



HAL
open science

Préparations hospitalières de β -bloquants en pédiatrie à l'AP-HM : indications, mise au point et études de stabilité

Laura Dubois

► To cite this version:

Laura Dubois. Préparations hospitalières de β -bloquants en pédiatrie à l'AP-HM : indications, mise au point et études de stabilité. Sciences pharmaceutiques. 2023. dumas-04256640

HAL Id: dumas-04256640

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04256640v1>

Submitted on 24 Oct 2023

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.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

**THÈSE D'EXERCICE
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES
DE PHARMACIE HOSPITALIÈRE
*PHASE D'APPROFONDISSEMENT***

Soutenue le vendredi 13 octobre 2023

Par M^{lle} Laura DUBOIS

Née le 27 septembre 1996 à Marseille

Conformément aux dispositions du décret n°2019-2020 du 04 octobre 2019

----oOo----

**PRÉPARATIONS HOSPITALIÈRES DE β -BLOQUANTS EN
PÉDIATRIE A L'AP-HM : INDICATIONS, MISE AU POINT ET
ÉTUDES DE STABILITE**

----oOo----

JURY :

Président : Monsieur le Professeur Patrice VANELLE

Directeur : Monsieur le Professeur Christophe CURTI

Membres : Monsieur le Docteur Christophe JEAN

Madame le Docteur Anita COHEN

27 Boulevard Jean Moulin – 13385 MARSEILLE Cedex 05
Tel. : 04 91 83 55 00 – Fax : 04 91 80 26 12

ADMINISTRATION :

| | |
|---|--|
| <i>Doyen :</i> | M. Jean-Paul BORG |
| <i>Vice-Doyens :</i> | Mme Florence SABATIER-MALATERRE, M. François DEVRED, M. Pascal RATHELOT, Mme Alexandrine BERTAUD |
| <i>Chargés de Mission :</i> | Mme Pascale BARBIER, Mme Alexandrine BERTAUD, M. David BERGELFRANC, Mme Manon CARRE, Mme Caroline DUCROS, M. Philippe GARRIGUE, M. Guillaume HACHE, M. Thierry TERME |
| <i>Conseiller du Doyen :</i> | M. Patrice VANELLE, Mme Françoise DIGNAT-GEORGE |
| <i>Doyens honoraires :</i> | M. Patrice VANELLE, M. Pierre TIMON-DAVID, |
| <i>Professeurs émérites :</i> | M. José SAMPOL, M. Athanassios ILIADIS, M. Philippe CHARPIOT, M. Riad ELIAS |
| <i>Professeurs honoraires :</i> | M. Guy BALANSARD, M. Yves BARRA, Mme Claudette BRIAND, M. Jacques CATALIN, Mme Andrée CREMIEUX, M. Gérard DUMENIL, M. Alain DURAND, Mme Danielle GARÇON, M. Maurice JALFRE, M. Joseph JOACHIM, M. Maurice LANZA, M. Patrick REGLI, M. Jean-Claude SARI |
| <i>Chef des Services Administratifs :</i> | Mme Sylvie BUREAU |
| <i>Chef de Cabinet :</i> | Mme Manon BONIFAY |
| <i>Responsable de la Scolarité :</i> | Mme Nathalie BESNARD |

DEPARTEMENT BIO-INGENIERIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Philippe PICCERELLE

PROFESSEURS

BIOPHYSIQUE

M. Vincent PEYROT
M. Hervé KOVACIC
M. François DEVRED

GENIE GENETIQUE ET BIOINGENIERIE

M. Christophe DUBOIS

PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE, BIOPHARMACIE ET COSMETOLOGIE

M. Philippe PICCERELLE

MAITRES DE CONFERENCES

BIOPHYSIQUE

Mme Odile RIMET-GASPARINI
Mme Pascale BARBIER
Mme Manon CARRE
M. Gilles BREUZARD
Mme Alessandra PAGANO

GENIE GENETIQUE ET BIOTECHNOLOGIE

M. Eric SEREE-PACHA
Mme Véronique REY-BOURGAREL

PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE,
BIOPHARMACIE ET COSMETOLOGIE

M. Pierre REBOUILLON
M. Emmanuel CAUTURE
Mme Véronique ANDRIEU
Mme Marie-Pierre SAVELLI

BIO-INGENIERIE PHARMACEUTIQUE ET BIOTHERAPIES
PHARMACO ECONOMIE, E-SANTE

M. Jérémy MAGALON
Mme Carole SIANI
Mme Muriel MASI

ENSEIGNANT CDI

ANGLAIS

Mme Angélique GOODWIN

A.H.U.

PHARMACOTECHNIE

Mme Mélanie VELIER

DEPARTEMENT BIOLOGIE PHARMACEUTIQUE
Responsable : Professeur Françoise DIGNAT-GEORGE

PROFESSEURS

BIOLOGIE CELLULAIRE

M. Jean-Paul BORG

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE

Mme Françoise DIGNAT-GEORGE
Mme Laurence CAMOIN-JAU
Mme Florence SABATIER-MALATERRE
Mme Nathalie BARDIN
M. Romaric LACROIX

MICROBIOLOGIE

M. Jean-Marc ROLAIN
M. Philippe COLSON

PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET
ZOOLOGIE

Mme Nadine AZAS-KREDER

MAITRES DE CONFERENCES

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE

M. Edouard LAMY
Mme Alexandrine BERTAUD
Mme Claire CERINI
Mme Edwige TELLIER
M. Stéphane POITEVIN
Mme Sandra GHAYAD

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE

Mme Aurélie LEROYER
Mme Sylvie COINTE

MICROBIOLOGIE

Mme Anne DAVIN-REGLI
Mme Véronique ROUX
M. Fadi BITTAR
Mme Isabelle PAGNIER
Mme Sophie EDOUARD
M. Seydina Mouhamadou DIENE

PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET ZOOLOGIE

Mme Carole DI GIORGIO
M. Aurélien DUMETRE
Mme Magali CASANOVA
Mme Anita COHEN

BIOLOGIE CELLULAIRE
BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE

Mme Anne-Catherine LOUHMEAU
Mme Alexandra WALTON

A.H.U.

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE

Mme Amandine BONIFAY

MAITRES DE CONFERENCE ASSOCIES A TEMPS PARTIEL (M.A.S.T.)

PRATIQUE OFFICINALE

M. Jérôme JOUVE
Mme Emmanuelle TONNEAU-PFUG

DEPARTEMENT CHIMIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Patrice VANELLE

PROFESSEURS

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION

Mme Catherine BADENS

CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES

M. David BERGE-LEFRANC

CHIMIE THERAPEUTIQUE - CHIMIE MINERALE ET STRUCTURALE

M. Pascal RATHELOT
M. Maxime CROZET

CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE

M. Patrice VANELLE
M. Thierry TERME

PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE

Mme Sok Siya BUN

MAITRES DE CONFERENCES

| | |
|--|---|
| BOTANIQUE ET CRYPTOLOGAMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE | Mme Anne FAVEL M. Quentin ALBERT |
| CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION | Mme Catherine DEFOORT M. Alain NICOLAY Mme Estelle WOLFF Mme Elise LOMBARD Mme Camille DESGROUAS M. Charles DESMARCHELIER M. Mathieu CERINO |
| CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES | M. Duje BURIC M. Pascal PRINDERRE |
| CHIMIE THERAPEUTIQUE - CHIMIE MINERALE ET STRUCTURALE | Mme Sandrine ALIBERT Mme Caroline DUCROS M. Marc MONTANA Mme Manon ROCHE Mme Fanny MATHIAS |
| CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE HYDROLOGIE | M. Armand GELLIS M. Christophe CURTI Mme Julie BROGGI M. Nicolas PRIMAS M. Cédric SPITZ M. Sébastien REDON |
| PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE | Mme Valérie MAHIOU-LEDDET Mme Béatrice BAGHDIKIAN M. Elnur GARAYEV |

MAITRES DE CONFERENCE ASSOCIES A TEMPS PARTIEL (M.A.S.T.)

| | |
|---|--|
| CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES | Mme Haïfa LAYACHI RAHABI M. Cyril PUJOL |
| DROIT ET ETHIQUE | Mme Laurie PAHUS |
| GESTION PHARMACEUTIQUE, PHARMACOECONOMIE ET ETHIQUE PHARMACEUTIQUE OFFICINALE, DROIT ET COMMUNICATION PHARMACEUTIQUES A L'OFFICINE ET GESTION DE LA PHARMAFAC | Mme Félicia FERRERA |
| DISPOSITIFS MEDICAUX | Mme Valerie MINETTI-GUIDONI |

DEPARTEMENT MEDICAMENT ET SECURITE SANITAIRE

Responsable : Professeur Benjamin GUILLET

PROFESSEURS

| | |
|----------------------------------|---|
| PHARMACIE CLINIQUE | M. Stéphane HONORÉ |
| PHARMACODYNAMIE | M. Benjamin GUILLET |
| TOXICOLOGIE ET PHARMACOCINETIQUE | M. Bruno LACARELLE M. Joseph CICCOLINI |
| TOXICOLOGIE GENERALE | Mme Caroline SOLAS-CHESNEAU |

MAITRES DE CONFERENCES

| | |
|----------------------------------|--|
| PHARMACIE CLINIQUE | M. Florian CORREARD Mme Marie-Anne ESTEVE |
| PHARMACODYNAMIE | M. Guillaume HACHE Mme Ahlem BOUHLEL M. Philippe GARRIGUE |
| PHYSIOLOGIE | Mme Sylviane LORTET |
| PHYSIOLOGIE / PHARMACOLOGIE | Mme Anaïs MOYON |
| TOXICOLOGIE ET PHARMACOCINETIQUE | Mme Raphaëlle FANCIULLINO Mme Florence GATTACECCA Mme Anne RODALLEC M. Nicolas FABRESSE |
| TOXICOLOGIE GENERALE | M. Pierre-Henri VILLARD |

A.H.U.

| | |
|-----------------------------|--|
| PHYSIOLOGIE / PHARMACOLOGIE | M. Vincent NAIL |
| PHARMACIE CLINIQUE | Mme Maeva MONTALEYTANG Mme Charlotte BERARD |

CHARGES D'ENSEIGNEMENT A LA FACULTE

Mme Valérie AMIRAT-COMBRALIER, Pharmacien-Praticien hospitalier
M. Pierre BERTAULT-PERES, Pharmacien-Praticien hospitalier
Mme Martine BUES-CHARBIT, Pharmacien-Praticien hospitalier
Mme Annie CILIA, Pharmacien-Praticien hospitalier
M. Yann COTTE, Pharmacien Assistant
M. Nicolas COSTE, Pharmacien-Praticien hospitalier
Mme Nicole FRANCOIS, Pharmacien-Praticien hospitalier
Mme Sophie GENSOLLEN, Pharmacien-Praticien hospitalier
M. Sylvain GONNET, Pharmacien titulaire
Mme Céline HIRSCH, Pharmacien Conseil de l'Assurance Maladie
Mme Christelle LABRANDE, Pharmacien-Praticien hospitalier
Mme Florence LEANDRO-DIJON, Pharmacien adjoint
Mme Nathalie MARTIN, Pharmacien-Praticien hospitalier
Mme Sophie MERLIN, Pharmacien Assistant
Mme Vanessa METZ, Pharmacien hospitalier
Mme Alice PERINEAU, Pharmacien Assistant
Mme Florence PEYRON, Pharmacien-Praticien hospitalier
M. Stéphane PICHON, Pharmacien titulaire
M. Bertrand POURROY, Pharmacien-Praticien hospitalier
Mme Clémence TABELLE, Pharmacien-Praticien attaché
M. Badr Eddine TEHHANI, Pharmacien – Praticien hospitalier
M. Joël VELLOZZI, Expert-Comptable

Mise à jour le 23 février 2023

« L'Université n'entend donner aucune approbation, ni improbation aux opinions émises dans les thèses. Ces opinions doivent être considérées comme propres à leurs auteurs. »

Remerciements

Aux membres du Jury,

À monsieur le Professeur Patrice VANELLE

De me faire l'honneur de présider ce jury et d'évaluer ma thèse. Je vous remercie de m'accorder de votre temps en ce jour si important. Veuillez trouver ici l'expression de mon grand respect et de ma reconnaissance.

À monsieur le Professeur Christophe CURTI

Pour m'avoir donné l'opportunité de travailler sur ce sujet très intéressant. Je vous remercie de m'avoir fait confiance et de m'avoir accompagnée au cours de la réalisation de ce travail. Votre disponibilité et vos conseils m'ont été très précieux. Vous êtes pour moi un exemple de rigueur et d'exigence, j'espère que vous serez fier du résultat final. Je vous remercie également pour tout ce que vous m'avez appris pendant mon semestre au SCQIP. Soyez assuré de ma plus grande reconnaissance.

À monsieur le Docteur Christophe JEAN

Pour ton implication, ton aide et tes encouragements durant la réalisation de cette thèse. Un grand merci aussi pour m'avoir accueillie six mois au préparatoire, pour la bienveillance dont tu fais toujours preuve à mon égard et pour m'avoir transmis tes connaissances. Que ceci soit le témoignage de mon profond respect et de ma gratitude.

À madame le Docteur Anita COHEN

De me faire l'honneur de siéger dans ce jury. Je vous suis très reconnaissante de l'intérêt que vous avez porté à mon travail. Veuillez recevoir l'expression de mes sentiments respectueux.

À mes parents,

À toi **maman**, pour le soutien inconditionnel que tu m'apportes depuis le début, pour toujours croire en moi, même quand moi je n'y crois plus, pour chercher des solutions à tous mes problèmes et rendre mes mauvais jours moins mauvais, et surtout pour ton amour pudique mais démesuré. Je n'aurais jamais réussi sans toi.

À toi **papa**, pour être le meilleur papa qu'un enfant puisse avoir, un père dévoué, toujours prêt à tout pour rendre sa famille heureuse. Je te suis reconnaissante pour tous tes conseils des plus aux moins avisés, pour ton recul philosophique mais surtout pour tous les rires et toutes les attentions que tu m'apportes au quotidien. Je te remercie aussi d'avoir pris le temps de relire ce travail.

Maman, Papa, je vous remercie de nous avoir élevés Mathieu, Nicolas et moi dans le bonheur dans lequel a baigné notre enfance et de nous avoir transmis les valeurs qui portent notre famille. Je vous suis profondément reconnaissante de nous avoir aiguillés et encouragés sans nous mettre de pression. Ma réussite aujourd'hui je vous la dois. Je vous aime tellement et je suis fière d'être votre fille.

À Frédéric,

À toi mon amour, mon meilleur ami, à nos six années passées ensemble, à notre complicité. Je te remercie pour tout le soutien que tu m'apportes et tout particulièrement au cours de cette année difficile. Merci de rendre ma vie si lumineuse, de prendre soin de moi comme tu le fais, d'apaiser mes angoisses et mes chagrins, de me faire sourire au quotidien. Je suis comblée à tes côtés. Je t'aime.

À ma famille

À mes frères **Mathieu et Nicolas**, des jumeaux si différents mais si complémentaires. Grandir avec vous a été ma meilleure expérience. J'ai tant appris à vos côtés, en passant par toutes les émotions ! Que notre complicité demeure notre force à travers le temps et les kilomètres. Je suis très fière d'être votre grande sœur.

À mon **Papi Jacques**. Je te remercie pour tout l'amour et la force que tu m'apportes depuis mon enfance. Pour ton sens de l'écoute, ta générosité et ta créativité. À tous les mercredis que j'ai passés avec Mamie et toi. Je tiens aussi à dédier cette thèse à ma **Mamie Aline** qui aurait été si heureuse d'être là pour la concrétisation de mes années d'études. Je suis comblée de pouvoir célébrer cet évènement dans ce lieu qu'elle affectionnait tant.

À **Stéphane**, merci pour ta gentillesse et ton soutien. À tous ces bons moments qu'on passe ensemble depuis qu'on est tout petits et à tous nos futurs souvenirs.

À toute ma famille, à mes grands-parents, mes tantes, mes oncles, ma cousine et mes cousins.

À ma belle famille

Sabine, Barbara, Carine, Nicolas, merci de m'avoir si bien intégrée dans votre famille. Je vous remercie pour le soutien discret mais réel dont vous avez fait preuve durant toutes ces années d'études. Je vous suis reconnaissante pour toutes les soirées jeux, les Noëls sous des montagnes de cadeaux, les anniversaires pleins de bonbons et de faire de chaque évènement une occasion de s'amuser.

À mes amis,

À **Lili**, ma meilleure amie. À toi qui as été là dans toutes les évolutions de ma vie, qui m'as conseillée et soutenue dans chacun de mes choix ! À notre colocation qui aura marqué un tournant de notre amitié, à toutes nos confidences, notre confiance, nos rires, nos souvenirs, à nos appels qui durent des heures mais sont si salvateurs, aux chats, aux écuries de Fontmagne et au chocolat rouge. Je n'ai pas de sœur de sang mais tu es ma sœur de cœur. Et dire que je t'ai suivie en PACES, cette carrière au fond je te la dois !

À **Marion**, une merveilleuse amie, mon troisième mousquetaire. Merci pour tous ces supers souvenirs que nous avons créés ensemble depuis nos 11 ans. Grandir (pas beaucoup) et mûrir à tes côtés a été un vrai plaisir. À cette amitié chère à mon cœur.

Aux Coupines, **Sophie, Pauline, Ophélie, Audrey V, Séverine, Angèle, Audrey D, Caroline**, merci à chacune de vous d'être toujours présente depuis toutes ces années, d'être compréhensive quand je ne donne pas de nouvelles pendant des mois et d'être bienveillante quoi qu'il arrive. À tous ces bons moments passés à vos côtés et à notre amitié tenace ! Oh oui, j'ai souvent entendu qu'on ne garde pas ses amies du collège parce que chacune est destinée à évoluer dans sa propre direction... Mais nous voilà, 16 ans plus tard presque au complet ! Je pense que ce groupe est bien la preuve qu'on peut évoluer dans sa propre direction mais ensemble. À notre passé, notre présent et notre futur.

À **Loanne**, merci pour ton grand cœur et ton sens de l'humour. Tu es un vrai rayon de soleil. J'espère que notre amitié demeurera solide à travers le temps, avec toujours cette petite touche enfantine et réconfortante qui la caractérise.

À ma binôme **Mélanie**, merci d'avoir rendu ces années de fac inoubliables. À tous nos rires, nos fou-rires, nos pleurs aussi ! C'est maintenant avec un peu de nostalgie que je repense à nos TP, merci d'y avoir apporté autant de sérieux que d'amusement. À notre équipe de folie, à notre amitié.

À ma coloc **Annabelle**. Merci à toi de m'avoir choisie pour être ta colocataire. Cette année là tu es entrée aussi bien dans mon appartement que dans mon cœur. De simple coloc au début, je suis ravie de pouvoir te compter aujourd'hui parmi mes véritables amis. À nos soirées filles, aux films avec Katherine Heigl, aux sushis et au vin blanc.

Aux hérissons de Manosque. **Jules, Fanny, Natacha et Nayan**, je suis tellement heureuse d'avoir passé mon premier semestre d'internat à vos côtés. Co-internes, colocs, mais surtout amis, vous aurez toujours une place particulière dans ma mémoire et dans mon cœur.

À mes co-internes...

L'équipe de Nord, **Camille, Tiffany, Marine, Jeremy, Antonin** et les tous les autres, merci pour ces blagues, ces fou-rires et toutes ces viennoiseries. À Cyril !

L'équipe de Sud, **Patrick**, pour la co-élaboration de notre fameuse DDS mousse, et bien sûr **Lucile, Laurie et Guillaume**. Aux CMR, à Cimaise, aux planches d'étiquettes, au cirque, à la perruche sous EDTA et aux blaireaux !

Pierre et Céleste pour ce fabuleux semestre au SCQIP, et toutes ces bonnes rigolades. Aux quiches aux poireaux, aux petites bières, à l'osmomètre-doudou et à notre petite **Cloni**.

Adil, pour ces deux semestres de galère commune et pour toutes nos différences qui font notre complémentarité. Merci de m'avoir supportée (dans les deux sens du terme) tout au long de l'élaboration de cette thèse. À nos voitures !

... Et tout particulièrement ceux qui sont passés au SCQIP après moi, qui ont risqué de faire une overdose aux β -bloquants ! Je vous suis vraiment reconnaissante d'avoir contribué à l'obtention des résultats essentiels à ce travail et de m'avoir toujours tenue informée.

Aux techniciennes du SCQIP, **Nathalie, Stéphanie, Véronique et Emmanuelle**. Je vous remercie pour votre aide et votre disponibilité pendant mon stage au laboratoire ainsi que durant la réalisation de cette thèse. La pédagogie dont vous faites preuve est une grande qualité !

À l'équipe de **Louis Raffalli**, ma toute première expérience en tant qu'interne. Je vous remercie de m'avoir donné le goût du métier et d'avoir fait preuve de tant de bienveillance à mon égard. Je suis ravie de vous retrouver en novembre prochain. À très vite !

À l'ensemble des équipes avec qui j'ai eu l'honneur de travailler. Je vous remercie pour ce que chacun a su m'apporter professionnellement mais aussi humainement.

Table des matières

| | |
|---|----|
| Remerciements..... | 8 |
| Table des matières..... | 12 |
| Liste des abréviations..... | 17 |
| Liste des figures..... | 19 |
| Liste des tableaux..... | 21 |
| Introduction générale..... | 23 |
| Partie I : β -bloquants généralités et préparations hospitalières en pédiatrie..... | 25 |
| I. Généralité sur les β -bloquants..... | 25 |
| 1. Historique..... | 25 |
| 2. Mécanisme d'action..... | 25 |
| 3. Structure chimique..... | 27 |
| 4. Relation structure-activité..... | 30 |
| 5. Propriétés pharmacocinétiques..... | 30 |
| 6. Effets indésirables..... | 32 |
| II. Préparations hospitalières à l'AP-HM..... | 32 |
| 1. Préparations pharmaceutiques..... | 32 |
| a. Définitions..... | 32 |
| b. Cadre législatif..... | 34 |
| c. Bonnes Pratique de Préparation (BPP)..... | 34 |
| 2. Préparatoire central de l'AP-HM..... | 35 |
| a. Locaux et équipements..... | 35 |
| i. Préparatoire non stérile..... | 35 |
| ii. Préparatoire stérile..... | 36 |
| iii. Zone de stockage..... | 37 |
| b. Personnel..... | 37 |
| i. Missions..... | 38 |
| ii. Habilitations..... | 39 |
| c. Activité..... | 39 |
| 3. Laboratoire de contrôle de la qualité..... | 41 |
| a. Missions et personnel..... | 42 |
| b. Locaux et équipements..... | 43 |

| | | |
|---|---|----|
| III. | Indications thérapeutiques en pédiatrie dans la littérature et à l'AP-HM..... | 44 |
| 1. | Bétaxolol..... | 44 |
| a. | À l'AP-HM..... | 44 |
| b. | Littérature..... | 44 |
| 2. | Bisoprolol..... | 46 |
| a. | À l'AP-HM..... | 46 |
| b. | Littérature..... | 47 |
| 3. | Nadolol..... | 49 |
| a. | À l'AP-HM..... | 49 |
| b. | Littérature..... | 50 |
| Partie II : Mise au point d'une suspension buvable de Nadolol à 10 mg/mL en préparation hospitalière..... | | 53 |
| I. | Mise au point de la forme galénique..... | 53 |
| 1. | Décision de développement d'une préparation hospitalière de Nadolol..... | 53 |
| 2. | Choix de la forme galénique et du dosage..... | 53 |
| 3. | Choix de la formulation..... | 54 |
| a. | Principe actif..... | 54 |
| b. | Véhicule..... | 55 |
| II. | Mise au point de la méthode de dosage par HPLC-UV..... | 57 |
| 1. | Référentiels..... | 57 |
| a. | Pharmacopées..... | 57 |
| i. | Pharmacopée Européenne..... | 57 |
| ii. | Pharmacopée Française (PhFr)..... | 57 |
| iii. | Pharmacopée Américaine (USP)..... | 58 |
| b. | Recommandations ICH..... | 58 |
| c. | Guide du GERPAC..... | 58 |
| 2. | La chromatographie liquide haute performance..... | 59 |
| a. | Principes généraux..... | 59 |
| b. | Paramètres théoriques..... | 60 |
| c. | Paramètres de l'HPLC..... | 63 |
| d. | Préparation de la phase mobile..... | 64 |
| 3. | Validation de la méthode de dosage..... | 64 |
| a. | Linéarité..... | 64 |
| b. | Précision..... | 66 |
| i. | Répétabilité..... | 66 |
| ii. | Fidélité intermédiaire..... | 66 |
| c. | Justesse..... | 67 |

| | | |
|---|--|----|
| d. | Spécificité et étude de dégradation forcée | 67 |
| i. | En présence d'agent oxydant | 68 |
| ii. | Par exposition à la chaleur..... | 68 |
| iii. | En présence d'Acide..... | 69 |
| iv. | En présence de Base | 70 |
| v. | Par exposition à la lumière | 70 |
| vi. | Interprétation | 71 |
| 4. | Dosage en routine..... | 71 |
| a. | Préparation des CQ (Contrôles Qualités)..... | 71 |
| b. | Conformité du standard..... | 72 |
| c. | Conformité du système | 72 |
| d. | Préparation des échantillons..... | 73 |
| e. | Interprétation du chromatogramme..... | 73 |
| III. | Mise au point des tests microbiologiques | 74 |
| 1. | Dénombrements microbiens (DGAT et DMLT) | 74 |
| a. | Méthode par filtration + α -amylase..... | 75 |
| b. | Applicabilité de la méthode en présence du produit..... | 76 |
| i. | Préparation du diluant + α -amylase | 77 |
| ii. | Préparation des échantillons pour ensemencement bactériologique | 78 |
| iii. | Préparation des échantillons pour ensemencement mycologique | 79 |
| iv. | Ensemencements | 79 |
| v. | Validation de la méthode | 80 |
| vi. | Résultats | 81 |
| c. | Réalisation en routine..... | 81 |
| i. | Préparation des échantillons..... | 81 |
| ii. | Interprétation des résultats..... | 82 |
| 2. | Germes spécifiques | 83 |
| IV. | Études de stabilité et DLU | 84 |
| 1. | Déroulement de l'étude | 84 |
| 2. | Résultats | 85 |
| Partie III : étude de stabilité du Bisoprolol et du Bétaxolol en suspensions buvables après modification de leur formule..... | | 86 |
| I. | Contexte : pourquoi ce changement de formule ?..... | 86 |
| II. | Plan de l'étude..... | 87 |
| III. | Stabilité physico-chimique..... | 88 |
| 1. | Dosage..... | 88 |
| a. | Conditions d'analyse des suspensions de Bétaxolol et de Bisoprolol | 88 |

| | | |
|------|--|-----|
| i. | Paramètres de l'HPLC | 89 |
| ii. | Préparation de la phase mobile..... | 89 |
| iii. | Préparation des CQ..... | 89 |
| iv. | Conformité du standard secondaire..... | 90 |
| v. | Conformité du système : System Suitability test (SST)..... | 91 |
| vi. | Préparation des échantillons..... | 92 |
| b. | Études de dégradations forcées | 92 |
| c. | Résultats..... | 94 |
| i. | Bétaxolol..... | 94 |
| ii. | Bisoprolol..... | 98 |
| 2. | pH..... | 101 |
| a. | Détermination potentiométrique du pH | 101 |
| b. | Résultats..... | 102 |
| i. | Bétaxolol..... | 102 |
| ii. | Bisoprolol..... | 103 |
| 3. | Viscosité..... | 103 |
| a. | Méthode du viscosimètre rotatif | 104 |
| b. | Résultats..... | 106 |
| i. | Bétaxolol..... | 106 |
| ii. | Bisoprolol..... | 107 |
| IV. | Stabilité microbiologique..... | 108 |
| 1. | Applicabilité de la méthode en présence du produit..... | 108 |
| a. | Ensemencements..... | 109 |
| b. | Validation de la méthode..... | 111 |
| c. | Résultats..... | 111 |
| 2. | DGAT et DMLT par dénombrement sur plaque..... | 116 |
| a. | Protocole | 116 |
| b. | Résultats..... | 117 |
| 3. | Efficacité de la conservation antimicrobienne | 118 |
| a. | Méthode d'analyse | 118 |
| i. | Préparation des souches | 118 |
| ii. | Préparation des échantillons..... | 119 |
| iii. | Ensemencements | 120 |
| b. | Résultats..... | 121 |
| i. | Bétaxolol..... | 121 |
| ii. | Bisoprolol..... | 121 |

| | | |
|----|--|-----|
| 4. | Conclusion et attribution des DLU | 122 |
| a. | Bétaxolol | 122 |
| b. | Bisoprolol..... | 122 |
| V. | Suspension buvable de β -bloquants – Libération de lot | 124 |
| 1. | Préparation et échantillonnage au préparatoire | 124 |
| 2. | Contrôles au SCQIP | 125 |
| 3. | Libération du lot au préparatoire..... | 126 |
| | Conclusion générale..... | 127 |
| | Bibliographie..... | 128 |
| | Annexes..... | 133 |

Liste des abréviations

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

ANSM : Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé

AP-HM : Assistance Publique des Hôpitaux de Marseille

ARS : Agence Régionale de Santé

ASI : Activité Sympathomimétique Intrinsèque

BPF : Bonnes Pratiques de Fabrication

BPP : Bonnes Pratiques de Préparation

CDER : Center for Drug Evaluation and Research

CMR : Cancérigènes, Mutagènes et Reprotoxiques

CQ : Contrôle Qualité

CSP : Code de la Santé Publique

DDS : Décontamination Digestive Sélective

DLU : Date Limite d'Utilisation

EDQM : Direction Européenne de la Qualité du Médicament et soins de santé

EMA : Écart Maximal Acceptable

FDA : Food and Drug Administration

GERPAC : Groupe d'Évaluation et de Recherche sur la Protection en Atmosphère Contrôlée

HPLC : Chromatographie en Phase Liquide Haute performance

IC : Insuffisance Cardiaque

ICH : Conseil International pour l'Harmonisation des exigences techniques relatives aux produits pharmaceutiques à usage humain

IEC : Inhibiteur de l'Enzyme de Conversion

JO : Journal Officiel

JP : Pharmacopée Japonaise

LCQ : Laboratoire de Contrôle de la Qualité

MPUP : Matières Premières à Usage Pharmaceutique

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PE : Pharmacopée Européenne

PH : Préparation Hospitalière

PhFr : Pharmacopée Française

PM : Préparation Magistrale

PP : Préparations Pharmaceutique

PPH : Préparateur en Pharmacie Hospitalière

PSM : Poste de Sécurité Microbiologique

PUI : Pharmacie à Usage Intérieur

SAB : Sabouraud

SST : System Suitability Test

TSA : Trypticase Soja

TSV : Tachycardie Supraventriculaire

TVC : Tachycardie Ventriculaire Catécholinergique

UFC : Unité Formant Colonie

USP : US Pharmacopeia

ZAC : Zone à Atmosphère Contrôlée

Liste des figures

| | |
|---|----|
| Figure 1 : Structure chimique des β -stimulants | 28 |
| Figure 2 : Structure chimique du Propranolol..... | 28 |
| Figure 3 : Structure chimique des 2 familles chimiques des β -bloquants..... | 28 |
| Figure 4 : Structure chimique du bétaxolol, du bisoprolol et du nadolol..... | 29 |
| Figure 5 : Stéréoisomères de la molécule de nadolol..... | 29 |
| Figure 6 : Plan du préparatoire non stérile | 36 |
| Figure 7 : Plan du préparatoire stérile | 37 |
| Figure 8 : Répartition des préparations hospitalières par formes galéniques | 40 |
| Figure 9 : Nombre de lots de préparations magistrales effectuées en garde..... | 41 |
| Figure 10 : Plan du SCQIP..... | 43 |
| Figure 11 : Table de compatibilité entre les différents Syrspend® du laboratoire FAGRON et une liste de principes actifs..... | 56 |
| Figure 12 : Schéma du principe d'une chaîne HPLC..... | 60 |
| Figure 13 : Schématisation du t_m et du t_r sur un chromatogramme..... | 61 |
| Figure 14 : Schématisation des plateaux théoriques dans une colonne | 62 |
| Figure 15: Schématisation de la résolution des pics en fonction de la valeur de R..... | 63 |
| Figure 16 : Chromatogramme du nadolol dégradé dans l'eau oxygénée | 68 |
| Figure 17 : Chromatogramme du nadolol dégradé par la température | 69 |
| Figure 18 : Chromatogramme du nadolol dégradé dans l'acide chlorhydrique | 69 |
| Figure 19 : Chromatogramme du nadolol dégradé dans la soude..... | 70 |
| Figure 20 : Chromatogramme du nadolol dégradé par les UV | 70 |
| Figure 21 : CQ de nadolol à 200 $\mu\text{g/mL}$ | 74 |
| Figure 22 : Système de filtration Microsart® | 75 |
| Figure 23 : Gélose Microsart® @media..... | 76 |
| Figure 24 : Bioball® | 77 |
| Figure 25 : Schématisation des flacons de Lethen broth échantillons pour ensemencements bactériologiques | 78 |
| Figure 26 : Schématisation des flacons de Lethen broth échantillons pour ensemencements mycologiques | 79 |
| Figure 27 : Produits de dégradation du bétaxolol | 93 |
| Figure 28 : Produits de dégradation du bisoprolol..... | 93 |

| | |
|---|-----|
| Figure 29 : Bétaxolol J ₀ | 94 |
| Figure 30 : Bétaxolol J ₆₀ | 95 |
| Figure 31 : Expression du dosage des suspensions de bétaxolol aux différents temps de mesure en pourcentage de déviation par rapport à la concentration initiale avec représentation de l'IC95%.... | 97 |
| Figure 32 : Bisoprolol J ₀ | 98 |
| Figure 33 : Bisoprolol J ₉₀ | 99 |
| Figure 34 : Expression du dosage des suspensions de bisoprolol aux différents temps de mesure en pourcentage de déviation par rapport à la concentration initiale avec représentation de l'IC95%.. | 100 |
| Figure 35 : pH-mètre <i>FiveEasy</i> de <i>METTLER TOLEDO</i> | 101 |
| Figure 36 : Schéma du mécanisme d'un viscosimètre rotatif..... | 104 |
| Figure 37 : Matériel de mesure de la viscosité d'un échantillon de faible volume sur viscosimètre Brookfield DV1M..... | 105 |
| Figure 38 : Représentation schématique des ensemencements bactériologiques | 110 |
| Figure 39 : Représentation schématique des ensemencements mycologiques | 110 |
| Figure 40 : Témoin souche de <i>Staphylococcus aureus</i> à J3 | 111 |
| Figure 41 : Témoin souche de <i>Bacillus subtilis</i> à J3 | 112 |
| Figure 42 : Témoin souche de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> à J3 | 112 |
| Figure 43 : Témoin souche de <i>Candida albicans</i> à J5 | 114 |
| Figure 44 : Témoin souche d' <i>Aspergillus brasiliensis</i> à J5 | 114 |
| Figure 45 : Souche titrée EZ PEC de <i>C. albicans</i> | 119 |
| Figure 46 : Étiquettes des préparations hospitalières de bisoprolol et de bétaxolol | 125 |

Liste des tableaux

| | |
|--|-----|
| Tableau 1 : Effets des β -bloquants sur les différents récepteurs β -adrénergiques | 26 |
| Tableau 2 : β -bloquants commercialisés en France | 27 |
| Tableau 3 : Évolution du nombre de préparations hospitalières disponibles à l'AP-HM | 39 |
| Tableau 4 : Nombre de lots de préparations hospitalières fabriqués ces dernières années | 40 |
| Tableau 5 : Tests pharmacologiques couplés avec bétaxolol de l'étude de la sécrétion de la GH..... | 45 |
| Tableau 6 : Protocole d'augmentation progressive des doses de bisoprolol | 46 |
| Tableau 7 : Composition du Syrspond® SF PH4 liquide neutre..... | 55 |
| Tableau 8 : Paramètres de la méthode de dosage HPLC du nadolol..... | 63 |
| Tableau 9 : Aires des pics des chromatogrammes correspondants aux 7 différents niveaux des 6 différentes gammes | 65 |
| Tableau 10 : Biais relatifs correspondants aux différents niveaux des 6 gammes | 65 |
| Tableau 11 : Répétabilité de la méthode de dosage du nadolol | 66 |
| Tableau 12 : Fidélité intermédiaire de la méthode de dosage du nadolol | 66 |
| Tableau 13 : Justesse de la méthode de dosage du nadolol..... | 67 |
| Tableau 14 : Critères d'acceptation du SST du nadolol..... | 73 |
| Tableau 15 : Récapitulatif du nombre de colonies dénombrées sur chacune des géloses..... | 81 |
| Tableau 16 : Plan de l'étude de stabilité des préparations hospitalières de nadolol | 85 |
| Tableau 17 : Fréquence de prélèvement en fonction des durées des études de stabilité..... | 88 |
| Tableau 18 : Paramètres de la méthode de dosage HPLC du bisoprolol et du bétaxolol..... | 89 |
| Tableau 19 : Critères d'acceptation du SST du bétaxolol..... | 91 |
| Tableau 20 : Critères d'acceptation du SST du bisoprolol | 91 |
| Tableau 21 : Résultats des dosages de la concentration en mg/mL des suspensions buvables de bétaxolol dans chacune des conditions de conservation à chacun des temps de mesure..... | 96 |
| Tableau 22 : Résultats des dosages de la concentration en mg/mL des suspensions buvables de bisoprolol dans chacune des conditions de conservation à chacun des temps de mesure | 100 |
| Tableau 23 : Moyennes des mesures de viscosité en cP des suspensions buvables de bétaxolol dans différentes conditions de conservation à chacun des temps de mesure | 107 |
| Tableau 24 : Moyennes des mesures de viscosité en cP des suspensions buvables de bisoprolol dans différentes conditions de conservation à chacun des temps de mesure | 107 |
| Tableau 25 : Résultats des ensemencements bactériologiques avec le bétaxolol | 113 |
| Tableau 26 : Résultats des ensemencements bactériologiques avec le bisoprolol | 113 |

| | |
|---|-----|
| Tableau 27 : Résultats des ensemencements mycologiques avec le bétaxolol | 115 |
| Tableau 28 : Résultats des ensemencements mycologiques avec le bisoprolol | 115 |
| Tableau 29 : Résultats des dénombrements microbiologiques des suspensions buvables de bétaxolol | 117 |
| Tableau 30 : Résultats des dénombrements microbiologiques des suspensions buvables de bisoprolol | 118 |
| Tableau 31 : Critères d'acceptation pour les formes orales | 120 |
| Tableau 32 : Contaminations théoriques aux différents temps d'analyse..... | 120 |
| Tableau 33 : Nombre de lots de préparations hospitalières de β -bloquants analysés par année..... | 124 |

Introduction générale

Les pharmacies à usage intérieur (PUI) ont pour mission de répondre aux besoins pharmaceutiques des patients pris en charge au sein des établissements de santé en assurant la qualité et la sécurité du circuit du médicament [1]. Pourtant, par manque d'essais cliniques menés chez l'enfant, tant pour des raisons éthiques que des problèmes de faible rentabilité économique, l'arsenal thérapeutique ayant une autorisation de mise sur le marché (AMM) pour la pédiatrie reste limité. C'est pourquoi depuis de nombreuses années, le recours à la prescription hors AMM est très souvent évoqué dans la population pédiatrique aussi bien à l'hôpital [2] qu'en ambulatoire [3]. Elle se définit par la prescription d'une indication, d'un dosage, d'une voie d'administration ou pour une population qui ne respectent pas les conditions fixées par l'AMM.

Néanmoins, les spécialités pharmaceutiques commercialisées pour les adultes ont souvent une forme galénique, un dosage ou des excipients inadaptés à la prise en charge thérapeutique des enfants. C'est le cas de nombreux médicaments du système cardiovasculaire dont le bisoprolol, le nadolol et le bétaxolol, commercialisés avec les spécialités en comprimés Cardensiel[®], Corgard[®] et Kerlone[®]. L'absence de spécialités pharmaceutiques disponibles et adaptées à l'usage pédiatrique a contraint les PUI à réaliser des préparations magistrales et hospitalières. Les préparatoires des pharmacies de ville fabriquent quant à eux des préparations officinales afin d'assurer une continuité des soins à la sortie d'hospitalisation.

À l'AP-HM le recours aux préparations hospitalières est privilégié pour limiter la réalisation de préparations magistrales et sécuriser les pratiques. Elles sont fabriquées au préparatoire central de la PUI de l'hôpital de Sainte Marguerite puis contrôlées par le Service Central de la Qualité et de l'Information Pharmaceutique (SCQIP) avant leur libération.

Pour cette thèse nous avons travaillé sur les préparations hospitalières de β -bloquants disponibles à l'AP-HM. Les différents objectifs de ce travail ont été de développer une suspension buvable de nadolol pour le service de cardiopédiatrie de l'hôpital de la Timone et de d'améliorer la stabilité microbiologique des suspensions de bisoprolol et bétaxolol afin d'assurer la sécurité des patients.

Dans une première partie, nous aborderons les généralités avec un rappel des définitions et des réglementations qui encadrent les préparations pharmaceutiques, nous présenterons le préparatoire central et le laboratoire de contrôle de la qualité de l'AP-HM, puis argumenterons avec des revues de la littérature les indications thérapeutiques des préparations hospitalières de β -bloquants disponibles pour nos services de soins.

Dans un second temps nous détaillerons les étapes de développement d'une préparation hospitalière de Nadolol en suspension buvable concentrée à 10 mg/mL, de la mise au point galénique, à la validation des tests de contrôle de la qualité physicochimique et microbiologique.

Enfin, dans une troisième et dernière partie nous déterminerons par des études de stabilité, la date limite d'utilisation des préparations hospitalières de bisoprolol et bétaxolol, après amélioration de leur formulation galénique.

Partie I : β -bloquants généralités et préparations hospitalières en pédiatrie

I. Généralité sur les β -bloquants

1. Historique

La première substance bêtabloquante, la dichloroisoprénaline, a été découverte en 1958 par Norton et Perkins qui ont montré que cette substance inhibe les effets stimulants cardiaques de l'adrénaline, d'où leur proposition de nommer cette classe « bloqueurs adrénériques » [4]. Cette substance analogue de l'isoprénaline présente la particularité d'avoir des effets opposés aux siens comme le démontrent les travaux de C.E. Powell et Irwin H. Slater [5].

S'inspirant de ces travaux, ainsi que de la théorie des récepteurs développée en 1948 par le pharmacologue américain Raymond P. Ahlquist suggérant que l'action de l'adrénaline et de la noradrénaline résultait de sa liaison à des « récepteurs » cellulaires, le pharmacologue britannique James W. Black développa en collaboration avec le chimiste John S. Stephenson des molécules exerçant une activité antagoniste sur les récepteurs β -adrénériques [6]. Le pronétholol synthétisé en 1960 n'a jamais été utilisé en médecine humaine car il présentait des effets cancérogènes chez la souris [7]. Il a été écarté au profit du propranolol, chef de file de la famille des β -bloquants, commercialisé en 1964 sous le nom d'Inderal[®], encore utilisé en clinique et qui reste une substance de référence. James W. Black a obtenu le Prix Nobel de physiologie ou médecine en 1988 pour cette découverte.

2. Mécanisme d'action

Il existe deux types de récepteurs adrénériques dont les ligands naturels sont l'adrénaline et la noradrénaline : les récepteurs α -adrénériques et les récepteurs β -adrénériques. Les β -bloquants constituent une famille de médicaments antagonistes compétitifs spécifiques des récepteurs β -adrénériques, appartenant à la famille des récepteurs couplés aux protéines G et qui comportent une structure à sept domaines transmembranaires [8].

On retrouve trois sous-types de récepteurs β adrénériques en fonction de leur localisation [9] [10] :

- **Les récepteurs β_1** sont présents :
 - Au niveau du myocarde : leur stimulation entraîne une accélération de la fréquence cardiaque par augmentation de l'activité du nœud sinusal (effet chronotrope +), une augmentation de la contractilité myocardique (effet inotrope +), une accélération de la conduction atrio-ventriculaire (effet dromotrope +) et une augmentation de l'excitabilité ventriculaire (effet bathmotrope +) entraînant ainsi une augmentation de la consommation en O_2 du myocarde et donc de ses besoins.
 - Au niveau de l'appareil juxtaglomérulaire rénal : leur stimulation déclenche la sécrétion de rénine entraînant une rétention hydrosodée par activation du système rénine angiotensine aldostérone, ayant ainsi un effet hypertenseur.
 - Au niveau de l'œil : leur stimulation entraîne la sécrétion d'humeur aqueuse.
- **Les récepteurs β_2** sont présents :
 - Au niveau des cellules musculaires lisses des vaisseaux, des bronches et de l'utérus gravidé : leur stimulation entraîne une vasodilatation, une bronchodilatation et une relaxation de l'utérus.
 - Au niveau du foie : leur stimulation entraîne une augmentation de la glycogénolyse et ainsi de la glycémie.
- **Les récepteurs β_3** sont présents au niveau des adipocytes, leur stimulation favorise la lipolyse par stimulation de la lipase qui hydrolyse les triglycérides en acides gras.

