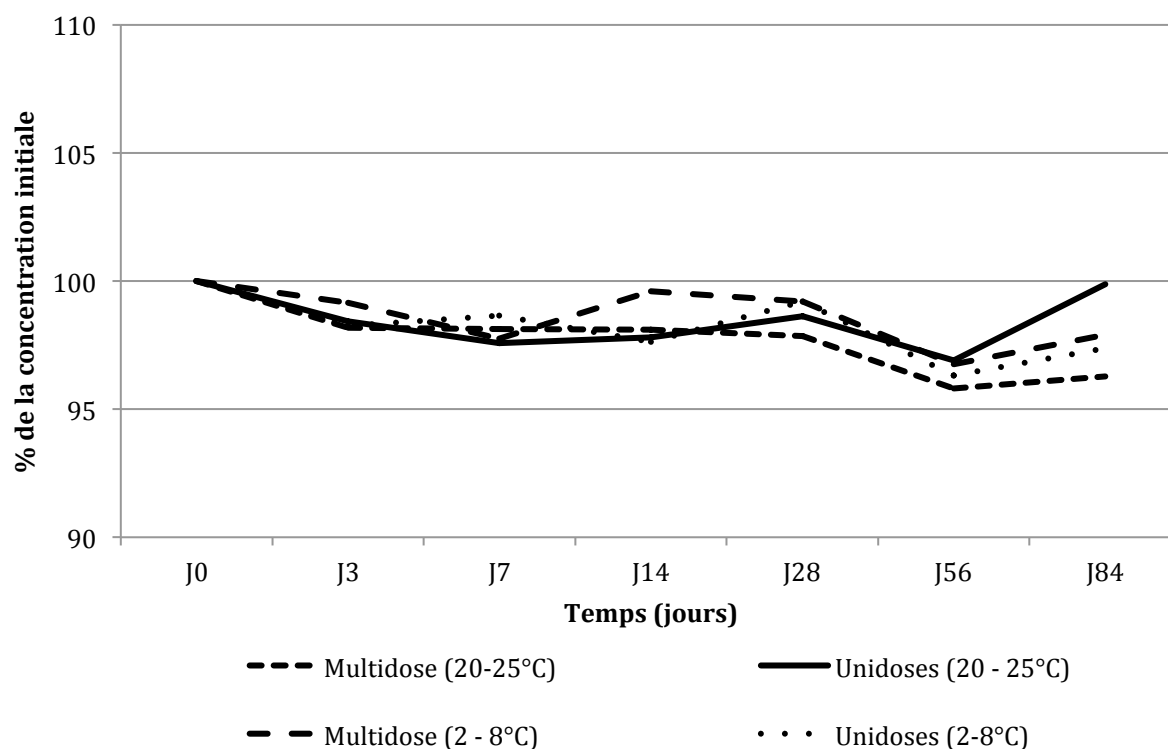


Figure 18. Evolution du pourcentage de riboflavine au cours du temps en fonction de la température de conservation

1.2 Stabilité physique

▪ pH

Le pH moyen des trois lots fabriqués à J0 est de $4,48 \pm 0,11$. Ce pH est légèrement acide de part la présence d'acide citrique dans l'Inorpha®. Les résultats des mesures sont répertoriés dans l'annexe 8. La figure 19 illustre l'évolution du pH des flacons unidoses et multidoses au cours du temps en fonction des conditions de conservation.

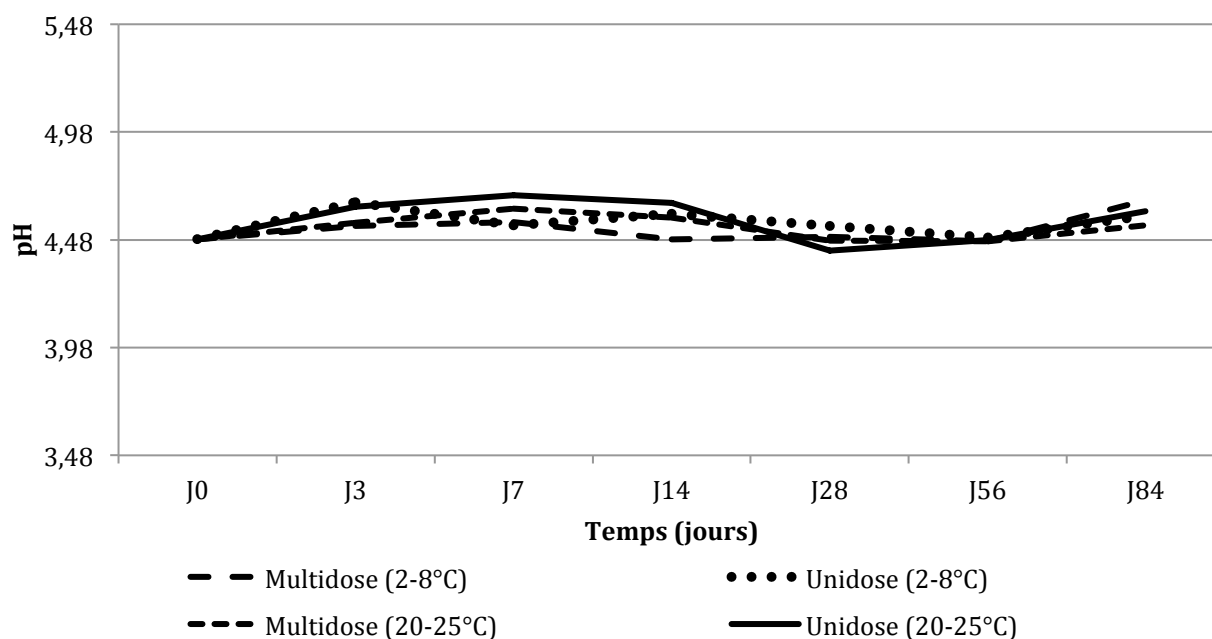


Figure 19. Evolution du pH des flacons en fonction du temps et des conditions de conservation

Les variations maximales observées pendant la durée de l'étude de stabilité sont de :

- + 4,09% pour le flacon multidose stocké entre 2 et 8°C,
- + 3,87% pour les flacons unidoses stockés entre 2 et 8°C,
- + 3,20% pour le flacon multidose stocké entre 20 et 25°C,
- + 4,61% pour les flacons unidoses stockés entre 20 et 25°C.

Le pH ne varie pas de plus de 0,21 unité par rapport à celui mesuré à J0. Selon le référentiel du Gerpac, une variation supérieure à une unité de pH doit être prise en compte lors d'une étude de stabilité (55). Le pH est donc stable quel que soit le mode de stockage.

▪ Osmolarité

L'osmolarité moyenne des trois lots fabriqués à J0 est de $157 \pm 4,58$. L'écart-type assez important entre les 3 lots est expliqué par la quantité différente d'eau utilisée lors de la production pour homogénéiser la poudre de riboflavine.

Les résultats des mesures sont répertoriés dans l'annexe 9. La figure 20 illustre l'évolution de l'osmolarité des flacons unidoses et multidoses au cours du temps en fonction des conditions de conservation.

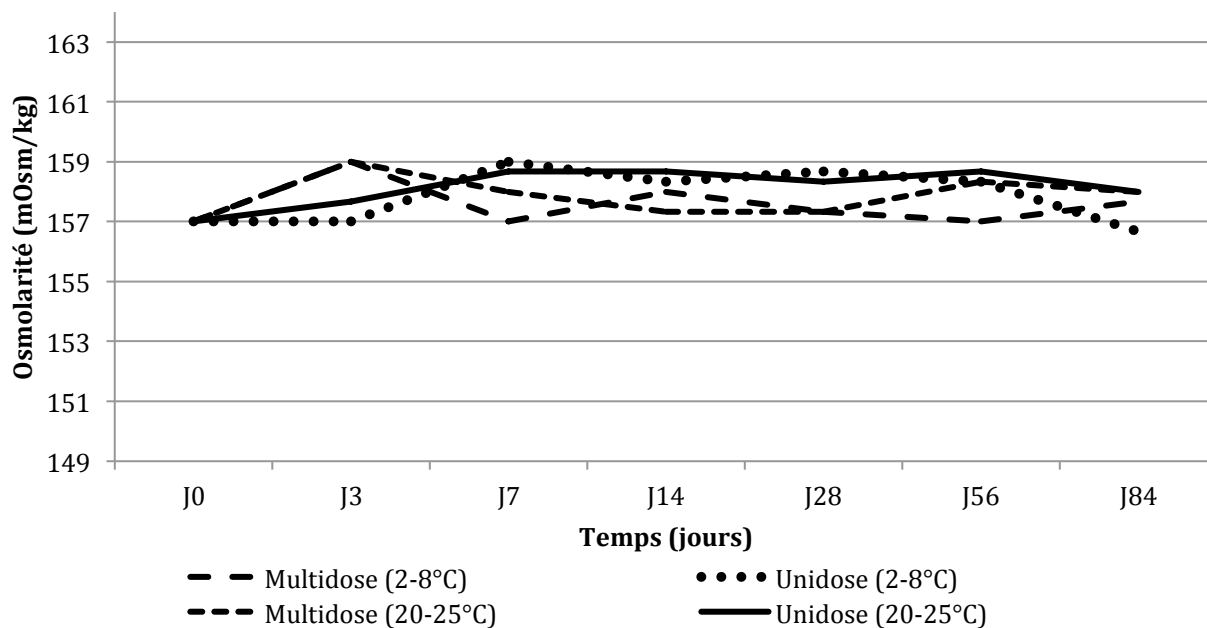


Figure 20. Evolution de l'osmolarité des flacons en fonction du temps et des conditions de conservation

La variation maximale observée pendant la durée de l'étude de stabilité est de 2 mOsm/kg, soit 1,27% de variation par rapport à la mesure initiale. L'osmolarité est donc stable sur la durée de l'étude de stabilité et dans les deux conditions de stockage testées.

▪ Caractères organoleptiques

Aucun changement de coloration ou de l'aspect de la forme buvable n'a été observé pendant la durée de l'étude, comme illustré sur la figure 21. Les suspensions ont également conservé leur odeur et leur goût initial.

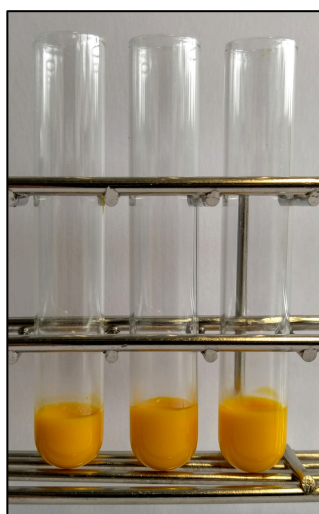


Figure 21. Témoin (à gauche) et formes buvables après 84 jours de conservation à 2-8°C (au milieu) et < 25°C (à droite)

2. Gélules de riboflavine

L'étude de stabilité a été menée sur la même durée que celle de la forme buvable. Les essais préliminaires à l'étude d'uniformité de masse et de teneur étaient conformes pour les trois lots de gélules de riboflavine.

Les échantillons ont été préparés et dilués selon le protocole validé précédemment. A J0, la concentration moyenne en riboflavine des trois lots était de $48,93 \pm 0,80$ mg. Les résultats des dosages par jour d'analyse sont présentés en annexe 7 et sur la figure 22.

