

Université de Poitiers
Faculté de Médecine et de Pharmacie

ANNÉE 2013/2014

Thèse n°

THÈSE
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE

(Arrêté du 17 juillet 1987)

et

MÉMOIRE
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES
DE PHARMACIE HOSPITALIERE_PRACTIQUE ET RECHERCHE

(Décret 88-996 du 19 octobre 1988)

présentée et soutenue publiquement
le 19 septembre 2014 à POITIERS
par Mademoiselle DERMU Marine

Étude de stabilité d'un collyre à l'Amphotéricine B 0.5%

Composition du jury :

Président : Monsieur le Docteur Antoine DUPUIS

Membres : - Madame le Docteur Michèle CHABIN
- Madame le Docteur Claire GRIGNON
- Monsieur le Professeur Frédéric LAGARCE
- Monsieur le Docteur Martial MERCIE

Directeur de thèse : Madame le Docteur Claire GRIGNON



PHARMACIE

Professeurs

- COUET William, Pharmacie Clinique
- FAUCONNEAU Bernard, Toxicologie
- IMBERT Christine, Parasitologie
- GUILLARD Jérôme, Pharmaco chimie
- JOUANNETAUD Marie-Paule, Chimie Thérapeutique
- LEVESQUE Joël, Pharmacognosie
- MARCHAND Sandrine, Pharmacocinétique
- OLIVIER Jean Christophe, Galénique
- PAGE Guylène, Biologie Cellulaire
- RABOUAN Sylvie, Chimie Physique, Chimie Analytique
- SARROUILHE Denis, Physiologie
- SEGUIN François, Biophysique, Biomathématiques

Maîtres de Conférences

- BARRA Anne, Immunologie-Hématologie
- BARRIER Laurence, Biochimie
- BODET Charles, Bactériologie
- BON Delphine, Biophysique
- BRILLAULT Julien, Pharmacologie
- CHARVET Caroline, Physiologie
- DEJEAN Catherine, Pharmacologie
- DEBORDE Marie, Sciences Physico-Chimiques
- DELAGE Jacques, Biomathématiques, Biophysique
- DUPUIS Antoine, Pharmacie Clinique
- FAVOT Laure, Biologie Cellulaire et Moléculaire
- GIRARDOT Marion, pharmacognosie, botanique, biodiversité végétale
- GREGOIRE Nicolas, Pharmacologie
- HUSSAIN Didja, Pharmacie Galénique
- INGRAND Sabrina, Toxicologie
- MARIVINGT-MOUNIR Cécile Pharmaco chimie

- PAIN Stéphanie, Toxicologie
- RAGOT Stéphanie, Santé Publique
- RIOUX BILAN Agnès, Biochimie
- TEWES Frédéric, Chimie et Pharmaco chimie
- THEVENOT Sarah, Hygiène et Santé publique
- THOREAU Vincent, Biologie Cellulaire
- WAHL Anne, Chimie Analytique

PAST - Maître de Conférences Associé

- DELOFFRE Clément, Pharmacien
- HOUNKANLIN Lyéwin, Pharmacien

Professeur 2nd degré

- DEBAIL Didier

Maître de Langue - Anglais

- LILWALL Amy

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Docteur Antoine Dupuis,

Maître de Conférences et Praticien Hospitalier au Centre Hospitalier Universitaire de Poitiers,

Vous me faites l'honneur de présider cette thèse. Merci pour la richesse de vos réflexions et de vos idées. Merci de m'avoir guidée durant mon cursus de pharmacie hospitalière, de m'avoir encouragée à en faire toujours plus. Veuillez trouver ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

Madame le Docteur Claire Grignon,

Pharmacien Assistant Hospitalo-Universitaire au Centre Hospitalier Universitaire de Poitiers,

Merci d'avoir dirigé ce travail en collaboration avec Antoine. Malgré les délais restreints qui m'étaient impartis, je te suis reconnaissante de m'avoir encadrée lors de travail.

Madame le Docteur Michèle Chabin,

Praticien hospitalier au Centre Hospitalier Universitaire de Poitiers,

Merci pour votre rigueur, votre aide dans la composition du jury, votre soutien lors des moments difficiles.

Monsieur le Professeur Frédéric Lagarce,

Professeur des Universités-Praticien Hospitalier au Centre Hospitalier Universitaire d'Angers

Merci d'avoir accepté d'être membre du jury de cette thèse et de juger ce travail, malgré les délais restreints. Je vous remercie également pour votre formation très enrichissante au cours de l'UV organisée à Angers, qui m'a confortée dans mon intérêt pour la pharmacotechnie.

Monsieur le Docteur Martial Mercié,

Merci pour le temps que vous m'avez accordé malgré votre emploi du temps chargé, merci d'avoir pu vous libérer pour la soutenance. Il nous a paru important qu'un médecin puisse juger ce travail.

Je vous remercie d'avoir accepté d'être membres du jury de cette thèse.

Je remercie **le Docteur Joëlle Grassin** de m'avoir accueillie dans votre service au cours de ces deux années et demie. Merci de m'avoir permis de conduire à bien ma formation au sein d'une équipe agréable.

Merci aux pharmaciens du CHU de Poitiers, en particulier **Christelle Aigrin** pour ton soutien dans les moments difficiles et ton aide au cours de ce dernier semestre.

Merci aux personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à ce travail : Anne Bousseau et Marie-Andrée du Laboratoire d'Hygiène du CHU de Poitiers ; Catherine Kauffmann-Lacroix pour les corrections et les conseils apportés à ce travail ; aux internes (François, Karen, Steeve) et aux externes (Romain, Mathilde) qui m'ont aidée pour certains dosages quand je n'étais plus au préparatoire.

Merci aux différentes équipes avec lesquelles j'ai travaillé tout au long de cet internat et qui ont rendu ma formation d'autant plus intéressante et agréable, je pense notamment à **l'équipe des chimios** et à **l'équipe de pharmacotechnie** à Poitiers ainsi qu'à **l'équipe du Laboratoire de Pharmacologie du CHU de Rennes**.