Le blocage de ces récepteurs par des molécules antagonistes entraîne les effets inverses soit :

| Au niveau des récepteurs β_1 | Au niveau des récepteurs β_2 | Au niveau des récepteurs β_3 |
|---|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> ▪ Diminution des besoins en O_2 du myocarde et diminution du débit cardiaque et de la pression artérielle par effets inotrope -, chronotrope -, dromotrope - et bathmotrope - ▪ Hypotension par baisse de la volémie ▪ Diminution de la pression intraoculaire par diminution de sécrétion de l'humeur aqueuse | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Vasoconstriction ▪ Bronchoconstriction ▪ Hypoglycémie | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Hypertriglycémie et diminution du HDL cholestérol |

Tableau 1 : Effets des β -bloquants sur les différents récepteurs β -adrénergiques

Certains β -bloquants sont dits **cardiosélectifs**, c'est-à-dire qu'ils agissent sélectivement sur les récepteurs β_1 , limitant les effets liés au blocage des β_2 (vasoconstriction, bronchoconstriction, résistance à l'insuline et symptômes d'hypoglycémie masqués). Cette sélectivité diminue cependant avec l'augmentation des doses [8].

Enfin, certains β -bloquants possèdent un effet agoniste partiel des récepteurs β , appelé **activité sympathomimétique intrinsèque** (ASI). Cette ASI limite les effets bradycardisants et le risque d'aggravation d'un syndrome de Raynaud.

Ces deux propriétés sont intéressantes car elles limitent les effets indésirables des β -bloquants, permettant leur utilisation relative chez les patients diabétiques, asthmatiques, atteints de BPCO ou du syndrome de Raynaud.

Les β -bloquants sont donc classés en fonction de leur sélectivité ou non pour les récepteurs β_1 et de la présence ou non d'une ASI [9] :

| Cardiosélectifs | | Non cardiosélectifs | |
|--|--------------------------|--|-----------------------|
| Sans ASI | Avec ASI | Sans ASI | Avec ASI |
| Aténolol Bétaxolol Bisoprolol Esmolol Landiolol Métoprolol Nébivolol | Acébutolol Céliprolol | Carvédilol Labétalol Nadolol Propranolol Sotalol Tertatolol Timolol | Cartéolol Pindolol |

Tableau 2 : β -bloquants commercialisés en France

Enfin, par blocage des récepteurs β -adrénergiques et notamment des récepteurs β_1 , cette classe de molécules possède également des **propriétés antiarythmiques** de classe II de Vaughan-Williams, à l'exception du sotalol dont l'effet antiarythmique est amiodarone-like (classe III) par allongement de la durée de la repolarisation ventriculaire [11].

3. Structure chimique

Les neuromédiateurs impliqués dans la stimulation des récepteurs adrénérergiques sont l'adrénaline et la noradrénaline. Leur structure est composée d'un noyau catéchol (ortho-hydroxy-phénol) substitué par une structure éthanolamine. L'amine terminale est substituée par un groupement méthyl pour l'adrénaline, alors qu'on retrouve une amine terminale primaire dans la structure de la noradrénaline.

À côté de ces deux ligands naturels, l'isoprénaline, prototype des β -stimulants, a été développée en substituant au niveau de la fonction amine le méthyl de l'adrénaline ou l'hydrogène de la noradrénaline par un motif isopropyl [12].

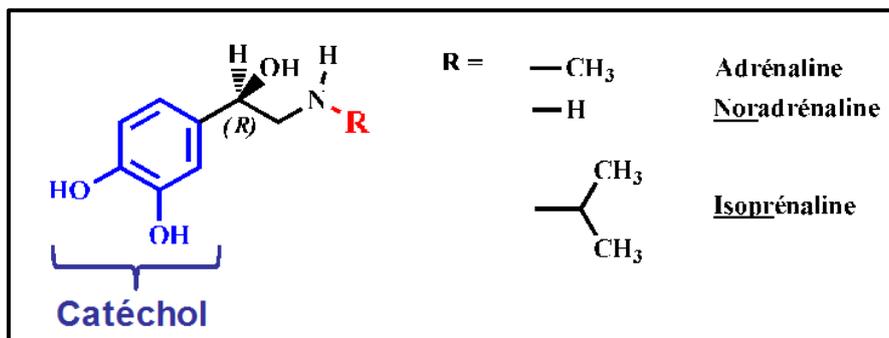


Figure 1 : Structure chimique des β -stimulants

Le propranolol, chef de file des β -bloquants ressemble beaucoup à l'isoprénaline, cependant le noyau catéchol a été remplacé par un noyau naphthalène relié à la chaîne éthanolamine par une fonction éther oxyde.

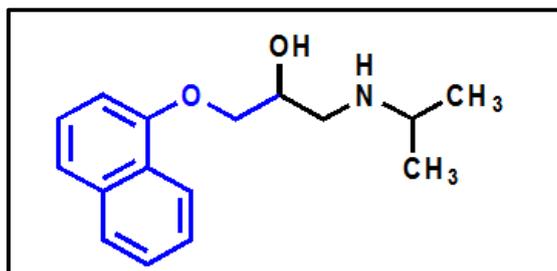


Figure 2 : Structure chimique du Propranolol

De nouveaux dérivés ont ensuite été développés. On peut les raccrocher à deux familles chimiques en fonction de la nature du substituant de la fonction éthanolamine [12] :

- Les Aryl-éthanolamines pour lesquels le suffixe de la DCI est « -alol »
- Les Aryl-oxypropanolamines pour lesquels le suffixe de la DCI est « -olol »

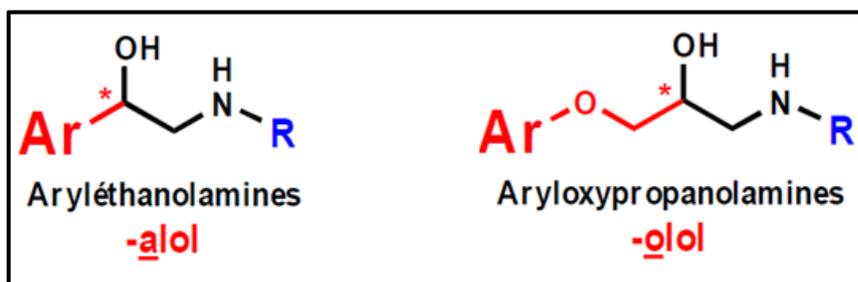


Figure 3 : Structure chimique des 2 familles chimiques des β -bloquants

On remarque que le carbone qui supporte la fonction alcool est un **carbone asymétrique** : dans la majorité des cas les β -bloquants sont commercialisés sous forme de **mélanges racémiques**. Seul l'isomère lévogyre détient l'activité β -bloquante, s'expliquant par analogie structurale avec la noradrénaline qui est de configuration lévogyre. [13]

Enfin, à part quelques exceptions près (carvédilol, labétalol), le substituant de la fonction aminée est un groupement isopropyle ou un groupement tertibutyle.

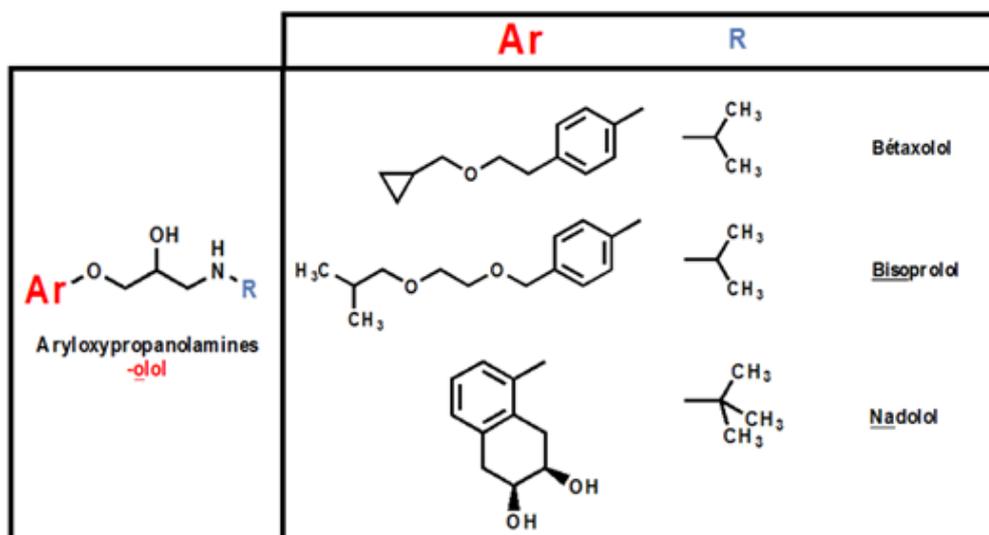


Figure 4 : Structure chimique du bétaxolol, du bisoprolol et du nadolol

Le bisoprolol et le bétaxolol sont des dérivés aryl-oxypropanolamines avec un noyau benzénique substitué en para et leur fonction amine est substituée par un groupement isopropyle.

Le nadolol est, comme son chef de file, un dérivé aryl-oxypropanolamine avec un carbocycle polycyclique. Dérivé du propranolol, le cycle naphthalène a été partiellement réduit en tétrahydronaphthalène, substitué par deux fonction hydroxyle. Sa fonction amine est en revanche substituée par un groupement tertio-butyle. D'un point de vue stéréochimique, la réduction du noyau confère à la molécule de nadolol **2 centres asymétriques supplémentaires**, soit 3 au total. Le nadolol est ainsi présent sous forme d'un **mélange de 4 stéréoisomères** formant 2 composés racémiques de 2 couples d'énantiomères RSR, SRS / RRS, SSR [14]. Ceci explique la présence de 2 pics en HPLC.

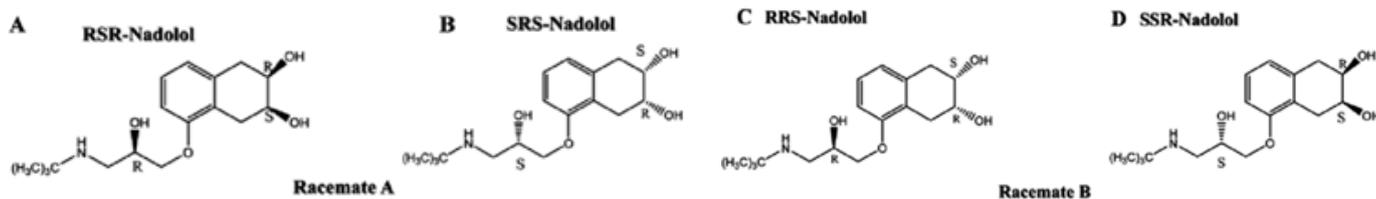


Figure 5 : Stéréoisomères de la molécule de nadolol

4. Relation structure-activité

L'affinité des β -bloquants pour les récepteurs β -adrénergiques résulte de la parentalité de structure avec les catécholamines. En effet la fonction éthanolamine est indispensable à l'activité de ces molécules, permettant différents points d'ancrage sur le récepteur [12] :

- Le **noyau benzénique** qui interagit avec une poche hydrophobe par des interactions π
- La **fonction alcool** qui interagit par liaison hydrogène
- La **fonction aminée** souvent présente sous forme salifiée « ammonium » qui interagit avec un site anionique du récepteur β -adrénergique

L'activité est également modifiée par la **nature du substituant de l'amine** [12] :

- Lorsqu'il s'agit d'un « petit groupement » (hydrogène ou méthyl des catécholamines) les molécules sont des ligands à la fois des récepteurs β -adrénergiques mais aussi des récepteurs α -adrénergiques par manque de sélectivité.
- Lorsqu'il s'agit d'un groupement de taille plus importante (isopropyle ou tertio-butyle) les molécules deviennent sélectives des récepteurs β -adrénergiques.

Enfin l'activité est modulée par la **nature du groupement aryle et ses substituants** [12]. En effet les β -bloquants substitués en position para au niveau du noyau benzénique par un groupement permettant la formation de liaisons hydrogène supplémentaires avec le récepteur β -adrénergique, deviennent cardio-sélectifs (sélectivité des récepteurs β -1).

5. Propriétés pharmacocinétiques

Les propriétés pharmacocinétiques des β -bloquants peuvent être très différentes d'une molécule à l'autre. En effet, certains β -bloquants présentent un profil plutôt lipophile (propranolol, métoprolol) alors que d'autres ont un profil plutôt hydrophile (sotalol, aténolol, nadolol) et la plupart auront un profil intermédiaire (bisoprolol, céliprolol, pindolol, nébivolol). Cette différence de solubilité entraîne des répercussions sur toutes les étapes du devenir du médicament dans l'organisme [10] :

- **Absorption** : les β -bloquants les plus lipophiles sont bien résorbés au niveau digestif mais ils subissent un effet de premier passage hépatique important rendant leur biodisponibilité orale assez variable. Inversement les β -bloquants plus hydrophiles sont moins bien résorbés par voie orale mais ne subissent pas d'effet de premier passage hépatique, leur biodisponibilité orale est supérieure à 50% et assez stable.

- **Distribution** : les molécules les plus lipophiles ont une forte distribution tissulaire avec franchissement des barrières hémato-encéphalique et fœto-placentaire mais également un pourcentage de fixation aux protéines plasmatiques plus élevé que celui des β -bloquants hydrophiles.
- **Métabolisme et élimination** : les β -bloquants à profil hydrophile ne subissent pas de métabolisme hépatique et sont éliminés sous forme inchangée par voie urinaire. Leur demi-vie est plutôt longue. Inversement, les principes actifs les plus lipophiles subissent un métabolisme hépatique notamment par le cytochrome CYP 2D6 et une élimination mixte dans les fèces et par voie rénale sous forme inactive. Ils ont une demi-vie plutôt courte.

Il existe une forte variabilité interindividuelle sur la pharmacocinétique des β -bloquants comme le démontre l'étude de F. N. Ågesen et al. [15]. En effet des différences interindividuelles telles que la perméabilité intestinale, la liaison aux protéines plasmatiques, le métabolisme hépatique ou encore l'insuffisance rénale font varier les paramètres ADME des β -bloquants. Le carvedilol, le métoprolol, le nébivolol et le propranolol ont fait l'objet d'un grand nombre d'études présentant une variabilité pharmacocinétique élevée, tandis que l'aténolol, le bisoprolol, le labétalol, le nadolol, le pindolol et le sotalol ont présenté une variabilité faible ou modérée.

Un paramètre majeur à prendre en compte est le degré de métabolisation par cytochrome p450 2D6 des β -bloquants au profil lipophile. En effet, leur métabolisme hépatique dépend des interactions avec des inhibiteurs ou des inducteurs du CYP 2D6, entraînant une augmentation des effets indésirables avec les premiers et d'une inefficacité thérapeutique avec les seconds. Une étude menée par T. Walley et al. [16] décrit l'inefficacité du métoprolol lorsqu'il est associé à la fluoxétine, inducteur du cytochrome p450 2D6. L'efficacité du métabolisme par le CYP 2D6 dépend également de l'expression du gène codant pour cette enzyme qui est très polymorphe, c'est pourquoi différents profils de métaboliseurs ont été identifiés. Une méta-analyse réalisée par C. Blake et al. a étudié la variabilité de la cinétique du métoprolol en fonction des 4 profils métaboliseurs (métaboliseurs ultra-rapides, bons métaboliseurs, métaboliseurs intermédiaires et faibles métaboliseurs) [17]. Exposés à une dose régulière de métoprolol, les métaboliseurs ultra-rapides peuvent être confrontés à une inefficacité thérapeutique, alors qu'inversement le risque d'effets indésirables est accru chez les mauvais métaboliseurs.

6. Effets indésirables

Des effets indésirables mineurs **gastro-intestinaux** comme des nausées, vomissements, douleurs gastriques, diarrhées ou encore constipations ont été décrits occasionnellement avec tous les β -bloquants. D'autres effets bénins assez fréquents à l'initiation du traitement sont notables comme **l'asthénie transitoire** ou encore une **irritabilité**.

Cependant, la plupart des effets indésirables induits par les β -bloquants sont étroitement liés à leur activité pharmacologique. En effet, on peut retrouver au niveau **cardiaque** une bradycardie sévère, une hypotension artérielle, des arythmies, mais également la possibilité de décompensation d'une insuffisance cardiaque. Ils peuvent également être à l'origine d'effets indésirables **vasculaires** dont les plus fréquents sont un refroidissement des extrémités voire un syndrome de Raynaud ainsi que des dysfonctions érectiles. Des effets indésirables sont aussi fréquents au niveau du **système respiratoire** avec des bronchospasmes et crises d'asthme. Les β -bloquants peuvent être à l'origine d'effets **métaboliques** telles que les dyslipidémies mais surtout une majoration de l'hypoglycémie diabétique dont les signes adrénérgiques annonciateurs se retrouvent masqués. Ils sont aussi responsables de manifestations **cutanées** telles que des éruptions psoriasiformes par blocage des récepteurs β_2 cutanés générant une prolifération des kératinocytes et une diminution de leur différenciation [19].

Enfin, à cause du passage de la BHE, des effets indésirables **neurologiques** peuvent également être induits par les β -bloquants lipophiles dont les plus fréquents sont des insomnies et des cauchemars.

II. Préparations hospitalières à l'AP-HM

1. Préparations pharmaceutiques

a. Définitions

En raison de l'absence de spécialité disponible ou adaptée, des préparations pharmaceutiques (PP) peuvent être réalisées par les officines et les PUI des établissements de santé (ES). Il s'agit des préparations magistrales (PM) et des préparations hospitalières (PH).

Les PM sont réalisées par les officines et les PUI, à partir d'une ordonnance, pour un patient donné. Les PH sont en revanche fabriquées uniquement en PUI, en petites séries et dispensées sur ordonnance pour un ou plusieurs patients de l'ES. Elles sont préparées à l'avance et sont soumises à des contrôles de qualité.

Juridiquement, les préparations pharmaceutiques sont définies dans l'article L5121-1 du Code de la Santé Publique (CSP) [20].

« On entend par :

Préparation magistrale, tout médicament préparé selon une prescription médicale destinée à un malade déterminé lorsqu'il n'existe pas de spécialité pharmaceutique adaptée ou disponible, y compris du fait de l'absence de commercialisation effective, disposant d'une autorisation de mise sur le marché, de l'une des autorisations ou d'un cadre de prescription compassionnelle mentionnés aux articles L. 5121-9-1, L. 5121-12 et L. 5121-12-1 , 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 ; »

- **Préparation hospitalière**, 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, lorsqu'il n'existe pas de spécialité pharmaceutique adaptée ou disponible, y compris du fait de l'absence de commercialisation effective, disposant d'une autorisation de mise sur le marché, de l'une des autorisations ou d'un cadre de prescription compassionnelle mentionnés aux articles L. 5121-9-1, L. 5121-12 et L. 5121-12-1 , 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. »

La fabrication de préparations magistrales est une mission obligatoire des PUI, alors que la réalisation de préparations hospitalières est une activité optionnelle des PUI soumise à une autorisation par l'Agence Régionale de Santé (ARS) et devant faire l'objet d'une déclaration à l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé (ANSM).

b. Cadre législatif

Le cadre législatif des préparations est défini par le Code de la Santé Publique. La notion de PUI dans les établissements de santé a été introduite en 1992 avec la loi n° 92-1279 promulguée le 8 décembre. L'**article R5126-9** du CSP [21] concerne les missions des PUI, dont le décret actuellement en vigueur est le **décret n°2019-489** du 21 mai 2019, qui vient en application de l'ordonnance n°2016-1729 du 15 décembre 2016 prise à la suite de la loi du 26 janvier 2016 de modernisation de notre système de santé. Désormais, d'après l'**article R5126-33** [22] modifié par le décret du 24 mai 2019, la réalisation de préparations hospitalières est considérée comme une activité comportant des risques particuliers, nécessitant une autorisation délivrée par les autorités compétentes. Cette autorisation a une durée de validité de sept ans depuis l'application du **décret n°2022-18** du 7 janvier 2022.

c. Bonnes Pratique de Préparation (BPP)

D'après l'article L.5121-5 du CSP, la préparation des médicaments doit être réalisée conformément aux bonnes pratiques de préparation [23]. Il s'agit d'un texte de référence élaboré par l'ANSM, opposable, destiné aux pharmaciens de ville et aux PUI et dont l'application est régie par une publication au JO.

Depuis le 20 septembre 2023, la version en vigueur est **l'édition 2023**, remplaçant ainsi l'édition de 2007. En effet, ce référentiel a été révisé par un comité scientifique regroupant pharmaciens hospitaliers, officinaux, inspecteurs et universitaires, ainsi qu'à partir de propositions formulées lors de consultations publiques, aboutissant à une version actualisée plus détaillée que la précédente. Les chapitres ont également été réarrangés pour se calquer sur la première partie des Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF) destinées à l'industrie pharmaceutique.

La version 2023 des BPP [24] se compose de neuf **chapitres généraux** décrivant les conditions opérationnelles et environnementales à prendre en compte lors de la réalisation de PP, de quatre **lignes directrices** apportant des éléments complémentaires spécifiques à certains types de préparations, et de **documents annexes** sous forme de fiches exemples constituant une aide à la mise en place de ces bonnes pratiques.

2. Préparatoire central de l'AP-HM

Depuis 2013, le pôle pharmacie de l'AP-HM a décidé d'harmoniser et de centraliser la production des préparations pharmaceutiques dans un préparatoire central et de développer la fabrication de préparations hospitalières. Le préparatoire central des hôpitaux Sud approvisionne les autres PUI de l'AP-HM soit celle de la Timone, de la Conception, de l'hôpital Nord et celle du centre pénitentiaire des Baumettes, ainsi que d'autres hôpitaux avec lesquels une convention de sous-traitance a été signée. Cette démarche s'inscrit dans une volonté de sécuriser la production des préparations, et ce face à une demande croissante des services de soins.

a. Locaux et équipements

À ce jour, le préparatoire central se situe dans les locaux de l'hôpital de Sainte Marguerite. Il est composé de 2 pièces distinctes constituant le préparatoire non stérile et le préparatoire stérile. Conformément aux BPP, les locaux sont adaptés en fonction du type de préparations réalisées, les surfaces de travail sont lisses et imperméables, facilement nettoyables et le stockage du matériel et des produits est pensé pour éviter le risque de confusion et de contaminations croisées [24].

i. Préparatoire non stérile

Le préparatoire non stérile est une pièce à pression atmosphérique, découpée en quatre zones de préparation réservées aux différentes formes pharmaceutiques : une pour la réalisation des suspensions buvables, une pour les décontaminations digestives sélectives (DDS), une pour les gélules et une, sous hotte aspirante, pour la réalisation des préparations cancérigènes-mutagènes-reprotoxiques (CMR). Au niveau du matériel on retrouve au niveau de la zone de pesée deux tables de pesées munies de leur balance de précision étalonnée. Il y a dans la zone de lavage un laveur-désinfecteur et deux éviers en corian intégrés aux paillasses, dont un double bac muni de robinets à jet d'eau automatique et équipés de filtres antibactériens, avec un suivi assuré par une société prestataire. On retrouve également une compteuse semi-automatique pour le conditionnement des gélules et un mélangeur de poudres. De nombreuses zones de stockage sont présentes, matérialisées par des placards en hauteurs pour le matériel et les MPUP (PA, excipients solides et liquide, véhicules liquides) dont un placard réservé aux principes actifs CMR, et des placards bas pour les articles de conditionnement (flacons de différents volumes, gélules vides et pots) et les équipements de protection individuelle (charlottes, surblouses, masques et gants) et champs stériles. Une armoire sécurisée renferme les différents jeux de pièces pour les géluliers automatiques à 300.

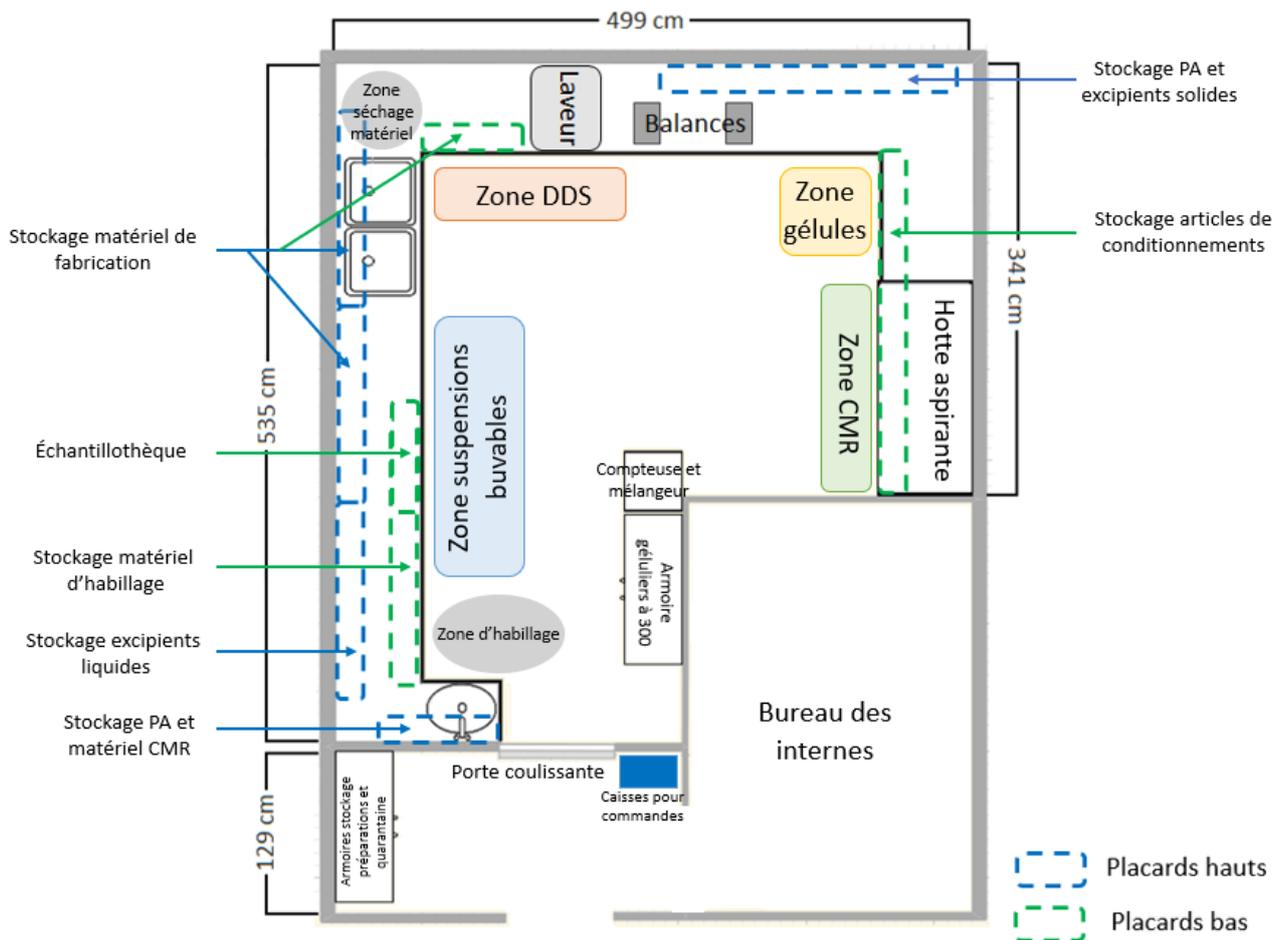


Figure 6 : Plan du préparatoire non stérile

ii. Préparatoire stérile

Le préparatoire stérile se situe à l'étage de la PUI. C'est une zone à atmosphère contrôlée (ZAC) en surpression de 16 PA, dans laquelle les préparations stériles sont réalisées sous une hotte à flux laminaire classée ISO 5 et définie en classe B pour les particules et en classe A pour la microbiologie. Il est accessible par un sas d'habillage et de décontamination qui a deux portes non asservies mais qui ne doivent jamais être ouvertes simultanément. On trouve dans le sas un évier pour le lavage des mains ainsi qu'un meuble de réserve des consommables nécessaires à la préparation des collyres (seringues de différents volumes, aiguilles, filtres, solutés pour dilution, compresses, ...) et des équipements de protection individuelle (charlottes, surblouses, masques, gants non stériles et gants stériles). Tout le matériel qui entrera sous le PSM est préalablement décontaminé à l'alcool à 70°.

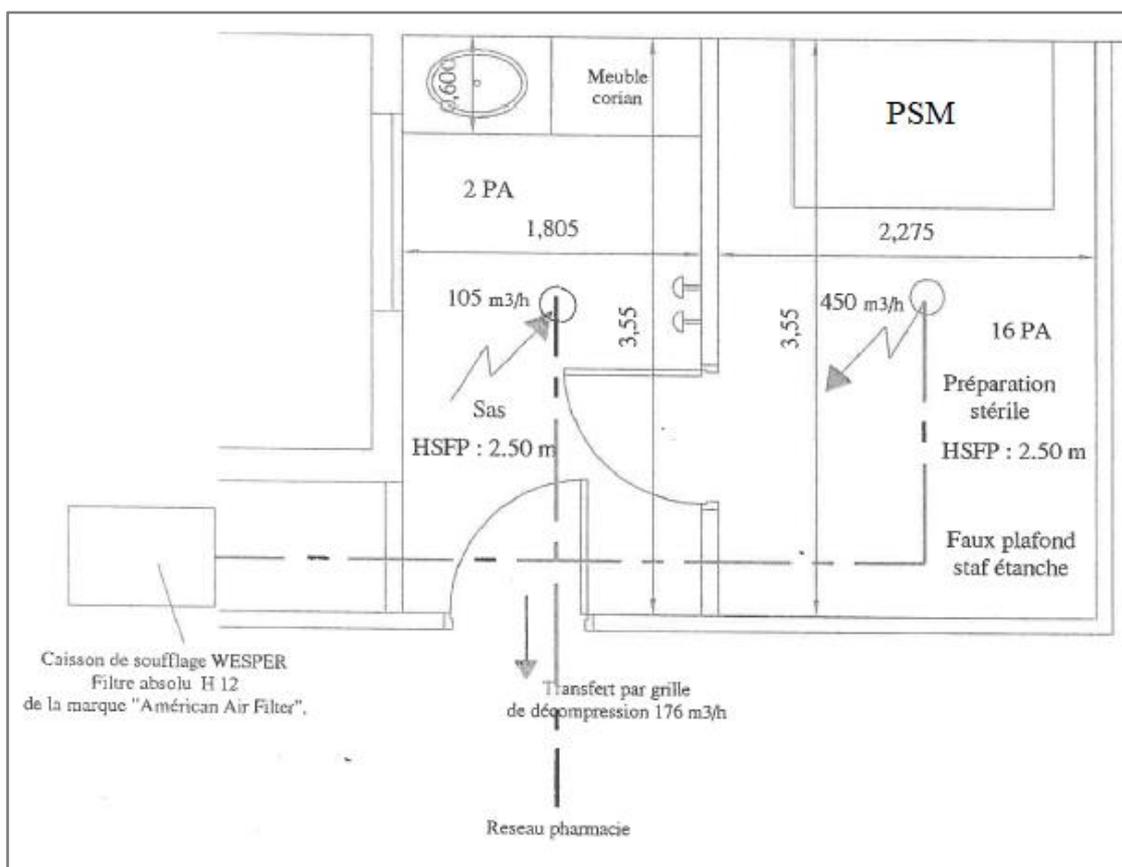


Figure 7 : Plan du préparatoire stérile

iii. Zone de stockage

Les zones de stockage des préparations hospitalières se situent en dehors des zones de préparation. Les préparations conservées au réfrigérateur sont stockées dans la chambre froide de la PUI : les préparations en attente de libération sont sur une étagère de quarantaine alors que les préparations libérées et entrées en stock sont rangées séparément par ordre alphabétique et par lots. Le même type de stockage est réalisé pour les préparations stockées à température ambiante, dans une armoire à l'extérieur du préparatoire non stérile.

b. Personnel

D'après les BPP, « La mise en place et le maintien d'un système d'assurance de la qualité satisfaisant, de même que la qualité de la réalisation des préparations, reposent sur l'implication de l'ensemble du personnel. Pour cette raison, la pharmacie dispose d'un personnel qualifié, en nombre suffisant pour mener à bien toutes les tâches qui lui incombent. Il convient de leur assurer une formation au poste de travail et une formation continue permettant notamment, de connaître les instructions d'hygiène et de sécurité en rapport avec l'activité exercée. » [24]

Le personnel dédié au préparatoire de Sainte Marguerite comprend :

- Un pharmacien responsable des préparations (1 ETP)
- Deux internes (1 ETP chacun)
- Un préparateur en pharmacie hospitalière (PPH) (0,8 ETP)
- Deux externes (0,5 à 1 ETP en fonction des filières de formation)

i. Missions

Le pharmacien est responsable de la libération des préparations (après fabrication pour contrôle puis après contrôle pour l'entrée en stock et dispensation), des commandes des matières premières et du matériel (de conditionnement et de fabrication), de la maintenance technique des locaux et équipements, de la qualité de l'air, ainsi que de l'amélioration continue de la qualité des préparations et de la mise à jour des procédures en collaboration avec l'équipe du préparatoire. Il est également responsable du suivi du stock des préparations hospitalières en association avec les internes et des commandes préparées par les internes pour l'approvisionnement des différents hôpitaux qu'il signe après vérification. Il supervise aussi la réalisation des préparations pour les essais cliniques.

Les internes sont responsables du suivi du stock physique et informatique des préparations hospitalières et de l'organisation de leur production en fonction des consommations. Ils réalisent le double-contrôle lors de la production des préparations et gèrent le suivi des dossiers de lots. Ils fabriquent principalement les préparations stériles en ZAC mais peuvent aussi participer à la production des préparations non stériles. Ils sont responsables de l'envoi des échantillons au SCQIP et du suivi de la quarantaine puis de l'entrée en stock après libération. Ils gèrent les commandes de préparations hospitalières pour les autres hôpitaux. Ils sont également responsables de la réception des matières premières, soit leur mise en quarantaine après avoir réalisé un aliquot (pour l'échantillothèque du SCQIP), analyse du certificat de conformité, recueil des bulletins d'analyse de conformité établi par le LCQ, enregistrement sur le registre, et mise en circuit avec numéro d'ordre.

Le PPH est responsable de la production et de l'échantillonnage des préparations planifiées, stériles et non stériles, y compris des préparations pour les essais cliniques. Il est responsable de l'inventaire hebdomadaire des consommables.

Les externes sont responsables de la production et de l'échantillonnage des préparations non stériles planifiées et réalisent hebdomadairement l'inventaire des préparations hospitalières. Sous supervision, ils assistent internes et PPH dans la réalisation des préparations stériles.

ii. Habilitations

Sous la responsabilité du pharmacien responsable des préparations, tous les membres du personnel reçoivent une formation appropriée aux missions qui leurs sont attribuées. La formation du personnel est documentée et réévaluée périodiquement. [24]

Tout le personnel du préparatoire réalise des **préparations non stériles type gélules** pour lesquelles il doit recevoir une habilitation préalable. Il en est de même pour les internes prenant des gardes à Sainte Marguerite qui peuvent être amenés à réaliser des préparations magistrales pour l'hôpital de la Timone en dehors de horaires d'ouverture de la PUI. Cette habilitation se déroule de la façon suivante : l'agent réalise un lot de gélules de mélatonine dosées à 2 mg puis 45 gélules sont envoyées au SCQIP avec un bon de demande d'analyse pour qualification. Le SCQIP réalise sur ce lot des analyses répondant aux exigences de la Pharmacopée Européenne soit l'uniformité de teneur [25] sur 10 gélules par dosage en chromatographie liquide, l'uniformité de masse [26] sur 20 gélules par pesées destructrices et un dénombrement microbien [27] sur 2 gélules par ensemencement direct sur gélose Trypticase-soja et Sabouraud. L'agent obtient le certificat d'habilitation (Annexe 1) si tous les tests sont conformes aux exigences PE.

Les internes et les PPH amenés à réaliser des **préparations stériles** sont habilités par le test de remplissage aseptique (TRA). Cette habilitation permet rendre compte des éventuelles contaminations issues lors de différentes manipulations effectuées par l'opérateur. Le test consiste en la réalisation de différentes manipulations en ZAC sous PSM, devant être aseptiques, réalisées lors de la fabrication réelle des collyres en utilisant un milieu de culture tout le long du test comme vecteur d'efficacité. Les flacons issus des différentes manipulations sont envoyés au SCQIP pour essai de stérilité, le bouillon utilisé est quant à lui soumis à un test de fertilité. Si tous les résultats sont conformes, l'opérateur est habilité.

c. Activité

Préparations hospitalières

Depuis la mise en place d'un préparatoire central, la production de préparations hospitalières a augmenté d'année en année. Il y avait 2 PH en 2014 contre 65 en 2023. Le listing des préparations hospitalières disponibles à l'AP-HM en 2023 est visible en Annexe 2.

| | 2014 | 2015 | 2016 | 2017 | 2018 | 2019 | 2020 | 2021 | 2022 | 2023 |
|----------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Préparations hospitalières | 2 | 6 | 15 | 19 | 30 | 38 | 46 | 50 | 59 | 65 |

Tableau 3 : Évolution du nombre de préparations hospitalières disponibles à l'AP-HM

L'augmentation de l'activité du préparatoire se traduit par l'augmentation de la diversité des PH mais aussi par le nombre de lots produits par an. Le nombre de lots produits a quasiment doublé entre 2019 et 2023 comme illustré dans le tableau ci-dessous.

| | 2019 | 2020 | 2021 | 2022 |
|------|------|------|------|------|
| Lots | 340 | 455 | 606 | 630 |

Tableau 4 : Nombre de lots de préparations hospitalières fabriqués ces dernières années

Les différentes préparations hospitalières couvrent différentes formes galéniques pour différentes voies d'abord. En effet, sont produites pour la voie orale des formes sèches (gélules et sachets) et des formes aqueuses (solutions et suspensions) ainsi du gel pour la DDS. Il y a également une forme liquide huileuse destinée aussi bien à la voie orale qu'à la voie rectale (mélange aux 2 huiles). Pour la voie topique on retrouve des préparations stériles (collyres) et des préparations non stériles sous forme solide (pommade) et liquide (solutions cutanées)

Les 65 préparations hospitalières actuellement disponibles se répartissent de la façon suivante :

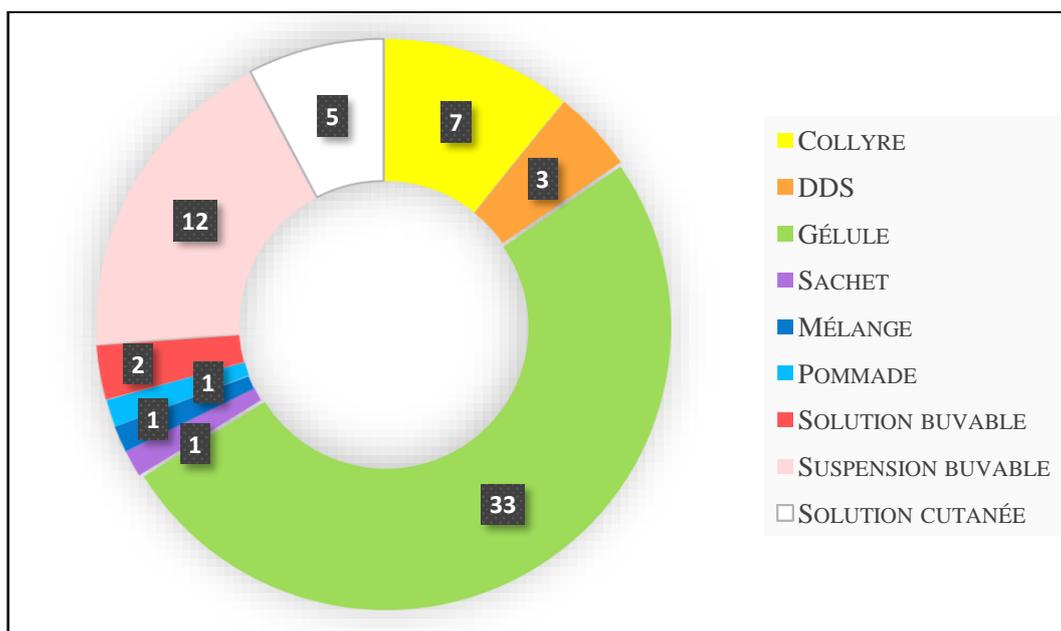


Figure 8 : Répartition des préparations hospitalières par formes galéniques

Préparations magistrales

L'activité du préparatoire de Sainte Marguerite comprend également la réalisation de préparations magistrales pour les hôpitaux Sud, le centre pénitentiaire des Baumettes et les hôpitaux conventionnés. De plus, l'interne de garde de Sainte Marguerite réalise les préparations magistrales pour l'hôpital de la Timone en dehors de horaires d'ouverture du préparatoire de la Timone.

Cette activité en garde tend à décroître ces dernières années, car des PH sont développées pour les principes actifs dont des PM sont fabriquées régulièrement. Par conséquent les besoins en PM diminuent.

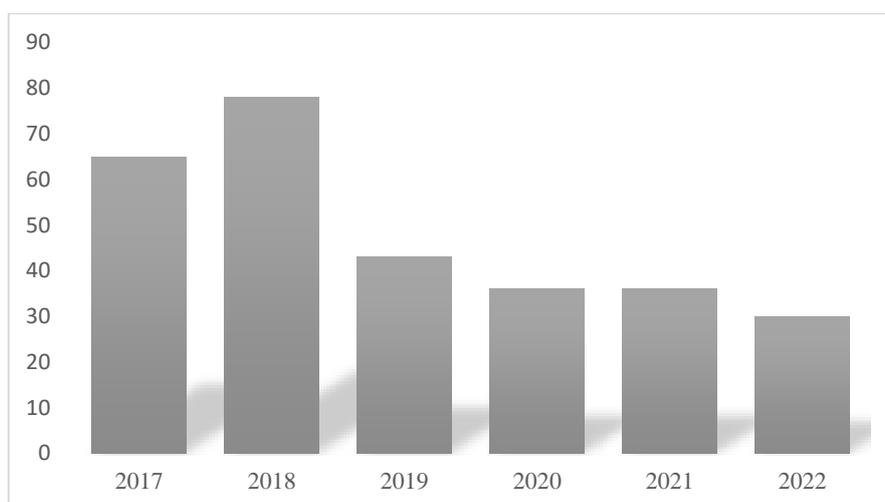


Figure 9 : Nombre de lots de préparations magistrales effectuées en garde

Préparations de β -bloquants

Concernant les β -bloquants, sont produites à ce jour 2 préparations hospitalières, non stériles, destinées à la voie orale, sous forme de suspensions buvables. Il s'agit du **bisoprolol hémifumarate à 0,5 mg/mL** et du **bétaxolol chlorhydrate à 1 mg/mL**.

De plus, la réalisation de préparation magistrale de nadolol étant un besoin régulier, nous étudierons dans la partie II de cette thèse l'exemple de la mise au point de la préparation hospitalière de **nadolol**.

3. Laboratoire de contrôle de la qualité

Dans le chapitre 6 « Contrôle de la qualité pharmaceutique », les BPP stipulent qu'un contrôle doit être réalisé sur les préparations hospitalières terminées. Les contrôles pouvant être mis en œuvre afin d'assurer la qualité des préparations pharmaceutiques sont [24] :

- Des contrôles de recevabilité documentaire (MPUP, réactifs, étalons de référence...)
- Des contrôles physico-chimiques
- Des contrôles pharmacotechniques
- Des contrôles microbiologiques
- Des contrôles de l'environnement (air, surfaces, eau)
- Et tous autres contrôles jugés nécessaires

À l'AP-HM, les contrôles sont réalisés par le laboratoire de contrôle de la qualité du service central de la qualité et de l'information pharmaceutique.

a. Missions et personnel

Le Service Central de la Qualité et de l'Information Pharmaceutiques (SCQIP) de l'AP-HM est l'une des activités mutualisées intégrées dans le Pôle Pharmacie de l'AP-HM [28].