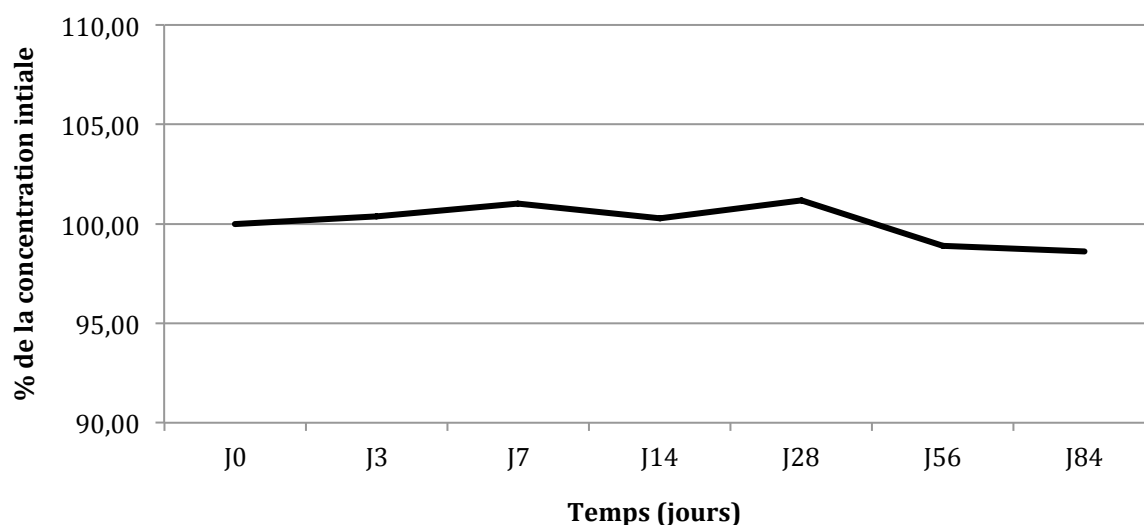


Figure 22 : Evolution de la concentration moyenne en riboflavine des gélules par rapport à la concentration initiale (%) en fonction du temps

Au bout de 84 jours, le pourcentage de riboflavine restant dans les gélules par rapport à la teneur mesurée au J0 est de $97,906 \pm 1,01$ %. Le seuil d'acceptabilité de 10% que nous nous étions fixés n'a pas été franchi, les gélules sont donc stables sur la durée de l'étude lorsqu'elles sont conservées à une température $< 25^{\circ}\text{C}$.

E. Etude de stabilité microbiologique

Les résultats présentés dans le tableau XVIII montre que le produit est stable 84 jours après ouverture d'un point de vue microbiologique, que ce soit à une température comprise entre 2 et 8°C ou $< 25^{\circ}\text{C}$. Les résultats détaillés sont présentés dans l'annexe 10.

Jour d'analyse	Dénombrement des germes aérobies totaux (UFC/ml)		Dénombrement des moisissures et levures totales (UFC/ml)		Présence d' <i>Escherichia coli</i>	
	2-8°C	< 25°C	2-8°C	< 25°C	2-8°C	< 25°C
J0	< 10 ²		< 10 ¹		Non	
J14	< 10 ²	< 10 ²	< 10 ¹	< 10 ¹	Non	Non
J28	< 10 ²	< 10 ²	< 10 ¹	< 10 ¹	Non	Non
J56	< 10 ²	< 10 ²	< 10 ¹	< 10 ¹	Non	Non
J84	< 10 ²	< 10 ²	< 10 ¹	< 10 ¹	Non	Non

Tableau XVIII. Résultats de l'étude de stabilité microbiologique

V. Discussion

A. Intérêt thérapeutique des formes développées

Les formes liquides et solides développées dans le cadre de cette étude permettent de répondre aux besoins de traitement pour la prise en charge des maladies héréditaires du métabolisme tout en palliant le manque de formulation adaptée à l'usage pédiatrique sur le marché. De plus, le développement de gélules destinées à l'adulte et aux enfants en âge d'avaler permet de s'affranchir du goût amer rémanent de la riboflavine.

Ces deux formules pourront être préparées à l'avance pour répondre aux demandes des services de pédiatrie ainsi qu'aux demandes de rétrocessions sous condition d'une acceptation par l'ANSM du statut de préparation hospitalière.

B. Formulation galénique

La concentration à 10 mg/ml de la forme buvable permet de couvrir une large échelle de concentration tout en évitant des erreurs lors de l'administration au domicile des patients dues à des calculs de dose compliqués. Elle permet également de ne pas nécessiter l'ingestion d'un volume de sirop trop important. Cette concentration avait également été choisie dans l'étude publiée concernant une suspension orale de riboflavine dans du Syrspend®(48).

Pour les gélules, nous avons choisi un dosage à 50 mg de principe actif permettant de répondre aux besoins vitaminiques chez l'adulte, qui sont estimés à 100 mg/jour en moyenne en 2 ou 3 prises (63). En effet, l'administration de 50 mg de riboflavine une fois par jour est recommandée en association à d'autres vitamines pour le traitement des maladies héréditaires en réanimation pédiatrique (acidurie glutarique de type II ou déficit de la chaîne respiratoire) (58). La préparation hospitalière de gélules de riboflavine à 50 mg permettrait d'avoir des traitements en stock à la pharmacie et d'approvisionner les services rapidement en cas de besoin urgent.

L'élément limitant majeur concernant la formulation de la forme buvable était la très faible solubilité de la riboflavine dans l'eau (53). L'étude précédemment publiée concernant une forme buvable dans du Syrspend® laissait à penser qu'une solubilisation dans un véhicule prêt à l'emploi était cependant possible (48). Cet excipient n'a pas été retenu en raison de la viscosité trop importante en présence de riboflavine, mais elle s'est avérée macroscopiquement soluble dans le véhicule Inorpha® et aucun phénomène de sédimentation n'a été observé après les 3 mois de l'étude de stabilité. En raison d'un manque de moyen, le type de solution développé (solution ou suspension) n'a pas été déterminé durant l'étude.

Enfin, l'amertume de la riboflavine est masquée en partie par l'Inorpha®, mais des conseils associés tels la conservation de la forme buvable au réfrigérateur peuvent être donnés lors de la délivrance du traitement pour favoriser la compliance, notamment chez les enfants.

C. Stabilité physico-chimique

La majeure partie des méthodes de dosages développée dans le cadre hospitalier est mise au point en utilisant la chromatographie liquide haute performance couplée à un détecteur UV/visible. Ceci peut être expliqué par la disponibilité de ce type d'appareil dans les PUI et par sa sensibilité suffisante pour doser les principes actifs. De plus, la plupart des molécules ont un groupement chromophore et peuvent donc être détectées par la spectrophotométrie.

La riboflavine étant une molécule très polaire, le développement d'une méthode par paire d'ions a été nécessaire. Il s'agit d'une méthode utilisée classiquement pour augmenter la rétention lors du dosage des vitamines hydrosolubles. L'ajout d'un contre-ion dans la phase mobile permet d'avoir une rétention suffisante sans avoir besoin de mettre en place un gradient de solvant. Elle a cependant l'inconvénient de condamner la colonne chromatographique à cet usage uniquement, les contre-ions se greffant sur la phase stationnaire.

Selon les recommandations des normes ICH, les coefficients de variations de fidélité intra-jour et inter-jour calculés lors de la validation de la méthode ne doivent pas s'éloigner de $\pm 2\%$ de la valeur cible attendue. Dans cette étude, le maximum atteint a été de 0,07% pour la fidélité intra-jour et de 1,56% pour la fidélité inter-jour. De même, la fidélité a été démontrée par un recouvrement moyen de 98,94% et la justesse par un recouvrement de 99,97 %. Ces résultats sont très satisfaisants, cependant ils peuvent être expliqués par le fait que toutes les étapes de la validation analytique aient été réalisées par un même manipulateur. Une étude de la variabilité inter-opérateur ou de la robustesse de la méthode en faisant varier les paramètres de pH ou de débit pourrait être mise en place avant le dosage de la riboflavine en routine au laboratoire de contrôle.

Concernant la stabilité physico-chimique de la forme liquide de riboflavine, les résultats obtenus sont comparables à ceux de De Oliveira Ferreira *et al* (48). Leur étude a été réalisée sur une forme orale de riboflavine dans du Syrspend® dans les mêmes conditions que celles que nous avons appliquées (concentration de 10 mg/ml et conservation entre 2-8°C et entre 20-25°C dans des bouteilles en verre opaques) et a été dosée par une technique similaire par HPLC. Ils ont également démontré la stabilité à 3 mois de la formulation préparée. Les études de stabilité des formes buvables dans des véhicules prêts à l'emploi sont limitées par les données de conservation après ouverture

des fabricants. Nous n'aurions donc pas pu avoir une stabilité plus longue, l'Inorpha® n'étant stable que 3 mois après ouverture.

Concernant la stabilité physico-chimique des gélules, aucune étude n'a été publiée concernant une forme solide de riboflavine. Une méthode dosage permettant une analyse quantitative de ce principe actif dans des comprimés multi vitaminiques a été mise au point par Pengfei *et al* mais l'étude de stabilité n'a pas été menée (49). La stabilité des gélules de riboflavine a été démontrée à 3 mois ; cependant, la riboflavine n'étant pas un principe actif particulièrement fragile si elle est conservée à l'abri de la lumière, l'étude de stabilité pourrait être poursuivie.

D. Etude de stabilité microbiologique

L'étude de stabilité microbiologique de la forme buvable de riboflavine a été réalisée selon les recommandations de la pharmacopée européenne (56). Les méthodes proposées sont la filtration sur membrane, l'ensemencement en profondeur, l'étalement en surface ou la méthode du nombre le plus probable. Nous avons opté pour l'étalement en surface car il s'agit de la méthode la plus simple à mettre en place et nécessitant le moins de manipulation. Cependant, la pharmacopée recommande de diluer les échantillons au 1/10^{ème} et d'étaler 0,1 ml, ce qui diminue la sensibilité de la méthode, alors que l'utilisation d'1 ml est recommandée pour l'ensemencement en profondeur. Après avoir essayé d'étaler le produit pur, dilué au 1/10^{ème} et dilué au 1/100^{ème} lors de la validation du dénombrement microbien, nous avons décidé d'utiliser la dilution au 1/10^{ème} et d'étaler 1ml de liquide sur les milieux de culture pour avoir une sensibilité équivalente à l'ensemencement en profondeur.

De plus, la contamination d'un échantillon de 10 ml de produit par < 100 UFC d'une souche microbienne de référence est recommandée lors de la validation de la méthode, qui est démontrée si aucun échantillon ne diffère de plus d'un facteur 2 avec le témoin positif. Cependant, la quantitéensemencée est faible (< 10 UFC en moyenne pour 1 ml étalé en surface), rendant l'analyse statistique des résultats peu significative lorsqu'un très faible nombre de colonies pousse sur la gélose.

La pharmacopée recommande l'utilisation d'un milieu Mac Conkey, sélectif des bacilles à Gram négatifs non exigeants pour la recherche de micro-organismes spécifiés, soit *Escherichia coli*. En accord avec l'équipe d'hygiène, nous avons utilisé des géloses BCP. Ce milieu de culture est un milieu non sélectif utilisé pour la culture des bacilles à Gram négatif. En cas de pousse lors de l'étude de stabilité, une coloration jaune du milieu de culture due à la fermentation du lactose par *E.coli* aurait ensuite entraîné une identification par spectrométrie de masse de type MALTI-TOF.

Enfin, les flacons multidoses étaient ouverts et prélevés chaque jour de l'étude de stabilité, mais une étude en vie réelle avec des prélèvements deux fois par jour aurait pu être mise en place afin de valider la stabilité microbiologique lors d'une utilisation au domicile des patients.

VI. Conclusion

Malgré une prévalence très faible dans la population générale, les maladies héréditaires du métabolisme restent une pathologie nécessitant une prise en charge précoce et un traitement à vie. La supplémentation par riboflavine est donc essentielle pour éviter l'aggravation de ces pathologies sous-diagnostiquées et pour lesquelles aucune alternative thérapeutique n'est disponible.

Afin de répondre aux attentes des services de soin, nous avons développé une forme buvable de riboflavine à la concentration de 10 mg/ml adaptée à une administration pédiatrique, ainsi que des gélules dosées à 50 mg utilisable quand cette posologie est nécessaire chez les enfants en âge d'avaler et chez les adultes.