Merci à la fine équipe de l'internat Jacques Aubert : Caroline, Fanny, Grégoire, Pierre ... sans oublier Régine.

Merci à mes co-internes avec une mention toute particulière pour mes chères sardines : Pauline, Lauranne et Astrid.

Merci à mes amis de « là-haut » : Caroline, Laura, Maxime ... et à mes camarades des bancs de la Fac de Lille.

Merci à toutes les personnes de tous horizons qui ont croisé ma route pendant ces quatre dernières années et qui l'ont rendue d'autant plus agréable !

Mes plus intenses remerciements s'adressent bien sûr à ma famille.

Merci à toute ma famille qui a supporté tous ces concours, examens, révisions, ... : c'en est fini ! Merci à mes parents pour m'avoir toujours soutenue dans les mauvais moments comme dans les bons. Merci à mon frère et ma sœur. Je vous aime. Après quatre années passées dans le grand Ouest, je suis heureuse de pouvoir me rapprocher de vous !

Mamie Su', je sais que tu aurais été fière de moi.

TABLE DES MATIERES

I.	Préambule	7
II.	Introduction.....	8
II.1	Ophtalmologie.....	8
II.1.1	Anatomie de l'œil	8
II.1.2	Kératite fongique.....	10
II.1.2.1	Epidémiologie	10
II.1.2.2	Agent responsable / étiologie	11
II.1.2.3	Symptomatologie clinique.....	11
II.1.2.4	Diagnostic des kératites fongiques.....	12
II.1.2.5	Prise en charge thérapeutique	15
II.1.3	L'amphotéricine B.....	19
II.1.3.1	Caractéristiques physico-chimiques.....	19
II.1.3.2	Spectre et mode d'action	20
III.	Matériel et méthodes.....	22
III.1	Formulation du collyre	22
III.1.1	Environnement technique de fabrication	22
III.1.1.1	Environnement de travail.....	22
III.1.1.2	Articles de conditionnement	23
III.1.1.3	Matières premières	24
III.1.2	Protocole de fabrication.....	24
III.1.3	Données de stabilité existantes.....	25
III.2	Méthode de dosage	25
III.2.1	Mise au point.....	25
III.2.2	Validation statistique de la méthode analytique	27
III.2.2.1	Limite de détection (LOD) ou seuil de détection (SD)	27
III.2.2.2	Limite de quantification (LOQ)	27
III.2.2.3	Spécificité	27
III.2.2.4	Linéarité.....	30
III.2.2.5	Exactitude/justesse	31
III.2.2.6	Fidélité	32
III.3	Etude de stabilité.....	34
III.3.1	Définition.....	34
III.3.1.1	Planification.....	34
III.3.1.2	Sélection des lots.....	35

III.3.2	Spécifications de l'étude de stabilité.....	35
III.3.2.1	Chimique.....	36
III.3.2.2	Physique	36
III.3.2.3	Microbiologique (essai de stérilité).....	38
III.3.2.4	Autres essais sur le produit fini	42
IV.	Résultats.....	42
IV.1	Validation statistique de la méthode analytique de dosage.....	42
IV.1.1	Limite de détection (LOD) / Seuil de détection (SD)	42
IV.1.2	Limite de quantification (LOQ)	42
IV.1.3	Spécificité	43
IV.1.4	Linéarité.....	47
IV.1.5	Exactitude.....	51
IV.1.6	Fidélité.....	53
IV.2	Etude de stabilité.....	55
IV.2.1	Chimique.....	55
IV.2.2	Physique	56
IV.2.2.1	Mesure du pH.....	56
IV.2.2.2	Osmolalité.....	56
IV.2.2.3	Coloration.....	57
IV.2.3	Microbiologique	57
V.	Discussion.....	57
VI.	Références bibliographiques.....	62
VII.	Résumé et mots clés.....	65
VIII.	ANNEXES.....	66

I. Préambule

Les collyres antifongiques à l'amphotéricine B (AB) sont destinés au traitement des kératites fongiques ou kératomycoses, cause rare d'infection cornéenne, mais dont l'incidence croît concomitamment à l'essor de l'utilisation des lentilles de contact et de l'usage intensif des corticoïdes et des immunosuppresseurs.

Il s'agit actuellement d'une préparation magistrale à la Pharmacie à Usage Intérieur (PUI) du Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Poitiers, c'est-à-dire que le collyre est "préparé selon une prescription médicale destinée à un malade déterminé en raison de l'absence de spécialité pharmaceutique disponible disposant d'une autorisation de mise sur le marché (...) extemporanément en pharmacie" [article L5121-1 1° du Code de la Santé Publique, modifié par la LOI n°2013-1203 du 23 décembre 2013 - art.47].

Il n'est donc pas préparé à l'avance mais dès réception d'une ordonnance à la PUI, et sa durée de stabilité a été fixée selon les données bibliographiques retrouvées. Cette durée étant de 10 jours, cela impose au patient un déplacement très régulier à la pharmacie et sur une période relativement importante, puisque les durées de traitement sont longues.

La fabrication et la dispensation de ces collyres est en nette croissance à la pharmacie (Tableau I). A cela deux raisons : d'une part, comme notifié plus haut, l'incidence de ces infections est en nette augmentation, d'autre part, des conventions de sous-traitance ont été établies avec plusieurs hôpitaux de la région ne disposant pas de Zone à Atmosphère Contrôlée (ZAC) leur permettant de réaliser ces préparations. Ceci justifie d'autant plus une évolution vers une fabrication en tant que préparation hospitalière, avec les contrôles que cela impose, certes, mais avec les facilités en termes de logistique et d'approvisionnement et les avantages non négligeables au patient que cela apporte.