Ses missions concernent :

- La coordination de la démarche qualité du pôle pharmacie : contrat de bon usage, circuit du médicament
- L'information pharmaceutique
- Le contrôle de qualité des produits de santé par le Laboratoire de Contrôle de la Qualité (LCQ)
- L'évaluation technique des réactifs et consommables de laboratoires

Nous n'aborderons dans cette thèse que le contrôle des préparations hospitalières, réalisé par le LCQ dont l'équipe dédiée est constituée de :

- Un pharmacien responsable des préparations (1,1 ETP)
- Trois internes (3 ETP)
- Quatre techniciennes de laboratoire (2 ETP sur le contrôle des préparations)
- Un agent administratif (0,5 ETP sur le contrôle des préparations)
- Deux externes (0,5 à 1 ETP chacun en fonction des filières de formation)

L'activité du laboratoire comprend les contrôles en routine des préparations hospitalières envoyées par le préparatoire de Sainte Marguerite, les études de stabilité, la revalidation et la mise en place de nouvelles méthodes de dosage et de microbiologie, mais aussi la qualification des équipements de stérilisation, les contrôles environnementaux et les tests de conformité des prises de gaz médicaux.

Les contrôles de routine sont des contrôles sur les paramètres physicochimiques des préparations et sur leur qualité microbiologique qui dépendent de la forme galénique, de la nature du principe actif et de son dosage. Nous détaillerons les contrôles des suspensions buvables de nadolol dosées à 10 mg/mL dans la partie II de cette thèse. Nous reverrons également les études de stabilité dans les parties II et III.

b. Locaux et équipements

Le laboratoire se situe sur le site de l'hôpital de la Conception. Il est divisé en plusieurs bureaux, des espaces de stockage de matériel (verrerie), de réactifs (salle des réactifs), des échantillons (étuves et réfrigérateurs), trois salles de manipulations et une salle de pesée avec des balances de précision.

Il y a dans la salle de microbiologie deux PSM de type IIB dont un est réservé aux tests de stérilité et un aux tests de dénombrements microbiens et aux recherches de microorganismes spécifiques. Le premier est équipé du dispositif Sterisart® de chez Sartorius, le deuxième est équipé d'une rampe de filtration pour les ensemencements par filtration sur membrane dont nous reparlerons dans la partie II.III. « Mise au point des tests microbiologiques ».

Situé au milieu du SCQIP, le laboratoire 1 est dédié aux manipulations avec des paillasse de laboratoire, et du matériel adapté tel qu'une centrifugeuse, des vortex, une hotte aspirante avec un bac à ultrasons, des bains marie, ...

La plupart des appareils analytiques sont installés dans le laboratoire 2, dont les principaux appareils utilisés pour déterminer la teneur en principe actif des préparations : un titrimètre Excellence T5® et quatre appareils HPLC (trois Dionex Ultimate 3000® et un Agilent 1260 Infinity®) dont nous verrons le fonctionnement dans la partie II de cette thèse.

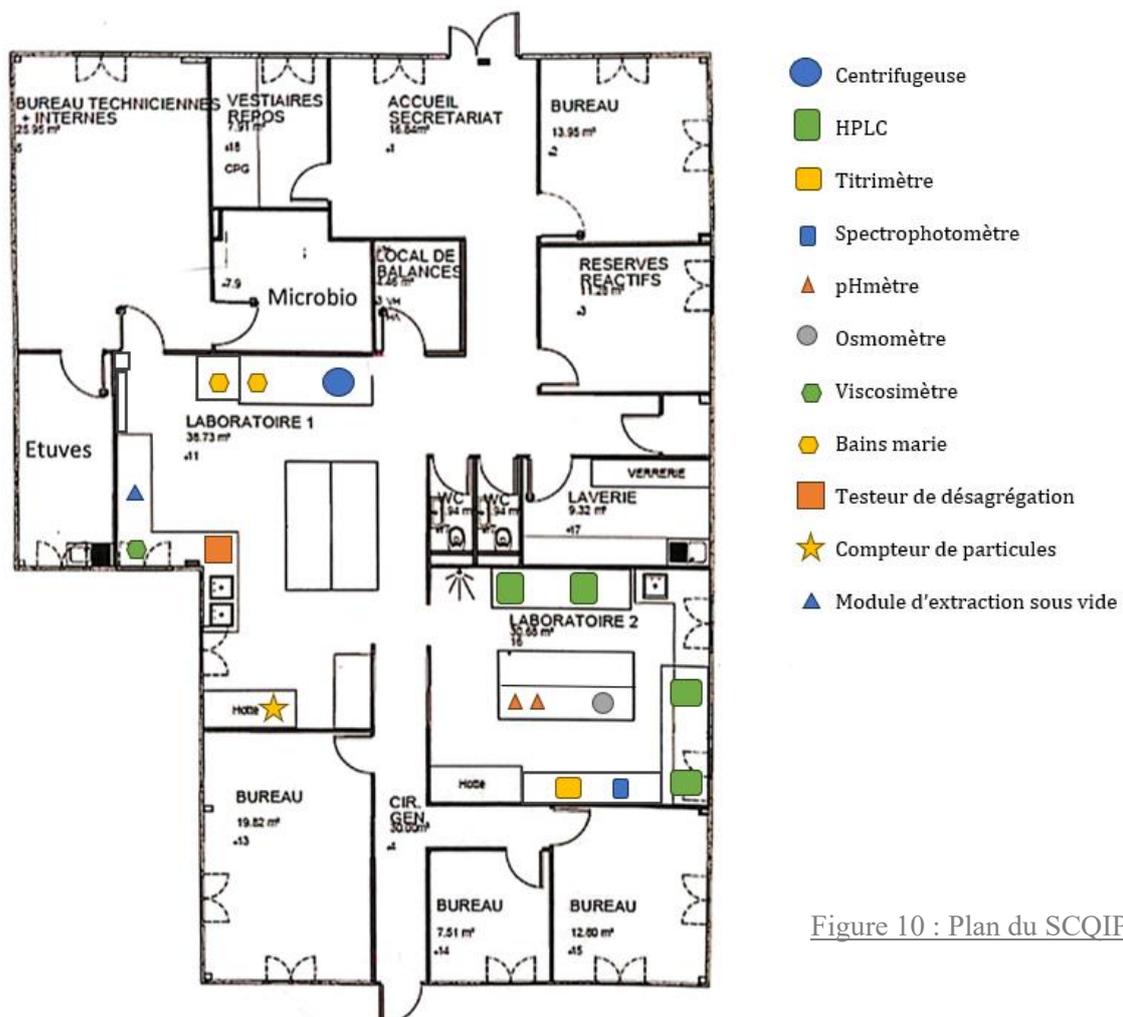


Figure 10 : Plan du SCQIP

III. Indications thérapeutiques en pédiatrie dans la littérature et à l'AP-HM

Nous avons vu dans la partie précédente que les préparations hospitalières de β -bloquants à l'AP-HM concernent le bétaxolol, le bisoprolol et que nous sommes en cours de développement de celle de nadolol. Nous allons donc nous concentrer sur les indications thérapeutiques de ces trois molécules en pédiatrie argumentées dans les revues de la littérature et sur leur utilisation à l'AP-HM.

1. Bétaxolol

a. À l'AP-HM

À l'AP-HM, les préparations hospitalières de bétaxolol chlorhydrate sous forme de suspensions buvables concentrées à 1 mg/mL sont dispensées au service d'endocrinologie pédiatrique. Prescrit hors indication AMM des comprimés commercialisés sous la spécialité Kerlone[®], le bétaxolol est utilisé en association synergique avec le glucagon comme stimulant de la sécrétion hypophysaire d'hormone de croissance et de cortisol dans le cadre de l'exploration dynamique de la fonction somatotrope. Ce test est réalisé chez les enfants présentant un retard de croissance ou en cas de pathologie hypophysaire.

Le protocole est le suivant :

- Patient à jeun depuis 12 heures et au repos pendant toute la durée du test
- T_{-30 minutes} : prise orale de bétaxolol à la dose 0,25 mg/kg
- T₀ : Injection intramusculaire de 1mg de glucagon

Des tubes de sang sont prélevés tout le long du test à intervalles réguliers afin de mesurer la glycémie, l'hormone de croissance et le cortisol.

b. Littérature

Par **voie orale** le bétaxolol est utilisé dans des tests pharmacologiques de **l'étude de la sécrétion de l'hormone de croissance (GH) et du cortisol** chez les enfants présentant un retard de croissance. On le trouve dans des protocoles en association avec un autre agent stimulant de la sécrétion de la GH comme la clonidine ou le glucagon.

| Association | Protocole | Références |
|-----------------------|---|-----------------------------|
| Clonidine + Bétaxolol | Administration orale de Clonidine 25 µg/m ² et de Bétaxolol 0,25 mg/kg | [29] [30] |
| Glucagon + Bétaxolol | Administration orale de Bétaxolol 0,25 mg/kg puis injection musculaire de 0,03 mg/kg de Glucagon (1 mg max) | [29] [31] [32] [33] [34] |

Tableau 5 : Tests pharmacologiques couplés avec bétaxolol de l'étude de la sécrétion de la GH

En 1993, la revue médicale *Acta Paediatrica* publie une étude rétrospective réalisée par P Rochiccioli et al. dans le service d'endocrinologie pédiatrique du CHU de Toulouse, qui fait l'analyse statistique de neuf tests de stimulation de la sécrétion de GH [29]. Sur 3143 enfants âgés de 3 à 16 ans présentant un retard de croissance, 2330 enfants ont été soumis à 2 tests différents et 813 à qu'un seul test. La répartition des enfants dans les groupes était homogène pour tous les tests car il n'y avait pas de différence significative d'âge chronologique, de sexe ou d'âge osseux.

Les différents tests pharmacologiques comparés étaient : test à l'arginine, test à la clonidine, test à l'insuline, test à l'ornithine, test à l'arginine + insuline, test à la clonidine + bétaxolol, test à la L-dopa, test au glucagon + propranolol et le test au glucagon + bétaxolol. Comme à l'AP-HM, ce dernier consiste en **l'administration orale de bétaxolol (0,25 mg/kg) et en une injection intramusculaire de 1 mg de glucagon** à 0 minute, suivi d'un prélèvement sanguin pour mesurer le taux d'hormone de croissance à 0, 90, 120, 150 et 180 minutes.

L'étude a révélé que la réponse variait considérablement en fonction du test utilisé et avait une faible spécificité et une faible sensibilité. La valeur moyenne du pic pouvait varier du simple au double d'un test à l'autre. Les pics de GH les plus importants ont été obtenus avec les tests associant le glucagon à un β -bloquant (bétaxolol ou propranolol). Effectivement, la plupart de ces tests agissent soit en stimulant la sécrétion de GHRH, soit en inhibant la sécrétion de somatostatine. Les tests associant deux agents pharmacologiques d'action complémentaire comme les tests au glucagon et au bétaxolol, ou les tests au glucagon et au propranolol, mettent en jeu un double mécanisme sécrétoire, ce qui explique la réponse plus élevée obtenue.

Les tests au glucagon + β -bloquant (bétaxolol ou propranolol) sont donc les tests les plus fiables pour étudier la sécrétion de la GH chez les enfants présentant un retard de croissance.

La même année, l'étude menée par M. Colle et al. a comparé la fiabilité et la sécurité de ces tests [31]. Elle a été réalisée sur 420 enfants présentant un retard de croissance dont 250 garçons et 170 filles, qui ont été répartis en 3 groupes d'enfants testés respectivement par du glucagon seul (n=70), du bétaxolol et du glucagon (n=225) et du propranolol et du glucagon (n=125).

La co-administration d'un β -bloquant et de glucagon a amélioré la fiabilité des tests de sécrétion de l'hormone de croissance en réduisant le nombre de résultats faussement négatifs de 16,5% pour le glucagon seul, à 5,8% pour le bétaxolol et le glucagon et 4,0% pour le propranolol et le glucagon. Des effets secondaires tels que la bradycardie ou l'hypoglycémie ont cependant été reportés pour 8% des enfants testés avec le propranolol alors que le bétaxolol, n'a pas modifié l'évolution de la réponse métabolique, étant par conséquent bien mieux toléré (aucun effet indésirable).

Le test bétaxolol-glucagon offre le meilleur rapport fiabilité/sécurité, il est donc recommandé pour le dosage de la GH chez les enfants présentant un retard de croissance.

2. Bisoprolol

a. À l'AP-HM

À l'AP-HM, la préparation hospitalière de bisoprolol en suspension buvable concentrée à 0,5 mg/mL est principalement dispensée au service de cardiologie pédiatrique de l'hôpital de la Timone. Bien que prescrit hors AMM, le bisoprolol per os fait partie des traitements de l'insuffisance cardiaque (IC), d'origine génétique (cardiomyopathie dilatée et cardiomyopathie hypertrophique), séquellaire (due à une myocardite) et congénitale ; et ce dès la naissance.

Comme chez l'adulte, le bisoprolol est utilisé à des posologies croissantes, d'augmentation progressive en quatre paliers sur huit semaines.

Les doses adultes de référence utilisées sont les suivantes :

| | |
|-----------------|---------|
| Semaines 1 et 2 | 1,25 mg |
| Semaines 3 et 4 | 2,5 mg |
| Semaines 5 et 6 | 5 mg |
| Semaines 7 et 8 | 10 mg |

Tableau 6 : Protocole d'augmentation progressive des doses de bisoprolol

La dose adulte est pondérée par la surface corporelle de l'enfant et divisée par la surface corporelle standard soit 1,73 m². Cette dose quotidienne calculée est répartie en 2 prises au cours des repas.

$$Dose\ enfant\ (mg) = \frac{Dose\ adulte \times Surface\ corporelle\ de\ l'enfant}{1,73}$$

Avec la surface corporelle calculée de la manière suivante :

$$Surface\ corporelle\ (m^2) = \frac{(4 \times poids\ en\ kg) + 7}{poids\ en\ kg + 90}$$

L'augmentation des doses est réalisée à l'hôpital, en hôpital de jour ou en hospitalisation sous surveillance de la tension artérielle et de l'électrocardiogramme 2 à 4 heures après la prise.

Dans le traitement de l'IC pédiatrique à l'AP-HM, le bisoprolol est associé à un inhibiteur de l'enzyme de conversion (IEC) (captopril/énalapril) ainsi qu'un diurétique (de l'anse, furosémide ou antagoniste des récepteurs à l'aldostérone, spironolactone) en cas de signes de congestion.

b. Littérature

L'insuffisance cardiaque se définit comme l'état dans lequel le cœur est incapable de répondre aux besoins de l'organisme en matière d'approvisionnement en sang. L'IC pédiatrique peut être liée à de nombreuses étiologies : des anomalies génétiques et/ou métaboliques, des maladies structurelles, à des arythmies, à l'hypoxémie, ou à une maladie du myocarde séquellaire (myocardite, traitement par anthracycline) ou congénitale. Les symptômes cliniques dépendent de la gravité de l'IC, mais aussi de l'âge et de la cause de l'IC [35].

De ce fait, contrairement au traitement chez l'adulte qui repose sur des recommandations qui sont périodiquement révisées et mises à jour, sur la base de résultats d'études portant sur de grandes cohortes de groupes de patients homogènes, les recommandations du traitement de l'insuffisance cardiaque chez l'enfant reposent essentiellement sur l'expérience du clinicien. De plus contrairement à l'IC chez les adultes, l'IC pédiatrique peut être résolutive, le myocarde chez les enfants présentant de fortes capacités de régénération. Les stratégies de régénération nécessitent une médecine de précision individualisée par les différences liées à une large tranche d'âge, aux étiologies hétérogènes et la physiopathologie de chaque maladie cardiaque. Ces paramètres de variation impliquent qu'il n'existe pas à ce jour d'essai clinique apportant suffisamment de preuves car ils ne permettent pas de recruter un nombre suffisant de patients pour les essais randomisés.

D'après l'avis de la commission de la transparence de la HAS du 5 octobre 2005 « Aucune donnée n'étant disponible avec le bisoprolol en pédiatrie, son utilisation ne peut donc être recommandée chez

les enfants. ». Cependant quelques rares références bibliographiques ont démontré l'efficacité de ce principe actif dans l'insuffisance cardiaque pédiatrique.

Dans son livre paru en 2012 [36], Fabien Bruno, **pharmacien titulaire de la pharmacie Delpech, spécialisée dans la sous-traitance des préparations magistrales**, décrit l'utilisation du bisoprolol par voie orale en pédiatrie. Citant les protocoles du service de cardiologie pédiatrique de **l'Hôpital Necker à Paris**, l'auteur recommande l'utilisation du bisoprolol dans les dysfonctions ventriculaires stables en l'absence de signe congestif. En effet, le **traitement de l'insuffisance cardiaque chronique de l'enfant** dans cet hôpital parisien, consiste en l'administration de bisoprolol en association avec un IEC [37]. La dose thérapeutique prescrite est la **dose journalière adulte, pondérée par la surface corporelle de l'enfant**, et ramenée à la surface corporelle standard d'1,73 m². Cette dose journalière doit être répartie en 2 prises au cours des repas et son augmentation est progressive en 4 paliers sur 8 semaines. Un diurétique est ajouté en cas de signes congestifs. Cette recommandation n'est cependant pas fondée sur des publications scientifiques mais repose sur l'expérience des cliniciens des hôpitaux parisiens. Ces données devraient être étayées à minima par le biais d'un case report précisant l'argumentaire ayant conduit à proposer cette posologie chez l'enfant ou au mieux par des études cliniques.

En 2019, le **centre universitaire de cardiologie pédiatrique à Giessen en Allemagne**, a publié dans la revue internationale *Transnational Pediatrics* un article sur la stratégie de **prise en charge thérapeutique de l'IC pédiatrique au sein de l'institution qui repose sur l'association médicamenteuse de bisoprolol, lisinopril et spironolactone** [35]. Déplorant le retard pris dans le traitement de l'IC pédiatrique par rapport aux connaissances de la recherche pharmacologique et à l'expérience clinique fondée sur des preuves chez l'adulte, les auteurs exposent leur approche basée sur les connaissances physiopathologiques et pharmacologiques actuelles ainsi que sur leur expérience professionnelle de l'évolution de paramètres de suivi tels que la fréquence cardiaque, le rythme respiratoire, la prise de poids des patients ainsi que sur des paramètres dérivés de l'imagerie et des biomarqueurs.

Le bisoprolol a été sélectionné dans la stratégie thérapeutique de l'IC pédiatrique à la clinique universitaire de Giessen car son affinité β_1/β_2 est 25 fois plus élevée que celle du Carvédilol. Ce choix a été fait, en s'appuyant sur les connaissances physiopathologiques de l'IC chez l'enfant. En effet, plusieurs études démontrent que le profil moléculaire et notamment l'expression des récepteurs β -adrénergiques diffère entre l'IC chez l'adulte de l'IC chez l'enfant. Le dosage de la densité des récepteurs β -adrénergiques sur des cœurs explantés d'enfants et d'adultes atteints de cardiomyopathies dilatées et de témoins non défaillants, a été réalisé par Miyamoto et al. en 2014

[38]. Les résultats ont montré qu'il existe une régulation à la baisse des récepteurs β_1 et β_2 chez les enfants, alors que l'expression des β_2 est maintenue chez les adultes. Compte tenu de ces données les cardiologues de Giessen suggèrent que le blocage des récepteurs β_2 , déjà régulés à la baisse par la physiopathologie de la maladie peut annuler les avantages de l'inhibition des β_1 . D'autant plus que la tachypnée, les problèmes respiratoires et la toux sont souvent les premiers symptômes chez les enfants atteints d'IC et, par conséquent, les β -bloquants non sélectifs peuvent également aggraver ces symptômes.

En 2021, ce même centre de cardiologie pédiatrique publie dans la revue *Pediatric Drugs*, une étude observationnelle, unicentrique, rétrospective sur 5 ans sur l'utilisation du bisoprolol chez des nouveau-nés atteints de syndrome du cœur gauche hypoplasique lors de l'interstade qui suit la phase I après une chirurgie par approche hybride [39]. La prise en charge médicale de cette malformation congénitale, repose sur une approche chirurgicale en 3 étapes après stabilisation des patients. Le premier stade est réalisé pendant la première semaine de vie par une procédure hybride puis le second stade est effectué à l'âge de 3 à 6 mois. **Entre ces deux stades le bisoprolol, β -bloquants β_1 spécifique est instauré à la dose de 0,1 à 0,2 mg/kg chez 90% des 51 nouveau-nés de la cohorte.**

Le paramètre principal témoin de l'efficacité du bisoprolol était la surveillance de la fréquence cardiaque jusqu'au stade II. La fréquence cardiaque moyenne au repos a diminué de 138 bpm à l'admission à 110 bpm avant le stade II, accompagnée d'une prise de poids favorable et aucun effet secondaire hémodynamique ou métabolique nécessitant un traitement n'a été observé.

Le bisoprolol s'est montré efficace et sûr, chez les nouveau-nés lors de l'interstade qui suit la phase I d'une approche hybride, permettant de réduire la consommation en oxygène par abaissement de la fréquence cardiaque à un optimum individuel pour permettre une bonne nutrition et éviter les facteurs de stress précoces.

3. Nadolol

a. À l'AP-HM

À l'AP-HM, les préparations magistrales de nadolol sont principalement dispensées au service de cardiologie pédiatrique de l'hôpital de la Timone. Moins prescrit que le propranolol sous forme de solution buvable disponible via une autorisation d'accès compassionnel, le nadolol est indiqué dans certains troubles du rythme supra-ventriculaires et ventriculaires tels que les tachycardies catécholinergiques à la dose de 2 mg/kg/jour répartis en 1 mg/kg matin et soir.

b. Littérature

L'utilisation, du nadolol chez les enfants est décrite dans le livre *Doses maximales et usuelles en pédiatrie* publié en 2012 [36]. L'auteur préconise l'indication de ce β -bloquant non cardiosélectif dans l'hypertension artérielle et les troubles du rythme cardiaque chez l'enfant à la dose **de 1 mg/kg/jour ou 25 à 75 mg/m²/jour en une ou deux prises quotidiennes**. L'augmentation des doses doit être progressive, sous surveillance cardiaque étroite (fréquence cardiaque, pression artérielle, électrocardiogramme). Aucune bibliographie pouvant être à l'origine de cette recommandation n'est cependant citée, il est fortement probable que l'auteur se soit servi de protocoles de services d'hôpitaux parisiens ce qui apporte un biais majeur au niveau de preuve que pourrait présenter cette recommandation. Ces données devraient être étayées à minima par le biais d'un case report précisant l'argumentaire ayant conduit à proposer ces posologies dans cette indication.

Des publications scientifiques sont tout de même disponibles sur l'utilisation du nadolol dans le traitement des tachycardies supraventriculaires et des tachycardies ventriculaires catécholinergiques infantiles.

La **tachycardie supraventriculaire (TSV)** est une arythmie fréquente chez le nourrisson, pour laquelle les bêta-bloquants sont souvent choisis comme traitement. La TSV est un des critères d'octroi de l'AAC du propranolol en suspension buvable, ce β -bloquant est donc un choix courant, bien qu'il soit administré toutes les 6 à 8 heures [40] [41]. De par sa demi-vie d'élimination prolongée, le nadolol pourrait être une alternative plus pratique que le propranolol.

Une étude prospective a été menée entre 1985 et 1991 incluant 27 enfants âgés de 3 mois à 15 ans présentant une **tachycardie supraventriculaire symptomatique** [42]. Ils étaient suivis au **Christopher's hospital à Philadelphie et au James H. Quillen College of Medicine à Johnson City**, dans le Tennessee. L'objectif de cette étude a été d'évaluer l'efficacité et l'innocuité du nadolol par voie orale chez les enfants souffrant de troubles supraventriculaires symptomatiques récurrents et de prédire son efficacité par la capacité des patients à répondre au traitement par propranolol par voie intraveineuse.

Tous les patients, sauf un, ont reçu un traitement oral par nadolol. L'arythmie a été bien contrôlée chez 23 d'entre eux, 2 ont eu une tachycardie récurrente et 1 patient a eu une tachycardie 25 % plus lente. La dose efficace de nadolol était comprise entre **0,5 et 2,5 mg/kg de poids corporel une fois par jour** avec une **dose médiane efficace à 1 mg/kg par jour**. Au cours du suivi qui a duré de 3 à 36 mois, 5 patients ont présenté des effets secondaires nécessitant une modification du traitement

médicamenteux. 2 d'entre eux souffraient d'une maladie réactive des voies respiratoires, ils ont donc été traités par un β -bloquant cardiosélectif. Les 3 autres ont respectivement souffert de cauchemars, trouble du sommeil et de la personnalité et de maux de tête fréquents. Les enfants dont le traitement a été modifié recevaient une faible dose de nadolol oral (0,8 mg/kg). Les quatre patients qui ont reçu 2 à 2,5 mg/kg par jour de nadolol oral n'ont pas eu d'effets secondaires au cours du suivi. Les effets indésirables ne semblaient pas être liés à la dose.

Les auteurs concluent que le **nadolol administré une fois par jour est un agent relativement sûr et efficace dans le traitement de la tachycardie supraventriculaire chez l'enfant**. Ils ont également démontré que son efficacité à long terme par voie orale peut être prédite par la réponse à court terme au nadolol ou au propranolol intraveineux au cours d'une étude électrophysiologique programmée.

En 2017, Johannes C von Alvensleben et al. publient dans la revue *Pediatric cardiology* une étude de cohorte rétrospective de patients de moins de 2 ans recevant du nadolol pour une **tachycardie supraventriculaire au Centre de cardiologie congénitale de l'Université du Michigan** [43].

25 nourrissons présentant une tachycardie régulière à complexe étroit ont reçu une suspension extemporanée de nadolol, dont 18 en monothérapie. 7 ont eu besoin d'agents pharmacologiques supplémentaires (flécaïnide chez 6 patients, digoxine chez 1 patient). La **dose thérapeutique située dans l'intervalle 0,5 à 2 mg/kg/jour prédominait à 1 mg/kg/jour** pour 79% des nourrissons. 71% des patients étaient traités par une dose quotidienne, 25% d'entre eux par 2 doses quotidiennes et 4% recevaient du nadolol 3 fois par jour.

Sur les 20 patients atteints de tachycardie régulière à complexe étroit traités par nadolol en monothérapie, 85% n'ont pas eu de récurrence après un an de suivi. Des effets secondaires ont été suspectés chez 10,7 % des patients, notamment une respiration sifflante, une irritabilité, une diarrhée et une bradycardie.

L'étude conclut que le **nadolol en monothérapie peut donc être utilisé avec succès dans le traitement de la tachycardie supraventriculaire chez les nourrissons et les jeunes enfants** avec des effets secondaires minimes.

La **tachycardie ventriculaire catécholinergique (TVC)** est une maladie arythmogène génétique induite par les catécholamines se manifestant par une syncope ou une mort subite. L'âge typique de début se situe chez les garçons comme chez les filles entre 7 et 9 ans. Les signes de découverte de ce trouble arythmique induit par le stress sont souvent des épisodes syncopaux lors d'un effort ou d'une émotion violente. La mort subite peut être révélatrice chez certains cas (10 à 20%). Le traitement repose sur les β -bloquants en première intention à la dose maximale tolérée pour contrôler les arythmies. [44]

La HAS a publié en 2022, un protocole national pour **la prise en charge diagnostique et thérapeutique des patients atteints de tachycardie ventriculaire catécholinergique**, Rédigé en collaboration par des cardiologues des centres de référence de Paris, Nantes et Lyon, ce protocole a été élaboré par le **Centre de Référence Maladies Cardiaques Héritaires**. [45]

Les auteurs recommandent l'utilisation d'un β -bloquant, pour réduire le risque d'arythmie, chez tous les sujets ayant un diagnostic de TVC, qu'ils soient **symptomatiques ou non, et ce dès l'âge de 18 mois**. Pour A. Leenhardt et al., le nadolol et à défaut le propranolol sont les β -bloquants de choix dans le traitement de la TVC. En effet, l'étude publiée en 2016 dans *Heart Rhythm Society* conclue à la **supériorité du traitement par nadolol au traitement par β -bloquants cardiosélectifs, sur l'incidence et des sévérité des arythmies ventriculaires** [46]. Le β -bloquant doit être titré à la **dose tolérable la plus élevée possible**, ou permettre d'obtenir au moins une fréquence cardiaque autour de 65 % de la fréquence maximale théorique.

Le service de cardiologie pédiatrique de **l'Hôpital Necker à Paris** adopte également les β -bloquants comme antiarythmiques dans les tachycardies ventriculaires et en particulier les **tachycardies ventriculaires catécholinergiques**, ainsi que dans la prévention des récurrences de tachycardies jonctionnelles chez les grands enfants [37]. Les protocoles de services décrivent des prises en charge thérapeutiques par :

- Propranolol à la dose de 0,25 à 1 mg/kg, 3 à 4 fois par jour.
- **Nadolol à la dose de 25 à 75 mg/m²/jour en une prise matinale ou deux prises quotidiennes.**

Partie II : Mise au point d'une suspension buvable de Nadolol à 10 mg/mL en préparation hospitalière

I. Mise au point de la forme galénique

1. Décision de développement d'une préparation hospitalière de Nadolol

Comme nous l'avons vu dans la première partie, l'activité du préparatoire central de l'AP-HM est en développement et perfectionnement constants. Par soucis d'amélioration de la qualité, il a été décidé de privilégier les préparations hospitalières par rapport aux préparations magistrales, ces premières étant jugées plus sécurisées.

En effet afin d'être libérées puis dispensées, les préparations hospitalières sont contrôlées par le laboratoire de contrôle de la qualité. De plus les conditions de préparation sont optimales : préparations toujours réalisées par du personnel du préparatoire habilité, en formation continue, selon un planning de fabrication adapté au temps nécessaire à la préparation. À contrario, les préparations magistrales fabriquées en garde ne sont pas analysées avant libération. De plus, elles peuvent être réalisées par un interne n'ayant pas toujours fait un stage au préparatoire (mais ayant validé sa formation pour la prise de gardes), et souvent dans des conditions plus stressantes.

La demande de fabrication de gélules de nadolol en préparation magistrale étant une des plus fréquentes, nous avons décidé de développer une préparation hospitalière pour ce principe actif (PA). Les formes orales les plus adaptées à un usage en pédiatrie sont les gélules ouvertes dans un solvant et les préparations liquides buvables. Il a fallu réaliser une étude de faisabilité.

2. Choix de la forme galénique et du dosage

Une préparation magistrale étant destinée à un seul et unique patient, la dose peut être fixe et adaptée aux caractéristiques du malade (poids, âge, indication thérapeutique). Ainsi une multitude de dosages de gélules de nadolol en préparations magistrales pouvaient être préparés (exemples : 2 mg, 7 mg, 22 mg, 40 mg, 60 mg, ...). Cependant ce fonctionnement est très peu adapté aux préparations hospitalières qui sont préparées à l'avance pour plusieurs patients, nécessitant une adaptation plus aisée de la dose d'administration.

Il a donc fallu développer une forme galénique liquide buvable multidose de nadolol, à une concentration intermédiaire, compatible avec une préparation à l'avance en lots et compatible avec la méthode de dosage. Les formes orales liquides présentent en effet plusieurs avantages par rapports aux formes orales solides, notamment de ne dispenser qu'une préparation pour plusieurs dosages, de diminuer le temps de fabrication et d'être des formes prêtes à l'emploi permettant une meilleure précision d'administration. Elles ont cependant d'autres inconvénients tels qu'une stabilité chimique et microbiologique inférieure à celle des formes sèches et la présence d'excipients à effet notoire (EEN) est fréquente dans la composition des formes liquides, utilisés notamment comme conservateur ou édulcorant.

Nous avons décidé de réaliser des suspensions buvables concentrées à 10 mg/mL en nadolol.

D'après la Pharmacopée Européenne, les suspensions buvables sont définies comme des « préparations liquides obtenues par dispersion d'un ou plusieurs principes actifs solides dans un solvant aqueux ». Elles ont pour avantage la dispersion d'une quantité plus importante de PA que les solutions permettant l'obtention de préparations plus concentrées.

3. Choix de la formulation

a. Principe actif

En France, les Bonnes Pratiques de Préparation (BPP) requièrent de privilégier l'utilisation de principe actif sous forme de matière première pour usage pharmaceutique (MPUP) à celle des comprimés broyés. En effet, définies à l'article L.5121-6 du code de la santé publique, les MPUP répondent aux spécifications de la Pharmacopée Européenne et un certificat d'analyse de lot signé par le fournisseur comportant le référentiel des contrôles effectués accompagne chacun des lots. Les MPUP présentent comme avantages de ne contenir aucun excipient qui pourrait créer des interactions ainsi que de permettre une très bonne reproductibilité de préparation, la teneur réelle en PA étant établie dans le certificat d'analyse alors que celle des comprimés peut légèrement varier.

Cependant, dans d'autres pays parmi lesquels nous pouvons citer les États-Unis, l'utilisation des comprimés broyés est privilégiée. En effet, l'utilisation de comprimés conditionnés sous blister présente d'autres avantages tels qu'une meilleure stabilité chimique et microbiologique ainsi qu'une réduction du risque d'erreur de pesée.

Pour la réalisation de préparation pharmaceutique de nadolol, nous utilisons la MPUP référence 42200-5, commercialisée par le laboratoire INRESA, qui se présente en pot de 5 g.

Selon la monographie de la PE, les caractéristiques du nadolol sont les suivantes :

- Formule brute : $C_{17}H_{27}NO_4$
- Nom : cis-5-[(2RS)-3-[(1,1-Diméthyléthyl)amino]-2-hydroxypropoxy]-1,2,3,4-tétrahydro naphthalène-2,3-diol
- Forme : 2 paires d'énantiomères présents sous forme de 2 composés racémiques
- Masse moléculaire : 309,4 g/mol
- Aspect : poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche peu soluble dans l'eau, facilement soluble dans l'éthanol à 96 % et pratiquement insoluble dans l'acétone.

b. Véhicule

Le véhicule permet de faciliter la mise en suspension et améliorer le goût de la préparation. Il s'agit d'une base, qui permet la dispersion homogène et rapide des principes actifs. Il en existe plusieurs gammes sur le marché dont Ora-blend[®] SF, Syrspend[®] SF et InOrpha[®] référencées à l'AP-HM.

Au préparatoire central de Sainte Marguerite, le véhicule de choix pour les préparations hospitalières était le Syrspend[®] SF pH4 Poudre. Il s'agit d'une poudre à reconstituer avec de l'eau stérile, présentant une formule minimale, sans conservateur, ayant pour avantage de ne contenir aucun EEN. Cependant après la découverte de moisissures dans trois lots de suspensions buvables en avril 2022, les formules ont été modifiées pour utiliser un véhicule avec conservateur. Cet événement sera le déclencheur de la partie III de cette thèse.

Aujourd'hui le véhicule de choix est le Syrspend[®] SF PH4 liquide neutre, prêt à l'emploi qui contient un agent conservateur. Il est commercialisé par le laboratoire FAGRON en flacons de 500 mL. Sa composition est détaillée dans le tableau suivant.

| Eau purifiée | Base |
|--|--------------------|
| Amidon de maïs | Agent épaississant |
| Sucralose | Édulcorant |
| Benzoate de Sodium (EEN, < 0,1%) | Conservateur |
| Citrate de Sodium, Acide citrique et Acide malique | Agents tampons |

Tableau 7 : Composition du Syrspend[®] SF PH4 liquide neutre

Malgré la présence d'un EEN en agent conservateur, le Syrspend® SF PH4 liquide présente une composition allégée par comparaison à son concurrent Ora-blend® qui contient six EEN et dont l'osmolalité de 1665 mOsm/kg est supérieure à l'osmolalité maximale de 450 mOsm/kg recommandée par l'Académie Américaine de Pédiatrie pour les administrations orales [47]. Le Syrspend® a quant à lui une faible osmolalité de 50 mOsm/kg ayant pour avantage de ne pas entraîner d'effet gastro-intestinal secondaire.

De plus, le Syrspend® SF PH4 liquide a une viscosité d'environ 3000 cPs soit plus importante que les deux autres véhicules (≈ 700 cPs pour Ora-blend® et ≈ 50 cPs pour InOrpha®), propriété intéressante permettant de limiter la sédimentation des suspensions.

Afin de vérifier la compatibilité avec le nadolol, nous nous sommes référés à la table de compatibilité de FAGRON, ainsi qu'à une étude menée en 2016 au Brésil [48] qui démontre la stabilité physico-chimique durant 90 jours du nadolol concentré à 10 mg/mL dans le Syrspend® SF PH4.

| SyrSpend® SF | | | | | | |
|---|-------------------------|---------------------------|--------------------------|---|---------------------------------------|--|
| Table de compatibilité | | | | | | |
| Légende | Concentrations communes | SYRSPEND® SF PH4 (LIQUID) | | | SYRSPEND® SF PH4 (DRY) ⁰⁰⁰ | SYRSPEND® SF ALKA (DRY) ⁰⁰⁰ |
| | | 702330 - 500 ML (Cherry) | 702331 - 500 ML (Neutre) | | 700729 - Unit Dose pour 200 ML | 700724 - Unit Dose pour 100 ML 700725 - Unit Dose pour 200 ML |
| Légende ● Combinaison compatible pendant 30 jours ● Combinaison compatible pendant 60 jours ● Combinaison compatible pendant 90 jours ☒ Combinaison non recommandée Température de stockage 🏠 15-25°C ❄️ 2-8°C API | | | | | | |
| En suspension directement⁰⁰⁰⁰ ✔️ Humidifier n'est pas nécessaire ☒ Humidifier est nécessaire | | | | | | |
| Nadolol ¹⁷ | 10 mg/ml | ● | 🏠 | ☒ | 14 j. ❄️ | ☒ |
| Naltrexone HCl ¹⁷ | 1 mg/ml | ● | 🏠 | ☒ | 14 j. ❄️ | ☒ |
| Naproxène ¹⁶ | 25 mg/ml | ● | 🏠 | ☒ | 14 j. ❄️ | ☒ |
| Nifédipine ¹ | 4 mg/ml | ● | 🏠 | ☒ | 14 j. ❄️ | ☒ |
| Nitrendipine® (comprimés) ^{*/24} | 5 mg/ml | ● | 🏠 | ☒ | 14 j. ❄️ | ☒ |
| Nitrofurantoïne ^{00/****/20/29} | 2 - 10 mg/ml | ● | 🏠 | ☒ | 14 j. ❄️ | ☒ |

Figure 11 : Table de compatibilité entre les différents Syrspend® du laboratoire FAGRON et une liste de principes actifs

II. Mise au point de la méthode de dosage par HPLC-UV

1. Référentiels

a. Pharmacopées

Dérivées du terme grec *φαρμακοποιία/farmakopoiia* qui signifie « l'art des préparer les médicaments », les pharmacopées sont des ouvrages à caractère officiel et réglementaire, destinées à guider les PUI dans leur activité de fabrication et de contrôle des produits à usage pharmaceutique. Elles sont rédigées sous forme de monographies. Les monographies générales décrivent les tests analytiques applicables aux différentes formes pharmaceutiques et les monographies spécifiques décrivent les contrôles à réaliser pour une substance ou un produit pharmaceutique donné. Ces textes sont régulièrement mis à jour.

Il existe des pharmacopées nationales et des pharmacopées internationales. Les trois plus influentes sont la Pharmacopée Américaine (USP), la Pharmacopée Européenne (PE) et la Pharmacopée Japonaise (JP).

i. Pharmacopée Européenne

La PE est préparée par la Direction Européenne de la Qualité du Médicament et des soins de santé (EDQM). La version actuellement en vigueur est la 11^{ème} édition ; elle est applicable réglementairement dans 39 états européens qui ont signé la convention relative à son élaboration. Elle est disponible à l'achat en version papier et numérique. Les PUI, les officines et les établissements de santé ont l'obligation de la détenir. La PE propose des monographies générales et des monographies de matières premières applicables aux MPUP.

ii. Pharmacopée Française (PhFr)

Certains pays comme la France ont une pharmacopée nationale qui vient compléter la PE. La PhFr comporte des textes strictement nationaux applicables par arrêtés ministériels publiés au Journal Officiel (JO) de la République française. Rédigée et publiée par l'ANSM, la Pharmacopée Française est gratuite et disponible en ligne [49]. La version actuellement en vigueur est la 11^{ème} édition.

Le formulaire national s'intègre à la Pharmacopée Française. Il se compose d'une quarantaine de monographies et vise à standardiser les pratiques de préparation et les exigences en qualité de contrôle. Cependant ce formulaire n'est pas tenu à jour par rapport aux pratiques courantes et certains

excipients sont parfois difficilement transposables pour des préparations hospitalières en routine (comme le lactose ou le mannitol qui sont des excipients à effet notoire).

iii. Pharmacopée Américaine (USP)

La Pharmacopée Américaine actuellement en vigueur est la 47^{ème} édition. L'autorité compétente qui gère son application est la Food and Drug Administration (FDA). Comme la PE, l'USP propose des monographies générales et des monographies spécifiques des matières premières, mais également des monographies spécifiques des médicaments et des préparations, ainsi qu'un guide sur l'attribution des DLU pour les préparations pharmaceutiques. Elle est disponible à l'achat en version papier et en ligne par système d'abonnement [50].

b. Recommandations ICH

Né en 1990, le Conseil International pour l'Harmonisation des exigences techniques relatives aux produits pharmaceutiques à usage humain (ICH) est une association internationale à but non lucratif qui rassemble les autorités de réglementation et les représentants de l'industrie pharmaceutique d'Europe, du Japon et des États-Unis. Comme son nom l'indique, il a pour but d'harmoniser les recommandations dans le développement pharmaceutique mondial par l'élaboration de lignes directrices, afin d'assurer la sécurité, l'efficacité et la qualité des médicaments.

Les lignes directrices harmonisées sont réparties dans quatre catégories : Quality Guidelines (dans lesquelles sont décrites la conduite des études de stabilité et la validation d'une méthode analytique), Safety Guidelines, Efficacy Guidelines et Multidisciplinary Guidelines.

c. Guide du GERPAC

Créée en 1998 par des hospitaliers, des universitaires et des chercheurs, le GERPAC (Groupe d'Évaluation et de Recherche sur la Protection en Atmosphère Contrôlée) est une association scientifique à but non lucratif (loi 1901), qui a pour objectif la diffusion des connaissances techniques et des compétences nécessaires au développement des protections biologiques et physico-chimiques dans le domaine hospitalier pharmaceutique concernant la préparation des médicaments toxiques comme les anticancéreux.

Le GERPAC a pris une dimension internationale en développant son champ d'action aux modalités de préparation d'autres médicaments stériles (comme les collyres, la nutrition parentérale, les

médicaments de thérapie innovante) et non stériles à visée systémique ou locale au travers des différentes présentations galéniques (formes injectables, formes orales sèches et liquides et formes à administration locale) ; obtenant le titre de « European Society of Hospital Pharmaceutical Technologies » dont la traduction française est la « Société Européenne de Technologies Pharmaceutiques Hospitalières ».

Cette société savante a également pour but la promotion des connaissances scientifiques au niveau européen afin d'être source d'expertise dans le champ des technologies pharmaceutiques hospitalières, de la pharmacotechnie, de la pharmacie galénique et des contrôles de qualité associés.

En collaboration avec le groupe stabilité de la société française de pharmacie clinique (SFPC), le GERPAC a publié un guide méthodologique pour la réalisation des études de stabilité des préparations pharmaceutiques stériles et non stériles en milieu hospitalier. Ce guide constitue aussi une aide à l'interprétation des résultats.

2. La chromatographie liquide haute performance

a. Principes généraux

Le dosage des suspensions buvables de nadolol est réalisé par chromatographie en phase liquide haute performance (HPLC) couplée à un détecteur UV. Cette méthode de dosage est décrite au chapitre 2.2.29 de la Pharmacopée Européenne [52].

L'HPLC repose sur la distribution différentielle des espèces entre deux phases non miscibles, une phase stationnaire contenue dans une colonne et une phase mobile liquide qui traverse, par percolation, cette phase stationnaire. C'est une technique de séparation des composés mis en solution, permettant ainsi leur analyse qualitative et quantitative (dosage). Cette méthode séparative permet ainsi la séparation du principe actif de ses produits de dégradation. L'HPLC est une méthode d'analyse dite « indicatrice de stabilité ».

L'appareillage se compose d'un système de pompage capable de délivrer une phase mobile de composition constante (élution isocratique) ou variable (gradient d'élution), d'un injecteur, d'une colonne chromatographique (éventuellement thermostatée), d'un détecteur et d'un système d'acquisition des données.