Notre étude a permis de démontrer la stabilité microbiologique et physico-chimique de la forme buvable pendant 84 jours à des températures comprises entre 2 et 8°C ainsi qu'à 25°C lorsqu'elle est conservée à l'abri de la lumière. Elle a également permis de démontrer que la teneur en riboflavine dans les gélules est stable 84 jours à 25°C lorsqu'elles sont conservées à l'abri de la lumière.

Ces résultats nous permettent d'envisager un enregistrement de ces deux formules en tant que préparations hospitalières et donc une production en lot. Ce type de production permet une meilleure organisation et un gain de temps au sein de l'unité et nécessite un contrôle de la teneur lors de la libération des lots, garantissant la qualité du produit fini. Il permet aussi de garantir une disponibilité immédiate des traitements.

Enfin, la mise en place d'un premier essai de dénombrement microbien sur une forme non stérile au sein de notre établissement permet d'envisager la mise en place d'étude de stabilité microbiologique sur les préparations hospitalières buvables déjà produites à ce jour. Cette démarche pourrait s'intégrer dans le contexte global d'amélioration de la qualité et de la sécurité des préparations pédiatriques.

VII. Références

1. Décret n° 2019-489 du 21 mai 2019 relatif aux pharmacies à usage intérieur. JORF n°0119 du 23 mai 2019.
2. Code de la Santé Publique. Article L5121-1, modifié par LOI n°2018-1203 du 22 décembre 2018 - art. 66 (V).
3. Bonnes Pratiques de Préparation. Ministère de la Santé, de la Jeunesse et des Sports, AFSSAPS. Paris: 2008, 47-57. Disponible sur : https://www.ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/a5d6ae4b3d5fdee013ca463462b7b296.pdf.
4. Révision des Bonnes Pratiques de Préparation - Consultation publique ouverte du 24/07/2019 au 23/09/2019. Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé, ANSM. Paris: 2019. Disponible sur : https://ansm.sante.fr/content/download/163971/2143491/version/3/file/BPP_Enquete-Publique_Juillet-2019.pdf.
5. P. Vaconsin, C. Vilain, A. Le, V. Salomon. Révision des Bonnes Pratiques de Préparation. Gerpac 2017.
6. Ministère des Solidarités et de la Santé - Les médicaments pédiatriques. Article publié le 13/06/2016 et mis à jour le 10/11/2016. Disponible sur : <https://solidarites-sante.gouv.fr/soins-et-maladies/medicaments/le-circuit-du-medicament/article/les-medicaments-pediatriques>.
7. European Medicines Agency (EMA) - Needs for paediatric medicines. Disponible sur : <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/research-development/paediatric-medicines/needs-paediatric-medicines>.
8. Abraham J. International Conference On Harmonisation Of Technical Requirements For Registration Of Pharmaceuticals For Human Use. In: Brouder A, Tietje C, éditeurs. Handbook of Transnational Economic Governance Regimes. Brill; 2009.
9. Règlement (CE) N° 1901/2006 du parlement européen et du conseil du 12 décembre 2006 relatif aux médicaments à usage pédiatrique. Journal officiel de l'Union européenne. Disponible sur : https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/eudralex/vol-1/reg_2006_1901/reg_2006_1901_fr.pdf.

10. Report from the Commission to the European Parliament and the Council. State of Paediatric Medicines in the EU, 10 years of the EU Paediatric Regulation. COM (2017) 626.
11. Règlement (CE) N° 141/2000 du parlement européen et du conseil du 16 décembre 1999 concernant les médicaments orphelins. Journal officiel de l'Union européenne. Disponible sur : https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/eudralex/vol-1/reg_2000_141_cons-2009-07/reg_2000_141_cons-2009-07_fr.pdf.
12. European medicines agency. 28 février 2018, EMA/ 551338/2017. Rare diseases, orphan medicines getting the facts straight. Disponible sur : http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Other/2018/02/WC500244578.pdf.
13. Nabarette H, Peterka J, Andoni Urtizberea J, Nga Brignol T. Médicaments orphelins : un nouveau concept à l'épreuve du temps. Cah Myol. juin 2018;(17):5-10.
14. Maillot F, Lavigne C, Douillard C. Prise en charge des maladies héréditaires du métabolisme à l'âge adulte. EMC - Endocrinol - Nutr. avr 2012;9(2):1-9.
15. Labarthe F, Willot S, Rouillet-Renoleau N, Maakaroun-Vermesse Z, Tardieu M, Leuret O, et al. Nutrition des maladies métaboliques rares en pédiatrie. Réanimation. sept 2010;19(5):441-7.
16. Jovet P, Touati G. Maladies héréditaires du métabolisme : ce que le réanimateur d'enfants peut transmettre au réanimateur d'adultes. Réanimation 23, 666-675 (2014).
17. Hedlund GL, Longo N, Pasquali M. Glutaric acidemia type 1. Am J Med Genet C Semin Med Genet. 15 mai 2006;142C(2):86-94.
18. Zschocke J, Hoffman GF. Vademecum metabolicum : diagnosis and treatment of inborn errors of metabolism. 3rd ed. Friedrichsdorf (Germany): Milapula Metabolics GmbH & Co; c2011.
19. Déficit en glutaryl-CoA déshydrogénase. In: Orphanet [Internet]. Disponible sur: [https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease_Search.php?lng=FR&data_id=3564&Disease_Disease_Search_diseaseGroup=Acidurie-glutarique-type-1&Disease_Disease_Search_diseaseType=Pat&Maladie\(s\)/groupes%20de%20maladies=Deficit-en-glutaryl-CoA-deshydrogenase&title=D%E9ficit%20en%20glutaryl-CoA%20d%E9shydrog%E9nase&search=Disease_Search_Simple](https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease_Search.php?lng=FR&data_id=3564&Disease_Disease_Search_diseaseGroup=Acidurie-glutarique-type-1&Disease_Disease_Search_diseaseType=Pat&Maladie(s)/groupes%20de%20maladies=Deficit-en-glutaryl-CoA-deshydrogenase&title=D%E9ficit%20en%20glutaryl-CoA%20d%E9shydrog%E9nase&search=Disease_Search_Simple)

20. Kölker S, Christensen E, Leonard JV, Greenberg CR, Boneh A, Burlina AB, et al. Diagnosis and management of glutaric aciduria type I—revised recommendations. *J Inher Metab Dis*. 2011;34(3):677.
21. De Lonlay P, Dubois S, Valayannopoulos V, Depondt E, Ottolenghi C, Rabier D. (2013) Interprétation du bilan biologique. In: *Prise en charge médicale et diététique des maladies héréditaires du métabolisme*. Springer, Paris. https://doi.org/10.1007/978-2-8178-0046-2_2
22. Déficit multiple en acyl-CoA déshydrogénases. In: Orphanet [Internet]. [cité 11 août 2020]. Disponible sur: https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?Expert=26791&lng=FR
23. Prasun P. Multiple Acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency. 2020 Jun 18. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., editors. *GeneReviews®*. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2020.
24. Liu X-Y, Wang Z-Q, Wang D-N, Lin M-T, Wang N. A Historical Cohort Study on the Efficacy of Glucocorticoids and Riboflavin Among Patients with Late-onset Multiple Acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency. *Chin Med J (Engl)*. 20 janv 2016;129(2):142–6.
25. Maillart E, Acquaviva-Bourdain C, Rigal O, Brivet M, Jardel C, Lombès A, et al. Déficit multiple en acyl-CoA déshydrogénases: une cause traitable de lipodose musculaire d'origine génétique. *Rev Neurol (Paris)*. mars 2010;166(3):289–94.
26. Goh LL, Lee Y, Tan ES, Lim JSC, Lim CW, Dalan R. Patient with multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency disease and ETFDH mutations benefits from riboflavin therapy: a case report. *BMC Med Genomics*. 03 2018;11(1):37.
27. Zhu M, Zhu X, Qi X, Weijiang D, Yu Y, Wan H, et al. Riboflavin-responsive multiple Acyl-CoA dehydrogenation deficiency in 13 cases, and a literature review in mainland Chinese patients. *J Hum Genet*. mai 2014;59(5):256–61.
28. Powers HJ. Riboflavin (vitamin B-2) and health. *Am J Clin Nutr*. 2003 Jun;77(6):1352-60. doi: 10.1093/ajcn/77.6.1352. PMID: 12791609.
29. Institute of Medicine (US) Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes and its Panel on Folate, Other B Vitamins, and Choline. *Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline*. Washington (DC): National Academies Press (US); 1998.

30. Zempleni J, Galloway JR, McCormick DB. Pharmacokinetics of orally and intravenously administered riboflavin in healthy humans. *Am J Clin Nutr.* 1 janv 1996;63(1):54-66.
31. Feillet F. "Adaptation métabolique à la malnutrition: modèle des lipides, de la cobalamine, de la riboflavine et des acides organiques dans la malnutrition protéino-énergétique de l'enfant et dans l'anorexie mentale". Thèse de doctorat en génie biologique et médical, option biochimie clinique et nutrition, université Nancy I, 2018.
32. H.F. Bradford. *Chemical neurobiology. Introduction to neurochemistry.* New York: WH FREEMAN and Co, 1986.
33. J.R. Cooper et al. *The biochemical basis of neuropharmacology (5th ed).* New York: Oxford University Press, 1986.
34. Monographie de la BÉflavine. In: Dictionnaire Vidal en ligne e-vidal [Internet]. Disponible sur: https://evidal.vidal.fr/medicament/beflavine_10_mg_cp_enr-1975.html
35. WHO Model List of Essential Medicines, 18th list. avr, 2013. Disponible sur: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/93142/EML_18_eng.pdf;jsessionid=C809BEE511F2C2F58C28A13EAE1C22E7?sequence=1
36. Thakur K, Tomar SK, Singh AK, Mandal S, Arora S. Riboflavin and health: A review of recent human research. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 22 nov 2017;57(17):3650-60.
37. Henriques BJ, Lucas TG, Gomes CM. Therapeutic Approaches Using Riboflavin in Mitochondrial Energy Metabolism Disorders. *Curr Drug Targets.* 2016;17(13):1527-34.
38. Aintablian HK, Narayanan V, Belnap N, Ramsey K, Grebe TA. An atypical presentation of ACAD9 deficiency: Diagnosis by whole exome sequencing broadens the phenotypic spectrum and alters treatment approach. *Mol Genet Metab Rep.* 1 mars 2017;10:38-44.
39. Repp BM, Mastantuono E, Alston CL, Schiff M, Haack TB, Rötig A, et al. Clinical, biochemical and genetic spectrum of 70 patients with ACAD9 deficiency: is riboflavin supplementation effective? *Orphanet J Rare Dis.* 19 juill 2018;13.
40. Ha H, Gonzalez A. Migraine Headache Prophylaxis. *Am Fam Physician.* 01 2019;99(1):17-24.
41. Talebian A, Soltani B, Banafshe HR, Moosavi GA, Talebian M, Soltani S.

Prophylactic effect of riboflavin on pediatric migraine: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Electron Physician*. 25 févr 2018;10(2):6279–85.

42. Martinez-Esteve Melnikova A. "Riboflavine dans le syndrome des vomissements cycliques". Thèse de doctorat, université de Genève, 2018 - Méd. 10871.

43. Monographie de la Riboflavine. Pharmacopée Européenne 9.0.

44. Sheraz MA, Kazi SH, Ahmed S, Anwar Z, Ahmad I. Photo, thermal and chemical degradation of riboflavin. *Beilstein J Org Chem*. 26 août 2014;10:1999–2012.