Tableau I. Evolution du nombre d'unités de collyre à l'AB 0.5% préparées à la PUI

Nombre d'unités de préparation fabriquées en 2009	21
Nombre d'unités de préparation fabriquées en 2011	50
Nombre d'unités de préparation fabriquées en 2013	126
Nombre d'unités de préparation fabriquées en 2014	70 (de janvier à juillet 2014)

L'article L5121-1 2° définit ainsi la préparation hospitalière : "tout médicament (...) préparé selon les indications de la pharmacopée et en conformité avec les bonnes pratiques mentionnées à [l'article L. 5121-5](#), en raison de l'absence de spécialité pharmaceutique disponible ou adaptée disposant d'une autorisation de mise sur le marché (...) par une pharmacie à usage intérieur d'un établissement de santé (...). Les préparations hospitalières sont dispensées sur prescription médicale à un ou plusieurs patients par une pharmacie à usage intérieur dudit établissement. Elles font l'objet d'une déclaration auprès de l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé, dans des conditions définies par arrêté du ministre chargé de la santé." La réalisation de préparations hospitalières est une activité soumise à autorisation spéciale (Code de la Santé Publique Art. R. 5126-9),

accordée par l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé (ANSM).

Cette transition vers une fabrication en tant que préparation hospitalière nécessite un ensemble de données supplémentaires (validation de la méthode de dosage, étude de stabilité ...), qui font l'objet du présent travail.

Il pourra ainsi être envisagé aisément une délivrance aux hôpitaux donneurs d'ordre dans le cadre de la convention de sous-traitance, impossible avec une durée de stabilité de 10 jours comme c'est le cas actuellement.

Cette nouvelle organisation permettra en outre d'assurer une nette amélioration de la prise en charge du patient en rétrocession en limitant ses déplacements, une gestion des stocks plus aisée à la pharmacie et une plus grande réactivité dans le cadre d'une thérapeutique d'urgence.

II. Introduction

II.1 Ophtalmologie

II.1.1 Anatomie de l'œil

L'œil est formé de plusieurs organes : le globe oculaire, le nerf optique, l'encéphale et quelques organes annexes (dont les sourcils, les paupières, les cils et l'appareil lacrymal).

Le globe oculaire mesure environ 2.5cm de diamètre, une grande partie de sa surface étant logée dans l'orbite qui le protège. Du point de vue anatomique, il peut être divisé en trois membranes:

- **la tunique fibreuse** : membrane externe du globe oculaire.

Elle est formée :

- d'une partie postérieure, la sclérotique, aussi appelée "blanc de l'œil", une couche blanche de tissu fibreux dense qui enveloppe tout le globe oculaire sauf l'iris et percée du nerf optique sur sa face postérieure.
- d'une partie antérieure, la cornée, transparente et non vasculaire qui recouvre la partie colorée de l'œil.

- **la tunique vasculaire** : membrane moyenne du globe oculaire, aussi appelée uvée.

Elle est formée de trois parties :

- la choroïde, fine membrane de couleur brun foncé, richement vascularisée et percée en sa face postérieure du nerf optique, qui tapisse presque toute la surface interne de la sclérotique,
 - le corps ciliaire, prolongement de la choroïde en partie antérieure de la tunique vasculaire (couche la plus épaisse)
 - et l'iris, composé de fibres musculaires lisses, compris entre le cristallin et la cornée et dont l'ouverture constitue la pupille.
- **la tunique nerveuse** : membrane interne du globe oculaire, aussi appelée rétine, ne recouvrant que la partie postérieure de l'œil, elle est formée d'une couche de tissu nerveux interne et d'un épithélium pigmentaire externe.

En plus de ces trois tuniques, le globe oculaire contient le cristallin, situé directement entre la pupille et l'iris. Il divise l'intérieur du globe oculaire en deux parties :

- la cavité antérieure remplie d'humeur aqueuse (liquide aqueux), en grande partie responsable de la pression intraoculaire et secrété continuellement,
- la cavité postérieure, la plus grande, contenant une substance gélatineuse : le corps vitré, qui se forme durant la vie embryonnaire et n'est jamais remplacé.

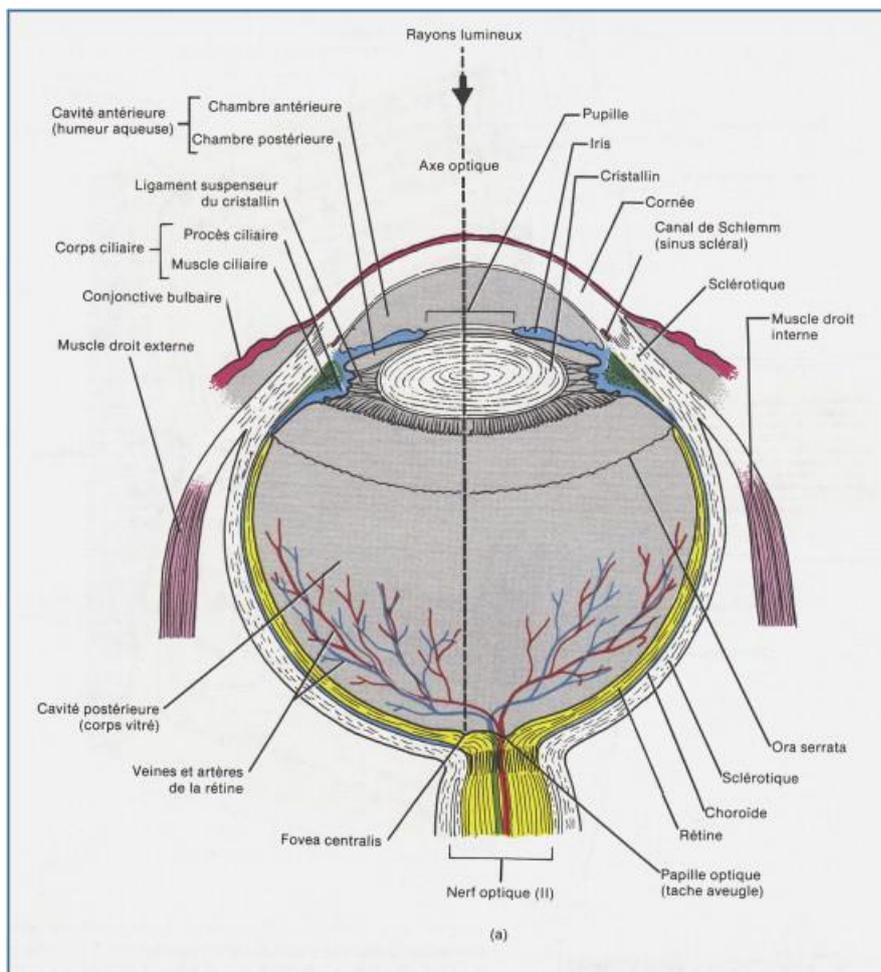


Fig. 1 Anatomie de l'œil (1)