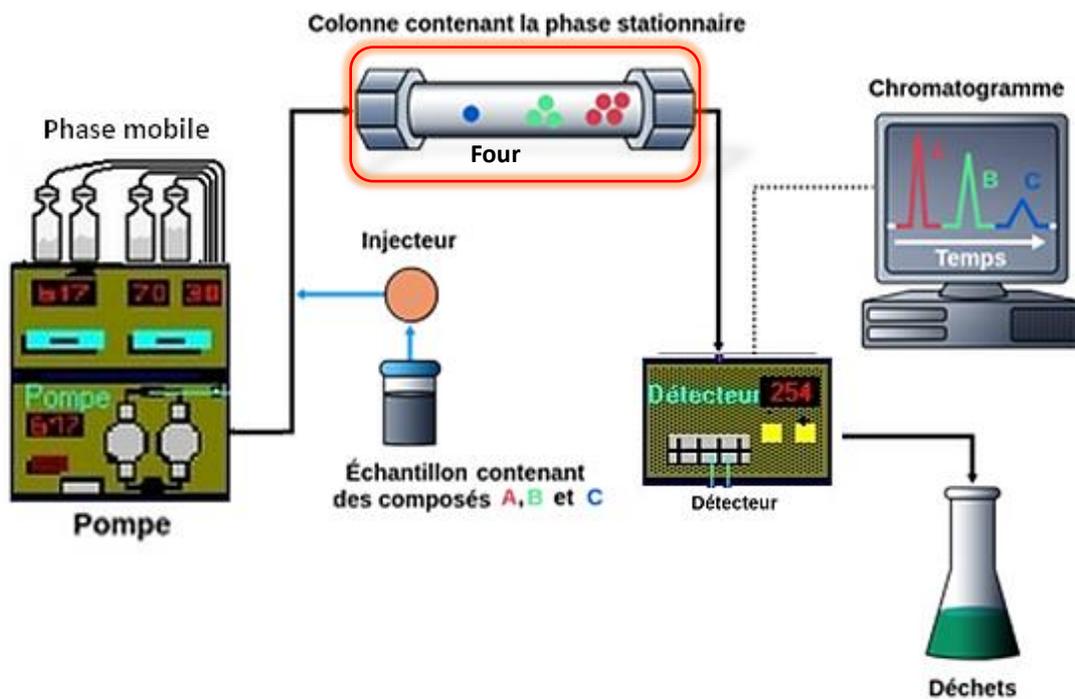


Figure 12 : Schéma du principe d'une chaîne HPLC

La solution à analyser est introduite dans la phase mobile circulante en tête de colonne par un système d'injection. Le mélange parcourt la colonne de chromatographie qui contient la phase stationnaire généralement à débit constant grâce à une pompe sous haute pression. La température de la colonne peut être contrôlée par un four, afin de garantir des conditions d'analyse constantes et permettre des dosages à des températures autres que la température ambiante.

Les composés en solution se répartissent dans la colonne en fonction de leur affinité pour l'une et l'autre des phases. Un composé ayant une forte affinité pour la phase mobile et peu pour la phase stationnaire sortira en premier. Inversement un composé ayant une forte affinité pour la phase stationnaire et peu pour la phase mobile mettra plus de temps à sortir de la colonne.

En sortie de colonne les composés passent dans un détecteur (ici détecteur ultra-violet) qui transmet le signal au système d'acquisition des données. Ce dernier permet de représenter les différents composés en pics de forme gaussienne sur un chromatogramme.

b. Paramètres théoriques

L'étude des paramètres théoriques comprend les paramètres de rétention, d'efficacité et de résolution d'une analyse chromatographique. [53] [54]

ÉTUDE DES PARAMÈTRES DE RÉTENTION

Le temps mort t_m : C'est le temps mis par la phase mobile (solvant non retenu par la colonne) pour traverser la colonne.

Le temps de rétention t_r : C'est le temps mis par un soluté pour traverser la colonne, il est caractéristique de la substance analysée. Si la substance a peu d'affinité avec la colonne, elle va peu interagir et va sortir rapidement de la phase stationnaire. Au contraire, si la substance a de l'affinité avec la colonne, elle va interagir et va sortir lentement de la phase stationnaire.

Le temps de rétention corrigé t'_r : C'est le temps passé par un soluté dans la phase stationnaire.

$$t'_r = t_r - t_m$$

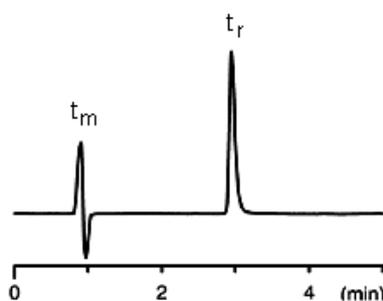


Figure 13 : Schématisation du t_m et du t_r sur un chromatogramme

Le coefficient de partage K : La concentration du composé dans la phase stationnaire est fonction de la concentration du composé dans la phase mobile. Cette fonction peut être représentée par une droite appelée isotherme de distribution. Le coefficient de partage K est la pente de cette droite, il définit l'affinité du composé pour l'une ou l'autre des phases et des différentes phases entre elles.

$$C_s = K \times C_m \quad \text{soit} \quad K = \frac{C_s}{C_m}$$

Avec C_s la concentration dans la phase stationnaire et C_m la concentration dans la phase mobile.

Le facteur de rétention (ou de capacité) k' : Il correspond à l'affinité des molécules vis-à-vis de la phase stationnaire. Ce paramètre décrit la vitesse de progression des composés dans la phase stationnaire.

$$k' = \frac{t_r - t_m}{t_m}$$

Si un composé n'est pas du tout retenu par la phase stationnaire il va sortir en même temps que le solvant donc le temps de rétention sera égal au temps mort et $k' = 0$. Si k' est trop grand, les temps de rétention sont trop importants et le temps d'analyse est trop long.

Les meilleures séparations se font lorsque k' est compris entre 1 et 5.

ÉTUDE DE L'EFFICACITÉ DE LA COLONNE

L'efficacité d'une colonne : elle correspond à N le nombre de plateaux théoriques qu'elle peut créer vis-à-vis du composé considéré. Plus le nombre de plateaux théoriques est élevé et plus l'efficacité de la colonne est bonne.

$$N = 16 \times \frac{t_r^2}{\omega^2} = 5,54 \times \frac{t_r^2}{\delta^2}$$

Avec t_r le temps de rétention, ω la largeur du pic à la base et δ la largeur du pic à mi-hauteur

La hauteur équivalente en plateaux théoriques HEPT : Pour une bonne efficacité on cherche à avoir des HEPT très faibles.

$$HEPT = \frac{L}{N}$$

Avec L la longueur de la colonne

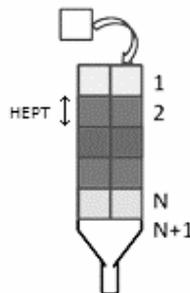


Figure 14 : Schématisation des plateaux théoriques dans une colonne

ÉTUDE DE LA SÉPARATION ENTRE DEUX COMPOSÉS

Le facteur de résolution R : il représente la résolution de la séparation entre 2 composés. La résolution est satisfaisante avec retour à la ligne de base entre les 2 pics lorsque $R \geq 1,5$.

$$R = 2 \times \frac{t_{rB} - t_{rA}}{\omega_A + \omega_B}$$

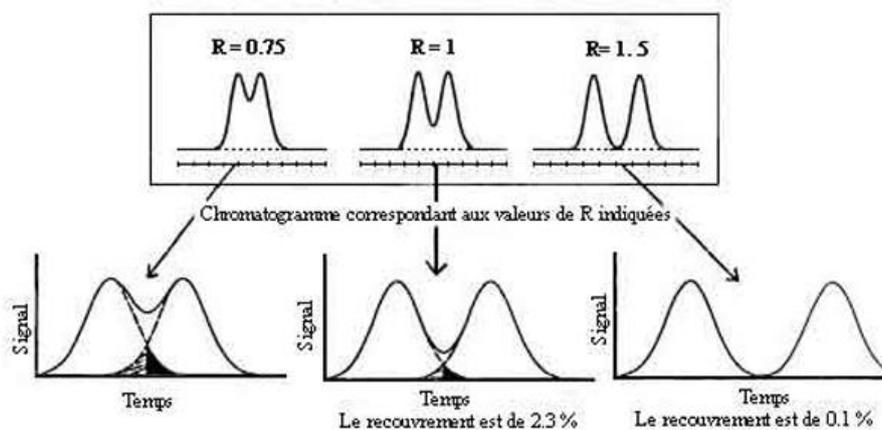


Figure 15: Schématisation de la résolution des pics en fonction de la valeur de R

Le facteur de sélectivité α : il décrit la position de l'un par rapport à l'autre de deux pics adjacents.

$$\alpha = \frac{k'_B}{k'_A}$$

Avec k' le facteur de rétention

c. Paramètres de l'HPLC

Pour réaliser le dosage du nadolol, il faut déterminer les différents paramètres de la méthode HPLC-UV : le temps d'analyse, le type de colonne à utiliser, la composition et le débit de la phase mobile, le volume d'injection, la température, la pression et la longueur d'onde de détection. Une méthode était déjà en place pour le dosage des β -bloquants, nous l'avons adaptée à la polarité du nadolol notamment dans le ratio du mélange de la phase mobile.

| | |
|------------------------------|--|
| Temps d'analyse | 40 minutes |
| Type de colonne | Stability 100-5 C18, 5 μ m (150 \times 4,6 mm) |
| Débit | 1 mL/min |
| Volume d'injection | 20 μ L |
| Température | 22°C |
| Pression | 150 – 165 bars |
| Longueur d'onde de détection | 220 nm |

Tableau 8 : Paramètres de la méthode de dosage HPLC du nadolol

d. Préparation de la phase mobile

La phase mobile est composée d'un mélange 75/25 de Dihydrogénophosphate de Potassium (KH_2PO_4) et de Méthanol (MeOH).

PROTOCOLE :

Dans un bécher d'un litre :

- Mélanger 2,043 g de KH_2PO_4 dans 750 mL d'eau HPLC
- Ajouter 250 mL de MeOH
- Ajuster à pH = 3 avec de l'acide orthophosphorique
- Filtrer la phase mobile à l'aide d'un système de filtration à usage unique de 0,45 μm . Porter des lunettes de protection lors de la filtration.
- Passer la phase mobile aux ultrasons pendant 15 minutes

La phase mobile se conserve un mois à 5°C.

3. Validation de la méthode de dosage

L'objectif de la validation d'une méthode analytique est de démontrer qu'elle est adaptée à l'usage auquel elle est destinée. Pour ce fait, la méthodologie à suivre est décrite par les recommandations Q2 (R1) [55] de l'ICH. L'objectif est d'obtenir une méthode linéaire, précise, juste et spécifique.

a. Linéarité

La linéarité d'une procédure analytique est sa capacité à obtenir des résultats directement proportionnels à la concentration de l'analyte dans l'échantillon. L'ICH recommande que la gamme soit composée d'au moins 5 points à 5 concentrations différentes, afin d'obtenir une droite de régression linéaire d'équation $y = ax + b$.

Nous avons ainsi réalisé 6 gammes indépendantes avec chacune 7 points de concentrations croissantes de nadolol : 25 – 50 – 100 – 200 – 300 – 400 – 500 $\mu\text{g/mL}$. Les différentes concentrations des gammes ont été diluées à partir de 6 solutions mères préparées indépendamment.

Les résultats des aires des pics obtenus pour chacun des points de chacune des gammes sont les suivants :

| | Niv1 | Niv2 | Niv3 | Niv4 | Niv5 | Niv6 | Niv7 |
|---------------------------------|---------------|---------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Nadolol | 25,000 | 50,000 | 100,000 | 200,000 | 300,000 | 400,000 | 500,000 |
| Auto 3 - 24/06/2022 - LD | 12,2390 | 24,6390 | 49,5270 | 100,0280 | 147,4100 | 195,1010 | 242,5610 |
| Auto 3 - 24/06/2022 - CG | 12,5820 | 24,8660 | 49,3020 | 97,7740 | 146,2650 | 194,7920 | 243,3780 |
| Auto 3 - 28/06/2022 - CG | 12,6110 | 24,6480 | 48,7620 | 98,2300 | 148,0690 | 194,5120 | 243,2740 |
| Auto 3 - 28/06/2022 - LD | 12,4650 | 24,6460 | 48,7450 | 98,1370 | 145,4550 | 194,1980 | 241,7100 |
| Auto 3 - 01/07/2022 - CG | 12,3450 | 24,8690 | 48,2130 | 97,0180 | 145,0020 | 192,6100 | 238,4350 |
| Auto 3 - 01/07/2022 - LD | 12,3900 | 24,6180 | 49,4530 | 97,1400 | 144,9770 | 190,0270 | 237,4310 |

Tableau 9 : Aires des pics des chromatogrammes correspondants aux 7 différents niveaux des 6 différentes gammes

Ces résultats ont été traduits en biais relatifs, soit en écarts en pourcentages des teneurs par rapport à la valeur attendue et sont retranscrits dans le tableau suivant :

| | Niv1 | Niv2 | Niv3 | Niv4 | Niv5 | Niv6 | Niv7 |
|---------------------------------|---------------|---------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Nadolol | 25,000 | 50,000 | 100,000 | 200,000 | 300,000 | 400,000 | 500,000 |
| Auto 3 - 24/06/2022 - LD | -7,5657 | -2,6794 | -0,0550 | 2,0042 | 0,5483 | -0,0205 | -0,4570 |
| Auto 3 - 24/06/2022 - CG | -1,2349 | -0,0240 | 0,3096 | 0,0645 | -0,0042 | -0,0199 | -0,0051 |
| Auto 3 - 28/06/2022 - CG | -1,1326 | -1,0651 | -0,9492 | 0,3836 | 1,0822 | -0,3142 | -0,1984 |
| Auto 3 - 28/06/2022 - LD | -2,1222 | -0,6302 | -0,4286 | 0,9081 | -0,0775 | 0,1672 | -0,1956 |
| Auto 3 - 01/07/2022 - CG | -4,4904 | 0,2250 | -0,9868 | 0,6247 | 0,5885 | 0,3735 | -0,5024 |
| Auto 3 - 01/07/2022 - LD | -8,4428 | -2,5265 | 1,2328 | 1,0167 | 1,0503 | -0,4057 | -0,2841 |
| - EMA | -10% | -10% | -10% | -10% | -10% | -10% | -10% |
| + EMA | +10% | +10% | +10% | +10% | +10% | +10% | +10% |

Tableau 10 : Biais relatifs correspondants aux différents niveaux des 6 gammes

L'écart maximal acceptable (EMA) est fixé à 10% par le LCQ, or tous les biais relatifs obtenus sont inférieurs à 10%. Nous pouvons en déduire que le domaine de linéarité de la méthode se situe entre 25 et 500 µg/mL.

La limite de quantification et la limite de détection sont ici confondues et correspondent à une concentration de nadolol de 25 µg/mL.

b. Précision

La précision d'une méthode analytique exprime la capacité à générer les mêmes résultats entre de multiples prélèvements issus d'une série de mesures d'un échantillon homogène. La précision peut être considérée à différents niveaux : la répétabilité et la fidélité intermédiaire. La précision est exprimée par le coefficient de variation d'une série de mesures.

i. Répétabilité

La répétabilité exprime la précision de l'analyse dans les mêmes conditions opératoires : même opérateur, même appareil d'analyse et dans un court intervalle de temps entre les répétitions. Elle doit être évaluée en utilisant un minimum de 9 mesures couvrant la gamme. Nous avons réalisé 3 séries d'analyses de 15 répétitions aux 3 concentrations suivantes : 180 – 200 – 220 µg/mL.

| Échantillons (µg/mL) | Nombre (N) | Moyenne (µg/mL) | Écart-type | CV (%) | CV (%) limite | Conclusion C/NC |
|----------------------|------------|-----------------|------------|--------|---------------|-----------------|
| 180 | 15 | 182,428 | 0,225 | 0,123 | 5 % | C |
| 200 | 15 | 202,206 | 2,003 | 0,991 | 5 % | C |
| 220 | 15 | 221,591 | 0,452 | 0,204 | 5 % | C |

Tableau 11 : Répétabilité de la méthode de dosage du nadolol

Les coefficients de variation sont inférieurs à 5%, la méthode analytique est répétable.

ii. Fidélité intermédiaire

La fidélité intermédiaire exprime la précision de l'analyse au sein d'un laboratoire dans des conditions opératoires différentes, en faisant varier au moins un des facteurs suivants : opérateur, appareil de mesure, jour de mesure, lots des réactifs, etc... En respectant la variation d'au moins un paramètre, nous avons réalisé 6 solutions mères à partir desquelles nous avons obtenu par dilution 3 solutions de 3 concentrations : 180 – 200 – 220 µg/mL et chaque échantillon a été analysé 3 fois.

| Échantillons (µg/mL) | Nombre (N) | Moyenne (µg/mL) | Écart-type | CV (%) | CV (%) limite | Conclusion C/NC |
|----------------------|------------|-----------------|------------|--------|---------------|-----------------|
| 180 | 18 | 179,86 | 0,104 | 0,829 | 5 % | C |
| 200 | 18 | 201,01 | 0,132 | 0,514 | 5 % | C |
| 220 | 18 | 219,32 | 0,033 | 0,956 | 5 % | C |

Tableau 12 : Fidélité intermédiaire de la méthode de dosage du nadolol

Les coefficients de variation sont inférieurs à 5%, la méthode analytique est fidèle.

c. Justesse

La justesse d'une méthode analytique, aussi appelée exactitude, exprime l'étroitesse de l'accord entre la valeur moyenne d'une série de mesure d'un échantillon homogène et la valeur considérée comme valeur de référence de cette mesure. Elle a été étudiée sur les mêmes prélèvements que ceux utilisés pour calculer la fidélité intermédiaire en calculant le biais relatif, soit l'écart en pourcentages de la moyenne des teneurs par rapport à la valeur attendue.

| Echantillons (µg/mL) | Nombre (N) | Valeur Labo (µg/mL) | Valeur MR (µg/mL) | Biais absolu (µg/mL) | Biais relatif (%) | Biais Limite (%) | Conclusion C/NC |
|-------------------------|---------------|---------------------------|-------------------------|----------------------------|-------------------------|------------------------|--------------------|
| 180 | 18 | 179,86 | 180 | -0,142 | -0,1 % | 5 % | C |
| 200 | 18 | 201,01 | 200 | 1,008 | -0,5 % | 5 % | C |
| 220 | 18 | 219,32 | 220 | -0,68 | -0,3 % | 5 % | C |

Tableau 13 : Justesse de la méthode de dosage du nadolol

Les biais relatifs sont inférieurs à la limite fixée par le LCQ soit 5%, la justesse de la méthode analytique est conforme.

d. Spécificité et étude de dégradation forcée

La spécificité d'une méthode analytique est sa capacité à garantir que le signal mesuré provient uniquement de la substance à analyser et ce même en présence d'autres composants susceptibles d'être présents (excipients, produits de dégradation, impuretés, ...). Cela signifie qu'il n'existe pas d'interférence de signal entre l'analyte et d'autres composants dans les conditions opératoires et que par conséquent la méthode est dite « indicatrice de stabilité ».

Pour vérifier la spécificité d'une méthode, nous réalisons une étude de dégradation forcée du principe actif. Cette étude permet d'évaluer la résistance du PA à différents facteurs de dégradation (acide, base, oxydation, lumière, chaleur) et de mettre en évidence l'apparition de produits de dégradation de cette molécule.

De plus l'étude de dégradation forcée est un test préliminaire nécessaire pour toute étude de stabilité d'une préparation hospitalière au cours de laquelle l'analyse semi-quantitative des produits de dégradation est réalisée.

i. En présence d'agent oxydant

Au contact de peroxyde d'hydrogène concentré à 3%, pendant 19 jours, le nadolol se dégrade de 4,6% et 6 produits de dégradation se forment aux temps de rétention : $tr_1 = 6,6$ min, $tr_2 = 9,3$ min, $tr_3 = 10,0$ min, $tr_4 = 10,5$ min, $tr_5 = 17,3$ min et $tr_6 = 27,2$ min. Le petit pic présent au $tr = 6,5$ min est celui lié à une impureté native I_1 que l'on retrouve dans le chromatogramme du nadolol non dégradé.

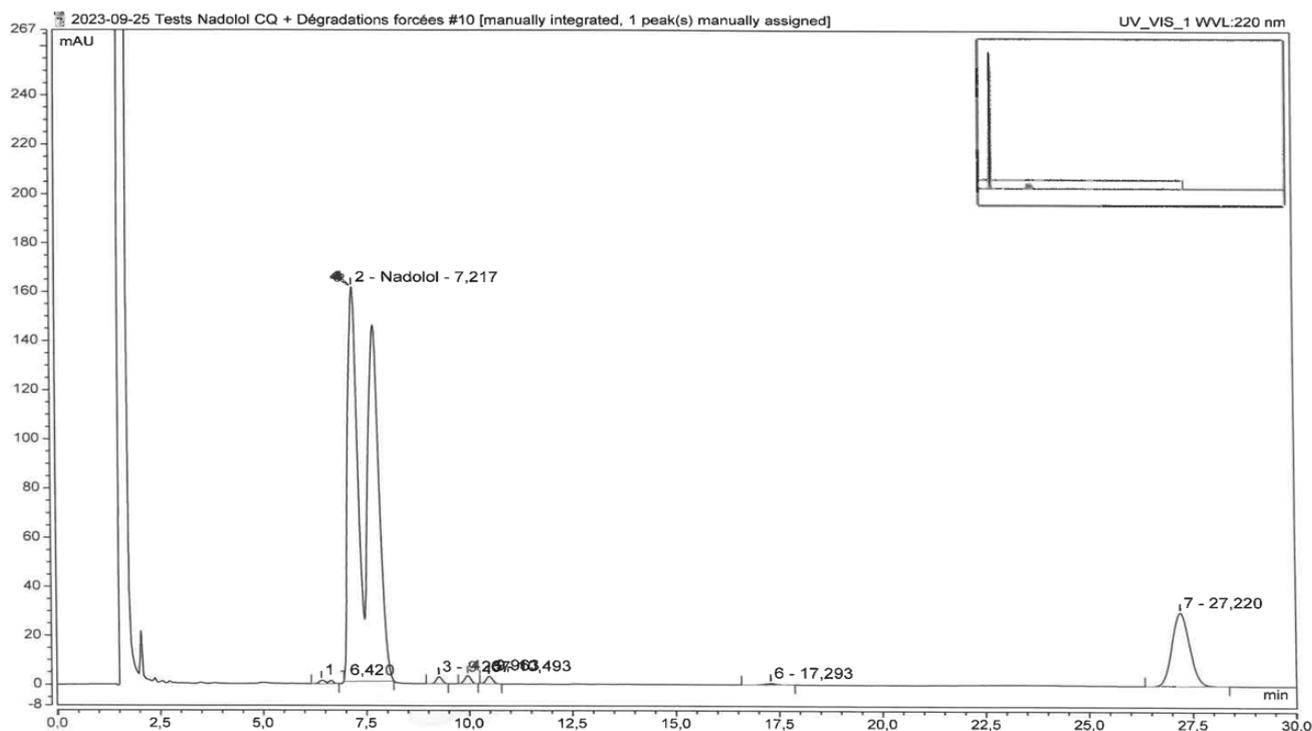


Figure 16 : Chromatogramme du nadolol dégradé dans l'eau oxygénée

ii. Par exposition à la chaleur

Soumis à une chaleur de 80°C pendant 8 jours, le nadolol se dégrade de 0,5% et 2 produits de dégradation se forment aux temps de rétention : $tr_1 = 4,1$ min et $tr_2 = 4,5$ min. On retrouve le pic au $tr = 6,5$ min lié à l'impureté native I_1 .

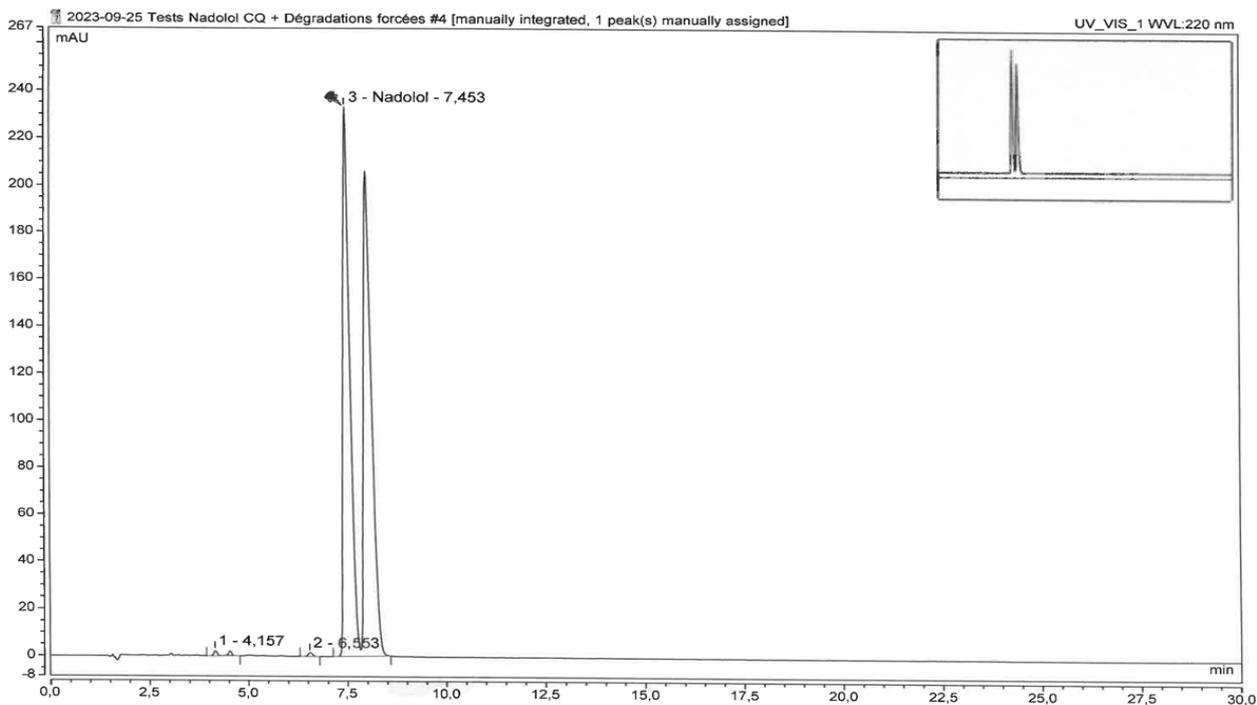


Figure 17 : Chromatogramme du nadolol dégradé par la température

iii. En présence d'Acide

Au contact d'acide chlorhydrique 2,5M, pendant 19 jours, aucune diminution de teneur significative n'a été reportée pour le nadolol mais un produit de dégradation apparait au $t_r = 13,3$ minutes.

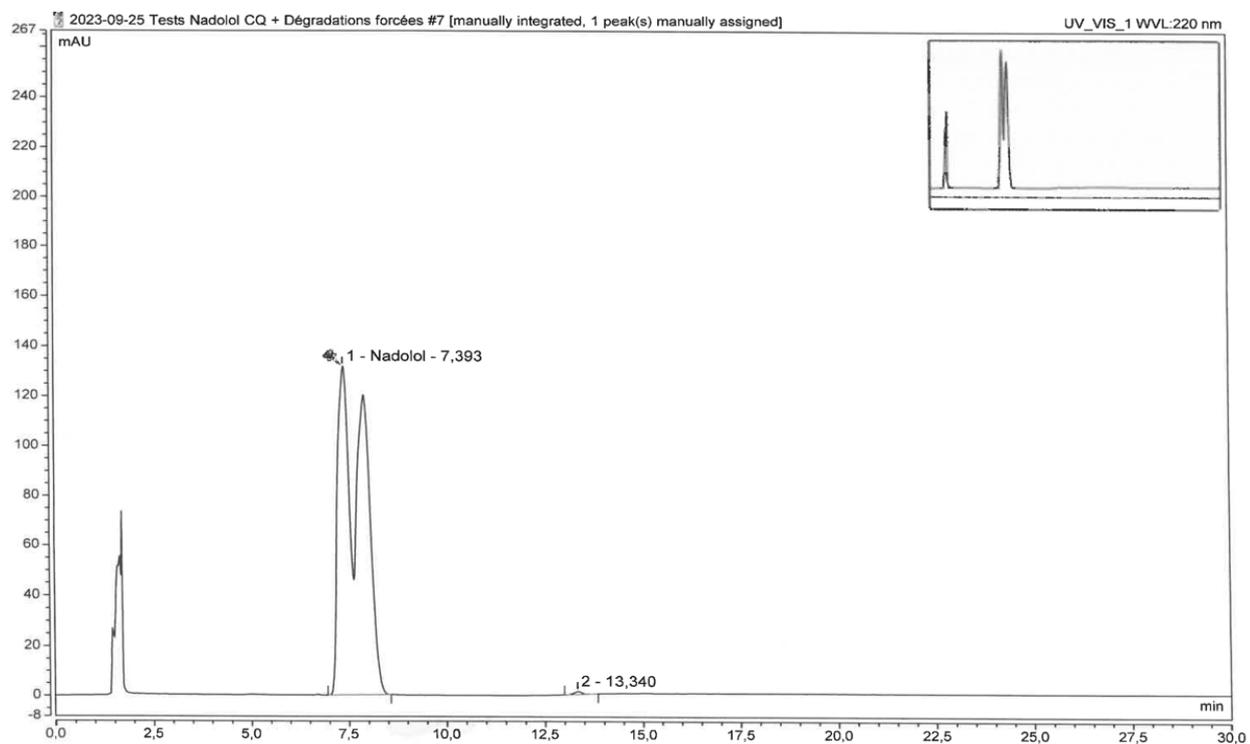


Figure 18 : Chromatogramme du nadolol dégradé dans l'acide chlorhydrique

iv. En présence de Base

Au contact d'hydroxyde de sodium 2,5M, pendant 19 jours, le nadolol ne se dégrade pas du tout, aucun produit de dégradation n'est détectable.

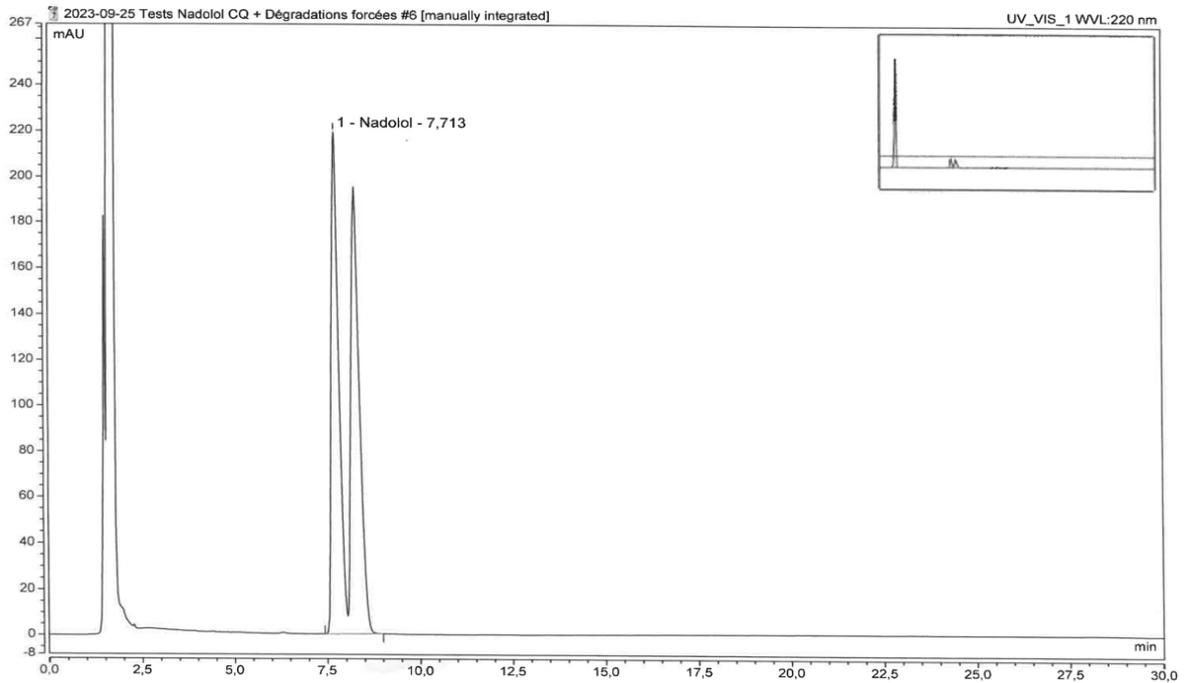


Figure 19 : Chromatogramme du nadolol dégradé dans la soude

v. Par exposition à la lumière

Il en est de même par exposition aux UV (Sunlamp) pendant 19 jours.

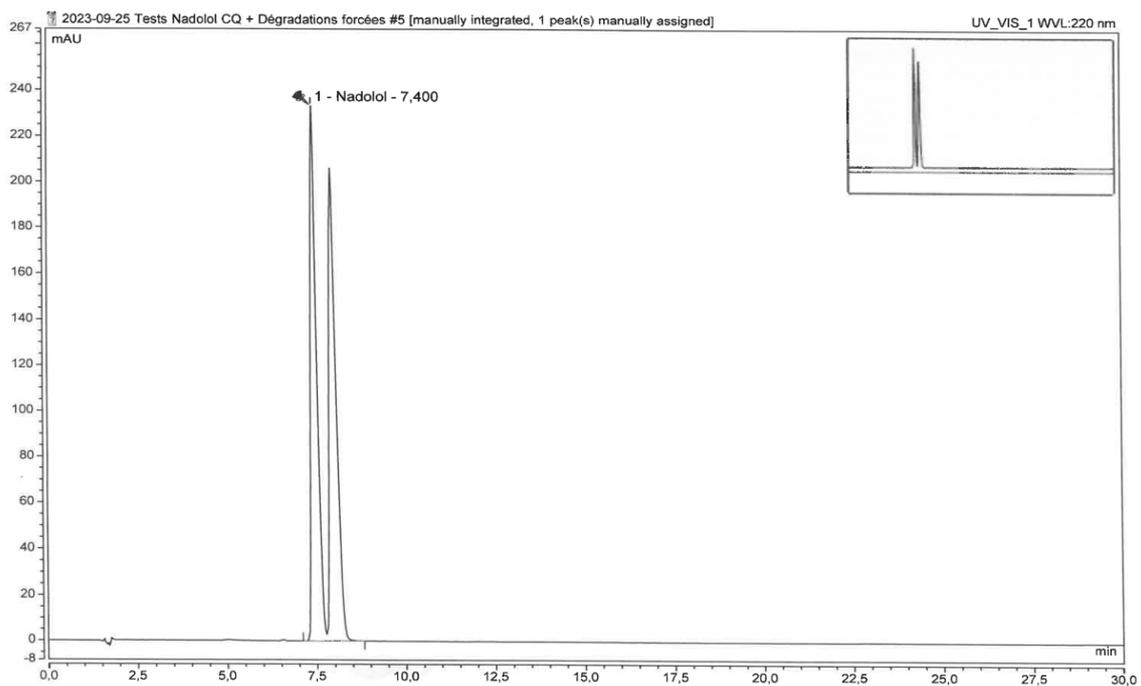


Figure 20 : Chromatogramme du nadolol dégradé par les UV

vi. Interprétation

Le nadolol est une molécule plutôt résistante, dont la voie de dégradation principale semble être l'oxydation. Une dégradation par alcalinisation ou par la lumière semble peu probable en conditions réelles.

Aucune interférence analytique n'a été mise en évidence entre les pics du nadolol et ceux de ses produits de dégradation. La méthode d'analyse peut donc être considérée comme indicatrice de stabilité, cependant les dégradations par chaleur, lumière, acide et base vont être réanalysées à T_{30j} et T_{60j} pour le confirmer.

4. Dosage en routine

a. Préparation des CQ (Contrôles Qualités)

Les CQ sont des solutions de concentration connue en analyte, préparées de façon indépendante, à partir des standards (primaire ou secondaire). Ils sont utilisés pour vérifier la conformité du système de dosage mais aussi en étalon externe permettant par comparaison des aires des pics de déterminer la concentration des échantillons à analyser.

Afin de réduire les biais interpersonnels, deux CQ à une concentration de 200 µg/mL de nadolol sont préparés indépendamment par deux opérateurs différents.

PROTOCOLE :

- Peser 20 mg de nadolol poudre (tenir compte de la pureté du standard) et les ajouter dans une fiole jaugée de 100 mL
- Compléter au $\frac{3}{4}$ avec de l'eau HPLC
- Mettre 5 minutes aux ultrasons
- Compléter au trait de jauge avec de l'eau HPLC
- Remettre 5 minutes aux ultrasons
- On obtient un CQ à 200 µg/mL

Lors de chaque analyse, le CQ1 et le CQ2 seront injectés avant les échantillons. Le pourcentage de variation entre les aires des pics des deux CQ ne doit pas dépasser 5% afin de garantir la fiabilité de l'analyse.

b. Conformité du standard

Nous avons vu que les CQ sont réalisés à partir du standard primaire (I) ou secondaire (II) :

- Standard I : flacon de 100 mg, EDQM référence Y0000146, conservation $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$
- Standard II : flacon de 400 mg, Sigma Aldrich référence PHR3212, conservation $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$

Le standard I est un étalon primaire international désigné comme présentant les plus hautes qualités métrologiques et dont la valeur assignée par l’OMS est acceptée sans le comparer à un autre étalon ; qui à l’échelle mondiale sert de base à la fixation de la valeur de tous les autres étalons de la grandeur concernée. On peut le commander sur le site de la Direction Européenne de la Qualité du Médicament et soins de santé (EDQM). [56]

Le standard II est un étalon secondaire, moins coûteux, qui doit présenter les mêmes propriétés que le standard I. Il est employé pour les contrôles qualité effectués en routine afin de limiter l’utilisation des standards I. Pour pouvoir utiliser un standard II, à chaque ouverture d’un flacon portant un nouveau numéro de lot, il faut vérifier sa conformité par comparaison avec le standard I. [57]

Pour cela il faut analyser par HPLC un CQ à $200 \mu\text{g/mL}$ réalisé avec chacun des standards et calculer le coefficient de variation des aires correspondant au nadolol quantifié avec les 2 standards.

Le coefficient de variation (RSD) des aires des pics nadolol des 2 standards doit être inférieur à 5% :

- $\text{RSD} < 5\%$: standard II conforme, peut être utilisé en routine
- $\text{RSD} > 5\%$: refaire le test et voir le responsable technique

c. Conformité du système

Le test d’adéquation du système (System suitability test = SST) [58] est utilisé pour vérifier que le système de mesure et les opérations analytiques sont adéquats pour l’analyse prévue. Il permet un contrôle de la qualité en augmentant la détectabilité des défaillances potentielles.

En effet, les performances du système peuvent changer en raison d’une utilisation continue. Le SST est ainsi réalisé une fois par mois pour chaque automate, de la manière suivante : deux CQ de nadolol à $200 \mu\text{g/mL}$ sont réalisés par deux personnes différentes à partir du standard. Le CQ1 est injecté une fois dans l’HPLC puis le CQ2 l’est six fois.

Les critères d’acceptation sont décrits par l’USP [59] et le Center for Drug Evaluation and Research (CDER) [60] faisant partie de la FDA. Ce sont :

- Le **facteur de rétention** : décrit la vitesse de progression des composés dans la colonne.
- Le **facteur de résolution** : permet de garantir que 2 pics sont correctement séparés.
- Le **nombre de plateaux théoriques** : représente l'efficacité de la colonne.
- Le **facteur de trainée** : informe sur la symétrie du pic. Lorsque l'asymétrie augmente, l'intégration et donc la précision deviennent moins fiables.
- Les **injections répétées d'un CQ** : permet de vérifier la précision du système.

| Paramètre | Critère de conformité | Absence de résultat | Non-conformité |
|-------------------------------------|----------------------------------|---|---|
| Facteur de rétention k' | $k' > 2$ (FDA) | Possible (pas de front de solvant) = voir responsable technique | Refaire phase mobile et changer colonne puis relancer |
| Facteur de résolution R | $R > 2$ (FDA) | Possible (1 pic) = voir responsable technique | |
| Nombre de plateaux théoriques N | $N > 2000$ (FDA) | | |
| Facteur de trainée T ($a+b/2a$) | $T \leq 3$ (Nadolol tablets USP) | | |
| Répétabilité (RSD) des 6 injections | $< 2\%$ (Nadolol tablets USP) | | |

Tableau 14 : Critères d'acceptation du SST du nadolol

d. Préparation des échantillons

La suspension buvable de nadolol est concentrée à 10 mg/mL.

PROTOCOLE :

- Dans un falcon de 50 mL verser 25 mL d'eau HPLC
- Retirer 0,5 mL
- Rajouter 0,5 mL de la suspension de nadolol en rinçant le cône de prélèvement 3 fois
- Vortexer 1 minute puis centrifuger 5 minutes à 2000 tours/minute
- On obtient S_0 à 200 $\mu\text{g/mL}$ de nadolol

À la fin du dosage la colonne est rincée par un mélange méthanol/eau HPCL (50/50, v/v).

e. Interprétation du chromatogramme

L'aire sous la courbe, calibrée par les CQ de concentration 200 $\mu\text{g/mL}$, renseigne la concentration de la suspension analysée en $\mu\text{g/mL}$. Le résultat est multiplié par 50 puis divisé par 1 000 pour obtenir la concentration en nadolol de la suspension en mg/mL.

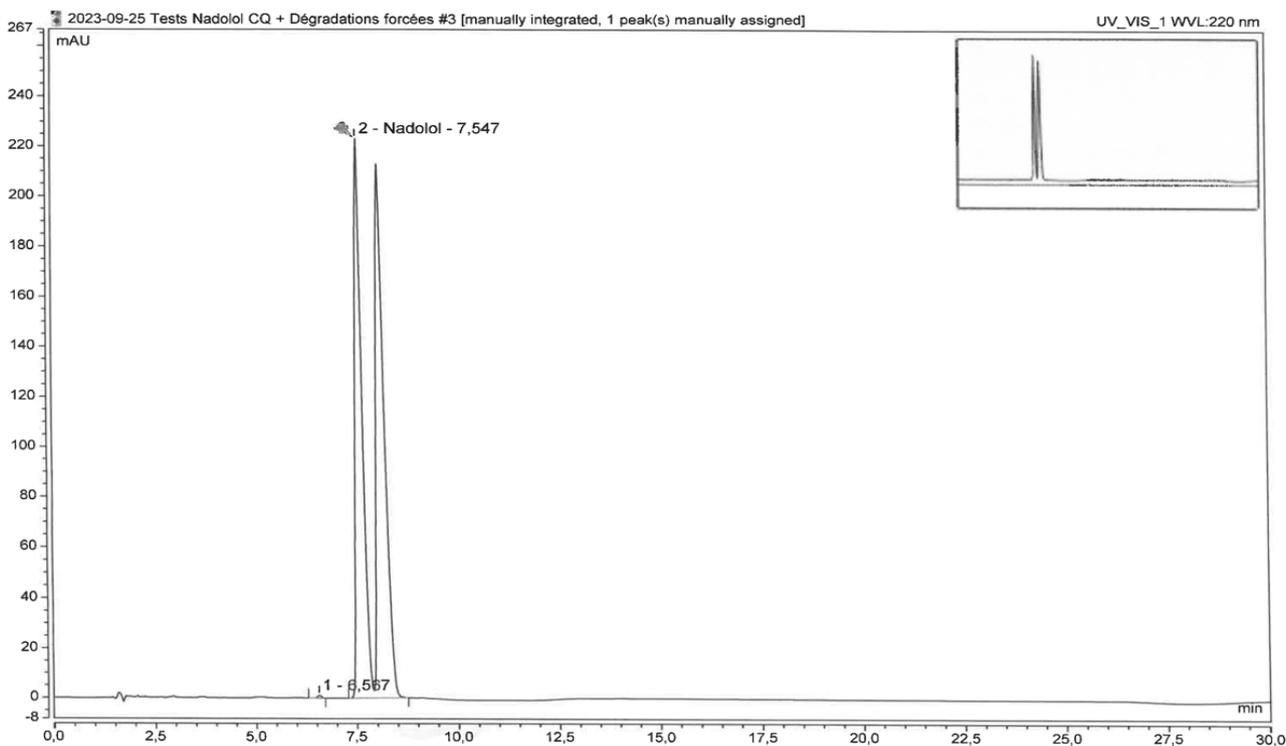


Figure 21 : CQ de nadolol à 200 µg/mL

III. Mise au point des tests microbiologiques

1. Dénombrements microbiens (DGAT et DMLT)

La présence de certains microorganismes dans des préparations non stériles peut réduire voire annuler l'effet thérapeutique et constitue un danger potentiel pour le patient.

Le dénombrement microbien des préparations non stériles est décrit au chapitre 2.6.12 « Contrôle microbiologique des produits non stériles : essais de dénombrement microbien » [27] de la Pharmacopée Européenne et les valeurs d'acceptation sont détaillées au chapitre 5.1.4 « Qualité microbiologique des préparations pharmaceutiques et des substances pour usage pharmaceutique non stériles » [61].

D'après la pharmacopée 2.6.12., 10 mL de prise d'essai sont nécessaires, sauf exception justifiée et autorisée. Ce volume est difficilement compatible avec des analyses de préparations hospitalières (volume total souvent inférieur à 1000 mL, nombre d'unités produites inférieures à 100, petits flaconnages adaptés aux populations pédiatriques...). Compte tenu de la faible taille des lots produits et de la faible contenance des flacons, le volume de prise d'essai a été réduit à 1 mL.

a. Méthode par filtration + α -amylase

Afin de s'affranchir des effets antimicrobiens du Syrspend[®], nous avons choisi de réaliser le dénombrement microbien des suspensions de nadolol par filtration sur membrane.