45. Smith EC, Metzler DE. The Photochemical Degradation of Riboflavin. 1963;85:4.

46. Bonnes Pratiques de Préparation. Agence Nationale de Sécurité du Médicament, ANSM. Texte en enquête publique. Paris: 2019 (cité 30 juin 2020). 2019.

47. Gul W, Anwar Z, Qadeer K, Perveen S, Ahmad I. (Volume 2, Issue 2, 2014) Methods of Analysis of Riboflavin (Vitamin B2): A Review. 2:13.

48. Ferreira ADO, Polonini HC, Silva SL da, Melo VAC de, Andrade LD, Marcos Antonio Fernandes Brandao. Stability of Alprazolam, Atropine Sulfate, Glutamine, Levofloxacin, Metoprolol Tartrate, Nitrofurantoin, Odansetron Hydrochloride, Oxandrolone, Pregabalin, and Riboflavin in SyrSpend SF PH4 Oral Suspensions. *Int J Pharm Compd*. juin 2017;21(3):255.

49. Vidović S, Stojanović B, Veljković J, Pražić-Arsić L, Roglić G, Manojlović D. Simultaneous determination of some water-soluble vitamins and preservatives in multivitamin syrup by validated stability-indicating high-performance liquid chromatography method. *J Chromatogr A*. août 2008;1202(2):155–62.

50. Ribeiro DO, Pinto DC, Lima LMT, Volpato NM, Cabral LM, de Sousa VP. Chemical stability study of vitamins thiamine, riboflavin, pyridoxine and ascorbic acid in parenteral nutrition for neonatal use. *Nutr J*. déc 2011;10(1):47.


51. Jin P, Xia L, Li Z, Che N, Zou D, Hu X. Rapid determination of thiamine, riboflavin, niacinamide, pantothenic acid, pyridoxine, folic acid and ascorbic acid in Vitamins with Minerals Tablets by high-performance liquid chromatography with diode array detector. *J Pharm Biomed Anal*. nov 2012;70:151–7.

52. Monographie de la riboflavine. United States Pharmacopeia.

53. Pharmacopée Européenne 9.0. Monographie de la riboflavine.

54. ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE: validation of analytical procedures: definitions and terminology (Q2A), Tripartite International Conference on Harmonization (ICH) text, ICH Tech coordination, Londres, 1994.
55. Guide méthodologique des Etudes de Stabilité des Préparations. Coord. V. Sautou. 1ère éd. SFPC/GERPAC, 2013
56. European Pharmacopoeia Online 9.0 (cité 29 juin 2020). In. Disponible sur: <http://online6.edqm.eu/ep900/>
57. Fernández Polo A, Cabañas Poy MJ, Clemente Bautista S, Oliveras Arenas M, Castillo Salinas F, Hidalgo Albert E. Osmolality of oral liquid dosage forms to be administered to newborns in a hospital. *Farm Hosp.* 2007 Sep-Oct;31(5):311-4.
58. Aubrion AR. "Maladies métaboliques héréditaires à risque de décompensation en pédiatrie: améliorer la prise en charge du patient par la coordination entre les différents acteurs". Thèse de doctorat, université de Caen, 2017.
59. Annex to the European Commission guideline on 'Excipients in the labelling and package leaflet of medicinal products for human use' (SANTE-2017-11668) EMA/CHMP/302620/2017/FR corr. 1.
60. Geoffrey D. Tovey. *Pharmaceutical Formulation: The Science and Technology of Dosage Forms*. Royal Society of Chemistry, 2018. 409 p. (RSC drug discovery series; vol. 64).
61. FORMULAIRE THERAPEUTIQUE MAGISTRAL. 2010;1072.
62. Ohrem HL, Schornick E, Kalivoda A, Ognibene R. Why is mannitol becoming more and more popular as a pharmaceutical excipient in solid dosage forms? *Pharm Dev Technol.* mai 2014;19(3):257-62.
63. V. Valayannopoulou, S. Romanoa, F. Fakhourib, F. Sedelc, D. Rabierd, I. Rungee, J.-L. Dubostf, A. Tabahg, P. De Lonlay. Maladies héréditaires du métabolisme vitaminosensibles chez l'adulte. Implications diagnostiques et thérapeutiques. *Réanimation* 16(4), 2007.

Annexe 1 : Fiche de fabrication des formes buvables de riboflavine

 C.H.U. Hôpitaux de Bordeaux		CHU DE BORDEAUX PHARMACIE PREPARATOIRE		EN-PHA-	
DOCUMENT D'ENREGISTREMENT D'UNE PREPARATION MAGISTRALE				Ind : 01 Page : 1/1	
Sirop de riboflavine 10 mg/ml - NUMERO D'ORDONNANCIER : . . . M					
MATERIES PREMIERES			MATERIEL UTILISE		
Designation	Numero de lot / Date de péremption	N° de diagnose ou de bulletin d'analyse	Quantité à prélever	- Balance de précision à 0,001g - Cartes, feuilles de papier pour pesée - Mortier en porcelaine et son pilon - fiole jaugée de 250 ml - Gants latex usage unique stériles, masque FFP3, lunettes, charotte (EN-PHA-008) - Champ papier - Compresses et alcool à 70° - Conditionnement : flacons bruns de 60 ml et flacons bruns de 3 ml - Document d'enregistrement complété par les différents intervenants et validé par le pharmacien responsable	
Riboflavine			2,5 grammes		
Eau Versable			15 ml		
Inorpha®			QSP 250 ml		
Coller ici le ticket de pesée des matières premières		NOM et Prénom du patient :		MODE OPERATOIRE 1. Remplir l'ordonnancier et la fiche de fabrication. 2. Préparer le matériel nécessaire sur un champ propre 3. Vérifier les dates de péremptions de la riboflavine, de l'eau versable et de l'inorpha. 4. Préparer les flacons ambres et les bouchons 5. Passer 2,5 grammes de riboflavine à l'aide de la balance de précision. Imprimer le ticket de pesée et le coller 6. Verser la totalité de la poudre dans le mortier en verre, rincer la coupule de pesée avec une partie de l'eau versable 7. Mesurer 250 ml d'inorpha dans une éprouvette 8. Triturer la riboflavine avec un peu d'inorpha. Une fois la poudre bien dissoute, rajouter de l'inorpha en versant le contenu dans une hôte jaugée de 250 ml en agitant le tout à l'aide de l'agitateur magnétique pendant 30 minutes 10. Compléter jusqu'au trait de jauge avec l'inorpha 11. Homogénéiser puis passez la solution aux ultrasons pendant 15 minutes 12. Répartir la solution dans 2 flacons ambres de 60 ml et dans des flacons de 3 ml	
Coller ici une étiquette blanche récapitulative de la préparation (nom de la préparation, dosage, numero d'ordonnancier, date de fabrication, date de péremption)					
CONTROLES DU PRODUIT FINI					
Nombre de pots réalisés	2 flacons de 120 ml + 1 flacon de 10 ml pour l'échantillonnage		Conformité : <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non Visa : _ _ _		
Conformité des tickets de pesée	Coller le ticket de contrôle d'uniformité de masse au dos de ce document		Conformité : <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non Visa : _ _ _		
Etiquetage / Conditionnement	Coller ici une étiquette unitaire (facultatif) ou préciser la couleur de l'étiquetage		Conformité : <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non Visa : _ _ _		
IDENTIFICATION DU PRESCRIPTEUR (Nom, Fonction, Service)					
PREPARATEUR(S)		INTERVENANTS (DATES ET VISAS)		PHARMACIEN RESPONSABLE	
Date(s) de préparation et visa(s)		Date(s) de conditionnement et visa(s)		Date de libération et visa	
Transmettre la préparation terminée et le document d'enregistrement correspondant au pharmacien responsable pour libération du lot					

Annexe 2 : Fiche de faisabilité de la forme buvable de riboflavine

PARTIE 1

VALIDITE TECHNIQUE-REGLEMENTAIRE DE LA PREPARATION

1. RENSEIGNEMENTS SUR LA PREPARATION

Dénomination de la préparation : forme buvable de riboflavine

a) Formule de la Préparation :

Substance active : Riboflavine

Dosage : 10 mg/ml

Excipient(s) : Inorpha®

Conditionnement primaire : flacon en verre ambré

b) Forme pharmaceutique :

- Préparation liquide pour application cutanée
- Préparation semi-solide pour application cutanée
- Gélules (capsules)
- Préparation nasale
- Préparation liquide pour usage oral
- Préparation rectale
- Préparation ophtalmique
- Préparation parentérale
- Autre :.....

c) Population ciblée :

- Pré-néaturé
- Nouveau-né (0-27 jours)
- Nourrison (28 jours-23 mois)
- Enfant (2 -11 ans)
- Adolescent (12- 18 ans)
- Adulte
- Adulte > 65ans

d) Modalité d'administration : prélévement de la dose nécessaire avec une seringue ou une pipette graduée et administration par voie orale

e) Classe thérapeutique (ATC²⁵) de la (ou des) substance(s) active(s) : A11HA04 - Alimentary tract and metabolism – other plain vitamin preparation

f) Réalisation de la préparation selon les textes réglementaires en vigueur²⁵:

Interruption d'utilisation : OUI NON Si oui, Référence à joindre au dossier

Restriction d'utilisation : OUI NON Si oui, Référence à joindre au dossier

g) Cas de pharmacovigilance connu, déclaré sur la substance active²⁶:

OUI NON NE SAIS PAS

2. POSITIONNEMENT DANS L'ARSENAL THERAPEUTIQUE (= INTERET)

a) Existence d'une ou plusieurs spécialités adaptées (AMM, ATU, autres procédures d'autorisation) :

OUI, laquelle : Belflavine® 10mg, bientôt retirée du marché NON

b) Existence d'une formule au Formulaire national ?

OUI NON

c) Justification de la préparation :

- Absence de forme pharmaceutique adaptée
- Absence de dosage adapté
- Absence d'alternative thérapeutique
- Rupture de stock d'une spécialité sans équivalent thérapeutique adapté
- Autre : retrait du marché d'une spécialité sans équivalent thérapeutique adapté

d) Données bibliographiques disponibles :

Dans le cadre de l'indication : OUI NON

Dans le cadre de la classe thérapeutique : OUI NON

3. VALEUR AJOUTEE DE LA PREPARATION

- OUI, justifier : traitement des maladies héréditaires du métabolisme nécessitant de fortes doses de riboflavine, sans alternative de traitement lors du retrait de la spécialité Belflavine® (riboflavine) 10mg

NON, justifier :.....

4. EVALUATION DU RISQUE DE LA PREPARATION

Résultat de l'analyse de risque :

Catégorie 1 Catégorie 2 Catégorie 3

5. FAISABILITE TECHNIQUE

PARTIE 2

LA PREPARATION ET SON PROCEDE

INFORMATION GENERALE

a) Statut de la préparation : Préparation hospitalière

b) Matière(s) Première(s) à Usage Pharmaceutique

1) Substance(s) active(s)

- Riboflavine (78-Diméthyl-10-[(2S,3S,4R)-2,3,4,5-tétrahydroxypentyl]- benzol[*b*]pyridine-2,4(3H,10H)-dione), poudre cristalline, jaune ou jaune orangé.
- Fournisseur : Cooper
- Conditions de conservation et de stockage dans la pharmacie : stockage dans le préparatoire à température ambiante et dans une atmosphère contrôlée.