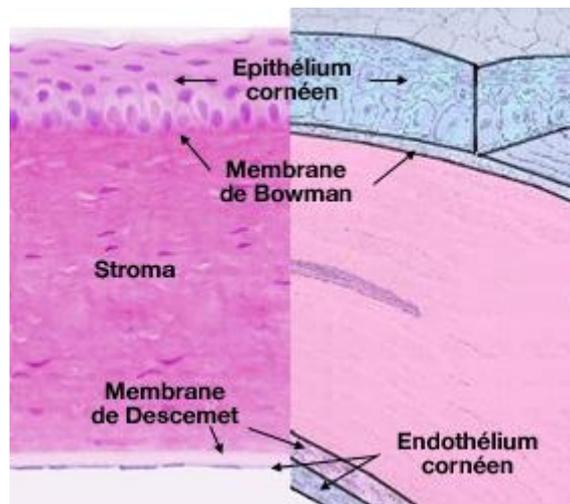


Fig 2. Histologie de la cornée (vetopsy.fr)

II.1.2 Kératite fongique

Divers agents infectieux peuvent être responsables d'une infection de la cornée : bactéries, champignons, virus, parasites.

Les kératites fongiques, aussi appelées kératomycoses, correspondent à des infections de la cornée et sont causées par des champignons. Elles sont relativement rares en Europe mais responsables d'une infection grave de la cornée. Elles surviennent sur des cornées déjà fragilisées par le biais de champignons opportunistes mais aussi sur cornées saines, le plus souvent après traumatisme végétal (ou tellurique).

II.1.2.1 Epidémiologie

Il est difficile d'estimer le nombre total de kératites survenant chaque année en France, en raison notamment de la variété des kératites et du parcours des patients (2), mais aussi de la définition parfois variable qu'en font les différents auteurs. L'incidence serait de l'ordre d'une dizaine de cas annuels et représente moins de 1% des infections cornéennes (3,4).

La majorité des kératomycoses sont dues à des levures (50 à 60%), alors que les champignons filamenteux sont plutôt à l'origine des infections cornéennes sous des climats tropicaux, chauds et humides.

La survenue d'une infection mycosique intervient le plus souvent sur des cornées pathologiques dont les systèmes de défense sont préalablement altérés. Un terrain d'immunodépression, général ou local, notamment induit par l'utilisation de plus en plus importante, et parfois inadaptée, des corticoïdes locaux, favorise le développement des champignons. Les infections mycosiques sont en rapport également avec l'utilisation des

immunosuppresseurs. Les kératomycoses sur cornée saine surviennent principalement dans les suites d'un traumatisme cornéen végétal ou tellurique (champignons filamenteux) ou encore chez les porteurs de lentilles de contact (bien que l'origine fongique ne soit retrouvée que dans 4% des kératites de porteurs de lentilles (2,5)).

L'évolution des kératomycoses est beaucoup plus lente que celle des kératites bactériennes et se fait sur plusieurs semaines à plusieurs mois. Leur pronostic est très mauvais, ceci étant dû à la virulence des agents pathogènes et à un retard diagnostique fréquent, avec une possible évolution vers la perte du globe dans près de 10% des cas. Une greffe de cornée est nécessaire dans 30% des cas (6).

II.1.2.2 Agent responsable / étiologie

Le tableau II présente les espèces isolées dans les kératites fongiques. Les espèces les plus fréquentes y figurent en italique.

Tableau II. Principales espèces de levures et champignons incriminées (5)

Filamenteux		Levures	Dimorphiques
Non pigmentés	Pigmentés		
<i>Fusarium</i>	Curvularia	<i>Candida</i>	Blastomyces
<i>Aspergillus</i>	Alternaria	Cryptococcus	Coccidioides
<i>Scedosporium</i>	Phialophora		Histoplasma
Acremonium	Bipolaris		Sporothrix
Paecilomyces	Exserohilum		(souvent responsables de
Penicillium	Cladosporium		mycoses profondes
Pseudallescheria	Lasiodiplodia		mais rarement de
Beauveria			kératites)

Les champignons filamenteux sont ubiquitaires et présents sur les plantes et dans la terre ; ils sont donc fréquemment retrouvés dans les kératomycoses post traumatisme sur cornée saine. Les levures, également très répandues dans l'environnement, sont saprophytes de la peau et des muqueuses ; elles infectent en général des cornées déjà pathologiques.

II.1.2.3 Symptomatologie clinique

Les premiers signes cliniques apparaissent généralement 24 à 36 heures après un traumatisme, mais la maladie peut aussi se déclarer sur plusieurs jours voire semaines.

L'évolution des infections oculaires mycosiques est généralement lente et insidieuse, occasionnant des retards diagnostiques et thérapeutiques, mais elle peut être explosive et rapidement défavorable.

L'œil est rouge (cercle périkératique) et souvent très douloureux en raison de la richesse de l'innervation sensitive de la cornée (4). On retrouve également une photophobie intense et un larmoiement important. D'autres signes habituellement retrouvés sont des signes d'inflammation non spécifiques, des sécrétions conjonctivales. La surface de l'épithélium cornéen est "rugueuse", et on retrouve la présence d'infiltrats voire de microabcès.

La symptomatologie est variable selon le stade évolutif :

- Au stade initial : simple ulcération avec atteinte épithéliale.
La surface de la cornée est alors "grise", "sale", ulcérée ou infiltrée (7);
- Au stade plus avancé : ulcère de cornée avec destruction du stroma voire abcès avec infiltration infectieuse des lames du stroma cornéen.
On retrouve alors des infiltrats à bords irréguliers, duveteux, des lésions satellites, des dépôts pigmentés, des microcristaux, un anneau immunitaire. L'abcès est souvent d'évolution chronique et torpide, sur des durées dépassant 1 mois le plus souvent.