Nous utilisons pour cela une pompe Microsart[®] du laboratoire Sartorius, ainsi que la rampe de filtration et le kit de filtration Microsart[®] @filter adaptés (entonnoir + membrane filtrante avec des pores de 0,45 μ m). La rampe de filtration est reliée à la pompe et possède 3 postes de filtration.

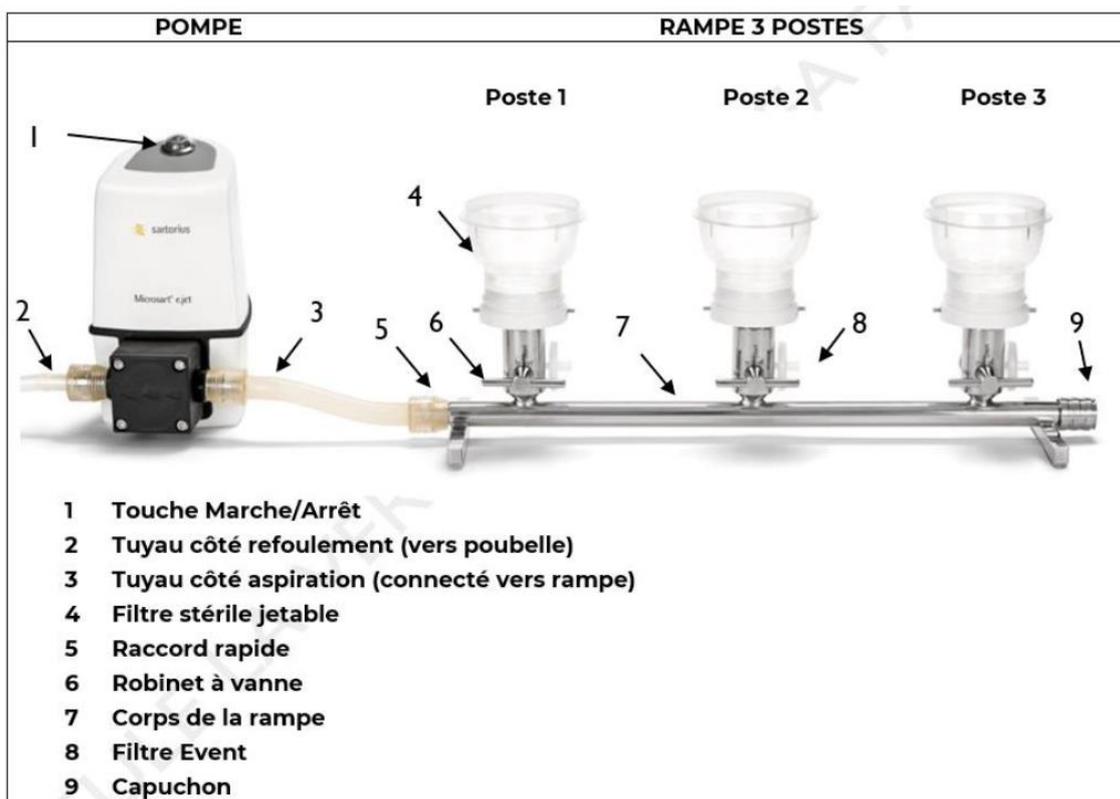


Figure 22 : Système de filtration Microsart[®]

FILTRATION DES ÉCHANTILLONS – PROTOCOLE :

- Vérifier que les robinets à vanne de la rampe soient en position fermée
- Placer le kit de filtration sur la rampe
- Verser le contenu de l'échantillon dans l'entonnoir
- Mettre la pompe en marche et ouvrir la vanne du robinet
- Rincer l'entonnoir deux fois avec 20 mL de Lethen Broth en ouvrant et fermant la vanne à chaque fois puis fermer le robinet
- Enlever l'entonnoir mais pas la membrane
- Transférer la membrane sur la gélose correspondante

Les géloses TSA et SAB utilisées sont des géloses adaptées, les Microsart® @media avec système de transfert sans contact des membranes sur le milieu gélosé, via un couvercle qui s'adapte sur la base des Microsart® @filter.



Figure 23 : Gélose Microsart® @media

Nous avons cependant été confronté à des difficultés lors de la filtration. En effet l'amidon présent dans le Syrspend® augmente la viscosité de la préparation et obstrue les pores de la membrane filtrante. Il a donc fallu trouver une solution pour éliminer cet amidon.

Après plusieurs essais infructueux par filtration sur membrane hydrophile, sur membrane lipophile, extraction par huile d'olive ou encore par myristate d'isopropyle, la méthode a été mise au point en ajoutant de l' α -amylase aux échantillons, enzyme dégradant l'amidon par hydrolyse. Nous utilisons l'enzyme issue de *Bacillus licheniformis*, référence A4551-1G de la société Sigma-Aldrich commercialisée par le laboratoire Merck.

b. Applicabilité de la méthode en présence du produit

Afin de pouvoir utiliser la méthode en routine, il est important de démontrer son applicabilité en présence de la suspension à analyser, méthode également décrite au chapitre 2.6.12 de la PE.

Pour cela, il faut réaliser en parallèle des encensements sur géloses TCA et Sabouraud :

- Du produit seul : témoins négatifs
- De souches bactériennes et mycologiques de référence Pharmacopée : témoins positifs
- Du produit en présence de chacune des souches de référence : essais

Les souches utilisées sont sous forme de Bioball® de 30 UFC, commercialisées par le laboratoire Biomérieux.

Liste des réactifs :

- 1 flacon de suspension buvable de nadolol
- 48 flacons de bouillon Letheen Broth
- 4 tubes de 9 mL de diluant Pharmacopée pH 7
- 14 géloses Trypticase Soja Microsart® @media
- 10 géloses Sabouraud/antibiotiques Microsart® @media
- 4 Bioball® Biomérieux pour chacune des souches de référence :
 - *Staphylococcus aureus* NCTC10788 (Bioball® Biomérieux référence 56045)
 - *Bacillus subtilis* NCTC10400 (Bioball® Biomérieux référence 56024)
 - *Pseudomonas aeruginosa* NCTC12924 (Bioball® Biomérieux référence 56040)
 - *Candida albicans* NCPF3179 (Bioball® Biomérieux référence 56026)
 - *Aspergillus brasiliensis* NCPF2275 (Bioball® Biomérieux référence 56022)



Figure 24 : Bioball®

Les différentes souches sont contenues dans des Bioball® de 30 UFC (unité formant des colonies). Ce sont des petites boules solubles dans des solutions aqueuses. Avant utilisation, sortir les Bioball® du congélateur et les laisser revenir à température ambiante.

i. Préparation du diluant + α -amylase

Cette préparation n'étant pas stable elle doit être préparée extemporanément.

PROTOCOLE :

- Hors PSM peser 150 mg d' α -amylase dans un falcon de 50 mL
- Sous le PSM ajouter 30 mL de diluant Pharmacopée pH 7
- Homogénéiser jusqu'à dissolution complète
- Filtrer avec une seringue stérile et un filtre de diamètre de filtration de 0,2 μ m

On obtient une solution à 5mg/mL d' α -amylase.

ii. Préparation des échantillons pour ensemencement bactériologique

PROTOCOLE : Travailler sous le PSM

- Homogénéiser la suspension de nadolol.
- Prendre 2 tubes de 9 mL de diluant Pharmacopée pH 7 et ajouter 1 mL de préparation hospitalière dans chacun des tubes.
- Identifier les 14 flacons de Lethen broth de 90 mL comme suit : 2 × Témoins négatifs produits – 2 × Témoins positifs *Staphylococcus* – 2 × Témoins positifs *Pseudomonas* – 2 × Témoins positifs *Bacillus* – 2 × Essais Nadolol + *Staphylococcus* – 2 × Essais Nadolol + *Pseudomonas* – 2 × Essais Nadolol + *Bacillus*. À chaque flacon échantillon correspondra un flacon Lethen broth de rinçage.
- Introduire 2,5 mL du mélange préparation hospitalière + diluant dans les 8 flacons Lethen broth concernés (témoins négatifs + essais).
- Prendre 2 tubes de diluant Pharmacopée et distribuer 2,5 mL dans les 6 flacons de Lethen broth témoins positifs des souches bactériennes.
- Introduire 1 mL de diluant + α -amylase dans tous les flacons échantillons de Lethen broth.
- Ajouter une Bioball® (30 UFC) de la souche bactérienne concernée dans chacun des flacons témoins positifs et essais.
- Bien agiter et attendre 5 minutes avant de passer à la filtration.

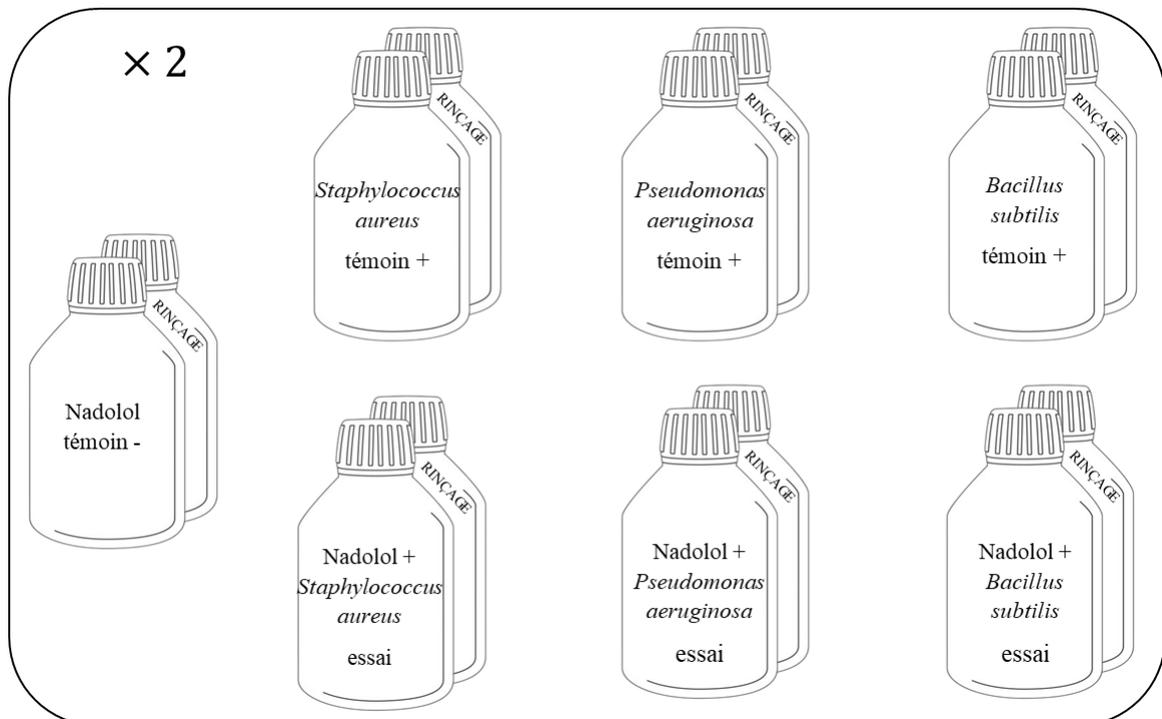


Figure 25 : Schématisation des flacons de Lethen broth échantillons pour ensemencements bactériologiques

iii. Préparation des échantillons pour ensemencement mycologique

PROTOCOLE : Travailler sous le PSM

- Homogénéiser la suspension de nadolol.
- Identifier les 10 flacons de Lethen broth de 90 mL comme suit : 2 × Témoins négatifs produits – 2 × Témoins positifs *Aspergillus* – 2 × Témoins positifs *Candida* – 2 × Essais Nadolol + *Aspergillus* – 2 × Essais Nadolol + *Candida*. À chaque flacon échantillon correspondra un flacon Lethen broth de rinçage.
- Introduire 1 mL de la préparation hospitalière de nadolol dans les 6 flacons Lethen broth concernés (témoins négatifs + essais).
- Introduire 1 mL de diluant + α -amylase dans tous les flacons échantillons de Lethen broth.
- Ajouter une Bioball[®] (30 UFC) de la souche mycologique concernée dans chacun des flacons témoins positifs et essais.
- Bien agiter et attendre 5 minutes avant de passer à la filtration.

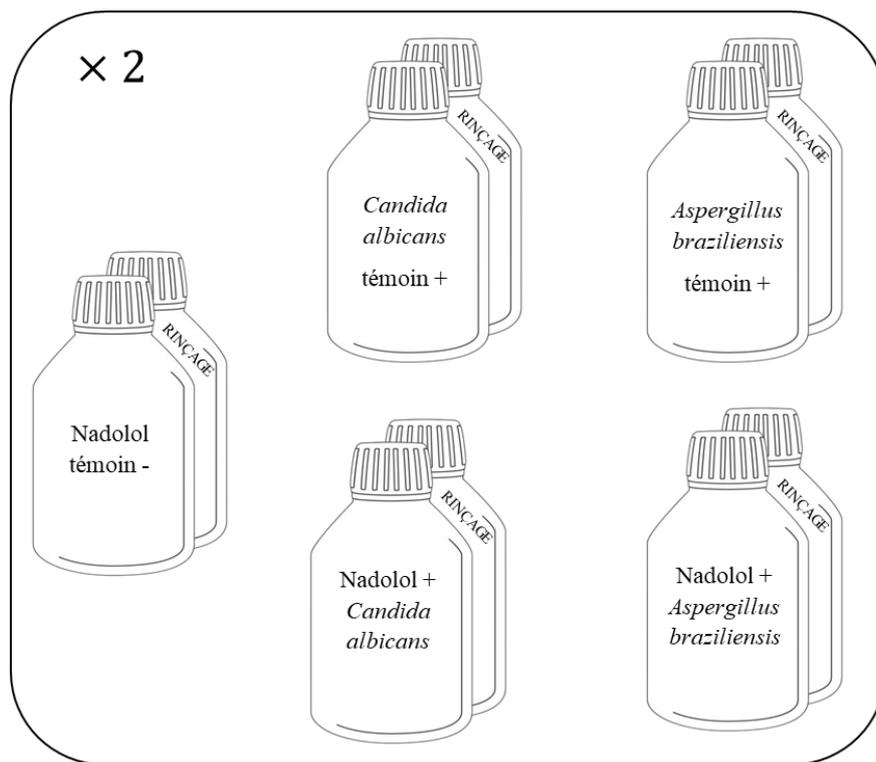


Figure 26 : Schématisation des flacons de Lethen broth échantillons pour ensemencements mycologiques

iv. Ensemencements

Dans chacune des conditions, 2 géloses sont ensemencées par filtration sur membrane comme décrit au paragraphe III.1.a. Les échantillons pour ensemencements bactériologiques sont déposés sur des géloses TSA, et incubés 3 jours dans une étuve à 30-35°C. Les échantillons pour ensemencements mycologiques sont déposés sur des géloses SAB, et incubés 5 jours dans une étuve à 20-25°C.

v. Validation de la méthode

À l'issue de la durée d'incubation il faut calculer la moyenne des colonies ayant poussé dans chacune des conditions, avec chaque germe : témoins produit, témoins souches, essais. Les géloses Microsart® @media étant plus petites que les géloses habituelles, un précomptage des colonies est réalisé à la moitié du temps d'incubation.

Concernant les géloses **Trypticase Soja** pour ensemencement **bactériologique**, nous avons :

- 2 géloses témoins du produit, que nous nommons UFC 1.
- 6 géloses témoins des souches bactériennes (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* et *Pseudomonas aeruginosa*), que nous nommons UFC 2.
- 6 géloses essais avec chacune des souches bactériennes au contact de la suspension de nadolol, que nous nommons UFC 3.

Pour que la méthode soit valide, il faut que :

- Les nombres moyens d'UFC des essais soient supérieurs au nombre moyen d'UFC des témoins du produit, soit que **UFC 3 > UFC 1**.
- Le nombre moyen obtenu pour chacune des souches de référence au contact du produit, ne doit pas varier de plus d'un facteur de 2 de la valeur obtenue en l'absence de produit, soit que **UFC 3 ≥ UFC 2 divisé par 2** et que **UFC 3 ≤ UFC 2 multiplié par 2**.

Concernant les géloses **Sabouraud** pour ensemencement **mycologique**, nous avons :

- 2 géloses témoins du produit, que nous nommons UFC 1'.
- 4 géloses témoins des souches mycologiques (*Candida albicans* et *Aspergillus brasiliensis*), que nous nommons UFC 2'.
- 4 géloses essais avec chacune des souches mycologiques au contact de la suspension de nadolol, que nous nommons UFC 3'.

Pour que la méthode soit valide, il faut que :

- Les nombres moyens d'UFC des essais soient supérieurs au nombre moyen d'UFC des témoins du produit, soit que **UFC 3' > UFC 1'**.
- Le nombre moyen obtenu pour chacune des souches de référence au contact du produit, ne doit pas varier de plus d'un facteur de 2 de la valeur obtenue en l'absence de produit, soit que **UFC 3' ≥ UFC 2' divisé par 2** et que **UFC 3' ≤ UFC 2' multiplié par 2**.

vi. Résultats

Le nombre d'UFC compté sur chacune des géloses est répertorié dans le tableau suivant, ainsi que la moyenne des UFC obtenues sur les deux géloses dans chacune des conditions.

| | | TEMOIN SOUCHE | | ESSAI PREPARATION | |
|-----------------|---|------------------------------|----------------|------------------------------|----------------|
| | | UFC Gélose 1 +Gélose 2 | Moyenne UFC | UFC Gélose 1 +Gélose 2 | Moyenne UFC |
| BACTERIO | Contrôle négatif avec produit sans souche | | | 0 + 0 | 0 |
| | Staph Aureus | 26 + 24 | 25 | 26 + 21 | 23,5 |
| | Bacillus Subtilis | 13 + 13 | 13 | 16 + 6 | 11 |
| | Pseudomonas Aeruginosa | 25 + 31 | 28 | 35 + 30 | 32,5 |
| MYCO | Contrôle négatif avec produit sans souche | | | 0 + 0 | |
| | Candida Albicans | 11 + 9 | 10 | 9 + 18 | 13,5 |
| | Aspergillus Braziliensis | 14 + 15 | 14,5 | 12 + 12 | 12 |

Tableau 15 : Récapitulatif du nombre de colonies dénombrées sur chacune des géloses

Les paramètres de validation de la méthode sont corrects pour les ensemencements bactériologiques :

- UFC 3 > UFC 1
- UFC 3 ≥ UFC 2 divisé par 2
- UFC 3 ≤ UFC 2 multiplié par 2

Les paramètres de validation de la méthode sont corrects pour les ensemencements mycologiques :

- UFC 3' > UFC 1'
- UFC 3' ≥ UFC 2' divisé par 2
- UFC 3' ≤ UFC 2' multiplié par 2

La méthode d'ensemencement par filtration sur membrane est applicable en routine pour le dénombrement microbien des préparations hospitalières de nadolol à 10 mg/mL.

c. Réalisation en routine

i. Préparation des échantillons

Pour un lot de flacons de suspension buvable de nadolol à 10 mg/mL, 2 flacons seront analysés, la prise d'essai est fixée à 1 mL.

PROTOCOLE : Travailler sous le PSM

- Dans un tube de 9 mL de diluant Pharmacopée pH 7 ajouter 1 mL de la préparation à analyser.
- Vortexer environ 1 minute.
- Prélever à la pipette de précision 2,5 mL du mélange et les introduire dans un flacon de Lethen broth de 90 mL (destiné à gélose TSA).
- Prélever également directement 1 mL de préparation à analyser non diluée et les introduire dans un flacon de Lethen broth de 90 mL (destiné à gélose SAB).
- Introduire 1 mL de diluant + α -amylase dans les deux flacons de Lethen broth.
- Recommencer les étapes pour le deuxième flacon de préparation hospitalière.
- En parallèle, réaliser un blanc analytique (témoin négatif pour gélose TSA) : introduire 2,5 mL de diluant Pharmacopée pH 7 dans un flacon de Lethen broth de 90 mL et ajouter 1 mL de diluant + α -amylase.

Procéder à l'ensemencement par filtration sur membrane à l'aide de la rampe Microsart® et des kits de filtration comme décrit au paragraphe III.1.a. Les échantillons pour ensemencements bactériologiques sont déposés sur des géloses TSA, et incubés 3 jours dans une étuve à 30-35°C. Les échantillons pour ensemencements mycologiques sont déposés sur des géloses SAB, et incubés 5 jours dans une étuve à 20-25°C.

ii. **Interprétation des résultats**

Pour le DGAT :

Après dilution, un quart du volume de la prise d'essai de 1 mL est ensemencé sur géloses Trypticase soja, soit :

$$DGAT = \text{nombre d'UFC sur gélose TSA} \times 4 \text{ (en UFC/mL)}$$

Pour le DMLT :

La totalité de la prise d'essai de 1 mL est ensemencée sur géloses Sabouraud, soit :

$$DMLT = \text{nombre d'UFC sur gélose SAB (en UFC/mL)}$$

Valeurs seuil :

Pour les formes aqueuses, administrées par voie orale, la limite acceptable maximale est de 200 UFC/mL pour les DGAT et 20 UFC/mL pour les DMLT.

2. Germes spécifiques

La nature des germes spécifiques recherchés dépend de la voie d'administration de la préparation d'intérêt et de l'état aqueux ou non aqueux des préparations destinées à la voie orale. D'après la PE 5.1.4, les préparations non stériles, aqueuses, destinées à la voie orale doivent être exemptes d'*Escherichia coli*. Ce caractère est vérifié et validé sur une prise d'essai d'un millilitre d'échantillon.

PROTOCOLE : les manipulations sont à réaliser sous un PSM

Étape 1 à J₀

- Diluer 1 mL de suspension buvable de nadolol dans bouillon aux peptones de caséine et de soja (milieu TCS) de 9 mL de puis vortexer manuellement.
- Incuber 24 heures à 30 – 35 °C.

Étape 2 à J₁

- Agiter l'échantillon puis en transférer 1 mL dans un milieu liquide de MacConkey de 100 mL.
- Incuber 24 heures à 42 – 44 °C.

Étape 3 à J₂

- Ensemencer une gélose MacConkey avec 500 µL de la préparation.
- Incuber 72 heures à 30 – 35°C.

Étape 5 à J₅

- Lecture de la gélose.
 - o La croissance de colonies indique la présence possible d'*E. coli*, à confirmer par des essais d'identification.
 - o Le rouge neutre est indicateur du pH : en acidifiant le milieu par fermentation du lactose, les colonies d'*E. coli* se colorent en rose/rouge.

IV. Études de stabilité et DLU

1. Déroulement de l'étude

Afin d'attribuer une DLU à une nouvelle préparation hospitalière il est possible de s'appuyer sur les données de la littérature et les recommandations de la pharmacopée US qui sont les suivantes [62] :

- Formes aqueuses sans conservateur : 14 jours au réfrigérateur
- Formes aqueuses avec conservateur : 35 jours au réfrigérateur ou à température ambiante
- Formes orales liquides non aqueuses : 90 jours au réfrigérateur ou à température ambiante
- Pour les autres formes non aqueuses : 120 jours au réfrigérateur ou à température ambiante

Cependant, il est fortement recommandé, pour toute préparation destinée à être stockée, de réaliser en interne une étude de stabilité conforme aux recommandations ICH Q1R2 [63] et en s'aidant du guide du GERPAC [64].

Pour cette étude 3 lots de 20 flacons de suspensions buvables de nadolol à 10 mg/mL sont réalisés par 3 opérateurs indépendants. Les flacons sont placés dans des conditions de stockage différentes (4°C, 4°C après ouverture du flacon et température ambiante) et les propriétés physicochimiques et microbiologiques sont mesurées à différents temps de prélèvement : T₀, T₇, T₁₅, T₃₀, T₄₅, T₆₀ et T₉₀, jusqu'à l'apparition d'une non-conformité ou jusqu'à la fin souhaitée de l'étude.

Les mesures réalisées le jour de fabrication (T₀) correspondent aux valeurs de référence et une préparation est considérée comme stable lorsque, en un laps de temps déterminé, ses propriétés essentielles ne changent pas.

Les paramètres suivis lors de l'étude de stabilité du nadolol en suspension buvable, préparation aqueuse avec agent conservateur, sont les suivants :

| CONCERNANT LA STABILITÉ PHYSICOCHIMIQUE | CONCERNANT LA STABILITÉ MICROBIOLOGIQUE |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none">▪ Le dosage du nadolol et le suivi semi-quantitatif des produits de dégradation▪ Le pH▪ La viscosité | <ul style="list-style-type: none">▪ Les dénombrements des germes aérobies totaux et des levures et moisissures totales▪ Le challenge test de conservation antimicrobienne |

2. Résultats

Ayant été confrontés à des problèmes de détérioration de plusieurs colonnes Stability 100-5 C18, 5 μm (150 \times 4,6 mm), les différentes études sur les β -bloquants ont pris un peu de retard. L'étude de stabilité des suspensions buvables de nadolol à 10 mg/mL n'a par conséquent pas débuté. Elle suivra le plan suivant à partir du mois d'octobre et permettra de définir la DLU de cette nouvelle préparation hospitalière afin de l'instaurer en routine à l'AP-HM.

| Frigo | T0 | T7j | T15j | T30j | T45j | T60j | T90j |
|-------------------------|----|-----|------|------|------|------|------|
| Dosage HPLC | | | | | | | |
| Moyenne | | | | | | | |
| pH | | | | | | | |
| DGAT / DMLT | | | | | | | |
| Efficacité conservation | | | | | | | |

| Frigo après ouverture | T0 | T7j | T15j | T30j | T45j | T60j | T90j |
|------------------------------|----|-----|------|------|------|------|------|
| Dosage HPLC | | | | | | | |
| Moyenne | | | | | | | |
| pH | | | | | | | |
| DGAT / DMLT | | | | | | | |
| Efficacité conservation | | | | | | | |
| Viscosité | | | | | | | |

| Température ambiante | T0 | T7j | T15j |
|-----------------------------|----|-----|------|
| Dosage HPLC | | | |
| Moyenne | | | |
| pH | | | |
| DGAT / DMLT | | | |
| Efficacité conservation | | | |
| Viscosité | | | |

Tableau 16 : Plan de l'étude de stabilité des préparations hospitalières de nadolol

Partie III : étude de stabilité du Bisoprolol et du Bétaxolol en suspensions buvables après modification de leur formule

I. Contexte : pourquoi ce changement de formule ?

À l'AP-HM la grande majorité des préparations hospitalières sous forme de suspensions buvables étaient formulées avec du SyrSpend® SF pH4 poudre neutre, commercialisé par le laboratoire Fagron. Il s'agit d'une base de suspension en poudre à reconstituer avec de l'eau stérile, pour la préparation de formes liquides orales. Ce véhicule ne contient aucun excipient à effet notoire et par conséquent aucun conservateur. De par sa formule épurée il est adapté aux groupes de patients vulnérables et notamment aux nouveau-nés, aux nourrissons et aux enfants. Le choix d'un véhicule sans conservateur pour les suspensions buvables était lié à la demande des prescripteurs en néonatalogie qui souhaitaient des préparations sans EEN.

D'après les recommandations du fabricant, la stabilité des préparations reconstituées avec le SyrSpend® SF pH4 poudre neutre est de 14 jours au réfrigérateur [65], ce qui est incompatible avec le circuit des préparations hospitalières. En effet, à l'inverse des préparations magistrales, les préparations hospitalières sont produites en lot, subissent une étape de quarantaine le temps des contrôles, ainsi qu'une étape de stockage avant leur dispensation puis leur administration ; une DLU plus éloignée s'avère donc indispensable. Ainsi, pour chacune des préparations développées, une étude de stabilité réalisée en interne a permis de définir une DLU au-delà des recommandations, qui est de deux ou trois mois en fonction des principes actifs mis en suspension.

Cependant, en avril 2022 des traces visuelles de contamination mycologique ont été mises en évidence en service de soin lors de l'utilisation d'une préparation hospitalière d'hydrochlorothiazide. Après vérification visuelle de tous les flacons de toutes les préparations dans tous les sites de l'AP-HM, des moisissures ont également été retrouvées dans deux lot différents de suspension buvable de bisoprolol. Des tests microbiologiques ont été réalisés sur les MPUP et le Syrspend® poudre utilisés, qui se sont avérés être microbiologiquement propres. Les lots de PH avaient bien entendu été testés et libérés par le LCQ. Néanmoins la limite de détection des dénombrements microbiologiques (DMLT

et DGAT) est de 10 UFC. Il a suffi d'une contamination inférieure au seuil de détection et l'absence de conservateur a pour eu conséquence la prolifération des souches.

Suite à cet évènement indésirable, toutes les formulations des suspensions buvables ont été modifiées pour utiliser un véhicule avec conservateur. Le Syrspend[®] SF PH4 liquide qui contient de l'acide benzoïque comme conservateur a été retenu ; ses avantages ont été développés précédemment dans cette thèse (cf partie II, chapitre I). Or l'acide benzoïque est un EEN qui chez le nouveau-né, entraîne l'augmentation de la bilirubinémie pouvant accroître le risque d'ictère néonatal et pouvant aggraver en ictère préexistant en ictère nucléaire [66]. Les pharmaciens des différents sites se sont donc entretenus avec les prescripteurs pour valider ce changement de formule et la dose seuil de benzoate de sodium a été fixée par les pédiatres à 5 mg/kg/jour.

Une étude des ordonnances a été menée à l'hôpital Nord pour s'assurer que la quantité d'acide benzoïque aux posologies usuelles de prescription ne dépasse pas la dose seuil journalière. Il a été conclu que la dose cumulée d'acide benzoïque administrée serait entre 4 et 30 fois inférieure à la dose seuil de 5 mg/kg/jour. Le poster résultant de cette étude est visible en Annexe 3.

Les excipients influent directement sur la stabilité du principe actif, ainsi à chaque modification de la formulation d'une préparation hospitalière, une nouvelle étude de stabilité doit être menée pour déterminer la date limite d'utilisation de la préparation.

II. Plan de l'étude

Le but d'une étude de stabilité est de fournir des preuves sur la façon dont la qualité d'un produit médicamenteux évolue dans le temps sous l'influence de facteurs environnementaux afin d'établir la DLU de la préparation et ses conditions de conservation. Pendant l'étude, les stabilités physicochimiques et microbiologiques sont étudiées. Ces analyses sont réalisées le jour même de la fabrication (T_0), puis à intervalle de temps régulier jusqu'à l'apparition d'une non-conformité ou jusqu'à la fin souhaitée de l'étude de stabilité.

Afin de s'affranchir de la variabilité interindividuelle lors de la fabrication des PH, l'étude doit être menée sur au moins 3 lots de la préparation, fabriqués et conditionnés dans les mêmes conditions qu'en routine.

Le prélèvement à T_0 sert de valeur de référence et différentes conditions de stockage sont testées : au réfrigérateur, au réfrigérateur après ouverture et à température ambiante. Il est recommandé de réaliser au moins cinq temps de prélèvement entre le T_0 et la fin de l'étude souhaitée. Le guide du GERPAC propose le calendrier suivant en fonction de la durée d'étude souhaitée [64] :

| Temps initial (T0) | Temps de prélèvements intermédiaires | | | | | | | Durée totale |
|--------------------|--------------------------------------|-----|-----|--------|--------|--------|--------|--------------|
| | | | 6h | 12h | 24h | 72h | 5j | |
| 0 | | | 6h | 12h | 24h | 72h | 5j | 7j |
| 0 | | | 24h | 48h | 7j | 15j | 22j | 30j |
| 0 | | 24h | 75h | 7j | 15j | 30j | 2 mois | 3 mois |
| 0 | | 24h | 7j | 15j | 30j | 2 mois | 3 mois | 6 mois |
| 0 | 24h | 7j | 30j | 2 mois | 3 mois | 6 mois | 9 mois | 12 mois |

Tableau 17 : Fréquence de prélèvement en fonction des durées des études de stabilité

Selon les recommandations ICH, un paramètre est considéré comme stable s'il varie de moins de 5% par rapport au paramètre de référence mesuré à T_0 . Ces recommandations strictes étant destinées à l'industrie pharmaceutique, nous utilisons en pratique, pour la plupart des molécules les recommandations de l'USP autorisant une variation < 10%. Cependant, pour les molécules toxiques ou les molécules à index thérapeutique étroit, nous gardons la limite de 5% de variation.

III. Stabilité physico-chimique

1. Dosage

Le dosage des suspensions buvables de bétaxolol et de bisoprolol est réalisé par HPLC couplée à un détecteur UV. Cette méthode de dosage est décrite au chapitre 2.2.29 de la Pharmacopée Européenne [52]. Comme nous l'avons vu dans la partie II, la chromatographie en phase liquide haute performance est une technique séparative permettant une analyse qualitative et quantitative des composés. Elle permet des **analyses dites indicatrices de stabilité**.

a. Conditions d'analyse des suspensions de Bétaxolol et de Bisoprolol

Nous utilisons pour le dosage du bétaxolol et du bisoprolol les mêmes conditions d'analyse soit les mêmes phases mobile et stationnaire et les mêmes paramétrages de l'HPLC. En revanche, la préparation des échantillons et des CQ diffère d'un β -bloquant à l'autre.

i. Paramètres de l'HPLC

Les paramètres de la méthode d'analyse sont les suivants :

| | |
|------------------------------|--|
| Temps d'analyse | 14 minutes |
| Type de colonne | Stability 100-5 C18, 5 µm (150×4,6 mm) |
| Débit | 1 mL/min |
| Volume d'injection | 20 µL |
| Température | 22°C |
| Pression | 150 – 165 bars |
| Longueur d'onde de détection | 220 nm |

Tableau 18 : Paramètres de la méthode de dosage HPLC du bisoprolol et du bétaxolol

ii. Préparation de la phase mobile

La phase mobile est composée d'un mélange 45/55 de Dihydrogénophosphate de Potassium (KH₂PO₄) et de Méthanol (MeOH).

PROTOCOLE :

Dans un bécher d'un litre :

- Mélanger 1,226 g de KH₂PO₄ dans 450 mL d'eau HPLC
- Ajouter 550 mL de MeOH
- Ajuster à pH = 3 avec de l'acide orthophosphorique
- Filtrer la phase mobile à l'aide d'un système de filtration à usage unique de 0,45 µm. Porter des lunettes de protection lors de la filtration
- Passer la phase mobile aux ultrasons pendant 15 minutes

La phase mobile se conserve un mois à 5°C.

iii. Préparation des CQ

Afin de réduire les biais d'analyse interpersonnels, deux CQ sont préparés indépendamment par deux opérateurs différents, avec les standards secondaires.

Bétaxolol : faire 3 CQ

Pour le CQ1 :

- Peser 25 mg de bétaxolol poudre et les dissoudre dans 250 mL d'eau HPLC dans une fiole jaugée de 250 mL
- Vortexer 1 minute
- On obtient un CQ à 100 µg/mL

Pour les CQ2 et CQ3 :

- Peser 25 mg de bétaxolol poudre dans un falcon de 50 mL et ajouter qsp 25 mL de Syrspend[®] SF PH4 liquide
- Vortexer
- Transférer dans une fiole jaugée de 250 mL et ajouter de l'eau HPLC qsp 250 mL (rincer plusieurs fois le falcon pour éviter une perte de matière)
- On obtient un CQ à 100 µg/mL

Bisoprolol :

- Prendre une ampoule de bisoprolol fumarate à 1 mg/mL (en bisoprolol base) dans le méthanol
- Prélever 400 µL, rajouter 3600 µL de phase mobile
- On obtient un CQ à 100 µg/mL de bisoprolol base

Après utilisation, mettre dans un tube serti de petit volume, identifier, dater et stocker au réfrigérateur.
La conservation est de 3 mois.

iv. Conformité du standard secondaire

À chaque ouverture d'un nouveau lot d'un standard secondaire, ce dernier doit être qualifié pour s'assurer qu'il présente les mêmes propriétés que le standard primaire (étalon international) correspondant.

Pour cela il faut analyser par HPLC un CQ réalisé avec le Standard I et un CQ réalisé avec le Standard II et calculer le coefficient de variation des aires correspondantes qui doit être inférieur à 5%.

Au LCQ, nous utilisons les standards dont les références sont les suivantes :

Bétaxolol :

- Standard I : flacon de 60 mg, EDQM ref B1103000, conservation $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$
- Standard II : flacon de 250 mg, LGC ref MM0436-00, conservation $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$

Bisoprolol

- Standard I : flacon de 25 mg, Sigma Aldrich ref 50787-25MG, conservation $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$
- Standard II : ampoule de 1,0 mg/1 mL, LGC ref LGCAMP046008-01, conservation $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$

v. Conformité du système : System Suitability test (SST)

Le SST est réalisé une fois par mois sur chaque automate afin de s'assurer que le système de mesure et les opérations analytiques sont adéquats pour l'analyse prévue. Pour cela le CQ1 est injecté une fois dans l'HPLC puis le CQ2 l'est six fois. Les paramètres à valider sont les suivants :

Bétaxolol

| Paramètre | Critère de conformité | Absence de résultat | Non-conformité |
|-------------------------------------|------------------------------------|---|---|
| Facteur de rétention | $K' > 2$ | Possible (pas de front de solvant) = voir responsable technique | Refaire phase mobile et changer colonne puis relancer |
| Résolution R_s | $R_s > 2$ (FDA) | Possible (1 pic) = voir responsable technique | |
| Nombre de plateaux théoriques N | $N > 2000$ (FDA) | | |
| Tailing factor T ($a+b/2a$) | $T \leq 3$ (Betaxolol tablets USP) | | |
| Répétabilité (RSD) des 6 injections | 1% (Betaxolol tablets USP) | | |

Tableau 19 : Critères d'acceptation du SST du bétaxolol

Bisoprolol

| Paramètre | Critère de conformité | Absence de résultat | Non-conformité |
|-------------------------------------|--|---|---|
| Facteur de rétention | $K' > 2$ (FDA) | Possible (pas de front de solvant) = voir responsable technique | Refaire phase mobile et changer colonne puis relancer |
| Résolution R_s | $R_s > 7$ (Bisoprolol fumarate tablets USP) | Possible (1 pic) = voir responsable technique | |
| Nombre de plateaux théoriques N | $N > 2000$ (FDA) | | |
| Tailing factor T ($a+b/2a$) | $T \leq 2$ (Bisoprolol fumarate tablets USP) | | |
| Répétabilité (RSD) des 6 injections | 2% (Bisoprolol fumarate tablets USP) | | |

Tableau 20 : Critères d'acceptation du SST du bisoprolol

vi. Préparation des échantillons

Bétaxolol :

La suspension buvable de bétaxolol chlorhydrate est à 1 mg/mL

- Dans un falcon de 50 mL verser 25 mL d'eau HPLC à la pipette à 2 traits
- Retirer 2,5 mL, les jeter et les remplacer par 2,5 mL de solution buvable de bétaxolol
- Vortexer environ 1 minute puis centrifuger 5 minutes à 2000 tours/minute
- On obtient $S_0 = 100 \mu\text{g/mL}$
- Filtrer puis mettre en vial

Bisoprolol :

La suspension buvable de bisoprolol est à 0,5 mg/mL en bisoprolol fumarate.

- Prélever 0,59 mL de suspension buvable dans un tube à centrifuger de 15 mL.
- Rajouter 1,91 mL de phase mobile (en rinçant 3 fois le cône à prélèvement)
- Vortexer environ 1 minute puis centrifuger 5 minutes à 2000 tours/minute
- On obtient $S_0 = 118 \mu\text{g/mL}$ en bisoprolol fumarate, soit $100 \mu\text{g/mL}$ en bisoprolol base

b. Études de dégradations forcées

Les études de dégradations forcées sur le bétaxolol et le bisoprolol ont permis de mettre en évidence la résistance de ces principes actifs à différents facteurs (acide, base, oxydation, lumière, chaleur) et de séparer leurs produits de dégradation. Lors de l'étude de stabilité nous pourrons ainsi comparer les chromatogrammes obtenus aux différents temps de prélèvement avec ceux des études de dégradation forcée afin de rechercher la possible apparition de ces produits de dégradation et d'en réaliser leur étude semi-quantitative.

Soumis aux conditions forcées spécifiées, le bétaxolol s'est dégradé en neuf produits, identifiés par leur temps de rétention. Ils sont représentés sur le schéma suivant.

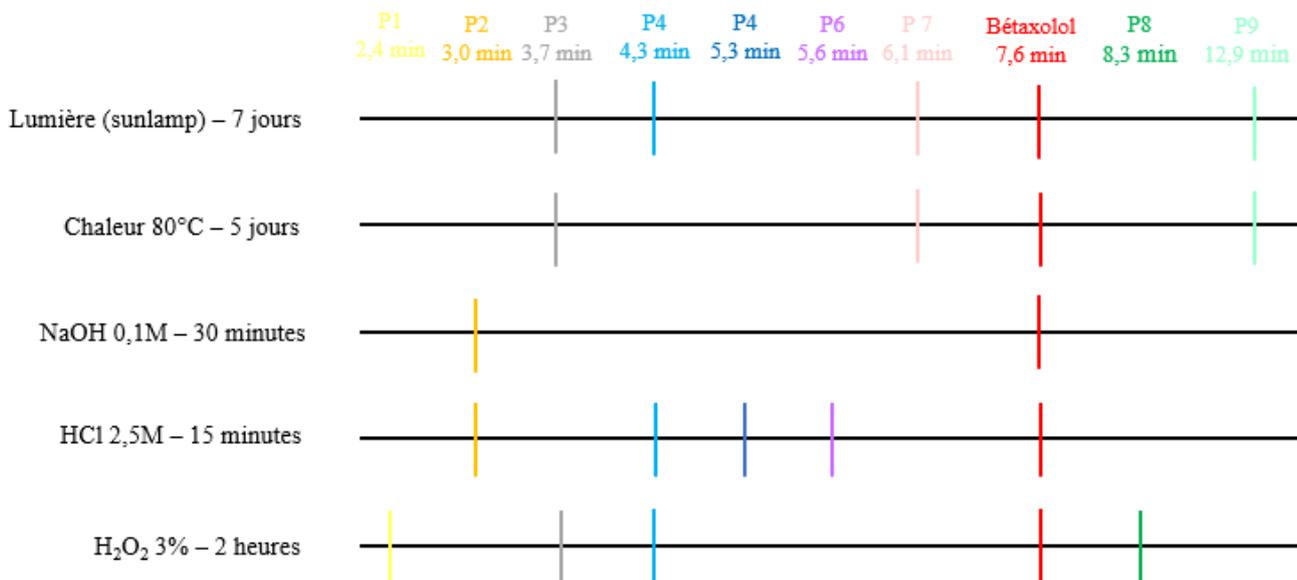


Figure 27 : Produits de dégradation du bétaxolol

Le bisoprolol s'est dégradé en sept produits, représentés sur le schéma suivant.

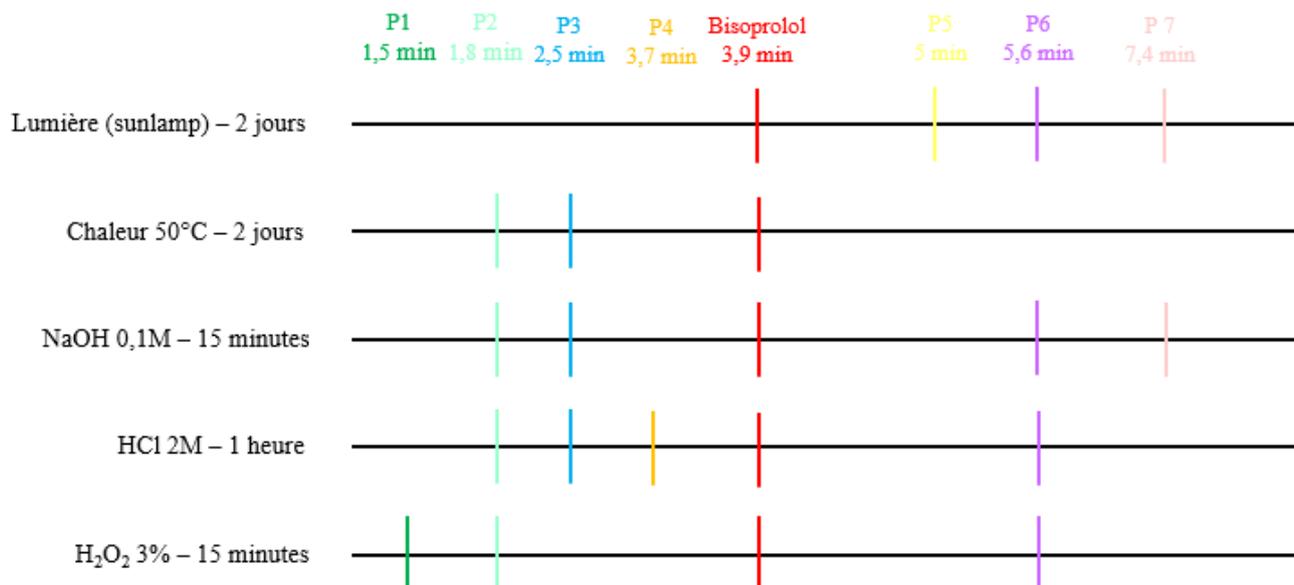


Figure 28 : Produits de dégradation du bisoprolol

c. Résultats

i. Bétaxolol

Concernant les impuretés et produits de dégradation

Les chromatogrammes ont permis de suivre au cours de l'étude, les éventuelles impuretés et produits de dégradation identifiés grâce à leur temps de rétention. Leur évolution dans le temps est estimée au regard de l'augmentation de la surface du ou des pics correspondants.