1) Excipient(s)

- Inorpha®
- Fournisseur : Invesa
- Conditions de conservation et lieu de stockage dans la pharmacie : stockage dans le préparatoire à température ambiante et dans une atmosphère contrôlée.

c) Précautions

Fiche de données sécurité disponible en annexe

- Vis à vis des produits

- Substance active pouvant présenter un risque pour la santé selon la définition du CSP : NON

- Vis-à-vis des opérateurs

Femme enceinte ou allaitante, niveau d'habilitation : habilitation du personnel à la réalisation de préparations hospitalières, pas de précautions chez la femme enceinte ou allaitante

- Vis-à-vis de l'accès à certains locaux

Réalisation de produits stériles : NON

PREPARATION

a) Nombre d'unités par lot(s)

16 flacons de 125 ml

b) Formule(s) des lot(s)

a) Lieux/équipements/ documentation/ personnels :

- Lieux permettant de garantir la qualité des préparations réalisées
 OUI
 NON, préciser:.....
- Matériel / équipement adapté et permettant de garantir la qualité des préparations réalisées
 OUI
 NON, préciser:.....
- Présence de procédures liées au circuit des matières premières à usage pharmaceutique et articles de conditionnement
 OUI
 NON
- Présence de procédures et modes opératoires liés à la préparation de la forme pharmaceutique demandée
 OUI
 NON
- Personnel formé et qualifié à la réalisation de la forme pharmaceutique
 OUI
 NON

b) Analyse de la formule de la préparation :

- Matière(s) première(s) disponible(s) de qualité pharmaceutique :
 OUI
 NON
- Maîtrise du procédé de préparation²⁸ :
 OUI
 NON
- Recherche de données d'incompatibilité :
 - entre les Matières Premières à Usage Pharmaceutique :
 OUI
 NON
 - entre les Matières Premières à Usage Pharmaceutique :
 PAS CONNU
- Si oui, quelle action est réalisée :
- entre le contenant et le contenu :
 OUI
 NON
- PAS CONNU
- Si oui, quelle action est réalisée :

6. DECISION FINALE

Considérant la valeur ajoutée, l'évaluation du risque et la faisabilité technique de la préparation, le pharmacien responsable décide de *réaliser la préparation* :

OUI
 NON, justifier :

Signature du pharmacien responsable en charge des préparations : Date :

Quantité de substance active : 20 grammes

c) Lieu(x) de préparation

Préparation réalisée dans le préparatoire de la PUI de notre établissement, dans un environnement de classe D. Les procédures concernant le niveau d'habilitation nécessaire ainsi que les étapes de maîtrise de l'environnement /qualification / nettoyage / habillage / formation ... sont disponibles dans les documents qualifiés internes.

d) Matériel et équipement à utiliser

- Riboflavine, ref 1862110, - Cooper
- Inorpha, ref 9919762 – Inresa
- Flacon en verre ambré de 125 ml - VWR
- Fioles jaugées de 2l – Schott Durant
- Spatule métallique
- Balance (précision 0,001g), ref QUINTIX221-1-CFR - Sartorius
- Agitateur vibrant TopMix FB14024 – Fisher Scientific
- Agitateur magnétique RET-basic, ref 836692 – IKA Laborrotechnik

Les procédures d'utilisation des matériels, des équipements, de qualifications et de nettoyage sont disponibles dans les documents qualifiés internes.

e) Description du procédé de préparation

1. Remplir l'ordonancier et la fiche de fabrication
2. Préparer le matériel nécessaire sur un champ propre
3. Vérifier les dates de péremptions de la riboflavine, de l'eau versable et de l'inorpha.
4. Préparer les flacons ambrés et les bouchons
5. Peser 20 grammes de riboflavine à l'aide de la balance de précision. Imprimer le ticket de pesée et le coller
6. Verser la totalité de la poudre dans le mortier en verre, rincer la cupule de pesée avec une partie de l'eau versable
7. Mesurer 2l d'inorpha dans une éprouvette
8. Triturer la riboflavine avec un peu d'inorpha. Une fois la poudre bien dissoute, rajouter de l'inorpha en versant le contenu dans une fiole jaugée de 2l en agitant le tout à l'aide de l'agitateur magnétique pendant 30 minutes
10. Compléter jusqu'au trait de jauge avec l'inorpha
11. Homogénéiser puis passer la solution aux ultrasons pendant 15 minutes
12. Répartir la solution dans les flacons ambrés de 125 ml

CONDITIONNEMENT DE LA PREPARATION

a) Articles de conditionnement

Les procédures décrivant les étapes de réception, contrôle et libération des articles de conditionnement sont disponibles dans les documents qualifiés internes.

- Dénomination(s) : Flacons en verre ambrés de 125 ml

- Fournisseur(s) : VWR

- Condition de conservation : température ambiante

- Lieux de stockage dans la pharmacie : réserve du préparatoire

b) Lieux de conditionnement

Conditionnement dans le préparatoire, dans une atmosphère de classe D.

c) Stabilité et stockage de la préparation terminée

Etude de stabilité physico-chimique et microbiologique réalisée au laboratoire de contrôle : 3 mois de stabilité à 25°C

d) Etiquetage

Les étiquettes comportent les indications suivantes :

- Le nom, le dosage et la forme pharmaceutique de la préparation : Célule de riboflavine 50

mg

- La composition qualitative et quantitative en principe actif : 50 mg de riboflavine

- Les excipients à effet notoire : non concerné

- La voie d'administration : forme orale

- Le numéro de lot ou d'ordonancier de la préparation


- La date limite d'utilisation

- Les précautions de conservation : à l'abri de la lumière

- Le nom et l'adresse de la PUI ayant réalisé et dispensé la préparation

Un modèle d'étiquetage est à conserver dans le dossier de préparation.

Annexe 3 : Fiche de fabrication des gélules de riboflavine

		CHU DE BORDEAUX PHARMACIE PREPARATOIRE		EN-PHA-
DOCUMENT D'ENREGISTREMENT D'UNE PREPARATION MAGISTRALE			Riboflavine 50 mg - NUMERO D'ORDONNANCIER : . . . M	Ind : 01 Page : 1/1
MATERES PREMIERES			MATERIEL UTILISE	
Désignation	Numéro de lot / Date de péremption	N° de diagnose ou de bulletin d'analyse	Quantité à prélever	<ul style="list-style-type: none"> - Balance de précision à 0,001g - Cartes, feuilles de papier pour pesée - Mortier en porcelaine et son pilon - Gants latex usage unique, masque FFP3, charlotte (EN-PHA-008) - Champ papier - Compresses et alcool à 70°
Riboflavine			5 g	<ul style="list-style-type: none"> - Etiquettes encadrées ROUGES (Lisite I) portant les mentions « Ne pas avaler » et Document d'enregistrement complétés par les différents intervenants et validé par le pharmacien responsable
Mannitol			QSP 21 ml	
Gélules taille 4				
<i>Coller ici le ticket de pesée des matières premières</i>		<i>NOM et Prénom du patient :</i>		MODE OPERATOIRE
<i>Coller ici une étiquette blanche récapitulative de la préparation (nom de la préparation, dosage, numéro d'ordonnancier, date de fabrication)</i>		<ol style="list-style-type: none"> 1. Remplir l'ordonnancier et la fiche de fabrication. 2. Préparer le matériel nécessaire sur un champ propre. 3. Vérifier les dates de péremptions de MIP du mannitol. 4. Préparer 100 gélules. Vérifier les dates de péremption puis les charger dans le gélulier. 5. Peser 5 grammes de riboflavine à l'aide de la balance de précision. Imprimer le ticket de pesée et le coller. 6. Mesurer à l'aide d'une éprouvette le volume de principe actif. 7. Mesurer la quantité d'excipient à additionner. 8. Verser la totalité de la poudre dans le mortier. 9. Triturer avec le pilon jusqu'à homogénéisation. 10. Remplir les gélules à l'aide d'une carte jusqu'à arasement (répartir 2/3 de la poudre, tasser puis rajouter le 1/3 restant), refermer les gélules, les déposer sur une lingette pour enlever l'excédent de poudre. 12. Peser 20 gélules au hasard et imprimer le ticket et contrôle statistique (Contrôle de l'uniformité de masse). 13. Répartir les gélules dans les alvéoles préformées. 14. Fermer hermétiquement les alvéoles avec les étiquettes imprimées. 		
CONTROLES DU PRODUIT FINI				
Nombre de pots réalisés	100 gélules	Conformité : <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non Visa : _ _ _		
Conformité des tickets de pesée	Coller le ticket de contrôle d'uniformité de masse au dos de ce document	Conformité : <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non Visa : _ _ _		
Etiquetage / Conditionnement	Coller ici une étiquette unitaire (facultatif) ou préciser la couleur de l'étiquetage	Conformité : <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non Visa : _ _ _		
IDENTIFICATION DU PRESCRIPTEUR (Nom, Fonction, Service)				
PREPARATEUR(S)		CONDITIONNEUR(S)		PHARMACIEN RESPONSABLE
Date(s) de préparation et visa(s)	Date(s) de conditionnement et visa(s)			Date de libération et visa
<i>Transmettre la préparation terminée et le document d'enregistrement correspondant au pharmacien responsable pour libération du lot</i>				

Annexe 4 : Fiche de faisabilité des gélules de riboflavine

PARTIE 1

VALIDITE TECHNICO-REGLEMENTAIRE DE LA PREPARATION

1. RENSEIGNEMENTS SUR LA PREPARATION

Dénomination de la préparation : gélules de riboflavine

a) Formule de la préparation :

Substance active : Riboflavine

Dosage : 50 mg

Excipient(s) : mannitol

Conditionnement primaire : gélules taille n°4

b) Forme pharmaceutique :

- Préparation liquide pour application cutanée
- Préparation semi-solide pour application cutanée
- Gélules (capsules)
- Préparation nasale
- Préparation liquide pour usage oral
- Préparation rectale
- Préparation ophtalmique
- Préparation parentérale
- Autre :

c) Population ciblée :

- Prématuré
- Nouveau-né (0-27 jours)
- Nourrisson (28 jours-23 mois)
- Enfant (2-11 ans)
- Adolescent (12-18 ans)
- Adulte
- Adulte > 65ans

d) Modalité d'administration : gélules à avaler, pouvant être ouvertes si besoin

e) Classe thérapeutique (ATC²⁴) de la (ou des) substance(s) active(s) : A11HA04 -

Alimentary tract and metabolism – other plain vitamin preparation

1) Réalisation de la préparation selon les textes réglementaires en vigueur²⁵.

Interruption d'utilisation : OUI NON Si oui, Référence à joindre au dossier

Restriction d'utilisation : OUI NON Si oui, Référence à joindre au dossier

g) Cas de pharmacovigilance connu, déclaré sur la substance active²⁶.

OUI NON NE SAIS PAS

2. POSITIONNEMENT DANS L'ARSENAL THERAPEUTIQUE (= INTERET)

a) Existence d'une ou plusieurs spécialités adaptées (AMM, ATU, autres procédures d'autorisation) :

OUI, laquelle : Bèflavine® 10mg, biondol retirée du marché NON

b) Existence d'une formule au Formulaire national ?