La cinétique de l'infection dépend de la virulence du champignon, de la taille de l'inoculum et des défenses immunitaires de l'hôte (5).

II.1.2.4 Diagnostic des kératites fongiques

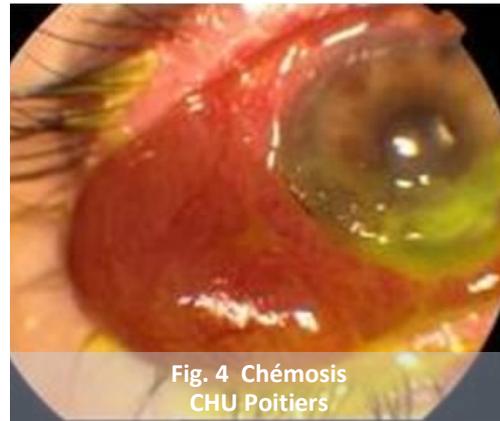
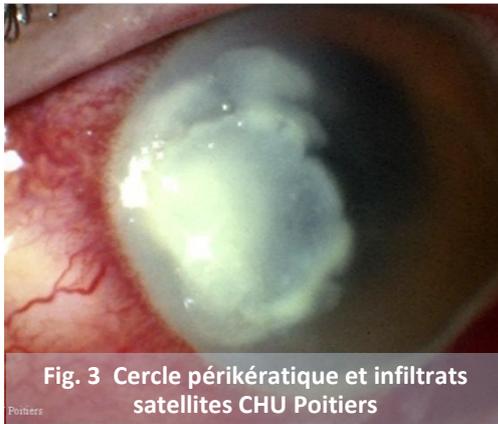
a. Diagnostic clinique

Le diagnostic est surtout orienté en fonction de la clinique et est souvent tardif.

L'interrogatoire pourra orienter fortement le diagnostic. En effet, certains signes pourront conforter l'origine fongique de l'infection cornéenne, notamment :

- la résistance à un traitement antibiotique préalable (qui élimine alors l'étiologie bactérienne),
- une corticothérapie locale au long cours ou un traitement par immunosuppresseur (IS),
- ou encore l'existence de facteurs de risque tels que :
 - traumatisme cornéen (végétal),
 - port de lentilles souples hydrogel (LSH),
 - pathologies chroniques de surface oculaire,
 - chirurgie cornéenne (greffe de cornée ...) (7).

L'examen de l'œil met en évidence un œil rouge, un cercle périkeratique (Fig. 3) (rougeur qui prédomine autour de la cornée, c'est-à-dire au niveau limbique), des infiltrats satellites, une baisse d'acuité visuelle ainsi qu'une éventuelle photophobie, un œdème palpébral et un chémosis (Fig. 4) (œdème de la conjonctive).



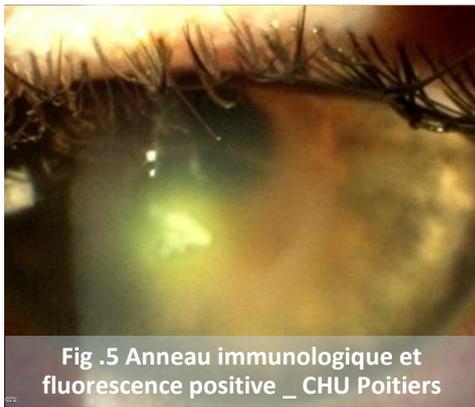
b. Diagnostic paraclinique

Le diagnostic clinique s'accompagne d'un examen paraclinique.

Ainsi, l'**examen biomicroscopique** permet d'appréhender le diamètre de l'abcès, la profondeur de l'atteinte stromale, la densité de l'infiltrat inflammatoire, et de visualiser l'anneau immunitaire de Wesseley (Fig. 5) ou l'hypopion convexe vers le haut (Fig. 6) (signe plus spécifique d'une infection fongique).

Un **examen de la cornée à la lampe à fente** peut également être réalisé après instillation d'une goutte de fluorescéine. En lumière bleue, la fluorescéine colore alors en vert brillant toute partie de la cornée qui s'est désépithélialisée (Fig. 5).

Enfin, la **microscopie confocale** peut s'avérer un examen de choix dans certains cas et permettre d'éviter certains actes invasifs. Il s'agit en effet d'un examen morphologique non invasif, de réalisation simple et rapide permettant l'étude *in vivo* de la cornée dans toute son épaisseur. Elle permet un diagnostic précoce, surtout utile pour les kératites mycosiques filamenteuses, particulièrement visibles avec cette technique, les levures étant plus difficiles à visualiser.



Certains de ces signes peuvent orienter sur le champignon en cause.

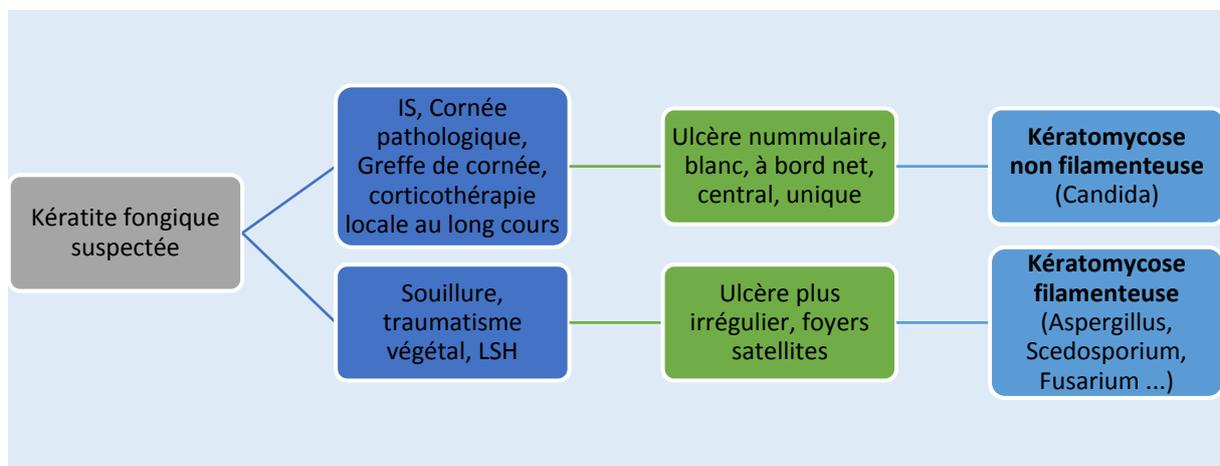


Fig. 7 Orientation diagnostique lors d'une suspicion de kératite fongique (4)