Nous pouvons comparer les chromatogrammes obtenus à T_0 et T_{60} :

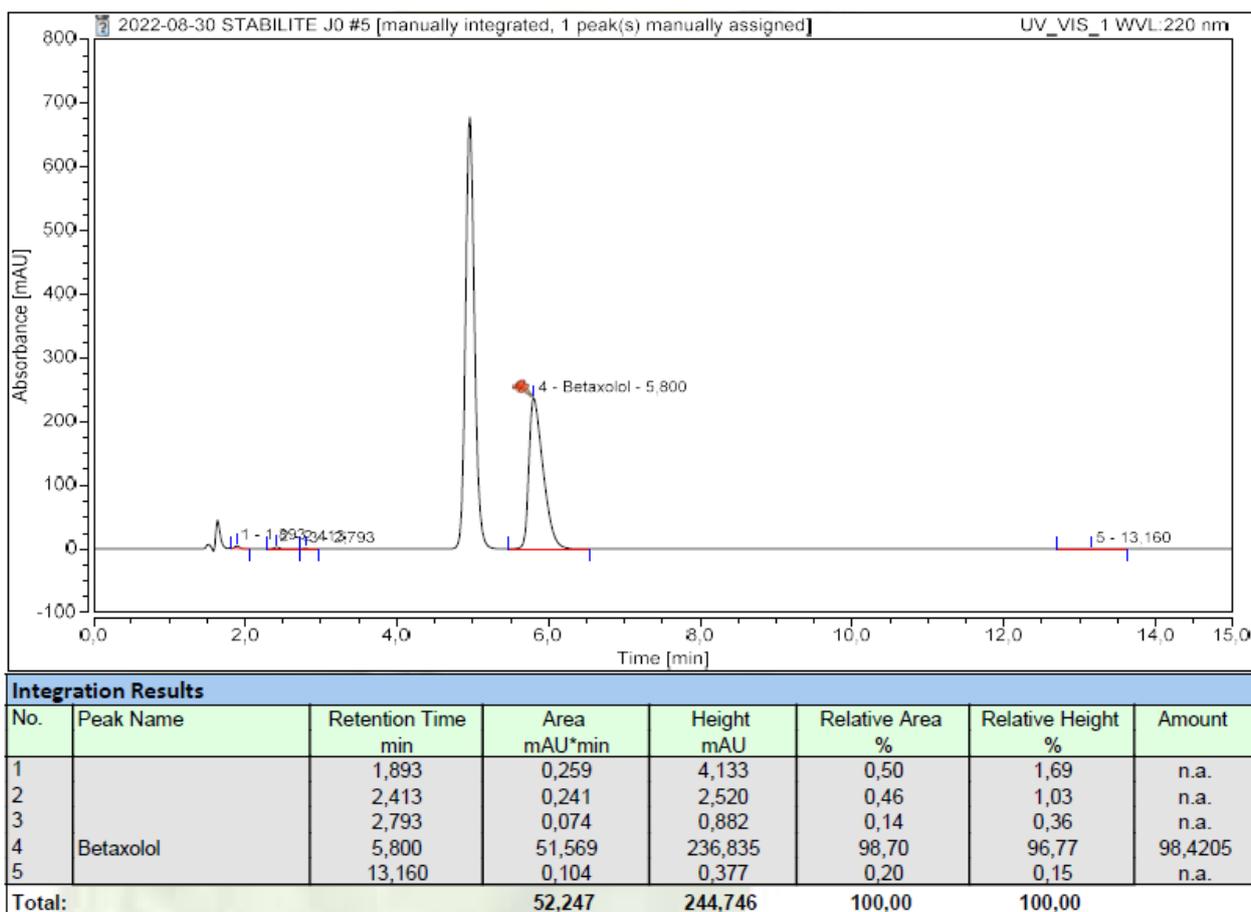


Figure 29 : Bétaxolol J_0

Nous visualisons que des impuretés sont présentes dès J_0 aux temps de rétention $t_r = 1,9$ min, $t_r = 2,4$ min, $t_r = 2,8$ min et $t_r = 13,2$ min. Elles ont respectivement une aire de 0,259 ; 0,241 ; 0,074 et 0,104 mAU×min représentant 1,30% du signal total. Pour précision, le grand signal à environ 5,0 minutes est le pic du Syrspond®.

Remarque : le temps de rétention du bétaxolol n'est pas le même que celui précédemment mentionné lors des études de dégradation forcée. En effet, nous avons dû faire face à des problèmes de détérioration de plusieurs colonnes Stability 100-5 C18, 5 μ m (150×4,6 mm). Les résultats des études

de stabilité ont par conséquent été obtenus avec une colonne présentant les mêmes paramètres mais commercialisée par une autre marque. C'est pourquoi les temps de rétention sont un peu différents.

D'après les monographies du chlorhydrate de bétaxolol et du chlorhydrate de bétaxolol comprimés de la Pharmacopée US, le pourcentage total d'impuretés ou de produits de dégradation doit être inférieur à 1,0%. Nous sommes ici au-dessus de cette valeur cependant il s'agit de la valeur limite applicable au principe actif pur, or nous dosons une suspension buvable dans un véhicule, réalisée à partir de comprimés de Kerlone®. Étant donné que ces préparations sont réalisées à partir de constituants préjugés conformes, ces valeurs à T₀ ne serviront que de comparateur pour vérifier l'éventuelle augmentation des produits de dégradation au cours du temps. La monographie USP du chlorhydrate de bétaxolol comprimés [67] indique une valeur limite de 0,2% d'augmentation pour toute impureté non spécifiée. Les deux premiers pics ayant un pourcentage respectif à T₀ de 0,5% et 0,46% (soit supérieurs à 0,2%) peuvent être attribués soit à une impureté spécifiée, soit à une impureté non liée au bétaxolol.

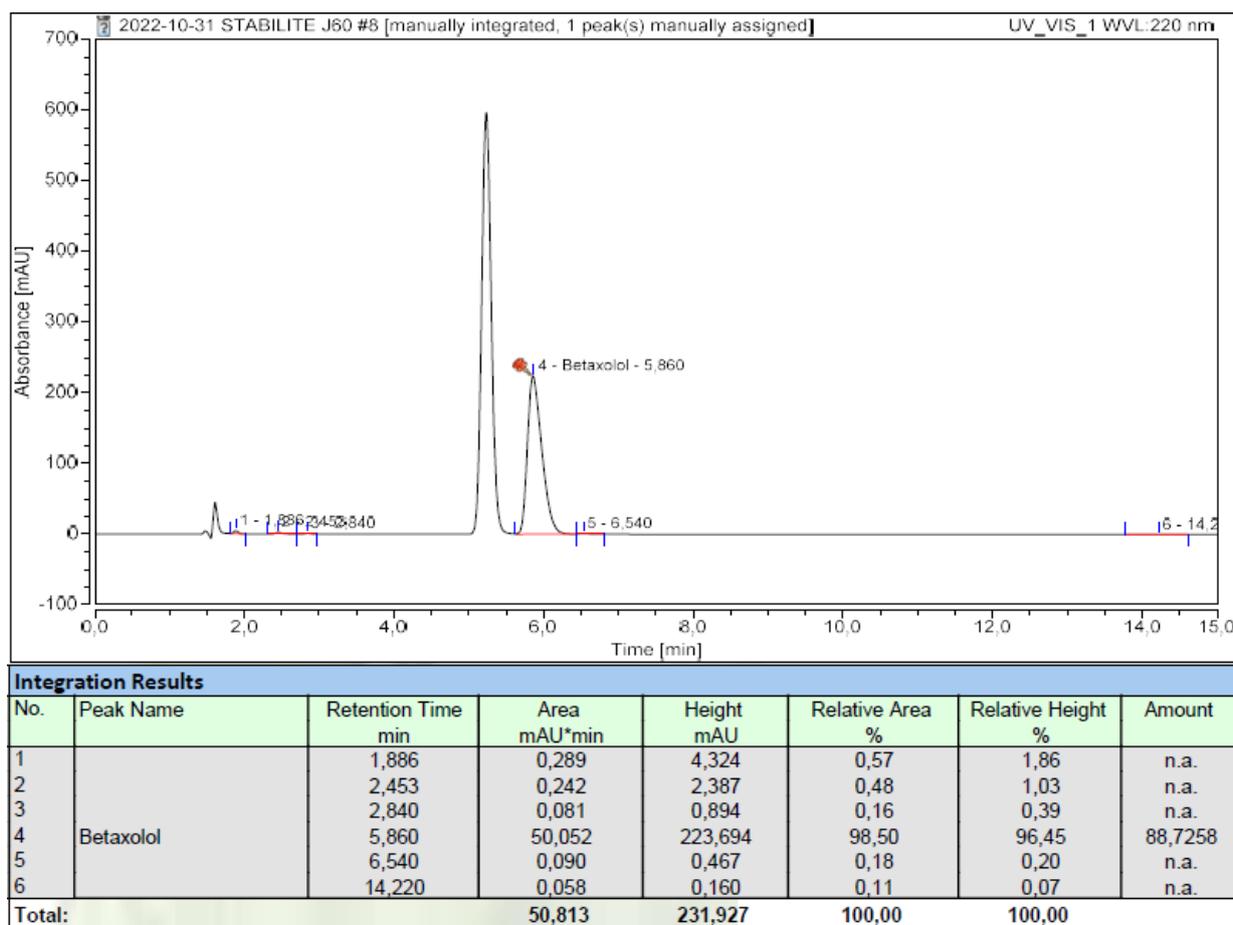


Figure 30 : Bétaxolol J₆₀

Les impuretés repérées au T₀ sont toujours présentes aux mêmes temps de rétention et l'augmentation de chacun des pics est bien inférieure à 0,2%. On remarque également qu'au cours de l'étude un

produit de dégradation s'est formé, repérable au $t_r = 6,5$ min. Il s'agit du P8, identifié lors de l'étude de dégradation forcée par oxydation du bétaxolol. Cette dégradation est due à la présence d'oxygène dissout dans la préparation. L'augmentation de la proportion relative de P8 (de 0% à 0,18%) étant inférieure à la limite de 0,2%, la présence de chacune des impuretés est bien conforme à J_{60} de l'étude de stabilité.

Concernant la teneur

À T_0 de l'étude de stabilité du bétaxolol, la moyenne des concentrations mesurées sur les trois premiers flacons était de 0,958 mg/mL. L'intervalle des valeurs normales pour toute la durée de l'étude de stabilité est donc de 0,958 mg/mL +/- 10% soit [0,862 ; 1,054] mg/mL.

Les concentrations mesurées aux différents temps d'analyse sont répertoriées dans le tableau suivant :

| | | 30/08/22 | 06/09/22 | 14/09/22 | 29/09/22 | 13/10/22 | 31/10/22 | 28/11/22 |
|-----------------------|------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Conservation | | T0 | T7j | T15j | T30j | T45j | T60j | T90j |
| Frigo | Flacons | F1, F2, F3 | F4, F5, F6 | F7, F8, F9 | F10, F11, F12 | F13, F14, F15 | F16, F17, F18 | F19, F20, F21 |
| | Dosages en mg/mL | 0,984 | 0,962 | 0,920 | 0,909 | 0,916 | 0,887 | 0,838 |
| | | 0,96 | 0,944 | 0,889 | 0,901 | 0,901 | 0,868 | 0,789 |
| | | 0,929 | 0,960 | 0,906 | 0,921 | 0,916 | 0,871 | 0,836 |
| Moyenne | 0,958 | 0,956 | 0,905 | 0,910 | 0,911 | 0,875 | 0,821 | |
| Frigo après ouverture | Flacons | F28, F29, F30 | | | | | | |
| | Dosages en mg/mL | 0,984 | 0,911 | 0,913 | 0,911 | | | |
| | | 0,960 | 0,922 | 0,896 | 0,894 | | | |
| | | 0,929 | 0,929 | 0,903 | 0,902 | | | |
| Moyenne | 0,958 | 0,921 | 0,904 | 0,902 | | | | |
| Ambiant | Flacons | F1, F2, F3 | F22, F23, F24 | F25, F26, F27 | | | | |
| | Dosages en mg/mL | 0,984 | 0,954 | 0,922 | | | | |
| | | 0,96 | 0,933 | 0,886 | | | | |
| | | 0,929 | 0,934 | 0,908 | | | | |
| Moyenne | 0,958 | 0,940 | 0,905 | | | | | |

Tableau 21 : Résultats des dosages de la concentration en mg/mL des suspensions buvables de bétaxolol dans chacune des conditions de conservation à chacun des temps de mesure

Pour être considérée stable, la concentration en principe actif exprimée en pourcentage de la concentration initiale obtenue à T_0 , c'est-à-dire immédiatement après fabrication de la préparation ne doit pas varier de plus de 10%.

Cependant une simple définition de la stabilité basée sur une variation de concentration en PA dans une marge de 10% est à proscrire car elle ne prend pas en considération la variabilité des analyses. C'est pour cela que pour chaque temps d'analyse, le pourcentage moyen est calculé, ainsi que l'intervalle de confiance à 95% (IC95) autour de cette moyenne [64].

L'IC95 des teneurs dosées au temps t correspond à l'intervalle de valeurs qui a 95% de chance de contenir la vraie valeur des teneurs. Sa formule est la suivante :

$$\left[\bar{x} - 1,96 \times \frac{\sigma}{\sqrt{n}} ; \bar{x} + 1,96 \times \frac{\sigma}{\sqrt{n}} \right]$$

Avec \bar{x} la moyenne observée, σ l'écart-type observé et n la taille de l'échantillon.

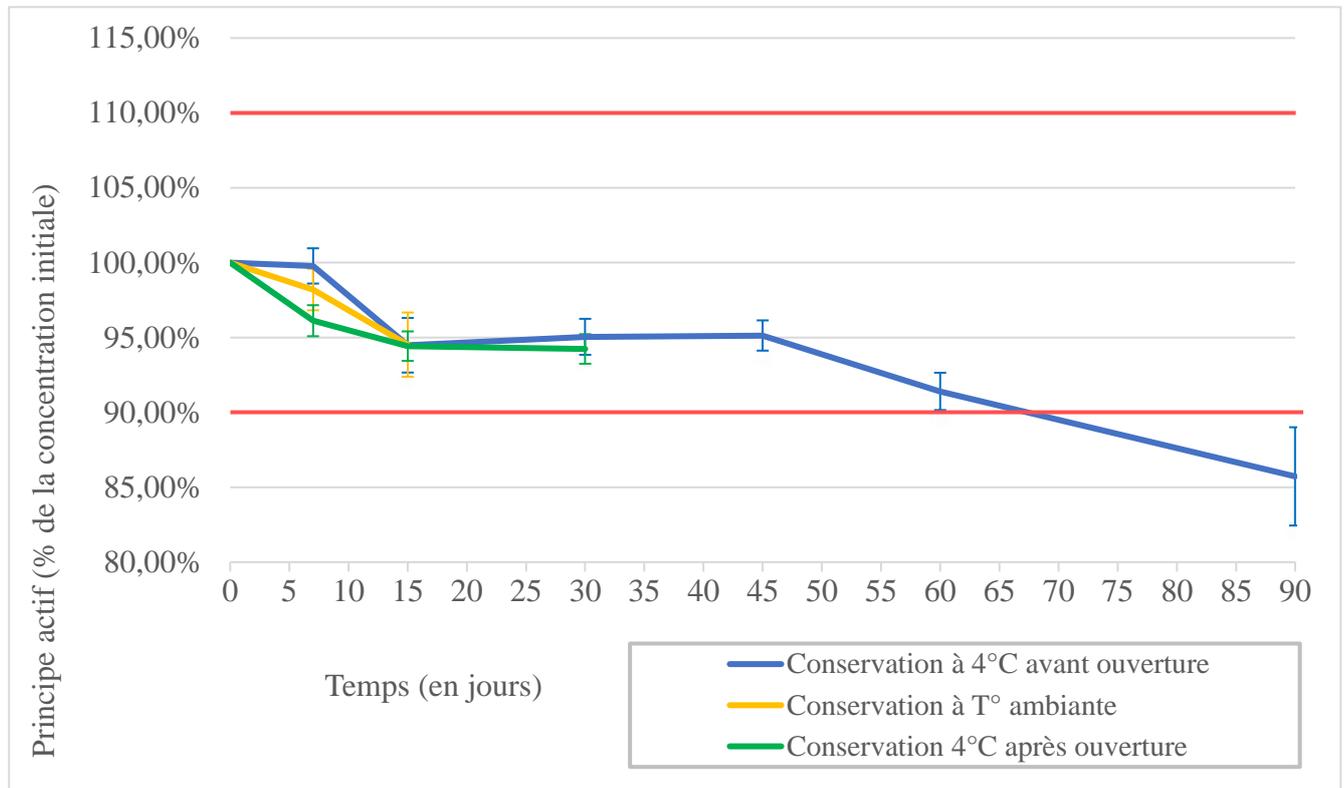


Figure 31 : Expression du dosage des suspensions de bétaxolol aux différents temps de mesure en pourcentage de déviation par rapport à la concentration initiale avec représentation de l'IC95%

Ci-dessus, nous avons exprimé graphiquement le pourcentage de déviation de la teneur en principe actif au cours du temps avec la représentation des intervalles de confiance à 95%. Jusqu'au T_{60j} toutes les déviations sont inférieures à 10%, cependant nous remarquons que pour la conservation à 4°C avant ouverture, le point à 90 jours dépasse les 10% de variation autorisés par rapport à la concentration initiale. Nous ne pouvons donc pas affirmer une stabilité de la teneur de 3 mois dans ces conditions de conservation.

La teneur du bétaxolol en suspension dans le Syrspend® SF PH4 est stable :

- Pendant 60 jours pour un flacon non ouvert conservé au réfrigérateur.
- Pendant 30 jours après ouverture d'un flacon conservé au réfrigérateur.
- Pendant 15 jours pour un flacon non ouvert conservé à température ambiante.

ii. Bisoprolol

Concernant les impuretés et produits de dégradation

Nous comparons les chromatogrammes obtenus à J_0 au début de l'étude à celui obtenu à la fin de l'étude de stabilité 3 mois plus tard.

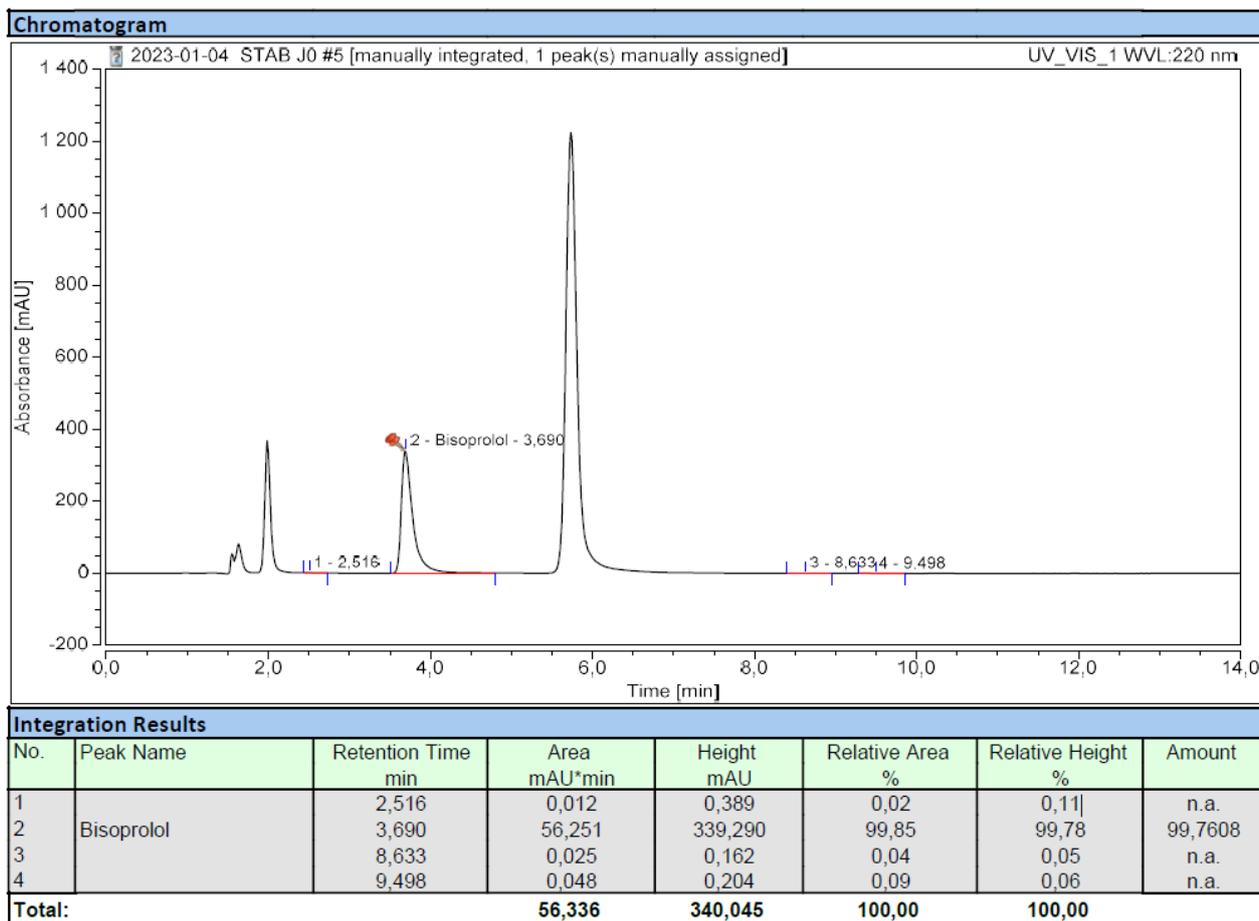


Figure 32 : Bisoprolol J_0

Nous remarquons que des impuretés sont présentes dès J_0 aux temps $t_r = 2,5$ min, $t_r = 8,6$ min et $t_r = 9,5$ min. Elles ont respectivement une aire de 0,012 ; 0,025 et 0,048 mAU×min soit 0,15% du signal total. D'après la monographie du bisoprolol fumarate de la Pharmacopée US, le pourcentage total d'impuretés doit être inférieur à 0,5%, il est donc conforme. Pour précision, le grand signal à environ 5,8 minutes est le pic du Syrspond®.

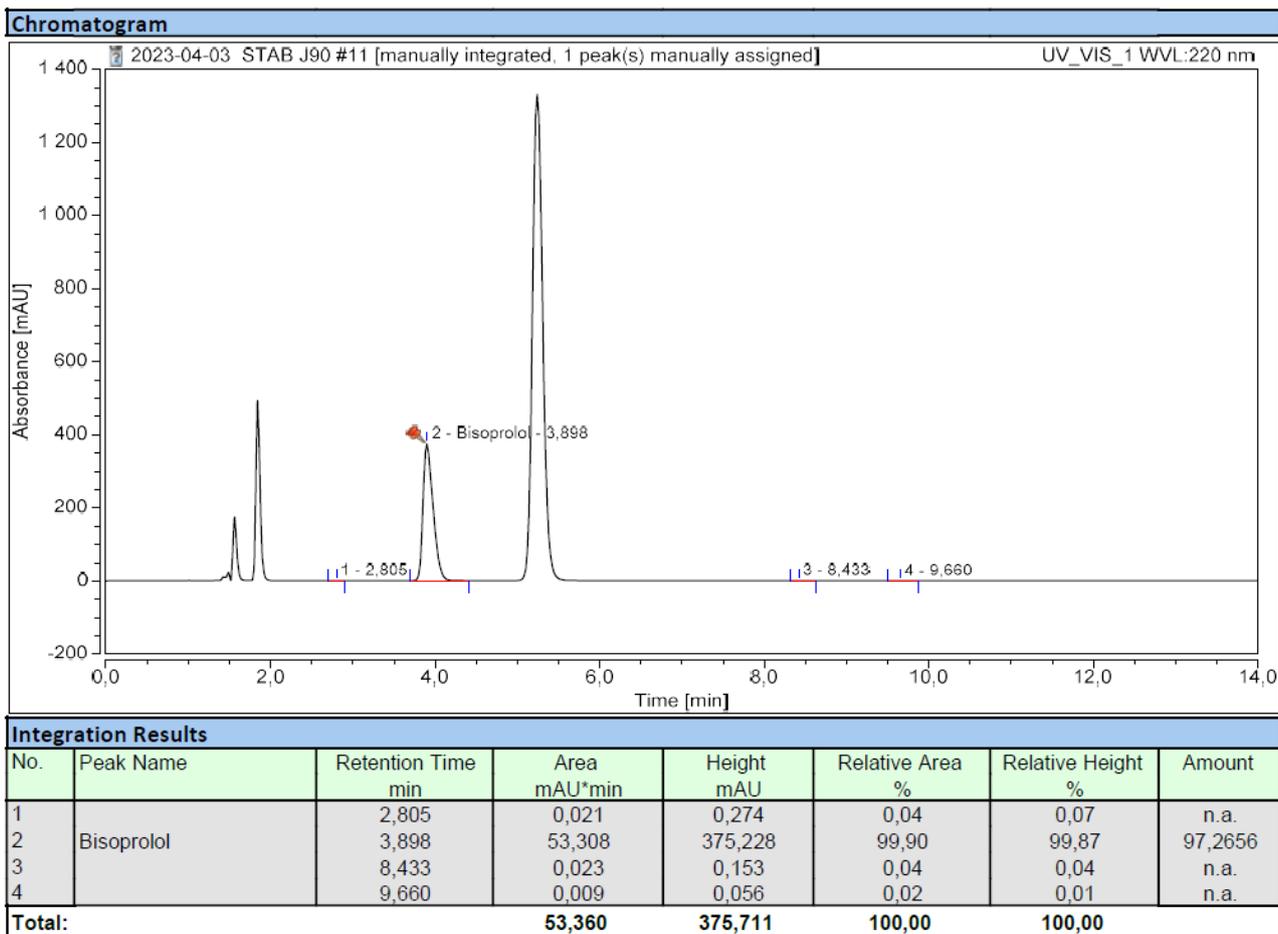


Figure 33 : Bisoprolol J₉₀

Aucun produit de dégradation n'est apparu au cours des 90 jours de l'étude de stabilité et les mêmes impuretés sont toujours présentes aux mêmes temps de rétention. Leur proportion est 0,10% du signal total, elle demeure stable et conforme au cours du temps.

Concernant la teneur

À T₀ de l'étude de stabilité du bisoprolol, la moyenne des concentrations mesurées sur les trois premiers flacons était de 0,496 mg/mL. L'intervalle des valeurs normales pour toute la durée de l'étude de stabilité est donc de 0, 496 mg/mL +/- 10% soit [0,446 ; 0,546] mg/mL.

Les concentrations mesurées aux différents temps d'analyse sont répertoriées dans le tableau suivant :

| | | 03/01/23 | 10/01/23 | 18/01/23 | 02/02/23 | 16/02/23 | 02/03/23 | 03/04/23 |
|------------------------------|------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| Conservation | | T0 | T7j | T15j | T30j | T45j | T60j | T90j |
| Frigo | Flacons | F1, F2, F3 | F4, F5, F6 | F7, F8, F9 | F10, F11, F12 | F13, F14, F15 | F16, F17, F18 | F19, F20, F21 |
| | Dosages en mg/mL | 0,499 | 0,496 | 0,490 | 0,491 | 0,501 | 0,486 | 0,493 |
| | | 0,496 | 0,498 | 0,489 | 0,488 | 0,499 | 0,477 | 0,486 |
| | Moyenne | 0,496 | 0,496 | 0,484 | 0,490 | 0,490 | 0,482 | 0,493 |
| Frigo après ouverture | Flacons | F28, F29, F30 | | | | | | |
| | Dosages en mg/mL | 0,499 | 0,500 | 0,494 | 0,484 | | | |
| | | 0,496 | 0,509 | 0,484 | 0,481 | | | |
| | Moyenne | 0,496 | 0,501 | 0,482 | 0,479 | | | |
| Ambiant | Flacons | F1, F2, F3 | F22, F23, F24 | F25, F26, F27 | | | | |
| | Dosages en mg/mL | 0,499 | 0,512 | 0,490 | | | | |
| | | 0,496 | 0,518 | 0,477 | | | | |
| | Moyenne | 0,496 | 0,508 | 0,478 | | | | |

Tableau 22 : Résultats des dosages de la concentration en mg/mL des suspensions buvables de bisoprolol dans chacune des conditions de conservation à chacun des temps de mesure

Toutes les moyennes à tous les temps de prélèvement, dans toutes les conditions de conservation sont dans l'intervalle de conformité. Nous avons ensuite exprimé graphiquement le pourcentage de déviation de la teneur en principe actif au cours du temps avec la représentation des intervalles de confiance à 95%. Jusqu'à la fin de l'étude, toutes les déviations sont inférieures à 10%.

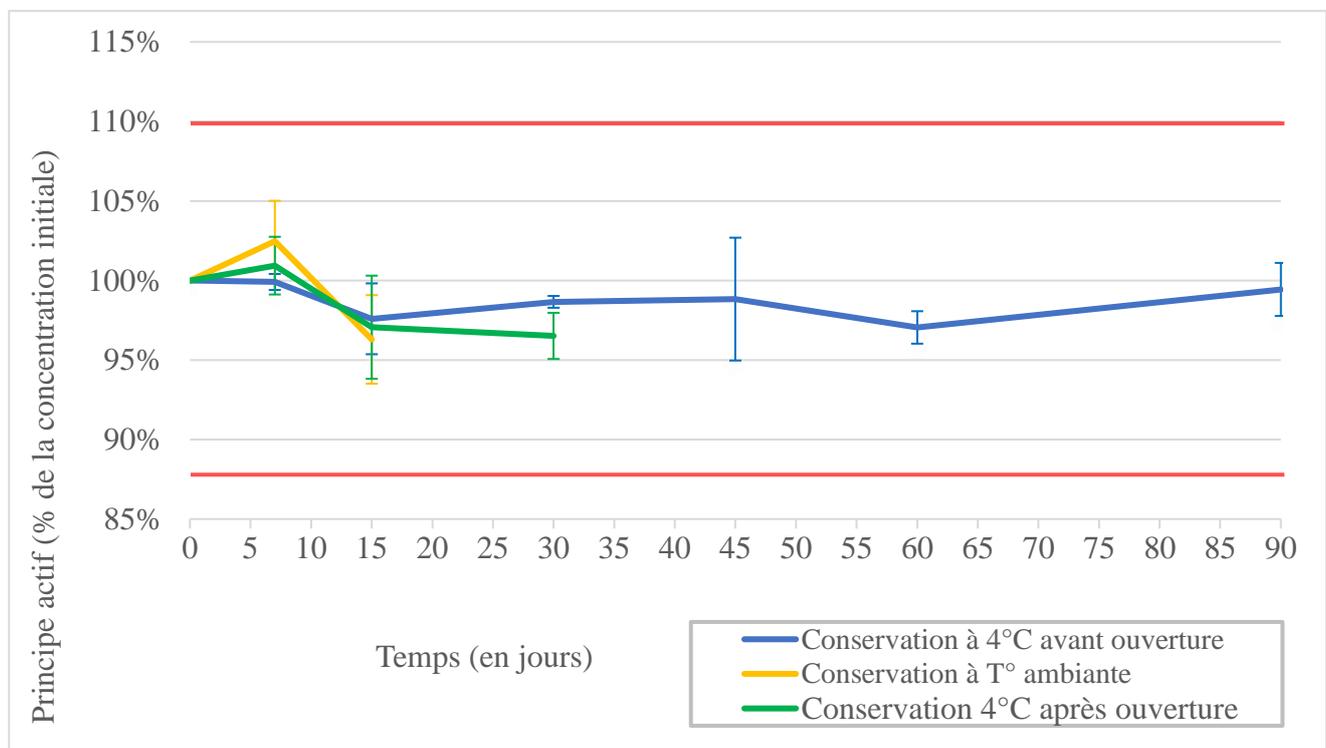


Figure 34 : Expression du dosage des suspensions de bisoprolol aux différents temps de mesure en pourcentage de déviation par rapport à la concentration initiale avec représentation de l'IC95%

La teneur du bisoprolol en suspension dans le Syrspend® SF PH4 est stable :

- ☑ Pendant 90 jours pour un flacon non ouvert conservé au réfrigérateur.
- ☑ Pendant 30 jours après ouverture d'un flacon conservé au réfrigérateur.
- ☑ Pendant 15 jours pour un flacon non ouvert conservé à température ambiante.

2. pH

Le pH d'une solution aqueuse est défini comme l'opposé du logarithme de l'activité des ions hydrogène présents de la solution. C'est une grandeur sans unité dont les valeurs varient entre 0 et 14, représentant l'acidité ou l'alcalinité d'une solution. Il est mesuré au moyen d'un pH-mètre.

Lors de la conservation des préparations hospitalières, plusieurs causes peuvent induire une modification de pH : une dégradation du principe actif lui-même, une dégradation d'un excipient, une interaction contenant/contenu, la diffusion du gaz carbonique ambiant à travers le conditionnement. Ainsi, toute modification du pH marquera une modification de la solution initiale préparée [64].

a. Détermination potentiométrique du pH

La détermination potentiométrique du pH est détaillée au chapitre 2.2.3 de la PE [68]. Elle est effectuée par la mesure de potentiel entre deux électrodes plongeant dans la solution à analyser. Ces deux électrodes sont souvent regroupées sous la forme d'une électrode combinée.

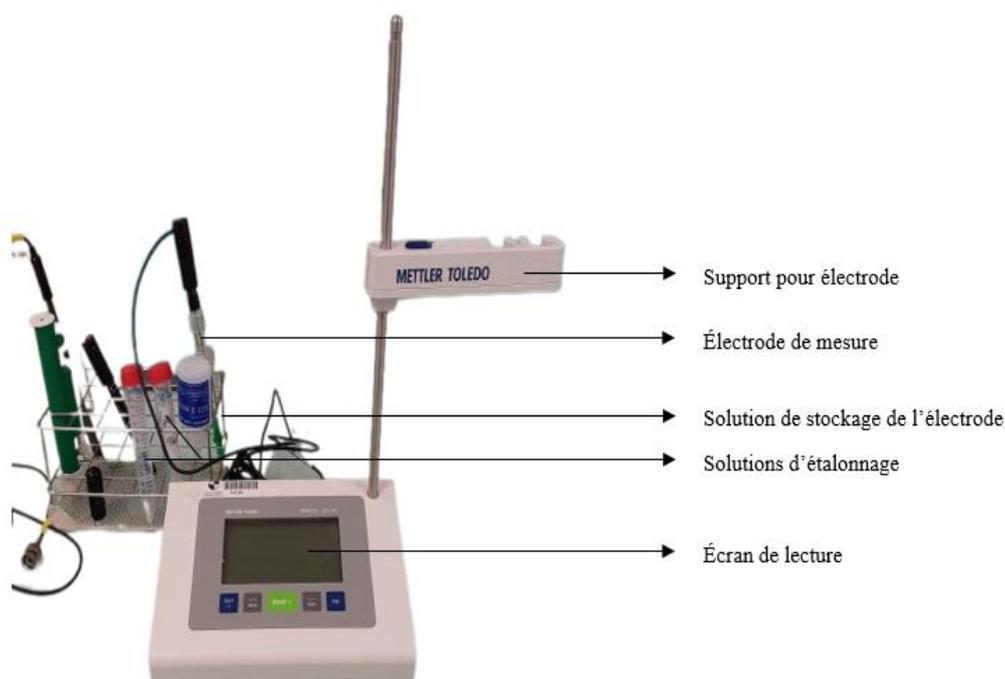


Figure 35 : pH-mètre *FiveEasy* de *METTLER TOLEDO*

PROTOCOLE DE MESURE SUR pH-MÈTRE FIVEEASY DE METTLER TOLEDO :

- Sortir l'électrode combinée de sa solution de stockage et la rincer à l'eau distillée puis l'essuyer au moyen d'une compresse.
- Chaque jour, calibrer le pH-mètre avec les deux solutions d'étalonnage.
- Rincer et essuyer l'électrode puis la tremper dans l'échantillon à analyser.
- Attendre la stabilisation de valeur numérique du pH et lire le résultat.
- Rincer l'électrode et la remettre dans sa solution de stockage.

b. Résultats

i. Bétaxolol

À T₀ de l'étude de stabilité du bétaxolol, la valeur moyenne des pH mesurés sur les flacons n°1, n°2 et n°3 était 4,47. L'intervalle des valeurs normales pour toute la durée de l'étude de stabilité est donc de 4,47 +/- 10% soit [4,02 ; 4,92].

Selon le plan de l'étude, les mesures de pH ont été réalisées :

| | 30/08/22 | 06/09/22 | 14/09/22 | 29/09/22 | 13/10/22 | 31/10/22 | 28/11/22 |
|------------------------------|-------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| Conservation | T0 | T7j | T15j | T30j | T45j | T60j | T90j |
| Frigo | F1, F2, F3 | F4, F5, F6 | F7, F8, F9 | F10, F11, F12 | F13, F14, F15 | F16, F17, F18 | F19, F20, F21 |
| | 4,47 | 4,38 | 4,43 | 4,46 | 4,43 | 4,39 | 4,36 |
| Frigo après ouverture | F1, F2, F3 | | | | | | |
| | 4,47 | 4,38 | 4,41 | 4,42 | | | |
| Ambiant | F1, F2, F3 | F22, F23, F24 | F25, F26, F27 | | | | |
| | 4,47 | 4,4 | 4,38 | | | | |

Tableau 5 : Résultats des mesures de pH des suspensions buvables de bétaxolol dans chacune des conditions de conservation à chacun des temps de mesure

Les valeurs mesurées dans les 3 conditions de conservation, à tous les intervalles de temps sont comprises dans l'intervalle de conformité.

Le pH des suspensions de bétaxolol est stable :

- Pendant 90 jours pour un flacon non ouvert conservé au réfrigérateur.
- Pendant 30 jours après ouverture d'un flacon conservé au réfrigérateur.
- Pendant 15 jours pour un flacon non ouvert conservé à température ambiante.

ii. Bisoprolol

À T₀ de l'étude de stabilité du bisoprolol, la valeur moyenne des pH mesurés sur les flacons n°1, n°2 et n°3 était 4,62. L'intervalle des valeurs normales pour toute la durée de l'étude de stabilité est donc de 4,62 +/- 10% soit [4,16 ; 5,08].

Selon le plan de l'étude, les mesures de pH ont été réalisées :

| | 03/01/23 | 10/01/23 | 18/01/23 | 02/02/23 | 16/02/23 | 02/03/23 | 03/04/23 |
|------------------------------|-------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| Conservation | T0 | T7j | T15j | T30j | T45j | T60j | T90j |
| Frigo | F1, F2, F3 | F4, F5, F6 | F7, F8, F9 | F10, F11, F12 | F13, F14, F15 | F16, F17, F18 | F19, F20, F21 |
| | 4,62 | 4,67 | 4,79 | 4,69 | 4,70 | 4,63 | 4,71 |
| Frigo après ouverture | F1, F2, F3 | | | | | | |
| | 4,62 | 4,66 | 4,76 | 4,68 | | | |
| Ambiant | F1, F2, F3 | F22, F23, F24 | F25, F26, F27 | | | | |
| | 4,62 | 4,66 | 4,71 | | | | |

Tableau 5 : Résultats des mesures de pH des suspensions buvables de bisoprolol dans chacune des conditions de conservation à chacun des temps de mesure

Les valeurs mesurées dans les 3 conditions de conservation, à tous les intervalles de temps sont comprises dans l'intervalle de conformité.

Le pH des suspensions de bisoprolol est stable :

- Pendant 90 jours pour un flacon non ouvert conservé au réfrigérateur.
- Pendant 30 jours après ouverture d'un flacon conservé au réfrigérateur.
- Pendant 15 jours pour un flacon non ouvert conservé à température ambiante.

3. Viscosité

Le coefficient de viscosité η est défini à la monographie 2.2.8 de la Pharmacopée Européenne [69] comme étant l'expression de la force tangentielle par unité de surface (appelée tension de cisaillement τ et exprimée en pascals), nécessaire pour déplacer parallèlement au plan de glissement une couche de liquide d'un mètre carré à une vitesse (v) d'un mètre par seconde par rapport à une couche parallèle située à une distance d'un mètre (x).

Ainsi la viscosité peut être définie comme l'ensemble des forces de cohésion intermoléculaires qui s'opposent à l'écoulement des couches de liquide les unes par rapport aux autres. Elle dépend de la température et est spécifique de chaque fluide.

Durant la conservation la viscosité peut évoluer donnant des produits plus fluides ou plus visqueux cependant pour déterminer une stabilité cette propriété ne doit pas évoluer au cours du temps.

a. Méthode du viscosimètre rotatif

Les viscosimètres rotatifs permettent de mesurer la viscosité des liquides newtoniens (à température constante leur viscosité reste constante quelque que soit la contrainte appliquée) ou non newtoniens (à température constante leur viscosité varie en fonction de la contrainte appliquée).

Le principe de la méthode consiste à mesurer la résistance qui s'exerce sur un mobile lorsqu'il est mis en rotation dans un échantillon à une vitesse de rotation constante. Cette résistance dépend de la vitesse de rotation et de la taille du mobile. Elle est évaluée par la torsion qu'elle exerce sur un ressort, directement liée aux forces de frottement subies par le mobile immergé.

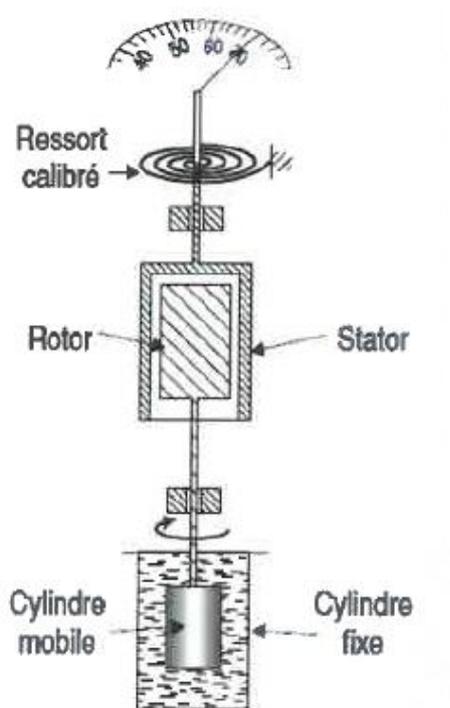


Figure 36 : Schéma du mécanisme d'un viscosimètre rotatif

Liste du matériel :

- Viscosimètre Brookfield DV1M
- Adaptateur faible volume SSA dédié à la mesure de la viscosité de petits volumes (9 mL)
- Mobile référence SC4-31
- Bain marie thermostaté
- Seringue et canule de nutrition



Figure 37 : Matériel de mesure de la viscosité d'un échantillon de faible volume sur viscosimètre Brookfield DVIM

PROTOCOLE :

Commencer par installer le matériel :

- Mettre l'appareil à niveau, pour que la bulle soit dans le cercle au niveau de la tête du viscosimètre afin d'assurer la reproductibilité des mesures.
- Placer l'adaptateur SSA sous la tête du viscosimètre.
- Brancher le tuyau d'arrivée d'eau au bain thermostaté à 25°C et y faire plonger le tuyau de sortie d'eau.
- Mettre en marche l'appareil et attendre 10 minutes pour le laisser chauffer.

Une fois le système installé et l'eau en circulation dans l'enveloppe thermostatique mettre en place l'échantillon :

- Déclipser la chambre de mesure (espace séparant le cylindre intérieur du cylindre extérieur).
- Introduire 9 mL d'échantillon en utilisant un kit seringue + canule « nutrition » pour les échantillons visqueux.
- Placer la chambre dans l'enveloppe thermostatique et attendre 10 minutes pour stabiliser la température.