OUI NON

c) Justification de la préparation :

- Absence de forme pharmaceutique adaptée
- Absence de dosage adapté
- Absence d'alternative thérapeutique
- Rupture de stock d'une spécialité sans équivalent thérapeutique adapté
- Autre : retrait du marché d'une spécialité sans équivalent thérapeutique adapté

d) Données bibliographiques disponibles :

Dans le cadre de l'indication : OUI NON
Dans le cadre de la classe thérapeutique : OUI NON

3. VALEUR AJOUTEE DE LA PREPARATION

OUI, justifier : traitement des maladies héréditaires du métabolisme nécessitant de fortes doses de riboflavine, sans alternative de traitement lors du retrait de la spécialité Bèflavine® (riboflavine) 10mg

NON, justifier :

4. EVALUATION DU RISQUE DE LA PREPARATION

Résultat de l'analyse de risque :

Catégorie 1 Catégorie 2 Catégorie 3

PARTIE 2

LA PREPARATION ET SON PROCÉDE

5. FAISABILITE TECHNIQUE

a) Locaux/équipements/documentation/personnels :

- Locaux permettant de garantir la qualité des préparations réalisées
 - ☒ OUI
 - ☐ NON, préciser:.....
- Matériel / équipement adapté et permettant de garantir la qualité des préparations réalisées
 - ☒ OUI
 - ☐ NON, préciser:.....
- Présence de procédures liées au circuit des matières premières à usage pharmaceutique et articles de conditionnement
 - ☒ OUI
 - ☐ NON
- Présence de procédures et modes opératoires liés à la préparation de la forme pharmaceutique demandée
 - ☐ NON
 - ☒ OUI
- Personnel formé et qualifié à la réalisation de la forme pharmaceutique
 - ☐ NON
 - ☒ OUI

b) Analyse de la formule de la préparation :

- Matière(s) première(s) disponible(s) de qualité pharmaceutique :
 - ☒ OUI
 - ☐ NON
 - Maîtrise du procédé de préparation²⁸ :
 - ☒ OUI
 - ☐ NON
 - Recherche de données d'incompatibilité :
 - entre les Matières Premières à Usage Pharmaceutique :
 - ☒ PAS CONNU
 - ☐ OUI
 - ☐ NON
 - entre le contenant et le contenu :
 - ☒ PAS CONNU
 - ☐ OUI
 - ☐ NON
- Si oui, quelle action est réalisée :

6. DECISION FINALE

Considérant la valeur ajoutée, l'évaluation du risque et la faisabilité technique de la préparation, le pharmacien responsable décide de *réaliser la préparation* :

☒ OUI

☐ NON, Justifier :

Signature du pharmacien responsable en charge des préparations : Date :

INFORMATION GENERALE

a) **Statut de la préparation** : Préparation hospitalière

b) **Matière(s) Première(s) à Usage Pharmaceutique**

i) Substance(s) active(s)

- Riboflavine (7-8-Diméthyl-1-0-[(2S,3S,4R)-2,3,4,5-tétrahydroxy-2-pentyl]-benzol[*g*]tréridine-2,4(3H,10H)-dione), poudre cristalline, jaune ou jaune orangé.

- Fournisseur : Cooper

- Conditions de conservation et de stockage dans la pharmacie : stockage dans le préparatoire à température ambiante et dans une atmosphère contrôlée.

ii) Excipient(s)

- Mannitol

- Fournisseur : COOPER

- Conditions de conservation et lieu de stockage dans la pharmacie : stockage dans le préparatoire à température ambiante et dans une atmosphère contrôlée.

c) **Précautions**

- Vis à vis des produits

Substance active pouvant présenter un risque pour la santé selon la définition du CSP : NON

- Vis-à-vis des opérateurs

Femme enceinte ou allaitante, niveau d'habilitation : habilitation du personnel à la réalisation de préparations hospitalières, pas de précautions chez la femme enceinte ou allaitante

- Vis-à-vis de l'accès à certains locaux

Réalisation de produits stériles : NON

PREPARATION

a) **Nombre d'unités par lot(s)**

300 gélules par lot

b) **Formule(s) des lot(s)**

Quantité de substance active : 15 grammes

c) **Lieu(x) de préparation**

Préparation réalisée dans le préparatoire de la PUI de notre établissement, dans un environnement de classe D. Les procédures concernant le niveau d'habilitation nécessaire ainsi que les étapes de maîtrise de l'environnement / qualification / nettoyage / habillage / formation ... sont disponibles dans les documents qualités internes.

d) **Matériel et équipement à utiliser**

- Riboflavine, ref 1862110, - Cooper
- Mannitol, ref 1493028- Cooper
- Géules taille 4ivoires, ref 1400422- Cooper
- Gélulier à chargeur pour 300 géules QB300 avec plaque taille 4, ref AI165 – LGA
- Spatule métallique
- Balance (précision 0,001g), ref QUINTEX221-1CFR - Sartorius

Les procédures d'utilisation des matériels, des équipements, de qualifications et de nettoyage sont disponibles dans les documents qualités internes.

e) **Description du procédé de préparation**

1. Remplir l'ordonnancier et la fiche de fabrication.
2. Préparer le matériel nécessaire sur un champ propre.
3. Vérifier les dates de péremptions de MP du mannitol.
4. Préparer 300 géules, vérifier les dates de péremption puis les charger dans le gélulier.
5. Peser 15 grammes de riboflavine à l'aide de la balance de précision. Imprimer le ticket de pesée et le coller.
6. Mesurer à l'aide d'une éprouvette le volume de principe actif.
7. Mesurer la quantité d'excipient à additionner.
8. Verser la totalité de la poudre dans le mortier.
9. Triturer avec le pilon jusqu'à homogénéisation.
10. Remplir les géules à l'aide d'une carte jusqu'à arasement (répartir 3/4 de la poudre, tasser puis rajouter le 1/4 restant), refermer les géules, les déposer sur une lingette pour enlever l'excédent de poudre.
11. Peser 20 géules au hasard et imprimer le ticket et contrôle statistique (Contrôle de l'uniformité de masse).
12. Répartir les géules dans les alvéoles préformées.
13. Fermer hermétiquement les alvéoles avec les étiquettes imprimées.

CONDITIONNEMENT DE LA PREPARATION

Conditionnement des géules de taille 4 et dans des blisters opaques.

a) **Articles de conditionnement**

Les procédures décrivant les étapes de réception, contrôle et libération des articles de conditionnement sont disponibles dans les documents qualité internes.

- Dénomination(s) : Géules taille 4 ivoire

- Fournisseur(s) : COOPER

- Condition de conservation : température ambiante

- Lieux de stockage dans la pharmacie : réserve du préparatoire

- Dénomination(s) : blister opaque

- Fournisseur(s) : Per'os

- Condition de conservation : température ambiante

- Lieux de stockage dans la pharmacie : réserve du préparatoire

b) **Lieux de conditionnement**

Conditionnement dans le préparatoire, dans une atmosphère de classe D.

c) **Stabilité et stockage de la préparation terminée**

Etude de stabilité physico-chimique réalisée au laboratoire de contrôle : 3 mois de stabilité à 25°C

d) **Etiquetage**

Les étiquettes comportent les indications suivantes :

- Le nom, le dosage et la forme pharmaceutique de la préparation : Gélule de riboflavine 50 mg

- La composition qualitative et quantitative en principe actif : 50 mg de riboflavine

- Les excipients à effet notoire : non concerné

- La voie d'administration : forme orale

- Le numéro de lot ou d'ordonnancier de la préparation

- La date limite d'utilisation

- Les précautions de conservation : à l'abri de la lumière

- Le nom et l'adresse de la PUI ayant réalisé et dispensé la préparation

Un modèle d'étiquetage est à conserver dans le dossier de préparation.

Annexe 5 : Résultats de l'étude de stabilité chimique de la forme buvable de riboflavine sur 84 jours à < 25°C

SOLUTION BUVABLE MULTIDOSE (< 25°C)	J0		J3		J7		J14	
	ASC	cc (mg/ml)	ASC	cc (mg/ml)	ASC	cc (mg/ml)	ASC	cc (mg/ml)
Lot 1 - A	28,072	9,997	28,070	9,996	27,686	9,859	27,887	9,930
Lot 1 - B	29,185	10,393	27,968	9,959	28,227	10,052	28,067	9,995
Lot 1 - C	28,629	10,195	27,828	9,910	28,248	10,059	28,018	9,977
Lot 2 - A	27,988	9,967	27,360	9,743	27,825	9,908	27,918	9,941
Lot 2 - B	28,178	10,034	27,593	9,826	27,843	9,915	27,937	9,948
Lot 2 - C	28,083	10,000	27,574	9,819	27,878	9,927	27,917	9,941
Lot 3 - A	28,496	10,147	29,075	10,354	28,361	10,099	28,455	10,133
Lot 3 - B	*	*	28,741	10,235	28,333	10,090	28,278	10,070
Lot 3 - C	*	*	28,746	10,236	28,435	10,126	28,286	10,073
MOYENNE (mg/ml)	28,376	10,105		10,009		10,004		10,001
ECART TYPE (EC)	0,428	0,153		0,216		0,100		0,073
COEFFICIENT DE VARIATION (CV)	1,510		2,162		1,003		0,731	
INTERVALLE DE CONFIANCE (IC)	0,317	0,113		0,160		0,074		0,054
RESULTAT (%)	100		99,049 ± 1,40		99,003 ± 0,65		98,974 ± 0,47	

SOLUTION BUVABLE MULTIDOSE (< 25°C)	J28		J56		J84				
	ASC	cc (mg/ml)	% de riboflavine restant	ASC	cc (mg/ml)	% de riboflavine restant			
Lot 1 - A	27,901	9,935	98,325	27,532	9,804	97,026	27,523	9,801	96,993
Lot 1 - B	27,982	9,965	98,613	27,443	9,772	96,710	27,560	9,814	97,125
Lot 1 - C	27,992	9,968	98,646	27,425	9,766	96,647	27,533	9,804	97,028
Lot 2 - A	28,325	10,086	99,820	27,191	9,683	95,823	27,301	9,722	96,212
Lot 2 - B	28,143	10,022	99,179	27,177	9,678	95,772	27,246	9,702	96,016
Lot 2 - C	28,174	10,033	99,289	27,171	9,676	95,754	27,235	9,698	95,977
Lot 3 - A	27,957	9,955	98,522	27,652	9,847	97,447	27,162	9,672	95,722
Lot 3 - B	27,811	9,904	98,010	27,630	9,839	97,371	27,135	9,663	95,626
Lot 3 - C	27,839	9,913	98,106	27,636	9,841	97,392	27,152	9,669	95,683
MOYENNE (mg/ml)		9,976	98,723		9,767	96,660		9,727	96,265
ECART TYPE (EC)		0,060	0,595		0,072	0,716		0,062	0,617
COEFFICIENT DE VARIATION (CV)			0,603			0,741			0,641
INTERVALLE DE CONFIANCE (IC)			0,045			0,054			0,046
RESULTAT (%)			98,723 ± 0,39		96,660 ± 0,47		96,265 ± 0,40		

		J0		J3		J7		J14				
	ASC	cc (mg/ml)	ASC	cc (mg/ml)	% de riboflavine restant	ASC	cc (mg/ml)	% de riboflavine restant	ASC	cc (mg/ml)	% de riboflavine restant	
SOLUTION BUVALE UNIDOSE (> 25°C)	Lot 1 - A	28,072	9,997	26,799	9,543	94,439	27,798	9,899	97,961	28,350	10,095	99,904
	Lot 1 - B	29,185	10,393	Résultat non interprétable			27,984	9,965	98,617	27,967	9,959	98,556
	Lot 1 - C	28,629	10,195	31,464	11,205	110,886	27,865	9,923	98,198	28,075	9,998	98,938
	Lot 2 - A	27,988	9,967	28,205	10,044	99,394	27,793	9,897	97,944	27,980	9,964	98,602
	Lot 2 - B	28,178	10,034	27,768	9,888	97,854	27,843	9,915	98,117	27,707	9,866	97,639
	Lot 2 - C	28,083	10,000	27,851	9,918	98,148	27,918	9,941	98,382	27,773	9,890	97,872
	Lot 3 - A	28,496	10,147	28,577	10,176	100,705	27,700	9,864	97,616	28,204	10,043	99,391
	Lot 3 - B	*	*	28,300	10,078	99,731	27,750	9,882	97,792	27,951	9,953	98,501
	Lot 3 - C	*	*	28,356	10,098	99,929	28,772	10,246	101,395	27,958	9,956	98,524
MOYENNE (mg/ml)	28,376	10,105		10,119	100,136		9,948	98,447		9,969	98,658	
ECART TYPE	0,428	0,153		0,480	4,755		0,116	1,146		0,070	0,697	
COEFFICIENT DE VARIATION (CV)		1,509		4,748		1,164		0,706				
INTERVALLE DE CONFIANCE (IC)	0,317	0,113		0,356	3,106		0,086	0,749		0,052	0,455	
RESULTAT (%)		100		100,136 ± 3,106		98,447 ± 0,75		98,658 ± 0,46				