c. Diagnostic microbiologique

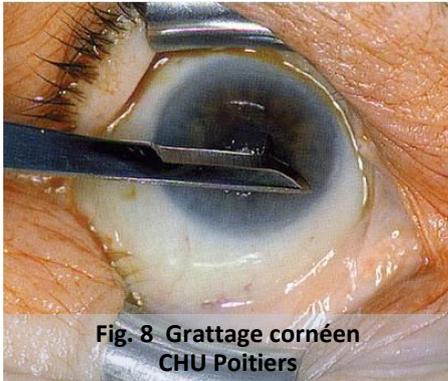
Enfin, un diagnostic microbiologique est réalisé, réel diagnostic étiologique, mais long et difficile.

Le grattage cornéen est le prélèvement de référence (Fig. 8), il est effectué de façon précoce avant toute antibiothérapie ou après une fenêtre thérapeutique. Il est réalisé par un ophtalmologiste à la lampe à fente ou au bloc, après instillation d'une goutte de collyre anesthésiant sans conservateur, et concerne la base et les berges de l'abcès. Il est réalisé avec des lames arrondies n°15, microsponges et aiguille. Ce prélèvement n'est pas justifié quand l'atteinte est de taille inférieure à 2mm, puisque la culture sera alors négative dans 75% des cas.

L'ensemencement doit être précoce et réalisé par l'ophtalmologiste lui-même.

Le diagnostic microbiologique peut être orienté selon certaines caractéristiques cliniques et/ou certains facteurs de risque associés. Il peut être exhaustif et rechercher les

germes de façon large : ainsi on recherchera successivement : des champignons (examen direct, milieu de Sabouraud), des bactéries (examen direct, gélose chocolat, milieu PGY ou équivalent) et des amibes libres (examen direct, culture, PCR). L'acheminement des prélèvements doit se faire en moins d'une heure, puisque un temps de latence trop important avant la mise en culture peut diminuer les chances d'avoir un prélèvement positif par dégradation du matériel prélevé.



L'analyse consiste ensuite en un examen direct, différentes colorations peuvent être employées :

- Coloration de Gram : champignons observés dans les champs contenant de nombreux polynucléaires et cellules épithéliales nécrotiques
- Coloration de May-Grünwald-Giemsa
- Coloration au méthénamine argentique de Gomori

un ensemencement et mise en culture (délai de 3 semaines avant les résultats) :

- gélose Sabouraud additionnée de Chloramphénicol à 50µg/mL ou de gentamycine à 50µg/mL
- ou gélose Sabouraud sans antibiotiques

+/- antifongogramme (Centre National de Référence des Mycoses invasives et Antifongiques de l'Institut Pasteur)

Une microbiopsie de cornée en périphérie peut être également réalisée lorsque la kératite infectieuse s'aggrave et qu'aucun germe n'a été isolé par grattage (culture ou techniques d'anatomopathologie et d'immunohistochimie).

II.1.2.5 Prise en charge thérapeutique

L'objectif du traitement est d'éradiquer l'infection, diminuer la réponse inflammatoire et prévenir la destruction de la cornée, ou en tout cas, l'évolution de sa destruction.

Il est débuté en principe après les prélèvements bactériologiques, afin de ne pas « décapiter » l'infection et empêcher une identification ultérieure du germe en cause.

Celui-ci doit être instauré le plus rapidement possible et réajusté de manière réactive selon les différents résultats des examens microbiologiques, cliniques, paracliniques, etc ... En effet, l'évolution sans traitement peut aboutir à des complications telles qu'une fonte stromale, une perforation cornéenne ou une endophtalmie (3).

Le débridement représente une première étape importante du traitement puisqu'il permet de réduire de façon importante la charge microbienne. De plus, certains auteurs ont observé qu'un débridement épithélial de 5 mm (qu'il s'agisse d'un frottis à usage diagnostique ou d'une procédure thérapeutique) augmentait fortement la pénétration des antifongiques (8). Il y aurait même une pénétration négligeable de l'amphotéricine B au niveau de la cornée si le débridement n'a pas été réalisé au préalable (9).

Les différents traitements médicamenteux ensuite proposés sont hors AMM. En effet, il existe peu d'études scientifiques contrôlées évaluant ces pratiques, elles ne font donc que l'objet d'un consensus professionnel.

Le traitement antifongique fait souvent suite à un traitement empirique initial local ciblant plutôt les bactéries (association quinolones et d'aminosides en collyre, ou collyres renforcés d'emblée selon la sévérité de l'infection), si celui-ci n'a pas été efficace ou si aucune amélioration sous traitement antibactérien n'a été observée.

Dans tous les cas, le traitement se présente souvent sous la forme suivante :

- Une **dose de charge**, permettant d'obtenir une élévation rapide de la concentration dans le stroma cornéen ; elle consiste en l'administration d'une goutte de collyre toutes les cinq minutes pendant 1 heure dans le cul-de-sac conjonctival.
 - L'expérimentation chez l'animal indique en effet que les applications locales toutes les 5 minutes pendant 1 heure permettent facilement d'atteindre une concentration thérapeutique (8), cependant vite éliminée d'où l'importance de la phase suivante (10) :
- Une **administration horaire (y compris la nuit) pendant 48h** ; ce rythme soutenu d'administration est expliqué par deux phénomènes :
 - D'une part, seule une fraction de la dose appliquée pénètre dans la cornée (11). En effet, le cul-de-sac conjonctival ne peut contenir qu'environ 10µL de liquide (soit environ 20% du volume d'une goutte de collyre) et le flux du drainage nasolacrymal est cent fois plus élevé que celui de l'absorption cornéenne.
 - D'autre part, la concentration d'anti-infectieux diminue progressivement au cours du temps, d'où une nécessité de renouveler régulièrement les instillations. Plusieurs raisons à ce phénomène : la dilution dans le film lacrymal, la résorption au niveau de la conjonctive, l'élimination par les canaux lacrymaux (le débit de la sécrétion lacrymale étant de 1,2µL/min mais

pouvant atteindre 400µL/min en cas d'irritation oculaire) (11), et la pénétration dans la cornée, voire dans la chambre antérieure (12).