Procéder ensuite au choix de la vitesse de rotation :

- Lorsque le mobile est sélectionné, l'écran affiche la vitesse de rotation optimale pour ce mobile et la valeur de viscosité maximale (Full Scale Range – FSR) pouvant être mesurée avec ce couple « mobile/vitesse ». La plage de viscosité pouvant être mesurée correspond alors à 10 – 100 % de la FSR.
- Si le couple « mobile/vitesse » sélectionné correspond à une FSR > 100% il faut augmenter la vitesse de rotation.
- Si le couple « mobile/vitesse » sélectionné correspond à une FSR < 10% il faut diminuer la vitesse de rotation.
- Lancer l'analyse et attendre l'équilibrage de la valeur affichée. Le résultat de la viscosité de l'échantillon s'affiche en centipoises (cP).

Une formule permet de calculer la viscosité maximale quantifiable (FSR) avec un couple « mobile/vitesse » sélectionné :

$$FSR = \frac{\text{Coefficient de plage}}{\text{Vitesse de rotation}}$$

Le coefficient de plage du mobile SC4-31 est 30 000 et la vitesse du mobile lors de la mesure de la viscosité des suspensions buvables de β -bloquants était de 50 rotations par minute (rpm). La FSR dans ces conditions d'analyse est donc 600 cP.

b. Résultats

i. Bétaxolol

À T₀ de l'étude de stabilité du bétaxolol, la valeur de la moyenne des viscosités mesurées sur les flacons n°28 à 30 était 484 cP. L'intervalle des valeurs normales pour toute la durée de l'étude de stabilité est donc de 484 +/- 10% pondérée par la précision de mesure du viscosimètre, fonction du couple mobile/vitesse.

Avec le mobile SC4-31 la précision de mesure correspond à 2% de la FSR soit 12 cP.

$$\text{Précision avec mobile SC431} = \frac{2}{100} \times \frac{\text{Coefficient de plage}}{\text{Vitesse de rotation}}$$

Pour être stable au cours du temps, la viscosité mesurée devra donc appartenir à l'intervalle de valeurs suivant : [424 ; 546] cP.

Selon le plan de l'étude, les mesures de la viscosité ont été réalisées :

| | 30/08/22 | 06/09/22 | 14/09/22 | 29/09/22 | 13/10/22 | 31/10/22 | 28/11/22 |
|------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------|----------|----------|----------|
| Conservation | T0 | T7j | T15j | T30j | T45j | T60j | T90j |
| Frigo après ouverture | F28, F29, F30 | | | | | | |
| | 484 | 490 | 509 | 490 | 454 | 440 | 439 |
| Ambiant | F1, F2, F3 | F22, F23, F24 | F25, F26, F27 | | | | |
| | 484 | 527 | 530 | | | | |

Tableau 23 : Moyennes des mesures de viscosité en cP des suspensions buvables de bétaxolol dans différentes conditions de conservation à chacun des temps de mesure

Les moyennes à tous les temps de prélèvement, dans les différentes conditions de conservation sont comprises dans l'intervalle de conformité.

La viscosité des suspensions de bétaxolol est stable :

- Pendant 90 jours après ouverture d'un flacon conservé au réfrigérateur.
- Par conséquent pendant 90 jours pour un flacon non ouvert conservé au réfrigérateur.
- Pendant 15 jours pour un flacon non ouvert conservé à température ambiante.

ii. Bisoprolol

À T₀ de l'étude de stabilité du bisoprolol, la valeur de la moyenne des viscosités mesurées sur les flacons n°28 à 30 était 394 cP. L'intervalle des valeurs normales pour toute la durée de l'étude de stabilité est donc de 394 +/- 10% pondérée par la précision de mesure du viscosimètre, soit 12 cP avec le mobile SC4-31 tournant à la vitesse de 50 rpm.

Pour être stable au cours du temps, la viscosité mesurée devra donc appartenir à l'intervalle de valeurs suivant : [343 ; 445] cP.

Selon le plan de l'étude, les mesures de viscosité ont été réalisées :

| | 03/01/23 | 10/01/23 | 18/01/23 | 02/02/23 | 16/02/23 | 02/03/23 | 03/04/23 |
|------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------|----------|----------|------------|
| Conservation | T0 | T7j | T15j | T30j | T45j | T60j | T90j |
| Frigo après ouverture | F28, F29, F30 | | | | | | |
| | 394 | 379 | 415 | 376 | 352 | 378 | 334 |
| Ambiant | F1, F2, F3 | F22, F23, F24 | F25, F26, F27 | | | | |
| | 394 | 389 | 406 | | | | |

Tableau 24 : Moyennes des mesures de viscosité en cP des suspensions buvables de bisoprolol dans différentes conditions de conservation à chacun des temps de mesure

Les moyennes à tous les temps de prélèvement jusqu'au T₆₀, dans les différentes conditions de conservation sont comprises dans l'intervalle de conformité. Cependant au 90^{ème} jour de conservation des flacons gardés au réfrigérateur, l'aspect de la suspension était beaucoup plus fluide et la viscosité mesurée était effectivement en dessous de l'intervalle de conformité.

La viscosité des suspensions de bisoprolol est stable :

- Pendant 60 jours après ouverture d'un flacon conservé au réfrigérateur.
- Par conséquent pendant 60 jours pour un flacon non ouvert conservé au réfrigérateur.
- Pendant 15 jours pour un flacon non ouvert conservé à température ambiante.

IV. Stabilité microbiologique

1. Applicabilité de la méthode en présence du produit

Avant le changement de formulation des suspensions buvables, la méthode de dénombrement microbien avait été validée par ensemencement direct après une dilution au dixième de l'échantillon. Nous commençons donc par vérifier l'applicabilité de la méthode en présence des suspensions de β -bloquants préparées avec le Syrspend[®] SF PH4 liquide qui contient un conservateur.

Pour cela, comme nous l'avons vu avec le nadolol, il faut réaliser en parallèle des ensemencements sur géloses TCA et Sabouraud :

- Du produit seul : témoin négatif
- De souches bactériennes et mycologiques de référence Pharmacopée : témoin positif
- Du produit en présence de chacune des souches de référence

Nous utilisons de nouveau des souches sous forme de Bioball[®] de 30 UFC du laboratoire Biomérieux.

Liste des réactifs :

- 1 flacon du produit à analyser (bisoprolol ou bétaxolol)
- Solution tampon phosphate pH 7,2 stérile en tube de 9 mL
- 14 géloses Trypticase Soja (TSA)
- 10 géloses Sabouraud/antibiotiques
- 4 Bioball[®] Biomérieux pour chacune des souches de référence :
 - *Staphylococcus aureus* NCTC10788 (Bioball[®] Biomérieux référence 56045)
 - *Bacillus subtilis* NCTC10400 (Bioball[®] Biomérieux référence 56024)
 - *Pseudomonas aeruginosa* NCTC12924 (Bioball[®] Biomérieux référence 56040)
 - *Candida albicans* NCPF3179 (Bioball[®] Biomérieux référence 56026)
 - *Aspergillus brasiliensis* NCPF2275 (Bioball[®] Biomérieux référence 56022)

PROTOCOLES :

Sortir les Bioball[®] du congélateur et les laisser revenir à T° ambiante, puis travailler sous le PSM.

Pour les souches témoins positifs

- Préparer 1 tube stérile avec 5 mL de diluant pharmacopée.
- Mettre une Bioball[®] d'une souche de référence dans les 5 mL, et agiter jusqu'à dissolution. On obtient une solution S₀ à 6 UFC/mL.
- Ensemencer 2 géloses avec 500 µL de S₀ soit avec 3 UFC.
- Répéter l'opération pour chacune des souches.

Pour les témoins négatifs

- Vortexer manuellement le flacon de suspension de bétaxolol ou bisoprolol.
- En prélever 1 mL et le mettre dans un falcon de 10 mL.
- Ajouter 9 mL de tampon phosphate et vortexer.
- Ensemencer 2 géloses SAB et 2 géloses TSA avec 500 µL de solution.

Pour les échantillons

- Vortexer manuellement le flacon de suspension de bétaxolol ou bisoprolol.
- En prélever 1 mL et le mettre dans un falcon de 10 mL.
- Ajouter 9 mL de tampon phosphate et vortexer.
- Récupérer 5 mL de la solution dans un deuxième falcon et y introduire la Bioball[®].
- Agiter jusqu'à dissolution. On obtient une solution S₀ à 6 UFC/mL.
- Ensemencer 2 géloses avec 500 µL de S₀ soit avec 3 UFC.
- Répéter l'opération pour chacune des souches.

a. Ensemencements

Dans chacune des conditions 2 géloses sont ensemencées par méthode directe.

Ensemencements bactériologiques :

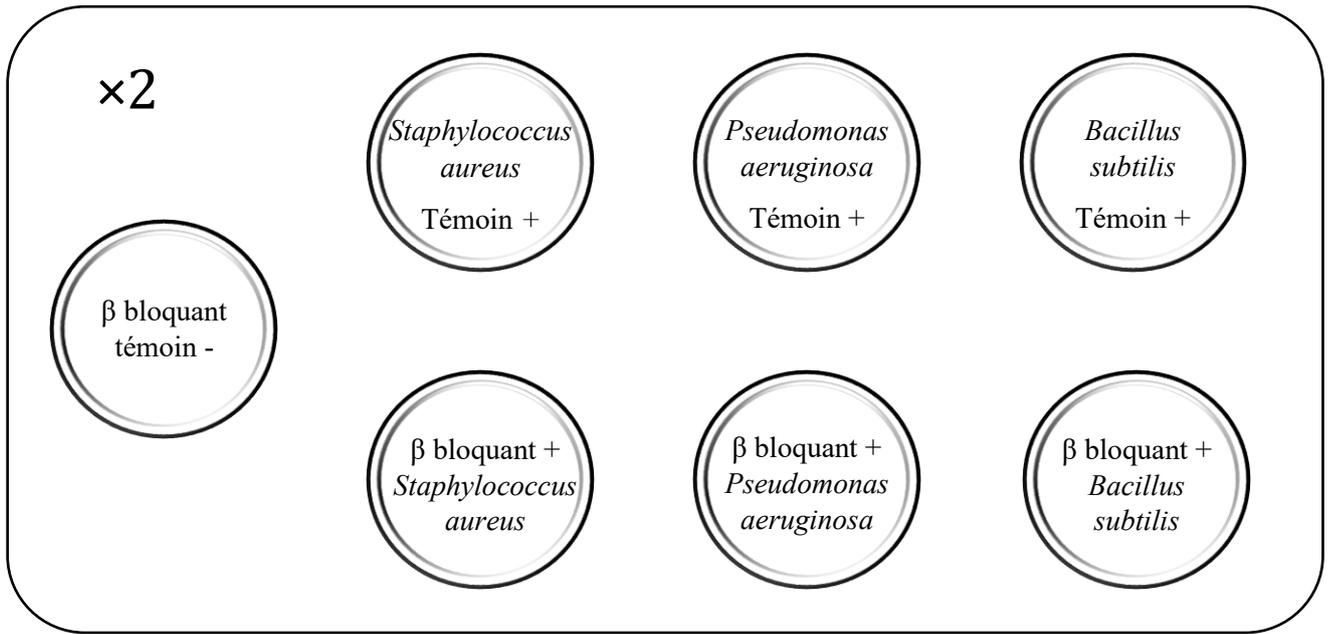


Figure 38 : Représentation schématique des ensemencements bactériologiques

Les géloses TSA sont placées 3 jours dans une étuve à 30-35°C.

Ensemencements mycologiques :

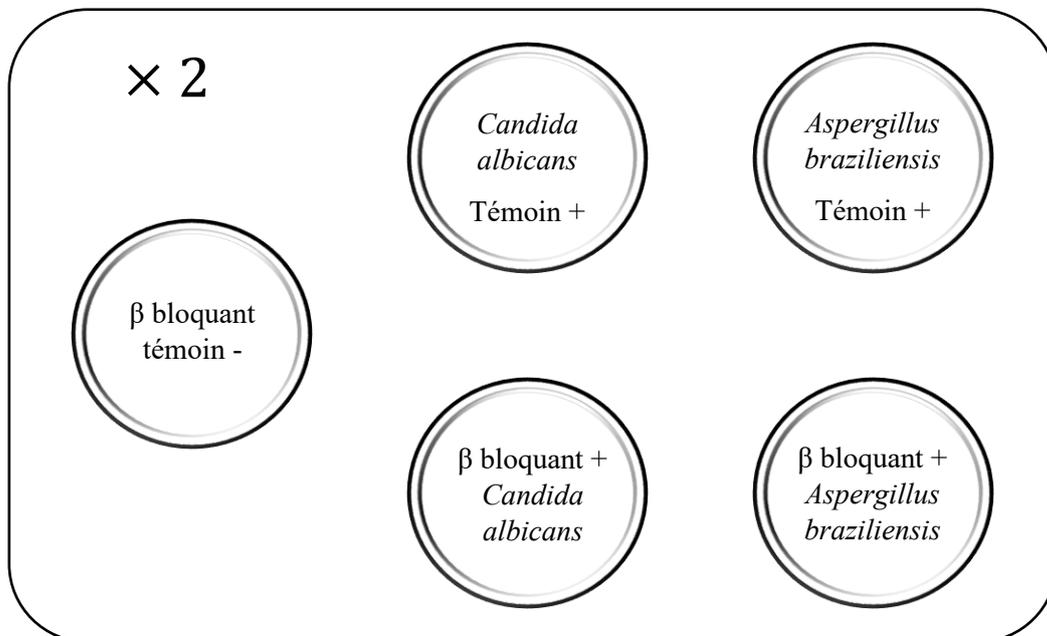


Figure 39 : Représentation schématique des ensemencements mycologiques

Les géloses SAB sont placées 5 jours dans une étuve à 20-25°C.

b. Validation de la méthode

À l'issue de la durée d'incubation nous calculons la moyenne des colonies ayant poussé sur les géloses dans chacune des conditions.

Pour que la méthode soit valide, il faut que :

- Les nombres moyens d'UFC des échantillons soient supérieurs au nombre moyen d'UFC des témoins produit, soit que $UFC\ 3(^{\circ}) > UFC\ 1(^{\circ})$
- Le nombre moyen obtenu pour chacune des souches de référence au contact du produit, ne doit pas varier de plus d'un facteur de 2 de la valeur obtenue en l'absence de produit, soit que $UFC\ 3(^{\circ}) \geq UFC\ 2(^{\circ})$ divisé par 2 et que $UFC\ 3(^{\circ}) \leq UFC\ 2(^{\circ})$ multiplié par 2

Avec UFC 1(^{\circ}) les témoins du produit, UFC 2(^{\circ}) les témoins des souches bactériennes et UFC 3(^{\circ}) les échantillons au contact des souches. Les UFC sans apostrophe concernent les ensemencements bactériens et les UFC' avec apostrophe concernent les ensemencements mycologiques.

c. Résultats

Concernant les résultats **bactériologiques**, le dénombrement des colonies a lieu à **J3**.

Les colonies de *Staphylococcus aureus* sont de petites colonies rondes et bombées et lisses à bord régulier. Elles sont opaques et de couleur caractéristique jaune/doré.



Figure 40 : Témoin souche de *Staphylococcus aureus* à J3

Celles de *Bacillus subtilis* sont des colonies irrégulières et aplaties à l'aspect plutôt duveteux, de couleur beige.



Figure 41 : Témoin souche de *Bacillus subtilis* à J3

Quant à celles de *Pseudomonas aeruginosa* ce sont des colonies plates, arrondies aux bords irréguliers. Elles sont beiges avec des teintes vertes dues à un pigment vert diffusible. Leur identification est facilitée par la production d'une molécule aromatique ayant une forte odeur caractéristique. [70]



Figure 42 : Témoin souche de *Pseudomonas aeruginosa* à J3

Le dénombrement bactériologique effectué pour la validation de méthode avec le bétaxolol puis avec le bisoprolol est répertorié dans les 2 tableaux ci-dessous :

| | Nombre de colonies sur Gélose TSA n°1 | Nombre de colonies sur Gélose TSA n°2 | Moyenne |
|--|---------------------------------------|---------------------------------------|---------|
| Témoin Bétaxolol (UFC 1) | 0 | 0 | 0 |
| Témoin souche <i>Staphylococcus aureus</i> (UFC 2 SA) | 4 | 2 | 3 |
| Bétaxolol + <i>Staphylococcus aureus</i> (UFC 3 SA) | 2 | 3 | 2,5 |
| Témoin souche <i>Bacillus subtilis</i> (UFC 2 BS) | 1 | 3 | 2 |
| Bétaxolol + <i>Bacillus subtilis</i> (UFC 3 BS) | 4 | 2 | 3 |
| Témoin souche <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (UFC 2 PA) | 4 | 5 | 4,5 |
| Bétaxolol + <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (UFC 3 PA) | 3 | 4 | 3,5 |

Tableau 25 : Résultats des ensemencements bactériologiques avec le bétaxolol

| | Nombre de colonies sur Gélose TSA n°1 | Nombre de colonies sur Gélose TSA n°2 | Moyenne |
|--|---------------------------------------|---------------------------------------|---------|
| Témoin Bisoprolol (UFC 1) | 0 | 0 | 0 |
| Témoin souche <i>Staphylococcus aureus</i> (UFC 2 SA) | 5 | 5 | 5 |
| Bisoprolol + <i>Staphylococcus aureus</i> (UFC 3 SA) | 4 | 2 | 3 |
| Témoin souche <i>Bacillus subtilis</i> (UFC 2 BS) | 1 | 4 | 2,5 |
| Bisoprolol + <i>Bacillus subtilis</i> (UFC 3 BS) | 3 | 4 | 3,5 |
| Témoin souche <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (UFC 2 PA) | 0 | 7 | 3,5 |
| Bisoprolol + <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (UFC 3 PA) | 2 | 3 | 2,5 |

Tableau 26 : Résultats des ensemencements bactériologiques avec le bisoprolol

Les paramètres de validation de la méthode sont corrects pour les 2 molécules :

- UFC 3 > UFC 1.
- UFC 3 ≥ UFC 2 divisé par 2
- UFC 3 ≤ UFC 2 multiplié par 2

La méthode d'ensemencement direct est validée pour le bétaxolol et le bisoprolol pour les ensemencements bactériologiques.

Concernant les résultats **mycologiques**, le dénombrement des colonies a lieu à **J5**.

Les colonies de *Candida albicans* sont de petites colonies rondes et bombées, lisses, à bord régulier. Elles sont opaques et de couleur blanche. [71]

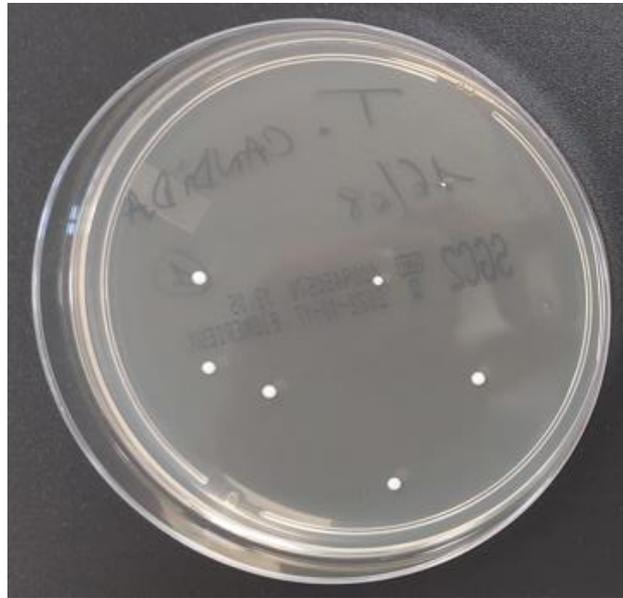


Figure 43 : Témoin souche de *Candida albicans* à J5

Les colonies d'*Aspergillus brasiliensis* sont étalées et filamenteuses. Elles sont dans un premier temps blanches puis deviennent brun foncé à noires.

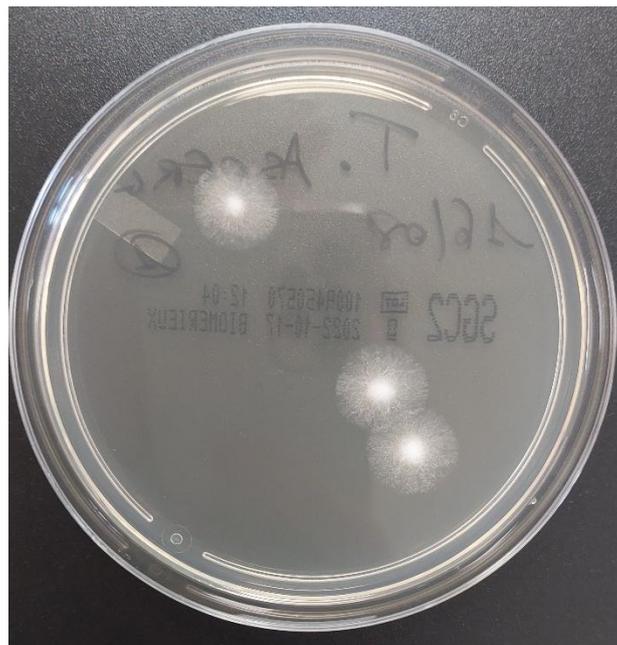


Figure 44 : Témoin souche d'*Aspergillus brasiliensis* à J5

Le dénombrement mycologique effectué pour la validation de méthode avec le bétaxolol puis avec le bisoprolol est répertorié dans les 2 tableaux ci-dessous :

| | Nombre de colonies sur Gélose SAB n°1 | Nombre de colonies sur Gélose SAB n°2 | Moyenne |
|---|---------------------------------------|---------------------------------------|---------|
| Témoin Bétaxolol (UFC 1') | 0 | 0 | 0 |
| Témoin souche <i>Candida albicans</i> (UFC 2' CA) | 1 | 4 | 2,5 |
| Bétaxolol + <i>Candida albicans</i> (UFC 3' CA) | 3 | 2 | 2,5 |
| Témoin souche <i>Aspergillus braziliensis</i> (UFC 2' AB) | 7 | 3 | 5 |
| Bétaxolol + <i>Aspergillus braziliensis</i> (UFC 3' AB) | 4 | 8 | 6 |

Tableau 27 : Résultats des ensemencements mycologiques avec le bétaxolol

| | Nombre de colonies sur Gélose SAB n°1 | Nombre de colonies sur Gélose SAB n°2 | Moyenne |
|---|---------------------------------------|---------------------------------------|---------|
| Témoin Bisoprolol (UFC 1') | 0 | 0 | 0 |
| Témoin souche <i>Candida albicans</i> (UFC 2' CA) | 5 | 3 | 4 |
| Bisoprolol + <i>Candida albicans</i> (UFC 3' CA) | 3 | 2 | 2,5 |
| Témoin souche <i>Aspergillus braziliensis</i> (UFC 2' AB) | 3 | 2 | 2,5 |
| Bisoprolol + <i>Aspergillus braziliensis</i> (UFC 3' AB) | 0 | 3 | 1,5 |

Tableau 28 : Résultats des ensemencements mycologiques avec le bisoprolol

Les paramètres de validation de la méthode sont corrects pour les 2 molécules :

- UFC 3' > UFC 1'**
- UFC 3' ≥ UFC 2' divisé par 2**
- UFC 3' ≤ UFC 2' multiplié par 2**

La méthode d'ensemencement direct est validée pour le bétaxolol et le bisoprolol pour les ensemencements mycologiques.

La méthode de dénombrement microbiologique par ensemencement direct peut être utilisée en routine pour les préparations hospitalières en suspensions buvables de bétaxolol à 1 mg/mL et de bisoprolol à 0,5 mg/mL.

2. DGAT et DMLT par dénombrement sur plaque

Le dénombrement des germes bactériens et mycologiques est réalisé par ensemencement direct dont l'applicabilité de la méthode en présence du produit à analyser a été démontrée au paragraphe précédent.

a. Protocole

Dérogant à la préconisation de la PE 2.6.12 comme nous l'avons vu précédemment dans la partie II au chapitre III.1 la prise d'essai pour le dénombrement microbien des PH en suspensions buvables est fixée à 1 mL. Le test est réalisé sur 2 flacons du lot.

Liste des réactifs :

- 2 flacons du produit à analyser (bisoprolol ou bétaxolol)
- Solution tampon phosphate pH 7,2 stérile en tube de 9 mL
- 3 géloses TSA
- 2 géloses SAB

PROTOCOLE :

- Sous le PSM, vortexer manuellement le flacon de suspension de β -bloquant.
- En prélever 1 mL et le mettre dans un tube à centrifuger de 15 mL.
- Ajouter 4 mL de tampon phosphate et vortexer.
- Réaliser une dilution au 10^{ème} de la solution obtenue : récupérer 1 mL de la solution dans un second tube, ajouter 9 mL de tampon phosphate et vortexer.
- À la pipette de précision, verser 500 μ L sur une gélose TSA, étaler avec un râteau.
- À la pipette de précision, verser 500 μ L sur une gélose SAB, étaler avec un râteau SAB.
- Répéter les étapes sur le deuxième flacon d'échantillon.

La dilution de l'échantillon au dixième a été ajoutée dans le protocole car ces principes actifs ont une légère activité antimicrobienne qui doit être neutralisée.

Réaliser en parallèle un témoin négatif sur une gélose TSA en l'ensemencant avec 500 μ L du tampon phosphate. En effet contrairement au milieu Sabouraud qui est sélectif des germes mycologiques grâce à l'ajout de chloramphénicol qui inhibe la croissance des bactéries Gram-positives et Gram-

négatives, le milieu TSA n'est pas sélectif de la croissance bactérienne. Il favorise la croissance de la plupart des bactéries Gram-négatives et Gram-positives non exigeantes ainsi que de nombreuses levures et moisissures.

Incuber les géloses TSA pendant 3-5 jours à 30-35°C.

Incuber les géloses SAB pendant 5-7 jours à 20-25°C.

b. Résultats

À l'issue de la durée de l'incubation, compter le nombre d'UFC pour chaque gélose et faire la moyenne des UFC comptées sur les géloses TSA et la moyenne des unités sur les géloses SAB. Les critères d'acceptation de la qualité microbiologiques des formes pharmaceutiques non stériles sont définis au chapitre 5.1.4 de la Pharmacopée Européenne [61]. Pour les formes aqueuses, administrées par voie orale, la limite acceptable maximale est de 200 UFC/mL pour les DGAT et 20 UFC/mL pour les DMLT.

Selon le plan de l'étude de stabilité du bétaxolol, les DGAT et DMLT ont été réalisés :

| | 30/08/22 | 06/09/22 | 14/09/22 | 29/09/22 | 13/10/22 | 31/10/22 | 28/11/22 |
|------------------------------|-------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| Conservation | T0 | T7j | T15j | T30j | T45j | T60j | T90j |
| Frigo | F1, F2, F3 | F4, F5, F6 | F7, F8, F9 | F10, F11, F12 | F13, F14, F15 | F16, F17, F18 | F19, F20, F21 |
| | OK | OK | OK | OK | OK | OK | OK |
| Frigo après ouverture | F1, F2, F3 | | | | | | |
| | OK | OK | OK | OK | | | |
| Ambiant | F1, F2, F3 | F22, F23, F24 | F25, F26, F27 | | | | |
| | OK | OK | OK | | | | |

Tableau 29 : Résultats des dénombrements microbiologiques des suspensions buvables de bétaxolol

Tous les dénombrements, à tous les temps de prélèvement et aux 3 conditions de conservation, sont conformes aux exigences de la PE.

Les suspensions buvables de bétaxolol sont microbiologiquement stables :

- Pendant 90 jours pour un flacon non ouvert conservé au réfrigérateur.
- Pendant 30 jours après ouverture d'un flacon conservé au réfrigérateur.
- Pendant 15 jours pour un flacon non ouvert conservé à température ambiante.

Il en a été de même lors de l'étude de stabilité du bisoprolol :

| | 03/01/23 | 10/01/23 | 18/01/23 | 02/02/23 | 16/02/23 | 02/03/23 | 03/04/23 |
|------------------------------|-------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| Conservation | T0 | T7j | T15j | T30j | T45j | T60j | T90j |
| Frigo | F1, F2, F3 | F4, F5, F6 | F7, F8, F9 | F10, F11, F12 | F13, F14, F15 | F16, F17, F18 | F19, F20, F21 |
| | OK | OK | OK | OK | OK | OK | OK |
| Frigo après ouverture | F1, F2, F3 | | | | | | |
| | OK | OK | OK | OK | | | |
| Ambiant | F1, F2, F3 | F22, F23, F24 | F25, F26, F27 | | | | |
| | OK | OK | OK | | | | |

Tableau 30 : Résultats des dénombrements microbiologiques des suspensions buvables de bisoprolol

Les suspensions buvables de bisoprolol sont microbiologiquement stables :

- Pendant 90 jours pour un flacon non ouvert conservé au réfrigérateur.
- Pendant 30 jours après ouverture d'un flacon conservé au réfrigérateur.
- Pendant 15 jours pour un flacon non ouvert conservé à température ambiante.

3. Efficacité de la conservation antimicrobienne

Au cours du développement d'une préparation pharmaceutique, il doit être démontré que la préparation assure une protection appropriée contre une éventuelle contamination microbienne et une prolifération au cours de la conservation et de l'usage de la préparation.

a. Méthode d'analyse

L'essai de l'efficacité de la conservation antimicrobienne est décrit au chapitre 5.1.3 de la Pharmacopée Européenne [72]. Il consiste en la contamination artificielle de la préparation avec une quantité connue de souches de référence, puis analyse par dénombrement microbien à différents temps de prélèvement.

i. Préparation des souches

Les différentes souches sont contenues dans des préparations de micro-organismes quantifiées, sous forme de pastilles de 2.10^7 à $9,9.10^7$ UFC commercialisées par le laboratoire Humeau. Ces pastilles lyophilisées se conservent à $+2/+8^{\circ}\text{C}$.

Les souches titrées compatibles 5.1.3 de la Pharmacopée utilisées sont :

- *Staphylococcus aureus* (EZ PEC Humeau référence 0485-PEC)
- *Pseudomonas aeruginosa* (EZ PEC Humeau référence 0484-PEC)
- *Candida albicans* (EZ PEC Humeau référence 0443-PEC)
- *Aspergillus brasiliensis* (EZ PEC Humeau référence 0392-PEC)



Figure 45 : Souche titrée EZ PEC de *C. albicans*

Pour chaque souche :

- Sortir le flacon du réfrigérateur et laisser le produit s'équilibrer à température ambiante.
- Porter en parallèle le liquide de reconstitution et les diluants à 35/37°C en les plaçant 30 minutes dans l'étuve.
- Travailler ensuite sous le PSM : À l'aide d'une pince stérile, prendre deux pastilles et les mettre dans le flacon contenant 2 mL de liquide de reconstitution.
- Reboucher le flacon de reconstitution et le mettre dans l'étuve 30 minutes à 35/37°C.
- Juste avant utilisation, vortexer pour garantir d'avoir une suspension homogène.
- On obtient une suspension d'un titre de $2 \cdot 10^7$ à $9,9 \cdot 10^7$ UFC/mL, qui doit être utilisée dans les 30 minutes qui suivent l'incubation.

ii. Préparation des échantillons

Ce test nécessite 6 échantillons : un par germe à tester et deux témoins négatifs.

Selon la PE, l'échantillon doit atteindre une contamination de $1 \cdot 10^5$ à $1 \cdot 10^6$ UFC par millilitre, sans que le volume de l'inoculum ne dépasse 1% du volume de l'échantillon.

Calcul des volumes à utiliser :

Le test de conservation antimicrobienne est réalisé sur 10 mL de suspension buvable de β -bloquant. La quantité de microorganismes à ajouter est de 10^5 à 10^6 par millilitre de suspension soit 10^6 à 10^7 UFC. Le volume maximal à ajouter est 1% de 10 mL soit 100 μ L d'inoculum.

On peut donc prélever 100 μ L de suspension d'inoculum pour ensemercer les échantillons avec $2 \cdot 10^6$ à $9,9 \cdot 10^6$ UFC soit $2 \cdot 10^5$ à $9,9 \cdot 10^5$ UFC/mL.

iii. Ensemencements

Le dénombrement microbiologique des suspensions de bisoprolol et de bétaxolol se fait par ensemencement direct, dont l'applicabilité de la méthode a été vérifiée précédemment. Le dénombrement bactériologique est fait sur gélose TSA et le dénombrement mycologique sur gélose Sabouraud.

Pour les formes orales, le dénombrement se fait à 3 temps de prélèvement : J₀, J₁₄ et J₂₈. Les critères d'acceptation sont les suivants :

| | Réduction logarithmique | |
|---------------|-------------------------|-----------------|
| | J ₁₄ | J ₂₈ |
| Bactériologie | 3 | NI |
| Mycologie | 1 | NI |

Avec NI = pas d'augmentation par rapport à la mesure précédente.

Tableau 31 : Critères d'acceptation pour les formes orales

Pour pouvoir être dénombré, le nombre d'UFC théoriques sur gélose doit être contenu entre 10 et 100. Il faudra donc diluer les échantillons aux différents temps de prélèvement en fonction de leur titre théorique :

| | J ₀ | J ₁₄ et J ₂₈ |
|---------------|--|--|
| Bactériologie | 10 ⁵ à 10 ⁶ UFC/mL | 10 ² à 10 ³ UFC/mL |
| Mycologie | 10 ⁵ à 10 ⁶ UFC/mL | 10 ⁴ à 10 ⁵ UFC/mL |

Tableau 32 : Contaminations théoriques aux différents temps d'analyse

La réalisation des ensemencements pour avoir 10 à 100 UFC sur les géloses se fait après dilutions des échantillons de la manière suivante :

À J₀, bactériologie + 1 témoin négatif et mycologie + 1 témoin négatif

- Mettre 1 mL de l'échantillon dans 9 mL de tampon neutralisant : 10⁴ à 10⁵ UFC/mL
- Vortexer puis mettre 900 µL dans 90 mL de Lethen modifié : 100 à 1000 UFC/mL
- Vortexer et ensemer la gélose avec 100 µL étalés au râteau : 10 à 100 UFC théoriques

À J₁₄ et J₂₈, bactériologie + 1 témoin négatif

- Mettre 1 mL de l'échantillon dans 4 mL de tampon neutralisant : 20 à 200 UFC/mL
- Vortexer et ensemer la gélose avec 500 µL étalés au râteau : 10 à 100 UFC théoriques

À J₁₄ et J₂₈, mycologie + 1 témoin négatif

- Mettre 1 mL de l'échantillon dans 9 mL de tampon neutralisant : 10³ à 10⁴ UFC/mL
- Vortexer puis mettre 900 µL dans 90 mL de Letheen modifié : 10 à 100 UFC/mL
- Vortexer et ensemercer la gélose avec 1 mL étalé au râteau : 10 à 100 UFC théoriques

b. Résultats

i. Bétaxolol

L'étude de la conservation antimicrobienne a été réalisée selon le plan de l'étude de stabilité du Bétaxolol :

- Pour les flacons conservés au frigo avant ouverture : à T₀, T₃₀ et T₆₀
- Pour les flacons conservés au frigo après ouverture : à T₀ et T₃₀
- Pour les flacons conservés à température ambiante : à T₀ et T₁₅

À chacun des temps de prélèvement, pour chacune des conditions de conservation des flacons, le test de la conservation antimicrobienne a été conforme pour chaque souche testée. Au contact du bétaxolol, le Syrspend[®] a une activité anti-*Staphylococcus aureus*, anti-*Pseudomonas aeruginosa*, anti-*Candida albicans* et anti-*Aspergillus brasiliensis* stable au cours du temps :

- Pendant 60 jours pour un flacon non ouvert conservé au réfrigérateur.
- Pendant 30 jours après ouverture d'un flacon conservé au réfrigérateur.
- Pendant 15 jours pour un flacon non ouvert conservé à température ambiante.

ii. Bisoprolol

L'étude de la conservation antimicrobienne a été réalisée selon le plan de l'étude de stabilité du bisoprolol :

- Pour les flacons conservés au frigo avant ouverture : à T₀, T₃₀ et T₆₀
- Pour les flacons conservés au frigo après ouverture : à T₀ et T₃₀
- Pour les flacons conservés à température ambiante : à T₀ et T₁₅

Le test de la conservation antimicrobienne des suspensions buvables de bisoprolol a été efficace à tous les temps de prélèvement pour *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Candida*

albicans, pour lesquels on observe bien une réduction de la contamination de 3 log à J₁₄ et aucune augmentation 14 jours après. Cependant pour les souches d'*Aspergillus braziliensis*, on observe un tapis pour les ensemencements réalisés à J₁₄ et J₂₈, et ce dès le premier temps d'analyse T₀. Il se pourrait que les excipients des comprimés de bisoprolol, utilisés en tant que matière première pour réaliser la suspension, interagissent avec le véhicule et inhibent l'activité anti-*Aspergillus*.

4. Conclusion et attribution des DLU

a. Bétaxolol

Concernant les suspensions buvables de **bétaxolol à 1 mg /mL dans le Syrspend® SF PH4 liquide**. Tous les tests menés au cours de l'étude de stabilité étaient conformes à tous les temps de prélèvement dans toutes les conditions de conservation, exceptée la teneur mesurée au 90^{ème} jour sur les flacons conservés au réfrigérateur avant ouverture. Par conséquent les DLU suivantes ont pu être attribuées à cette préparation :

- ⇒ **60 jours au réfrigérateur pour les flacons non ouverts**
- ⇒ **30 jours au réfrigérateur après ouverture des flacons**

Nous avons également démontré que la préparation est stable **14 jours à température ambiante** pour des flacons non ouverts, bien qu'en pratique ce ne soit pas dans ces conditions que nous souhaitons conserver la préparation hospitalière. Ces données de stabilité sont cependant nécessaires à connaître en cas de rupture de la chaîne du froid.

b. Bisoprolol

Concernant les suspensions buvables de **bisoprolol à 0,5 mg /mL dans le Syrspend® SF PH4 liquide**. Le test de l'efficacité de la conservation antimicrobienne est revenu non conforme et ce dès le T₀ pour la souche d'*Aspergillus braziliensis*. Il est en revanche concluant pour les trois autres germes à tous les temps de prélèvements. Or ce test implique une très lourde contamination (10⁶ à 10⁷ UFC) peu probable en pratique. De plus il s'est révélé concluant jusqu'au T₆₀ lors de l'étude de stabilité du bétaxolol dans le même véhicule, par conséquent le Syrspend® SF PH4 liquide possède bien une activité antimicrobienne contre *Aspergillus braziliensis*. En outre, tous les autres paramètres d'intérêt (teneur, produits de dégradation, pH, viscosité, dénombrement microbien) étudiés sur cette formulation de suspension buvable ont démontré la stabilité de la préparation pendant 60 jours (pour rappel, la viscosité au 90^{ème} jour était en deçà de l'intervalle de valeurs conformes). Il a donc été défini une **DLU provisoire** de :

⇒ **60 jours au réfrigérateur pour les flacons avant ouverture**

⇒ **30 jours au réfrigérateur après ouverture des flacons**

Nous avons également démontré que la préparation est stable **14 jours à température ambiante** pour des flacons non ouverts, bien qu'en pratique ce ne soit pas dans ces conditions que nous souhaitons conserver la préparation hospitalière. Ces données de stabilité sont cependant nécessaires à connaître en cas de rupture de la chaîne du froid.

Cette attribution provisoire implique tout de même de réfléchir rapidement à une **amélioration de la formule**. Nous suspectons qu'une incompatibilité entre le benzoate de sodium (conservateur du Syrspend[®] SF PH4 liquide) et un des excipients présents dans le bisoprolol comprimé est à l'origine de l'échec de la conservation antimicrobienne pour *Aspergillus*.

Nous allons donc étudier la conservation antimicrobienne des trois formules suivantes :

- Bisoprolol MPUP dans le Syrspend[®] SF PH4 liquide
- Bisoprolol comprimé dans l'InOrpha[®]
- Bisoprolol comprimé dans le Syrspend[®] SF PH4 liquide + 0,05% de benzoate de sodium

L'idéal serait de pouvoir partir sur une formule permettant de s'affranchir d'un maximum d'excipients en utilisant la matière première pour usage pharmaceutique de bisoprolol commercialisée par le laboratoire MedicaPharma. Cela permettrait d'éviter une incompatibilité entre les excipients du comprimé et les composants du Syrspend[®].

Si l'interaction s'avère dépendre du principe actif avec l'acide benzoïque, le véhicule Syrspend[®] SF PH4 liquide pourrait être remplacé par l'InOrpha[®] qui a l'acide sorbique comme conservateur (EEN). Nous avons, en effet, vu dans la partie II de la thèse que l'InOrpha[®] ne contient qu'un seul EEN contrairement à son concurrent l'Ora-blend[®] qui en a six dans sa formule.

Enfin, on pourrait également envisager une formule comme celle utilisée actuellement, soit bisoprolol comprimé et Syrspend[®] SF PH4 liquide, en ajoutant 0,05% de benzoate de sodium pour doubler la teneur du conservateur. Cette formule pourrait cependant avoir comme limite l'apport en benzoate de sodium, EEN qui peut accroître la survenue d'ictère chez le nouveau-né, notamment pour les patients traités par plusieurs préparations hospitalières en suspension buvable représentant chacune un apport quotidien de benzoate de sodium.

Une fois la formule idéale trouvée, nous reprogrammerons l'étude de stabilité correspondante.

V. Suspension buvable de β -bloquants – Libération de lot

La préparation hospitalière de bétaxolol à 1 mg/mL a été instaurée en routine en novembre 2018 et celle de bisoprolol à 0,5 mg/mL a été instaurée en février 2021. Depuis, 48 de lots de bétaxolol et 29 de lots de bisoprolol ont été analysés, répartis par année selon le tableau suivant :

| | 2019 | 2020 | 2021 | 2022 | 2023 |
|------------|------|------|------|------|------|
| Bétaxolol | 7 | 9 | 11 | 14 | 7 |
| Bisoprolol | | | 8 | 12 | 9 |

Tableau 33 : Nombre de lots de préparations hospitalières de β -bloquants analysés par année (dernière mise à jour au mois d'août 2023)

Chaque préparation réalisée fait l'objet d'un **dossier de lot** constitué par la pharmacie qui fabrique la préparation, conformément aux Bonnes Pratiques de Préparation [24]. Il est composé d'une partie préparation et conditionnement, une partie contrôle et la décision d'acceptation ou de refus du lot (libération pharmaceutique). On peut y retrouver aussi d'autres informations telles que les documents relatifs à la mise en échantillothèque. Le dossier de lot doit être conservé au moins un an après la date de péremption du lot concerné.

1. Préparation et échantillonnage au préparatoire

Lors de la préparation d'un lot, la fiche de fabrication (Annexe 4) est complétée avec les informations concernant la préparation et le conditionnement telles que la dénomination de la préparation et le dosage en substance active, le numéro de lot, le numéro d'inscription à l'ordonnancier de préparation, la date et le nom des personnes ayant contribué à la réalisation de la préparation, la date de péremption et la DLU après ouverture, la nature du conditionnement et le nombre d'unités conditionnées, mais également le numéro de lot et la date de péremption de chaque MPUP utilisée, les volumes mesurés et les tickets de pesées. Toutes ces informations sont vérifiées par un double contrôle et cette fiche de fabrication une fois complétée constitue le volet « préparation et conditionnement » du dossier de lot. Chaque flacon de la préparation est ensuite étiqueté et une étiquette est également collée sur la fiche de fabrication. Les étiquettes des préparations hospitalières de β -bloquants à l'AP-HM sont les suivantes :

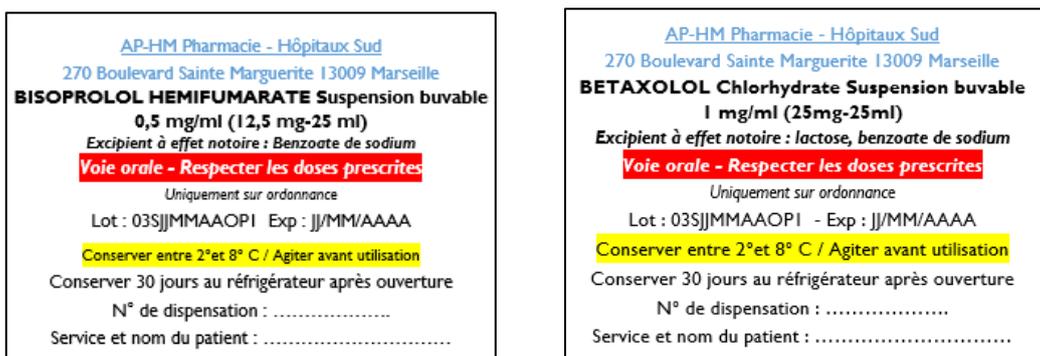


Figure 46 : Étiquettes des préparations hospitalières de bisoprolol et de bétaxolol

Une fois la préparation terminée, le pharmacien responsable des préparations la valide puis l'opérateur rempli un bon pour analyse (Annexe 5) et prélève des échantillons représentatifs du lot qui sont envoyés au LCQ en vue d'en effectuer les contrôles analytiques et microbiologiques.