		J28		J56		J84				
	ASC	cc (mg/ml)	% de riboflavine restant	ASC	cc (mg/ml)	% de riboflavine restant	ASC	cc (mg/ml)	% de riboflavine restant	
SOLUTION BUVALE UNIDOSE (<25°C)	Lot 1 - A	28,287	10,073	99,684	27,658	9,849	97,467	27,596	9,827	97,249
	Lot 1 - B	28,162	10,029	99,243	27,863	9,922	98,188	27,763	9,886	97,838
	Lot 1 - C	28,131	10,017	99,134	27,870	9,925	98,215	27,652	9,847	97,445
	Lot 2 - A	28,111	10,011	99,065	27,732	9,876	97,729	29,113	10,367	102,597
	Lot 2 - B	28,013	9,975	98,718	27,940	9,950	98,461	29,202	10,399	102,909
	Lot 2 - C	28,006	9,973	98,693	27,843	9,915	98,117	29,057	10,347	102,399
	Lot 3 - A	28,633	10,196	100,904	27,419	9,764	96,625	28,229	10,052	99,480
	Lot 3 - B	28,388	10,109	100,040	27,699	9,864	97,612	28,183	10,036	99,317
	Lot 3 - C	28,411	10,117	100,121	27,634	9,840	97,381	28,297	10,077	99,721
MOYENNE (mg/ml)		10,056	99,511		9,878	97,755		10,093	99,884	
ECART TYPE		0,074	0,736		0,057	0,565		0,227	2,248	
COEFFICIENT DE VARIATION (CV)		0,074	0,736		0,578	0,369		2,251	2,248	
INTERVALLE DE CONFIANCE (IC)		0,055	0,481		0,042	0,369		0,168	1,469	
RESULTAT (%)		99,511 ± 0,48			97,755 ± 0,37			99,884 ± 1,47		

ANNEXE 6 : Résultats de l'étude de stabilité chimique de la forme buvable de riboflavine sur 84 jours à 2-8°C

	J0		J3		J7		J14					
	ASC	cc (mg/ml)	ASC	cc (mg/ml)	% de riboflavine restant	ASC	cc (mg/ml)	% de riboflavine restant				
SOLUTION BUVALE MULTIDOSE (2-8°C)	Lot 1 - A	28,072	9,997	28,019	9,977	98,738	27,692	9,861	97,588	29,111	10,367	102,588
	Lot 1 - B	29,185	10,393	28,219	10,049	99,445	28,191	10,039	99,346	28,434	10,126	100,204
	Lot 1 - C	28,629	10,195	28,260	10,063	99,588	28,148	10,024	99,195	28,450	10,131	100,258
	Lot 2 - A	27,988	9,967	28,885	10,286	101,791	28,023	9,979	98,754	28,936	10,304	101,972
	Lot 2 - B	28,178	10,034	28,712	10,224	101,181	28,243	10,057	99,528	28,481	10,142	100,370
	Lot 2 - C	28,083	10,000	28,716	10,226	101,196	28,305	10,080	99,749	28,468	10,137	100,321
	Lot 3 - A	28,496	10,147	28,047	9,987	98,837	28,093	10,004	98,999	28,335	10,090	99,854
	Lot 3 - B	*	*	28,330	10,089	99,837	28,341	10,092	99,875	28,311	10,082	99,769
	Lot 3 - C	*	*	28,292	10,075	99,702	28,293	10,075	99,706	28,087	10,002	98,979
MOYENNE (mg/ml)	28,376	10,105		10,109	100,035		10,023	99,193		10,153	100,479	
ECART TYPE	0,428	0,153		0,110	1,093		0,071	0,705		0,113	1,117	
COEFFICIENT DE VARIATION (CV)			1,509			1,093		0,711			1,112	
INTERVALLE DE CONFIANCE (IC)	0,317	0,113		0,082	0,714		0,053	0,461		0,084	0,730	
RESULTAT (%)		100		100,035 ± 0,71		99,193 ± 0,46		100,479 ± 0,73				

	128			156			184			
	ASC	cc (mg/ml)	% de riboflavine restant	ASC	cc (mg/ml)	% de riboflavine restant	ASC	cc (mg/ml)	% de riboflavine restant	
SOLUTION BUVALE MULTIDOSE (2-8°C)	Lot 1 - A	28,682	10,214	101,076	27,903	9,936	98,331	28,365	10,101	99,961
	Lot 1 - B	28,475	10,140	100,347	27,742	9,879	97,763	28,323	10,086	99,811
	Lot 1 - C	28,601	10,185	100,791	27,710	9,868	97,650	28,341	10,092	99,874
	Lot 2 - A	27,705	9,866	97,634	28,095	10,005	99,008	27,669	9,853	97,507
	Lot 2 - B	27,979	9,963	98,598	27,439	9,771	96,696	27,632	9,840	97,374
	Lot 2 - C	28,052	9,989	98,855	27,433	9,769	96,672	27,630	9,839	97,366
	Lot 3 - A	29,304	10,435	103,268	27,645	9,844	97,421	27,365	9,744	96,432
	Lot 3 - B	28,369	10,102	99,973	27,692	9,861	97,587	27,384	9,751	96,501
	Lot 3 - C	28,455	10,133	100,276	27,632	9,840	97,375	27,336	9,734	96,331
MOYENNE (mg/ml)		10,114	100,091		9,864	97,611		9,893	97,906	
ECART TYPE		0,166	1,638		0,074	0,734		0,156	1,545	
COEFFICIENT DE VARIATION (CV)					0,074	0,752		0,156	1,578	
INTERVALLE DE CONFIANCE (IC)		0,123	1,070		0,055	0,479		0,116	1,009	
RESULTAT (%)		100,091 ± 1,07		97,611 ± 0,48		97,906 ± 1,01				

	J0		J3		J7		J14					
	ASC	cc (mg/ml)	ASC	cc (mg/ml)	ASC	cc (mg/ml)	ASC	cc (mg/ml)				
SOLUTION BUVALE UNIDOSE (2-8°C)	Lot 1 - A	28,072	9,997	28,483	10,143	100,373	28,737	10,233	101,269	28,581	10,178	100,722
	Lot 1 - B	29,185	10,393	28,069	9,995	98,916	28,002	9,972	98,680	28,107	10,009	99,050
	Lot 1 - C	28,629	10,195	27,967	9,959	98,555	28,114	10,012	99,075	28,186	10,037	99,326
	Lot 2 - A	27,988	9,967	28,050	9,989	98,847	28,010	9,974	98,707	28,091	10,003	98,992
	Lot 2 - B	28,178	10,034	27,766	9,887	97,845	28,199	10,042	99,374	27,690	9,860	97,578
	Lot 2 - C	28,083	10,000	27,873	9,926	98,225	28,227	10,052	99,471	27,794	9,898	97,947
	Lot 3 - A	28,496	10,147	28,195	10,040	99,361	28,543	10,164	100,588	27,737	9,877	97,743
	Lot 3 - B	*	*	28,326	10,087	99,823	28,166	10,030	99,256	27,584	9,823	97,206
	Lot 3 - C	*	*	28,426	10,123	100,174	28,209	10,045	99,409	27,750	9,882	97,789
	MOYENNE (mg/ml)	28,376	10,105		10,017	99,124		10,058	99,537		9,952	98,484
	ECART TYPE	0,428	0,153		0,088	0,873		0,087	0,856		0,113	1,122
	COEFFICIENT DE VARIATION (CV)		1,509			0,881			0,860			1,139
INTERVALLE DE CONFIANCE (IC)	0,317	0,113		0,065	0,570		0,064	0,559		0,084	0,733	
RESULTAT (%)		100		99,124 ± 0,56		99,537 ± 0,55		98,484 ± 0,73				

	J28			J56			J84			
	ASC	cc (mg/ml)	% de riboflavine restant	ASC	cc (mg/ml)	% de riboflavine restant	ASC	cc (mg/ml)	% de riboflavine restant	
SOLUTION BUVALE UNIDOSE (2-8°C)	Lot 1 - A	28,831	10,267	101,602	27,807	9,902	97,991	28,074	9,997	98,933
	Lot 1 - B	28,279	10,070	99,656	27,809	9,903	97,999	27,934	9,947	98,441
	Lot 1 - C	28,397	10,112	100,072	27,900	9,935	98,318	28,054	9,990	98,862
	Lot 2 - A	28,133	10,018	99,141	27,491	9,789	96,876	26,571	9,462	93,633
	Lot 2 - B	27,568	9,817	97,149	27,755	9,884	97,808	26,918	9,585	94,857
	Lot 2 - C	27,491	9,789	96,878	27,791	9,897	97,937	27,208	9,689	95,879
	Lot 3 - A	28,645	10,201	100,947	27,020	9,622	95,218	27,968	9,959	98,558
	Lot 3 - B	29,058	10,348	102,402	27,346	9,738	96,365	28,079	9,999	98,952
	Lot 3 - C	29,170	10,388	102,797	27,242	9,701	95,999	27,854	9,919	98,156
	MOYENNE (mg/ml)		10,112	100,071		9,819	97,168		9,839	97,363
	ECART TYPE		0,214	2,114		0,111	1,095		0,205	2,026
	COEFFICIENT DE VARIATION (CV)									
INTERVALLE DE CONFIANCE (IC)		0,158	1,381		0,082	0,715		0,152	1,324	
RESULTAT (%)		100,071 ± 1,38			97,168 ± 0,71			97,363 ± 1,32		

ANNEXE 7 : Résultats de l'étude de stabilité chimique des gélules de riboflavine sur 84 jours à < 25°C

Lots	J0		J3		J7		J14		J28		J56		J84	
	Pesées (mg)	SSC	Pesées (mg)	SSC	Pesées (mg)	SSC	Pesées (mg)	SSC	Pesées (mg)	SSC	Pesées (mg)	SSC	Pesées (mg)	SSC
Gélule lot 1 - 1A	26,468		26,579		26,768		26,881		26,765		26,446		26,729	
Gélule lot 1 - 1B	79,9		80,3		26,745		26,858		26,797		26,523		26,746	
Gélule lot 1 - 2A	26,949		26,714		26,756		26,615		26,892		26,195		26,234	
Gélule lot 1 - 2B	80,7		80,4		26,754		26,611		26,862		26,245		26,270	
Gélule lot 2 - 1A	27,563		27,756		28,496		28,243		28,410		27,550		27,324	
Gélule lot 2 - 1B	59,7		60,8		28,430		28,220		28,289		27,400		27,307	
Gélule lot 2 - 2A	27,907		28,199		28,253		27,731		28,477		27,669		27,118	
Gélule lot 2 - 2B	60,0		60,2		28,161		27,755		28,525		27,429		27,126	
Gélule lot 3 - 1A	28,048		27,872		28,193		28,026		28,228		27,850		27,633	
Gélule lot 3 - 1B	57,5		57,1		28,272		28,003		28,320		27,478		27,705	
Gélule lot 3 - 2A	28,061		28,223		28,223		27,915		28,106		27,742		27,480	
Gélule lot 3 - 2B	57,8		57,2		28,167		27,917		28,098		27,682		27,529	

	J0		J3		J7		J14	
	SSC	cc (mg)	SSC	cc (mg)	SSC	cc (mg)	% de riboflavine restant	% de riboflavine restant
Gélules lot 1	26,705	47,548	26,662	47,471	26,756	47,638	100,190	26,741
Gélules lot 2	27,743	49,396	27,972	49,804	28,335	50,451	102,135	27,987
Gélules lot 3	28,000	49,854	28,121	50,070	28,213	50,234	100,763	27,965
MOYENNE (mg)	27,483	48,933		49,115		49,441	101,029	
ECART TYPE	0,686	1,221		1,430		1,565	0,999	
COEFFICIENT DE VARIATION (CV)		2,496		2,911		3,166	0,653	
INTERVALLE DE CONFIANCE (IC)		0,798						
RESULTAT (%)		100		100,37 ± 0,3242		101,029 ± 0,65		100,28 ± 0,34