- Puis s'ensuit une instillation toutes les 3h pendant au moins 3 semaines (8), rythme à adapter en fonction de l'évolution sous traitement.

Le traitement local par collyre va être orienté en fonction des résultats microbiologiques, de l'antibiogramme et de la réponse au traitement et peut par la suite évoluer vers l'utilisation de formes systémiques (Fungizone® IV, Sporanox®, Nizoral®, Triflucan®), de traitements par injections intracaméculaires, intravitréennes, sous-conjonctivales, intra-stromales (Tableau 3)

Le traitement antifongique est en général poursuivi pour une durée d'un à plusieurs mois selon la gravité de l'atteinte et l'évolution sous traitement.

Le traitement médicamenteux s'accompagne éventuellement d'un traitement chirurgical (6) :

- Débridement régulier (diminution charge infectieuse, élimination matériel nécrotique),
- Greffe de cornée
 - classique, qui consiste à remplacer la partie centrale de la cornée sur toute son épaisseur : kératoplastie transfixiante (figure ...)
 - lamellaire, qui permet de conserver les couches saines de la cornée : kératoplastie lamellaire postérieure ou antérieure
- Greffe de membrane amniotique, qui consiste à greffer à la surface de l'œil une membrane prélevée sur un placenta obtenu lors d'une césarienne, son but étant de calmer la douleur et de favoriser la cicatrisation en diminuant l'inflammation et en favorisant la ré épithélialisation.



Tableau 3. Exemple de protocole antifongique utilisé pour le traitement des kératomycoses (5)

<p>Kératomycose débutante au stade épithélial = traitement local par collyre uniquement</p>	<p>Levure identifiée : Amphotéricine B ± Fluconazole</p> <hr/> <p>Filament identifié : Amphotéricine B + Voriconazole</p>
<p>En cas d'atteinte cornéenne profonde = Traitement général à ajouter</p>	<p>Filament identifié : Voriconazole per os (Vfend®)</p> <hr/> <p>Levure identifiée : Fluconazole per os (Triflucan®) Sauf <i>Candida krusei, glabrata</i> : Voriconazole (Vfend®)</p>
<p>En cas d'endophtalmie ou d'évolution défavorable</p>	<p>Discuter au cas par cas :</p> <hr/> <p>Caspofungine (Cancidas®) intraveineuse</p> <hr/> <p>Injection intrastromale de voriconazole (50 µg/0,1 ml)</p> <hr/> <p>Injection intracaméculaire de voriconazole (100 µg/0,1 ml)</p> <hr/> <p>Injection intravitréenne ou intracaméculaire d'Amphotéricine B (5 µg/0,1 ml)</p>

Parenthèse pharmacologie clinique (13)

Un traitement anti-infectieux est efficace lorsque des concentrations thérapeutiques supérieures aux concentrations inhibitrices du germe responsable (et inférieures aux concentrations toxiques) sont obtenues pendant une durée suffisante au niveau du site infecté. Le stroma cornéen est difficile d'accès du fait de la présence d'une barrière anatomique, l'épithélium cornéen, dont les cellules solidarisées par des jonctions serrées forment une barrière à la pénétration intra-cornéenne. L'accessibilité au site infectieux peut être facilitée par le processus inflammatoire et par les agents conservateurs connus pour altérer l'épithélium cornéen.

L'épithélium cornéen et l'endothélium étant essentiellement lipophile et le stroma hydrophile, le collyre "idéal" serait constitué d'une molécule à la fois hydrophile et lipophile, et de faible poids moléculaire pour traverser la cornée. Et encore, même en conditions optimales, ces barrières empêchent la cornée d'absorber plus de 1 à 10% de la substance active appliquée (14).

Il doit donc combiner efficacité anti-infectieuse (spectre large, biodisponibilité, fongicidie) et une bonne tolérance vis-à-vis des tissus et cellules de la surface oculaire. Selon les voies d'administration employées, les concentrations varient (Tableau IV).

Tableau IV.Exemple de pénétration oculaire obtenue chez l'homme et sur des modèles expérimentaux selon différentes voies d'administration (15)

Antifongique	Voie d'administration	Dose	Espèce	Pic de concentration dans l'humeur aqueuse ($\mu\text{g/mL}$)
Amphotéricine B	IV	0.6mg/kg	humain	0.1-0.24
	IV	1mg/kg	lapin	0.05-0.18
	sous-conjonctivale	150 μg	lapin	traces
	topique	0.5%	lapin	8

D'autres facteurs tels que concentration, pH, osmolarité, importance de la dilution par les larmes, fréquence du clignement palpébral ... influencent également la pénétration des agents anti-infectieux. De plus, il faut différencier la concentration absolue de l'antibiotique au niveau de la cornée (pharmacocinétique) de son activité antimicrobienne réelle au cours du temps ou concentrations effectivement biodisponibles.

II.1.3 L'amphotéricine B

II.1.3.1 Caractéristiques physico-chimiques

L'amphotéricine B est un antibiotique antifongique de la famille des polyènes produit naturellement par la culture d'un actinomycète *Streptomyces nodosus* (16). Il s'agit donc d'un produit hémisynthétique, dérivé d'un produit de fermentation. La molécule a été découverte et isolée pour la première fois en 1956, et sa structure chimique complète a été établie en 1970, sa formule brute est $\text{C}_{47}\text{H}_{73}\text{NO}_{17}$, le figure 10 représente sa formule semi-développée. La pharmacopée européenne définit l'amphotéricine B comme « un mélange de polyènes antifongiques (...) constitué en majeure partie d'amphotéricine B ». Elle recense trois impuretés : l'amphotéricine A, X1 et X2.