Des échantillons représentant la quantité minimale nécessaire pour réaliser l'analyse complète sont également conservés dans une échantillothèque le temps de la durée de péremption augmentée d'un an. Pour les suspensions buvables de β -bloquants, 2 flacons sont envoyés au LCQ pour analyses, et 2 flacons sont conservés dans l'échantillothèque de la chambre froide de la PUI.

Les autres flacons du lot sont placés en quarantaine dans l'attente d'une décision sur leur libération ou leur refus.

2. Contrôles au SCQIP

Les contrôles à effectuer dépendent de la forme pharmaceutique, du dosage et du nombre d'unités réalisées. Pour les préparations hospitalières en suspension buvable les contrôles réalisés sont les suivants :

- Analyse de la conformité de l'étiquetage
- Analyses physicochimiques : teneur et pH
- Analyses microbiologiques : DMLT, DGAT et recherche d'*Escherichia coli*

Les résultats sont ensuite compilés dans un bon de rendu des résultats daté avec l'identification de l'opérateur ayant réalisé les contrôles et signé par le pharmacien responsable des contrôles (Annexe 6). Il constitue le volet « contrôle » du dossier de lot.

Le SCQIP a une obligation de rendu de résultats dans les délais. Ces délais dépendent des analyses à réaliser sur la préparation et notamment de la recherche de microorganismes spécifiques. Pour les suspensions buvables avec recherche de microorganisme spécifique le délai est de 7 jours.

3. Libération du lot au préparatoire

Lorsqu'ils reçoivent le bon d'analyse du LCQ, les internes du préparatoire de l'Hôpital de Sainte Marguerite remplissent la fiche de libération du lot (Annexe 7) pouvant être libéré par le pharmacien responsable des préparations. La décision de libération comporte la date, le nom et la signature du pharmacien.

Le dossier complet du lot est archivé et le lot est entré en stock physiquement et informatiquement afin de pouvoir être dispensé.

Conclusion générale

Depuis la centralisation de la production des préparations hospitalières en 2014, l'activité du préparatoire central de l'AP-HM n'a cessé de se développer et de se perfectionner, et ce d'autant plus que le recours aux préparations hospitalières est privilégié afin de limiter la réalisation de préparations magistrales. Cette démarche s'inscrit dans un contexte d'amélioration de la qualité et de la sécurité du circuit du médicament car les PH sont soumises à des exigences de qualité.

Répondant aux besoins des services de soins dont la demande en gélules de nadolol était fréquente, nous avons développé pour ce principe actif, une préparation hospitalière sous forme de suspension buvable dosée à 10 mg/mL adaptée à une administration chez le nourrisson et l'enfant. Ainsi nous avons mis au point les tests de contrôle de la qualité de la préparation, validant la méthode de dosage par HPLC et les tests de dénombrements microbiens par filtration sur rampe après ajout d'une enzyme hydrolytique, l' α -amylase. Une étude de stabilité de la préparation sera prochainement réalisée en interne car il s'agit d'un domaine scientifique où peu d'études sont publiées.

Ces améliorations passent aussi par l'adaptation des procédés de fabrication et de contrôle des préparations. En effet, nous avons vu dans cette thèse que l'amélioration de la stabilité microbiologique des suspensions buvables de bétaxolol et de bisoprolol, initiée à la suite de contaminations mycologiques, est passée par l'ajout d'un conservateur dans les préparations aqueuses buvables ainsi que par le développement du test de la conservation antimicrobienne. Les études de stabilité menées sur ces deux préparations ont permis de définir une date limite d'utilisation de 60 jours pour les flacons non ouverts conservés au réfrigérateur et de 30 jours au réfrigérateur après ouverture des flacons. Nous avons également démontré qu'en cas de rupture de la chaîne du froid ces préparations sont stables 14 jours à température ambiante. Il s'agit toutefois d'une DLU provisoire pour les suspensions de bisoprolol à 0,5 mg/mL qui ne validaient pas le test de la conservation antimicrobienne pour *Aspergillus brasiliensis*. Nous travaillons donc sur une formulation qui permettrait de passer le test de la conservation antimicrobienne pour chacun des germes testés. Une nouvelle étude de stabilité sera réalisée une fois la formulation idéale établie.

Bibliographie

- [1] « Chapitre VI : Pharmacies à usage intérieur. (Articles L5126-1 à L5126-11) - Légifrance ». [En ligne]. Disponible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/codes/id/LEGISCTA000006171372>
- [2] P. Joret-Descout, S. Prot-Labarthe, F. Brion, J. Bataille, J.-F. Hartmann, et O. Bourdon, « Off-label and unlicensed utilisation of medicines in a French paediatric hospital », *Int. J. Clin. Pharm.*, vol. 37, n° 6, p. 1222-1227, déc. 2015.
- [3] A. Palmaro *et al.*, « Off-Label Prescribing in Pediatric Outpatients », *Pediatrics*, vol. 135, n° 1, p. 49-58, janv. 2015.
- [4] F. Chast, *Histoire contemporaine des médicaments*. La Découverte, 2013. [En ligne]. Disponible sur:
https://www.google.nl/books/edition/Histoire_contemporaine_des_m%C3%A9dicaments/wUPwAQAAQBAJ?hl=fr&gbpv=1&dq=norton+et+perkins+b%C3%AAtabloquant&pg=PR67&printsec=frontcover
- [5] C. E. Powell et I. H. Slater, « Blocking of inhibitory adrenergic receptors by a dichloro analog of isoproterenol », *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 122, n° 4, p. 480-488, avr. 1958.
- [6] V. Quirke, « Putting Theory into Practice: James Black, Receptor Theory and the Development of the Beta-Blockers at ICI, 1958–1978 », *Med. Hist.*, vol. 50, n° 1, p. 69-92, janv. 2006.
- [7] N. Tourneur, « Un père heureux ! », *Le Quotidien du Pharmacien*. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.lequotidiendupharmacien.fr/le-mag/histoire-de-la-pharmacie/un-pere-heureux>
- [8] P. Garrigue, « Médicaments inhibiteurs du système sympathique », Faculté de pharmacie de Marseille, [notes issues du cours], sept. 2017.
- [9] V. Bianchi et S. El Anbassi, « Médicaments », in Deboeck supérieur. .
- [10] « Béta-bloquants », Pharmacomedicale. [En ligne]. Disponible sur: <https://pharmacomedicale.org/medicaments/par-specialites/item/beta-bloquants>
- [11] D. Vital Durand et C. Le Jeune, « DOROSZ », 42e édition., 2023, p. 525-533.
- [12] P. Rathelot, « Chimie thérapeutique des β -bloquants », [notes issues du cours], Faculté de pharmacie de Marseille, sept. 2017.
- [13] Pharmacorama, « La stéréoisomérisation ». [En ligne]. Disponible sur: <https://www.pharmacorama.com/pharmacologie/medicaments-generalite/mecanisme-action-medicaments-niveau-moleculaire/stereoisomerie/>
- [14] « Guides techniques – Ph. Eur. - Guide sur la représentation graphique et la dénomination des formules chimiques dans la Pharmacopée Européenne », Direction européenne de la qualité du médicament & soins de santé. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.edqm.eu/en/ph-eur-technical-guides>

- [15] F. N. Ågesen, P. E. Weeke, P. Tfelt-Hansen, et J. Tfelt-Hansen, « Pharmacokinetic variability of beta-adrenergic blocking agents used in cardiology », *Pharmacol. Res. Perspect.*, vol. 7, n° 4, 2019.
- [16] T. Walley, M. Pirmohamed, C. Proudlove, et D. Maxwell, « Interaction of metoprolol and fluoxetine », *Lancet Lond. Engl.*, vol. 341, n° 8850, p. 967-968, 1993.
- [17] C. Blake, E. Kharasch, M. Schwab, et P. Nagele, « Meta-analysis of CYP2D6 metabolizer phenotype and metoprolol pharmacokinetics », *Clin. Pharmacol. Ther.*, vol. 94, n° 3, p. 394-399, sept. 2013.
- [18] « VIDAL, L'intelligence médicale au service du soin », VIDAL. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.vidal.fr/>
- [19] M. Grünenwald, C. Prins, M. Pechère, et A. Pechère-Bertschi, « Complications cutanées des traitements anti-hypertenseurs », *Rev Med Suisse*, vol. 032, p. 2093-2097, sept. 2005.
- [20] « Article L5121-1 - Code de la santé publique - Légifrance ». [En ligne]. Disponible sur: https://www.legifrance.gouv.fr/codes/article_lc/LEGIARTI000044628485
- [21] « Article R5126-9 - Code de la santé publique - Légifrance ». [En ligne]. Disponible sur: https://www.legifrance.gouv.fr/codes/article_lc/LEGIARTI000038598073/2019-05-24/
- [22] « Article R5126-33 - Code de la santé publique - Légifrance ». [En ligne]. Disponible sur: https://www.legifrance.gouv.fr/codes/article_lc/LEGIARTI000038597763
- [23] « Article L5121-5 - Code de la santé publique - Légifrance ». [En ligne]. Disponible sur: https://www.legifrance.gouv.fr/codes/article_lc/LEGIARTI000032906195
- [24] ANSM, « Bonnes Pratiques de Préparation », 2023, [En ligne]. Disponible sur: <https://ansm.sante.fr/documents/referance/bonnes-pratiques-de-preparation>
- [25] « 2.9.6 Uniformité de teneur des préparations unidoses », in *Pharmacopée Européenne*, 11^e éd., 2023.
- [26] « 2.9.5 Uniformité de masse des préparations unidoses », in *Pharmacopée Européenne*, 11^e éd., 2023.
- [27] « 2.6.12 Essais de dénombrement microbien », in *Pharmacopée Européenne*, 11^e éd., 2023.
- [28] « Service Central de la Qualité et de l'Information Pharmaceutiques (SCQIP) | AP-HM ». [En ligne]. Disponible sur: <http://fr.ap-hm.fr/service/scqip-service-central-qualite-information-pharmaceutiques>
- [29] P. Rochiccioli, C. Enjaume, M. Tauber, et C. Pienkowski, « Statistical study of 5473 results of nine pharmacological stimulation tests: a proposed weighting index », *Acta Paediatr.*, vol. 82, n° 3, p. 245-248, mars 1993.
- [30] C. Jullian, « Les troubles de la croissance chez l'enfant: hormone de croissance et conseils associés ».
- [31] M. Colle, J. Battin, J. P. Coquelin, et P. Rochiccioli, « Betaxolol and propranolol in glucagon stimulation of growth hormone », *Arch. Dis. Child.*, vol. 59, n° 7, p. 670-672, juill. 1984.
- [32] « Test au glucagon bétaxolol », Centre Hospitalier de Haguenau, Protocole.

- [33] « Test au glucagon bétaxolol », Hôpital universitaire Robert-Debré, Protocole.
- [34] « Test au glucagon bétaxolol pédiatrique », Centre Hospitalier Intercommunal de Fréjus-Saint Raphaël, Protocole.
- [35] S. Recla, D. Schmidt, T. Logeswaran, A. Esmaeili, et D. Schranz, « Pediatric heart failure therapy: why β 1-receptor blocker, tissue ACE-I and mineralocorticoid-receptor-blocker? », *Transl. Pediatr.*, vol. 8, n° 2, p. 127-132, avr. 2019.
- [36] F. Bruno, *Doses maximales et usuelles en pédiatrie*, Les éditions Porphyre. 2012.
- [37] D. Bonnet, « Médicaments en cardiologie pédiatrique », Hôpital Necker-Enfants malades.
- [38] S. D. Miyamoto *et al.*, « Beta-adrenergic adaptation in paediatric idiopathic dilated cardiomyopathy », *Eur. Heart J.*, vol. 35, n° 1, p. 33-41, janv. 2014.
- [39] T. Mienert *et al.*, « Cardiovascular Drug Therapy during Interstage After Hybrid Approach: A Single-Center Experience in 51 Newborns with Hypoplastic Left Heart », *Paediatr. Drugs*, vol. 23, n° 2, p. 195-202, mars 2021.
- [40] « ATU/RTU - Propranolol Rosemont », ANSM. [En ligne]. Disponible sur: <https://ansm.sante.fr/tableau-acces-derogatoire/propranolol-rosemont>
- [41] « Propranolol Rosemont 10mg/5ml Oral Solution - Summary of Product Characteristics (SmPC) - (emc) ». [En ligne]. Disponible sur: <https://www.medicines.org.uk/emc/product/127/smpc>
- [42] A. V. Mehta et B. Chidambaram, « Efficacy and safety of intravenous and oral nadolol for supraventricular tachycardia in children », *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 19, n° 3, p. 630-635, mars 1992.
- [43] J. C. von Alvensleben, M. J. LaPage, R. Caruthers, et D. J. Bradley, « Nadolol for Treatment of Supraventricular Tachycardia in Infants and Young Children », *Pediatr. Cardiol.*, vol. 38, n° 3, p. 525-530, mars 2017.
- [44] « Tachycardie ventriculaire catécholergique », Cardiogen. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.filiere-cardiogen.fr/public/pathologies/tachycardie-ventriculaire-catecholergique/>
- [45] L. Antoine, P. Vincent, et C. Philippe, « Tachycardies ventriculaires catécholergiques (TVC) - Centre de Référence Maladies Cardiaques Héritaires », Haute Autorité de Santé. [En ligne]. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/jcms/p_3314799/fr/tachycardies-ventriculaires-catecholergiques-tvc
- [46] I. S. Leren, J. Saberniak, E. Majid, T. F. Haland, T. Edvardsen, et K. H. Haugaa, « Nadolol decreases the incidence and severity of ventricular arrhythmias during exercise stress testing compared with β 1-selective β -blockers in patients with catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia », *Heart Rhythm*, vol. 13, n° 2, p. 433-440, févr. 2016.
- [47] L. A. Barness *et al.*, « Commentary on Breast-Feeding and Infant Formulas, Including Proposed Standards for Formulas », *Pediatrics*, vol. 57, n° 2, p. 278-285, févr. 1976.
- [48] H. C. Polonini, S. L. Silva, T. R. De Almeida, M. A. F. Brandão, et A. O. Ferreira, « Compatibility of caffeine, carvedilol, clomipramine hydrochloride, folic acid, hydrochlorothiazide, loperamide hydrochloride, methotrexate, nadolol, naltrexone

hydrochloride and pentoxifylline in SyrSpend SF PH4 oral suspensions », *Eur. J. Hosp. Pharm.*, vol. 23, n° 6, p. 352-358, nov. 2016.

- [49] ANSM, « La Pharmacopée française ». Consulté le: 29 mai 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://ansm.sante.fr/documents/referance/pharmacopee/la-pharmacopee-francaise>
- [50] « USP-NF Online ». [En ligne]. Disponible sur: <https://store.usp.org/usp-nf-online/category/USP-3110>
- [51] « USP29-NF24 », US Pharmacopeia. [En ligne]. Disponible sur: <http://www.pharmacopeia.cn/>
- [52] « 2.2.29 Chromatographie liquide », in *Pharmacopée Européenne*, 11^e éd., 2023.
- [53] C. Badens, « Techniques chromatographiques », [notes fournies dans le cours], Faculté de pharmacie Aix Marseille Université, oct. 2016.
- [54] USP, « General Chapters: <621> Chromatography ». [En ligne]. Disponible sur: http://www.pharmacopeia.cn/v29240/usp29nf24s0_c621_viewall.html
- [55] ICH, « Validation of analytical procedures : Text and Methodology Q2 (R1) Guideline », in *Handbook of Transnational Economic Governance Regimes*. [En ligne]. Disponible sur: <https://database.ich.org/sites/default/files/Q2%28R1%29%20Guideline.pdf>
- [56] « EDQM Etalon Nadolol ». [En ligne]. Disponible sur: <https://crs.edqm.eu/db/4DCGI/search?vSelectName=1&vContains=1&vtUserName=nadolol&OK=Search&vTypeCRS=>
- [57] « 5.12. Étalons de référence », in *Pharmacopée Européenne*, 11^e éd., 2023.
- [58] « Quality Control : Pharmaguideline ». [En ligne]. Disponible sur: <https://www.pharmaguideline.com/p/quality-control.html>
- [59] USP, « General Chapters: <621> System Suitability ». [En ligne]. Disponible sur: http://ftp.uspbpep.com/v29240/usp29nf24s0_c621s12.html
- [60] « CDER Reviewer Guidance : Validation of Chromatographic Methods.pdf ».
- [61] « 5.1.4 Qualité microbiologique des préparations pharmaceutiques et des substances pour usage pharmaceutique non stérile », in *Pharmacopée Européenne*, 11^e éd., 2023.
- [62] USP, « General Chapters: <795> Assigning Beyond-Use Dates ».
- [63] ICH, « Stability testing of new drug substances and products Q1 (R2) », in *Handbook of Transnational Economic Governance Regimes*. [En ligne]. Disponible sur: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-1-r2-stability-testing-new-drug-substances-products-step-5_en.pdf
- [64] Groupe d'évaluation et de recherche sur la protection en atmosphère contrôlée, *Guide méthodologique des études de stabilité des préparations*. SFPC GERPAC, 2013.
- [65] « FAGRON - Syrspend table de compatibilité.pdf ».

- [66] « Liste des excipients à effet notoire », ANSM. Consulté le: 1 septembre 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://ansm.sante.fr/qui-sommes-nous/notre-perimetre/les-medicaments/p/medicaments-generiques>
- [67] « USP Monographs: Betaxolol Tablets ». [En ligne]. Disponible sur: <http://www.pharmacoepia.cn/usp.asp>
- [68] « 2.2.3 Détermination potentiométrique du pH », in *Pharmacopée Européenne*, 11^e éd., 2023.
- [69] « 2.2.8 Viscosité », in *Pharmacopée Européenne*, 11^e éd., 2023.
- [70] V. Bianchi, S. El Anbassi, et N. Duployez, *Bactériologie Virologie*, 2013^e éd. in Deboeck supérieur.
- [71] C. Buffaz, E. Hodile, Y. Jourdy, C. Louvrier, et A. Marijon, *Parasitologie et Mycologie médicale pratique*. in Deboeck supérieur. 2014.
- [72] « 5.1.3 Efficacité de la conservation antimicrobienne », in *Pharmacopée Européenne*, 11^e éd., 2023.

DEMANDE D'HABILITATION, PREPARATION NON STERILE GELULES

Etablissement : CHR SAINTE MARGUERITE Service : PHARMACIE

Habilitation effectuée le : 29.11.2022

Habilitation initiale / Habilitation de confirmation

Période de validité (critères à fixer par le demandeur) : 6 mois

Personnel habilité : Y

Grade : INTERNE EN PHARMACIE

Echantillon : gélules de mélatonine 2 mg

Numéro de lot : 03G291122YH1

Date de péremption : 30.04.2023

Annexes

Annexe 1 : Certificat d'habilitation pour préparations non stériles types gélules

UNIFORMITE DE MASSE, GELULES < 300 MG

| Limites en mg | | Critères de conformité |
|--|--|---------------------------------------|
| [90% - 110%] Masse _{mojeenne} | | 8, 9 ou 10 unités dans cet intervalle |
| [80% - 90%] et [110% - 120%] Masse _{mojeenne} | | 2 unités maximum dans cet intervalle |
| [80%] < ou > [120%] Masse _{mojeenne} | | Aucune unité dans cet intervalle |

RESULTAT D'ANALYSE

| Gélule | Résultat (mg) | [90% - 110%] | [80% - 90%] et [110% - 120%] | [90%] < ou > [120%] |
|--------|---------------|--------------|------------------------------|---------------------|
| 1 | 84,23 | x | | |
| 2 | 78,21 | x | | |
| 3 | 87,71 | x | | |
| 4 | 86,1 | x | | |
| 5 | 87,05 | x | | |
| 6 | 81,13 | x | | |
| 7 | 81,66 | x | | |
| 8 | 85,01 | x | | |
| 9 | 82,05 | x | | |
| 10 | 83,13 | x | | |
| 11 | 84,69 | x | | |
| 12 | 81,94 | x | | |
| 13 | 83,38 | x | | |
| 14 | 83,07 | x | | |
| 15 | 87,14 | x | | |
| 16 | 84,44 | x | | |
| 17 | 81,31 | x | | |
| 18 | 80,62 | x | | |
| 19 | 83,56 | x | | |
| 20 | 86,74 | x | | |
| Total | 20 | 20 | 0 | 0 |

Masse_{mojeenne} = 83,6585 mg

Conforme

Non conforme

UNIFORMITE DE TENEUR

Dosage par HPLC (Méthode interne)

| Gélule | Q (mg) |
|--------|--------|
| 1 | 1,91 |
| 2 | 2,00 |
| 3 | 2,02 |
| 4 | 1,79 |
| 5 | 2,00 |
| 6 | 1,88 |
| 7 | 2,02 |
| 8 | 1,95 |
| 9 | 2,08 |
| 10 | 1,90 |

Série 1

Teneur moyenne = 1,96 mg

85% - 115% teneur moyenne = 1,66 – 2,25
75% - 125% teneur moyenne = 1,47 – 2,45

Conforme

Non conforme

DENOMBREMENT MICROBIEN

DGAT : Dénombrement des germes aérobies totaux (VN < 2000 UFC/g)
DMLT : Dénombrement des moisissures/levures totales (VN < 200 UFC/g)

Masses gélules analysées : G1 = 0,1271 grammes G2 = 0,1237 grammes

Géloses TSA, moyennes UFC : G1 = 0 G2 = 0

DGAT 1 = (moyenne X 10)/masse gélule 1 : <100 UFC/g
DGAT 2 = (moyenne X 10)/masse gélule 2 : <100 UFC/g

Géloses Sabouraud, moyenne UFC : G1 = 0 G2 = 0

DMLT 1 = (moyenne X 10)/masse gélule 1 : <100 UFC/g
DMLT 2 = (moyenne X 10)/masse gélule 2 : <100 UFC/g

Conforme

Non conforme

CONCLUSION

UNIFORMITE DE MASSE : **OUI** / NON

UNIFORMITE DE TENEUR : **OUI** / NON

DENOMBREMENT MICROBIEN : **OUI** / NON

HABILITATION : **OUI** / NON

S.C.Q.I.P.
Signature du pharmacien responsable du contrôle (LCO)
et de l'habilitation de fabrication des médicaments
L. 1277
Hôpital de la Croix-Rouge
14, bd S. M. T. MARSEILLE

Signature du pharmacien responsable de l'habilitation (préparatoire)

C. ARHIM
PHARMACIEN
14.11.23 H

Signature du personnel habilité (préparatoire)



Annexe 2 : Listing des préparations hospitalières disponibles à l'AP-HM en 2023

| FORME | PRINCIPE ACTIF | PÉREMPTION | CONSERVATION |
|---------|---------------------------------|------------|--------------|
| COLLYRE | Amphotéricine B 5 mg/ml | 6 mois | - 20°C |
| | | 1 mois | +2/+8°C |
| COLLYRE | Gentamicine 14 mg/ml | 3 mois | - 20°C |
| | | 21 jours | +2/+8°C |
| COLLYRE | Néosynéphrine 1.25 % | 2 mois | +2/+8°C |
| COLLYRE | PHMB 0.2 mg/ml | 3 mois | T ambiante |
| COLLYRE | Pipéracilline 20 mg/ml | 3 mois | - 20°C |
| | | 1 mois | +2/+8°C |
| COLLYRE | Vancomycine 50 mg/ml | 3 mois | - 20°C |
| | | 1 mois | +2/+8°C |
| COLLYRE | Voriconazole 10 mg/ml | 3 mois | - 20°C |
| | | 2 mois | +2/+8°C |
| DDS | Gel buccal 20 g | 45 jours | +2/+8°C |
| DDS | Suspension buvable 10 ml | 2 mois | +2/+8°C |
| DDS | Suspension buvable 120 ml | 2 mois | +2/+8°C |
| GELULE | Acide ursodésoxycholique 20 mg | 1 an | T ambiante |
| GELULE | Acide ursodésoxycholique 30 mg | 1 an | T ambiante |
| GELULE | Acide ursodésoxycholique 45 mg | 1 an | T ambiante |
| GELULE | Allopurinol 300 mg | 6 mois | T ambiante |
| GELULE | Amiodarone Chlorhydrate 5 mg | 4 mois | T ambiante |
| GELULE | Amiodarone Chlorhydrate 20 mg | 6 mois | T ambiante |
| GELULE | Amiodarone Chlorhydrate 50 mg | 1 an | T ambiante |
| GELULE | Amiodarone Chlorhydrate 100 mg | 6 mois | T ambiante |
| GELULE | Arginine Chlorhydrate 500 mg | 9 mois | T ambiante |
| GELULE | Benzoate de sodium 500 mg | 6 mois | T ambiante |
| GELULE | Biotine 40 mg | 4 mois | T ambiante |
| GELULE | Captopril 3 mg | 6 mois | T ambiante |
| GELULE | Carbidopa 200 mg | 1 an | T ambiante |
| GELULE | L-Citrulline 500 mg | 3 mois | T ambiante |
| GELULE | Clonidine chlorhydrate 20 µg | 1 an | T ambiante |
| GELULE | Dexaméthasone acétate 6 mg | 3 mois | T ambiante |
| GELULE | Erythromycine 20 mg | 1 an | T ambiante |
| GELULE | Furosémide 2 mg | 6 mois | T ambiante |
| GELULE | Mélatonine 2 mg | 6 mois | T ambiante |
| GELULE | Mysoline 25 mg | 1 mois | T ambiante |
| GELULE | N-acétylcystéine 400 mg | 3 mois | T ambiante |
| GELULE | Nicardipine chlorhydrate 0,5 mg | 1 an | T ambiante |
| GELULE | Nicardipine chlorhydrate 2 mg | 1 an | T ambiante |
| GELULE | Nicardipine chlorhydrate 5 mg | 1 an | T ambiante |
| GELULE | Pilocarpine chlorhydrate 5 mg | 4 mois | T ambiante |
| GELULE | Potassium chlorure 50 mg | 4 mois | T ambiante |
| GELULE | Pyridoxal-5-phosphate 50 mg | 3 mois | T ambiante |
| GELULE | Pyridoxine chlorhydrate 50 mg | 6 mois | T ambiante |

| | | | |
|---------------------------|-----------------------------------|----------|------------|
| GELULE | Riboflavine 50 mg | 1 an | T ambiante |
| GELULE | Sildenafil citrate 2 mg | 1 an | T ambiante |
| GELULE | Spironolactone 2,5 mg | 4 mois | T ambiante |
| GELULE | Spironolactone 10 mg | 4 mois | T ambiante |
| GELULE | Thiamine chlorhydrate 50 mg | 6 mois | T ambiante |
| GELULE | Warfarine sodique 0,2 mg | 6 mois | T ambiante |
| SACHET | Urée 5 g | 3 mois | T ambiante |
| SOLUTION CUTANEE | Acide acétique 1,5% | 3 mois | T ambiante |
| SOLUTION CUTANEE | Acide acétique 3% | 3 mois | T ambiante |
| SOLUTION CUTANEE | Acide acétique 5% | 4 mois | T ambiante |
| SOLUTION CUTANEE | Acide borique 3% | 2 mois | +2/+8°C |
| SOLUTION CUTANEE | Iodo-iodurée 2% | 3 mois | T ambiante |
| POMMADE | Oxyde de zinc 10% | 45 jours | T ambiante |
| MELANGE | Mélange aux 2 huiles 100 mL | 3 mois | T ambiante |
| SUSPENSION BUVABLE | Acide ursodesoxycholique 10 mg/ml | 2 mois | +2/+8°C |
| SUSPENSION BUVABLE | Benzoate de sodium 200 mg/mL | 4 mois | +2/+8°C |
| SUSPENSION BUVABLE | Bétaxolol chlorhydrate 1 mg/mL | 2 mois | +2/+8°C |
| SUSPENSION BUVABLE | Bisoprolol hémifumarate 0,5 mg/ml | 2 mois | +2/+8°C |
| SUSPENSION BUVABLE | Citrate de Caféine 10 mg/mL | 4 mois | +2/+8°C |
| SUSPENSION BUVABLE | Clonidine chlorhydrate 0,01 mg/mL | 2 mois | +2/+8°C |
| SUSPENSION BUVABLE | Hydrochlorothiazide 5 mg/mL | 2 mois | +2/+8°C |
| SUSPENSION BUVABLE | Hydrocortisone 1 mg/mL | 3 mois | +2/+8°C |
| SUSPENSION BUVABLE | Mélatonine 1 mg/ml | 3 mois | +2/+8°C |
| SUSPENSION BUVABLE | Sildénafil 5 mg/ml | 3 mois | +2/+8°C |
| SUSPENSION BUVABLE | Spironolactone 5 mg/ml | 3 mois | +2/+8°C |
| SUSPENSION BUVABLE | Topiramate 6 mg/ml | 2 mois | +2/+8°C |
| SOLUTION BUVABLE | Morphine 0,2 mg/ml | 4 mois | +2/+8°C |
| SOLUTION BUVABLE | Morphine 1 mg/ml | 3 mois | +2/+8°C |

Annexe 3 : Étude menée à l'hôpital Nord sur la quantité d'acide benzoïque dans les préparations hospitalières en suspensions buvables



Détermination de la quantité d'acide benzoïque dans les préparations hospitalières buvables à l'AP-HM

Emma SAYAGH
Pharmacie à usage intérieur de l'Hôpital Nord, Assistance publique des Hôpitaux de Marseille
Chef de service : Dr Martine BUES - CHARBIT, Tuteur : Dr Fanny MATHIAS



Introduction

Suite à un retrait de lot pour cause de contamination mycologique de certaines préparations hospitalières buvables (PHB), la formulation des préparations a été remise en question. ☞ Remplacement du Syrspond Poudre (sans conservateurs) par du **Syrspond Liquide** (avec conservateurs) pour diminuer le risque de contamination microbienne.

☹ Le Syrspond SF PH4 Liquide : contient de l'**acide benzoïque**, excipient reconnu **toxique** pour les nouveaux nés

Objectifs

- Recenser les préparations buvables hospitalières utilisées à Nord en néonatalogie
- Vérifier si les **quantités d'acide benzoïque** contenues dans la nouvelle formulation sont **acceptables** selon le seuil toléré par les pédiatres.

Matériel et méthodes

Listage des PHB utilisées à l'Hôpital Nord sur les 3 derniers mois

- Logiciel Pharma®
- Services : néonatalogie

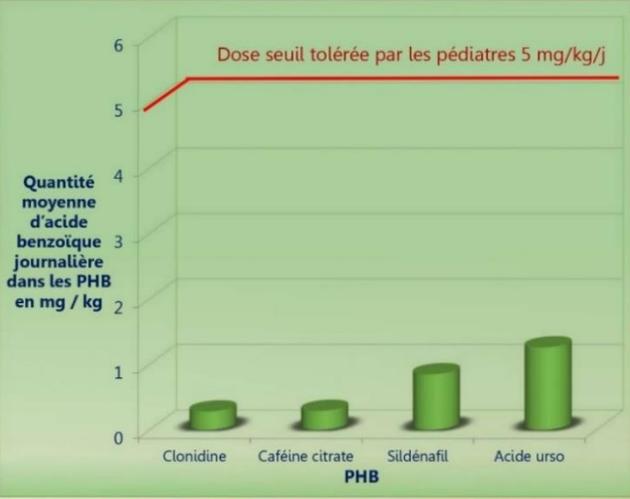
Calcul de la quantité d'acide benzoïque présente dans ces PHB à partir des protocoles de fabrication du préparatoire central de l'AP-HM.

Recueil des prescriptions des PHB en néonatalogie sur Logipren® .
Calcul de la **quantité d'acide benzoïque journalière reçue** à partir du **poids** des bébés et de la **posologie**.

Résultats et discussions



Etude réalisée sur une période 15 jours avec 8 nouveaux nés :
Age moyen 1M ± 5j ,
Poids moyen 2902 g ± 0,7 g
Poids min : 950 g – Poids max : 4685 g .



Le Syrspond® liquide contient au plus **0,84 mg/ml d'acide benzoïque** d'après le certificat d'analyse de la matière première.

| PHB | Quantité d'acide benzoïque présente (en mg/ml) | Posologie usuelle (mg/kg/j) | Quantité d'acide benzoïque présente (en mg/kg/j) |
|--------------------------|--|-------------------------------|---|
| Caféine citrate 10 mg/ml | 0,504 mg/ml | 10 mg/kg | 0,504 mg/kg |
| Acide urso 10 mg/ml | 0,84 mg/ml | 15 mg/kg | 1,26 mg/kg |
| Clonidine 0,01 mg/ml | 0,832 mg/ml | 0,004 mg/kg | 0,333 mg/kg |
| Sildénafil 5 mg/ml | 0,84 mg/ml | 5 mg/kg | 0,84 mg/kg |

Conclusion

L'étude des ordonnances montre qu'aux posologies usuelles utilisées, la dose quotidienne d'acide benzoïque administrée sera **toujours inférieure à la dose seuil de 5 mg/kg**.
La nouvelle formulation composée de Syrspond® avec conservateurs est donc **acceptable** d'après nos calculs.
Même si la quantité est négligeable, il a été convenu de rajouter sur le logiciel de prescription Logipren® un commentaire précisant la quantité d'acide benzoïque contenue dans la préparation ainsi que la dose seuil tolérée

Annexe 4 : Fiche de fabrication (bisoprolol hémifumarate 0,5 mg/mL)

|  <p>Hôpitaux SUD Service Pharmacie</p> | | FICHE DE FABRICATION PREPARATION HOSPITALIERE | | | Version N°6 21/12/2022 | |
|---|--------------|---|--------------------------------------|--|---|------------------------|
| | | 20 FLACONS DE SUSPENSION BUVABLE DE BISOPROLOL HEMIFUMARATE 0,5 mg/mL (12,5mg - 25mL) | | | Rédaction : Mickael LOUIS Approbation : Camille FOUILHE Validation : Dr Christophe JEAN | |
| DATE DE FABRICATION :/...../..... N° DE LOT : DATE DE PEREMPTION (4 mois) : N° ORDONNANCIER DE PREPARATION : QUANTITÉ FABRIQUÉE CONFORME : SCQJP (2 flacons de 25 mL (1 début, 1 fin)) : Bon n° ÉCHANTILLOTHÈQUE (2 flacons de 25 mL) : N° HEURE DE DEBUT : HEURE DE FIN : QUANTITÉ RÉELLE AJOUTÉE AU STOCK : | | | | <p style="text-align: center;"> <small>AP-HM Pharmacie - Hôpitaux Sud 270 Boulevard Sainte Marguerite 13009 Marseille</small> BISOPROLOL HEMIFUMARATE Suspension buvable 0,5 mg/ml (12,5 mg-25 ml) Excipient à effet notoire : Benzoate de sodium Voie orale - Respecter les doses prescrites Uniquement sur ordonnance Lot : 035JMMMAOPI Exp : JJ/MM/AAAA Conserver entre 2° et 8° C / Actier avant utilisation Conserver 30 jours au réfrigérateur après ouverture N° de dispensation : Service et nom du patient : </p> | | |
| FORMULE | | | | | | |
| Matière première ou Spécialité | Fournisseurs | Volume, poids ou quantité | Numéro de lot | Date de péremption | Contrôle des volumes ou ticket de pesée | Nom/Prénom Du contrôle |
| Bisoprolol : BISOCE® 10 mg | MYLAN | 25 comprimés | | | | |
| Syrspend® SF PH4 Liquid neutre | FAGRON | 500 mL | | | | |
| Flacons verre brun 30 mL | LGA | 20 | X | X | X | X |
| CONTROLE PREALABLE (Matières premières, lots, conditionnement...) <input type="checkbox"/> Nom : | | | | | | |
| MODE OPERATOIRE | | | | | | |
| <input type="checkbox"/> Lavage des mains <input type="checkbox"/> Habillage <input type="checkbox"/> Anomalie(s)..... | | <input type="checkbox"/> Nettoyage du plan de travail <input type="checkbox"/> Nettoyage du matériel | | | | |
| CONTROLE DES NIVEAUX PAR MIRAGE DES FLACONS | | | Lot accepté <input type="checkbox"/> | | Lot refusé <input type="checkbox"/> | |
| ETIQUETAGE DES FLACONS | | | Nombre d'étiquettes imprimées : | | Contrôle : | |
| | | | Nombre d'étiquettes utilisées : | | Contrôle : | |
| Préparation réalisée par | | | Préparation contrôlée par | | | |
| Nom : | | | Nom : | | | |
| Signature : | | | Signature : | | | |
| VALIDATION DE LA PREPARATION (en attente résultats SCQJP) | | | | | | |
| Date :/...../..... | | | PHARMACIEN : SIGNATURE : | | | |

Annexe 5 : Bon pour analyse au SCQIP

| | | |
|---|---|--|
|  <p>Hôpital Sainte Marguerite Service Pharmacie PREPARATOIRE UF 4688</p> | <p>BON POUR ANALYSE Hôpital de la CONCEPTION LABORATOIRE DE CONTROLE QUALITE Dr C. CURTI Tél. secrétariat : 04 91 38 35 40 Fax : 04 91 38 35 07</p> | <p>Date application: 02/12/2022</p> <p>Version: 7.0</p> <p>Rédaction: Mickael LOUIS Approbation: Dr Christophe JEAN Validation: Dr Pierre BERTAULT-PERES</p> |
|---|---|--|

Date :

N°Bon|

| | | |
|--------------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|
| Préparation effectuée par : | <input type="checkbox"/> Interne | <input type="checkbox"/> PPH |
| | <input type="checkbox"/> Externe | <input type="checkbox"/> Pharmacien |

| | |
|----------------------------|---|
| Echantillon analysé : | |
| Numéro de lot : | <div style="border: 1px solid black; width: 150px; height: 100px; margin: auto;"> <p><i>Etiquette à coller</i></p> </div> |
| Date de péremption : | |
| Quantité à envoyer : | |

| Analyse gélules | Analyse solution buvable / sachets pour solution buvable | Analyse collyres | Analyse solution cutanée |
|---|--|--|---|
| <input type="checkbox"/> Uniformité de teneur | <input type="checkbox"/> Teneur | <input type="checkbox"/> Teneur | <input type="checkbox"/> Teneur |
| <input type="checkbox"/> Variation de masse | <input type="checkbox"/> PH | <input type="checkbox"/> PH | <input type="checkbox"/> PH |
| <input type="checkbox"/> Dénombrement microbien | <input type="checkbox"/> Dénombrement microbien | <input type="checkbox"/> Osmolarité | <input type="checkbox"/> Dénombrement microbien |
| <input type="checkbox"/> Recherche E.Coli | <input type="checkbox"/> Recherche E.Coli | <input type="checkbox"/> Contrôle particulaire | <input type="checkbox"/> Recherche P.Aeruginosa /S.Aureus |
| <input type="checkbox"/> Uniformité de masse (test 2.9.5) | <input type="checkbox"/> Uniformité de masse | <input type="checkbox"/> Stérilité : Nombre d'échantillons : (5% du lot minimum) | |
| <input type="checkbox"/> Qualification opérateur (45 gélules) | <input type="checkbox"/> Identification | <input type="checkbox"/> Test point de bulle Nombre de filtres : Référence du filtre : | |

Cachet de la pharmacie et signature :

Annexe 6 : Bon de rendu des résultats des préparations sous forme buvable



SERVICE CENTRAL DE LA QUALITE ET DE L'INFORMATION PHARMACEUTIQUES

LABORATOIRE DE CONTROLE DE LA QUALITE

UF 7256

Professeur Patrice VANELLE
Docteur Christophe CURTI
Docteur Caroline CASTERA-DUCROS
Docteur Edouard LAMY
Docteur Nicolas PRIMAS

HOPITAL CONCEPTION – 147 Bd Baille – 13005 MARSEILLE
TEL : 04.91.38.35.40 – FAX : 04.91.38.35.07

Marseille, le

BON N°

DEMANDE D'ANALYSE DE PREPARATION, FORME BUENABLE

Etablissement : Service :

Prélèvement effectué le : Par :

Echantillon :

| Echantillon | Teneur | pH |
|--|--------------------|-------------|
| Acide Ursodésoxycholique 10 mg/mL | 9,00 – 11,00 mg/mL | 3,87 – 4,73 |
| Azathioprine 10 mg/mL | 9,00 – 11,00 mg/mL | |
| Benzoate de sodium 200 mg/mL | 180 – 220 mg/mL | 5,81 – 7,11 |
| Bisoprolol 0,5 mg/mL | 0,45 – 0,55 mg/mL | 4,22 – 5,15 |
| Chlorhydrate de betaxolol 1 mg/mL | 0,90 – 1,10 mg/mL | 3,96 – 4,84 |
| Chlorhydrate de morphine trihydratée 1 mg/mL | 0,90 – 1,10 mg/mL | 6,00 – 7,40 |
| Chlorhydrate de morphine trihydratée 0,2 mg/mL | 0,18 – 0,22 mg/mL | 6,00 – 7,40 |
| Citrate de caféine 10 mg/mL | 9,50 – 10,50 mg/mL | 2,83 – 3,45 |
| Captopril 1 mg/mL | 0,90 – 1,10 mg/mL | |
| Chlorhydrate de clonidine 10 µg/mL | 9,00 – 11,00 µg/mL | 4,10 – 5,01 |
| Hydrochlorothiazide 5 mg/mL | 4,50 – 5,50 mg/mL | 3,91 – 4,77 |
| Hydrocortisone 1 mg/mL | 0,90 – 1,10 mg/mL | 3,88 – 4,74 |
| Mélatonine 1 mg/mL | 0,90 – 1,10 mg/mL | 4,11 – 5,03 |
| Sildénafil 5 mg/mL | 4,50 – 5,50 mg/mL | 3,70 – 4,52 |
| Spirolactone 5 mg/mL | 4,75 – 5,25 mg/mL | 4,18 – 5,11 |
| Topiramate 6 mg/mL | 5,40 – 6,60 mg/mL | 3,77 – 4,61 |

Numéro de lot :

Analyse réalisée le :

par :

Standard secondaire :ref :

lot :

Standard primaire : ref :

lot :

Conformité du système (SST) :

SST réalisé le :

Conforme

Etiquetage :

1/2

RESULTATS D'ANALYSE

Dosage par HPLC (Méthode interne)

Teneur : mg/mL

Physico-chimie

pH :

Dénombrement microbien

DGAT : Dénombrement des germes aérobies totaux (VN < 200 UFC/mL)

DMLT : Dénombrement des moisissures/levures totales (VN < 20 UFC/mL)

Géloses TSA, moyenne UFC = DGAT = moyenne X 10 : UFC/mL

Géloses Sabouraud, moyenne UFC = DMLT = moyenne X 10 : UFC/mL

Recherche de micro-organismes spécifiés (*E Coli*) :

Culture :

CRITERES D'ACCEPTATION

TENEUR / pH

Voir descriptif de l'échantillon analysé

DENOMBREMENT MICROBIEN

DGAT : Dénombrement des germes aérobies totaux (VN < 200 UFC/mL)

DMLT : Dénombrement des moisissures/levures totales (VN < 20 UFC/mL)

RECHERCHE DE MICROORGANISMES SPECIFIES

Absence de croissance d'*E Coli* sur gélose Mc Conkey (masse analysée = 1 mL)

Conclusion

CONFORME

NON CONFORME

Signature du pharmacien responsable du contrôle

Les résultats de ce présent rapport s'appliquent uniquement à l'échantillon tel qu'il a été reçu par le LCQ.

2/2

Annexe 7 : Fiche de libération de lot (bisoprolol hémifumarate 0,5 mg/mL)

| | | |
|--|--|---|
| APHM – HOPITAUX SUD PHARMACIE PREPARATOIRE | Préparation Hospitalière BISOPROLOL HEMIFUMARATE Suspension buvable 0,5 mg/mL | Date application : 23/03/2021 Version : 1.0 Rédaction : Marc-Antoine Luc Approbation : Camille Panuccio Validation : Dr Christophe JEAN |
|--|--|---|

| | | |
|--|---------------------------|-----------------------------|
|  | PHARMACIE HOPITAUX SUD | Préparation Hospitalière |
| FICHE DE LIBERATION DU LOT SUSPENSION BUVABLE DE BISOPROLOL HEMIFUMARATE 0,5 mg/mL N° de lot de la préparation : Date de la préparation : Date de péremption : N°ordonnancier fabrication : | | |

• **Paramètres physico-chimiques :**

Teneur en BISOPROLOL HEMIFUMARATE (TENEUR : 0.45-0.55mg/ml)

Teneur : mg/mL Conforme / NON conforme

PH : (4,22-5,15) Conforme / NON conforme

• **Dénombrement microbien :**

DGAT < 200 UFC/mL et DMLT < 20 UFC/mL OUI / NON

• **Conditionnement :**

Etiquette Conforme / NON conforme

Libération du Lot : OUI / NON

DATE de libération :

Nom et signature du pharmacien :

SERMENT DE GALIEN

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

- ❖ D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.*
- ❖ D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.*
- ❖ De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.*
- ❖ 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 couvert d'opprobre, méprisé de mes confrères, si j'y manque.