	J28		J56		J84	
	SSC	cc (mg)	SSC	cc (mg)	SSC	cc (mg)
Gélules lot 1	26,829	47,768	26,352	46,919	26,495	47,173
Gélules lot 2	28,425	50,611	27,512	48,985	27,219	48,463
Gélules lot 3	28,188	50,189	27,688	49,298	27,587	49,118
MOYENNE (mg)		49,523		48,401		48,251
ECART TYPE		1,534		1,293		0,989
COEFFICIENT DE VARIATION (CV)		3,098		2,671		2,051
INTERVALLE DE CONFIANCE (IC)		0,717		0,160		0,364
RESULTAT (%)		101,198 ± 0,72		98,910 ± 0,16		98,615 ± 0,36

ANNEXE 8 : résultats des mesures de pH au cours de l'étude de stabilité

SOLUTION BUVALE MULTIDOSE (2-8°C)		Jour d'analyse		J0	J3	J7	J14	J28	J56	J84	Moyenne par lot	Ecart-type par lot	Coefficient de variation par lot	
		Multidoses lot 1	Multidoses lot 2											Multidoses lot 3
pH moyens par lot	Moyenne	Multidoses lot 1	Multidoses lot 2	4,45	4,50	4,23	4,54	4,56	4,50	4,62	4,49	0,12	2,78	
		Multidoses lot 2	Multidoses lot 3	4,39	4,40	4,78	4,46	4,47	4,49	4,73	4,53	0,16		3,48
		Moyenne		4,61	4,73	4,68	4,45	4,45	4,43	4,64	4,57	0,12		
Ecart-type				4,48	4,54	4,56	4,48	4,49	4,47	4,66				
Coefficient de variation (%)				0,11	0,17	0,29	0,05	0,06	0,04	0,06				
				2,54	3,72	6,42	1,10	1,30	0,85	1,26				
SOLUTION BUVALE UNIDOSE (2-8°C)		Jour d'analyse		J0	J3	J7	J14	J28	J56	J84	Moyenne par lot	Ecart-type par lot	Coefficient de variation par lot	
		Unidoses lot 1	Unidoses lot 2											Unidoses lot 3
pH moyens par lot	Moyenne	Unidoses lot 1	Unidoses lot 2	4,45	4,78	4,36	4,75	4,65	4,51	4,53	4,58	0,16	3,41	
		Unidoses lot 2	Unidoses lot 3	4,39	4,40	4,67	4,65	4,50	4,46	4,58	4,52	0,11		2,53
		Moyenne		4,61	4,78	4,61	4,40	4,48	4,50	4,67	4,58	0,13		
Ecart-type				4,48	4,65	4,55	4,60	4,54	4,49	4,59				
Coefficient de variation (%)				0,11	0,22	0,16	0,18	0,09	0,03	0,07				
				2,54	4,71	3,62	3,92	2,05	0,59	1,54				
SOLUTION BUVALE MULTIDOSE (< 25°C)		Jour d'analyse		J0	J3	J7	J14	J28	J56	J84	Moyenne par lot	Ecart-type par lot	Coefficient de variation par lot	
		Multidoses lot 1	Multidoses lot 2											Multidoses lot 3
pH moyens par lot	Moyenne	Multidoses lot 1	Multidoses lot 2	4,45	4,64	4,59	4,54	4,47	4,50	4,50	4,53	0,07	1,50	
		Multidoses lot 2	Multidoses lot 3	4,39	4,35	4,56	4,58	4,46	4,49	4,59	4,49	0,09		2,10
		Moyenne		4,61	4,69	4,72	4,63	4,50	4,43	4,55	4,59	0,10		
Ecart-type				4,48	4,56	4,62	4,58	4,48	4,47	4,55				
Coefficient de variation (%)				0,11	0,18	0,09	0,05	0,02	0,04	0,05				
				2,54	4,03	1,84	0,98	0,47	0,85	0,99				
SOLUTION BUVALE UNIDOSE (< 25°C)		Jour d'analyse		J0	J3	J7	J14	J28	J56	J84	Moyenne par lot	Ecart-type par lot	Coefficient de variation par lot	
		Unidoses lot 1	Unidoses lot 2											Unidoses lot 3
pH moyens par lot	Moyenne	Unidoses lot 1	Unidoses lot 2	4,45	4,75	4,67	4,60	4,40	4,48	4,60	4,56	0,13	2,76	
		Unidoses lot 2	Unidoses lot 3	4,39	4,59	4,72	4,57	4,35	4,46	4,56	4,52	0,13		2,83
		Moyenne		4,61	4,56	4,67	4,78	4,54	4,50	4,68	4,62	0,10		
Ecart-type				4,48	4,63	4,69	4,65	4,43	4,48	4,61				
Coefficient de variation (%)				0,11	0,10	0,03	0,11	0,10	0,02	0,06				
				2,54	2,20	0,62	2,44	2,22	0,45	1,32				

ANNEXE 9 : résultats des mesures d'osmolarité au cours de l'étude de stabilité

SOLUTION BUVALE MULTIDOSE (2-8°C)		J0	J3	J7	J14	J28	J56	J84	Moyenne par lot	Ecart-type par lot	Coefficient de variation par lot
Jour d'analyse	Osmolarités moyennes par lot	Multidoses lot 1	161	162	160	163	161	162	161,43	0,98	0,60
		Multidoses lot 2	158	161	157	158	159	157	158,29	1,38	0,87
		Multidoses lot 3	152	154	154	153	152	153	153,00	0,82	0,53
	Moyenne	157,00	159,00	157,00	158,00	157,33	157,00	157,67			
Ecart-type EC		4,58	4,36	3,00	5,00	4,73	4,00	4,51			
Coefficient de variation CV (%)		2,92	2,74	1,91	3,16	3,00	2,55	2,86			
SOLUTION BUVALE UNIDOSE (2-8°C)		J0	J3	J7	J14	J28	J56	J84	Moyenne par lot	EC par lot	CV par lot
Jour d'analyse	Osmolarités moyennes par lot	Unidoses lot 1	161	162	164	163	164	162	162,43	1,27	0,78
		Unidoses lot 2	158	157	158	158	159	158	157,86	0,69	0,44
		Unidoses lot 3	152	152	155	154	153	155	152	153,29	1,38
	Moyenne	157,00	157,00	159,00	158,33	158,67	158,33	156,67			
Ecart-type		4,58	5,00	4,58	4,51	5,51	3,51	4,51			
Coefficient de variation (%)		2,92	3,18	2,88	2,85	3,47	2,22	2,88			
SOLUTION BUVALE MULTIDOSE (< 25°C)		J0	J3	J7	J14	J28	J56	J84	Moyenne par lot	EC par lot	CV par lot
Jour d'analyse	Osmolarités moyennes par lot	Multidoses lot 1	161	163	162	161	162	163	162,14	0,90	0,55
		Multidoses lot 2	158	159	158	158	157	158	158,00	0,58	0,37
		Multidoses lot 3	152	155	154	153	153	154	153	153,43	0,98
	Moyenne	157,00	159,00	158,00	157,33	157,33	158,33	158,00			
Ecart-type		4,58	4,00	4,00	4,04	4,51	4,51	5,00			
Coefficient de variation (%)		2,92	2,52	2,53	2,57	2,87	2,85	3,16			
SOLUTION BUVALE UNIDOSE (< 25°C)		J0	J3	J7	J14	J28	J56	J84	Moyenne par lot	EC par lot	CV par lot
Jour d'analyse	Osmolarités moyennes par lot	Unidoses lot 1	161	162	163	163	162	163	162,43	0,79	0,48
		Unidoses lot 2	158	158	159	159	160	159	158,71	0,76	0,48
		Unidoses lot 3	152	153	154	154	153	154	153,29	0,76	0,49
	Moyenne	157,00	157,67	158,67	158,67	158,33	158,67	158,00			
Ecart-type		4,58	4,51	4,51	4,51	4,73	4,51	5,00			
Coefficient de variation (%)		2,92	2,86	2,84	2,84	2,98	2,84	3,16			

Annexe 10 : Résultats de l'étude de stabilité microbiologique, nombre d'UFC observée par lot, par jour d'analyse et par milieu (TCS : *Trypticase soja*, Sab : *Sabouraud*, BCP : *BromoCrésol Pourpre*)

			J0			J14			J28			J56			J84			
			TCS	Sab	BCP	TCS	Sab	BCP	TCS	Sab	BCP	TCS	Sab	BCP	TCS	Sab	BCP	
TEMPERATURE AMBIANTE	Lot 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Moyenne	0	0	0	0,33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lot 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	0	0	0	0	0	0	0	0	5*	0	0	0	0	0	0	0	0	
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Moyenne	0	0	0	0	0	0	0	1,66	0	0	0	0	0	0	0	0	
Lot 3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Moyenne	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

			J0			J14			J28			J56			J84			
			TCS	Sab	BCP	TCS	Sab	BCP	TCS	Sab	BCP	TCS	Sab	BCP	TCS	Sab	BCP	
TEMPERATURE REFREGIEE	Lot 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Moyenne	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lot 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Moyenne	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Lot 3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Moyenne	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

* : résultat non significatif, contamination de la gélose lors de l'ensemencement

Serment de Galien

Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des Pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruite 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.

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

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

Que je sois couverte d'opprobre et méprisée de mes confrères si j'y manque.

MISE AU POINT ET ETUDE DE STABILITE DE GELULES ET D'UNE FORME ORALE LIQUIDE DE RIBOFLAVINE

La riboflavine, ou vitamine B2, fait partie des traitements recommandés dans la prise en charge de certaines maladies héréditaires du métabolisme tel que l'acidurie glutarique. Ces maladies rares nécessitent une prise en charge dès l'enfance et un traitement au long cours, nécessitant des adaptations des posologies en fonction de l'âge. La spécialité disponible n'étant pas adaptée à un usage pédiatrique que ce soit au niveau de sa forme ou du dosage, une préparation hospitalière sous forme buvable a été développée pour faciliter la compliance et l'adaptation des doses chez l'enfant. Au préalable, une étude a été réalisée afin de déterminer les excipients les plus appropriés à la formulation de la forme buvable et à son utilisation en pédiatrie. L'excipient liquide Inorpha[®] a permis le développement d'une suspension buvable de riboflavine dosée à 10 mg/ml. Des gélules à un dosage adapté à la prise en charge des maladies du métabolisme chez l'adulte, soit 50 mg, ont également été développées. La stabilité chimique des deux formulations a été étudiée par une méthode de chromatographie liquide haute performance en appariement par paire d'ions couplée à un détecteur UV-visible préalablement validée. La stabilité physique de la forme buvable a été conduite par l'évaluation du pH, de l'osmolalité et des caractéristiques organoleptiques des préparations. La stabilité microbiologique a été menée sur la forme buvable conformément aux recommandations de la Pharmacopée européenne. Notre étude a montré une stabilité physico-chimique et microbiologique de la formulation buvable pendant 90 jours à 25°C comme à 4°C ainsi qu'une stabilité chimique des gélules de riboflavine pendant 90 jours à 25°C. Les préparations hospitalières développées nous permettent de fabriquer des lots à l'avance et ainsi de répondre plus rapidement aux demandes des services de pédiatrie en cas de prise en charge d'urgence ainsi qu'aux demandes des patients aux rétrocessions.

Discipline : Pharmacie Hospitalière.

Mots-clés: Riboflavine – Stabilité – Pédiatrie – Préparation.

**UNIVERSITE DE BORDEAUX
UFR DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES
146 RUE LEO SAIGNAT
33076 BORDEAUX CEDEX**