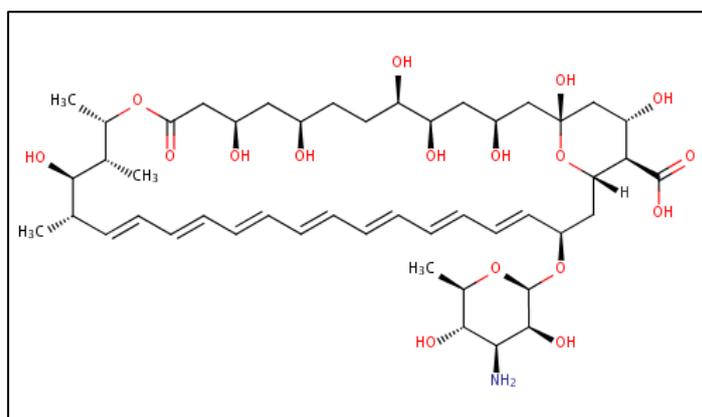


Fig. 10. Formule semi-développée de l'Amphotéricine B (17)

La molécule se décompose en :

- une partie apolaire hydrophobe (sept doubles liaisons conjuguées), cette partie est responsable de l'intense spectre d'absorption UV, ce qui permet de l'étudier par méthodes spectroscopiques ;
- une partie polaire hydrophile, composée de groupements hydroxyles, mycosamine (pKa = 10) et fonction carboxylique (pKa = 5.5).

Elle présente donc un caractère amphiphile.

Il s'agit d'une poudre jaune ou orange, hygroscopique, pratiquement insoluble dans l'eau et sensible à la lumière dans les solutions diluées. [Ph eur. 8.0 01/2009:1292 corrigé 6.6] La molécule possède un poids moléculaire de 923 Da.

Son spectre d'absorption présente des maxima d'absorption à 362, 381 et 405nm (Ph eur.).

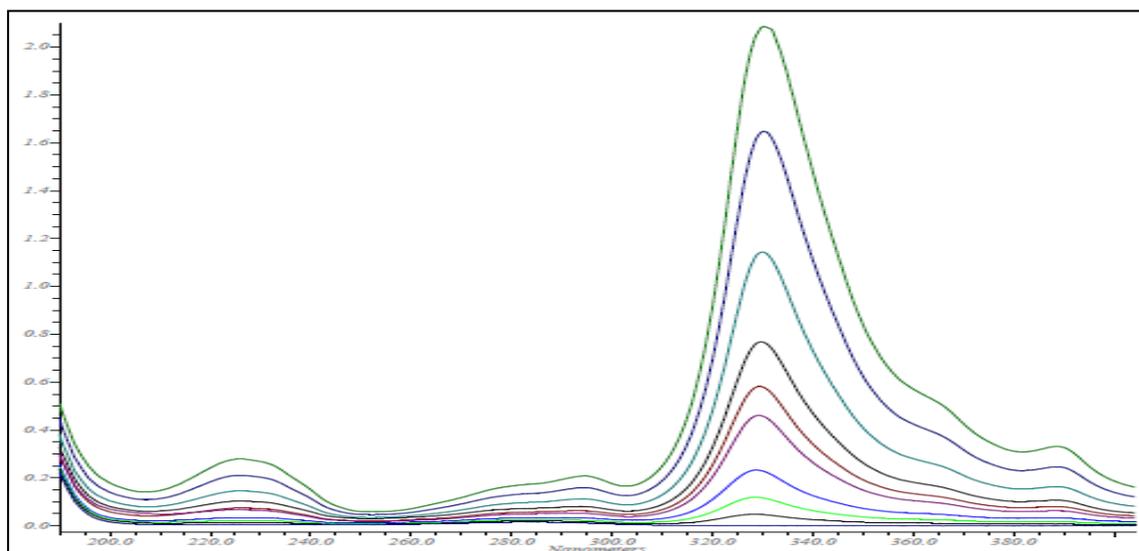


Fig 11 Spectres d'absorption UV de l'amphotéricine B reconstituée dans le glucose 5% en concentrations croissantes

II.1.3.2 Spectre et mode d'action

a. Spectre

L'Amphotéricine B a une activité *in vitro* importante sur de nombreuses espèces de champignons, indifféremment des levures, des filamenteux ou des dimorphiques. En effet, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Candida species*, *Blastomyces dermatitidis*, *Rhodotorula*, *Cryptococcus neoformans*, *Sporothrix schenckii*, *Mucor mucedo* et *Aspergillus*

fumigatus ont tous une croissance inhibés in vitro par des concentrations d'Amphotéricine B allant de 0,03 à 1,0 µg/mL (17).

Alors que le *Candida albicans* est généralement plutôt sensible à l'Amphotéricine B, les espèces non-*albicans* le sont moins. *Pseudallescheria boydii* et *Fusarium sp.* sont par contre souvent résistantes à cette molécule. Enfin, l'Amphotéricine B est sans effet sur les bactéries, les rickettsies et les virus.

b. Mode d'action

L'amphotéricine B est fongistatique et fongicide selon la concentration obtenue localement et la susceptibilité du germe en cause.

La molécule agit en se liant de façon irréversible aux stérols (plus précisément l'ergostérol) dans la membrane cellulaire des champignons. Cela crée ainsi un canal transmembranaire duquel résulte une rupture de l'intégrité de la membrane et par conséquent une plus grande perméabilité (Fig. 12). Ce phénomène induit alors une fuite des composants intracellulaires et la mort de la cellule (18). L'ergostérol, principal stérol retrouvé dans la membrane cytoplasmique des champignons, est le site d'action aussi bien des polyènes que des azolés.

Ainsi, tous les organismes sensibles aux polyènes, l'amphotéricine B en particulier, contiennent des stérols dans leur membrane externe (19).

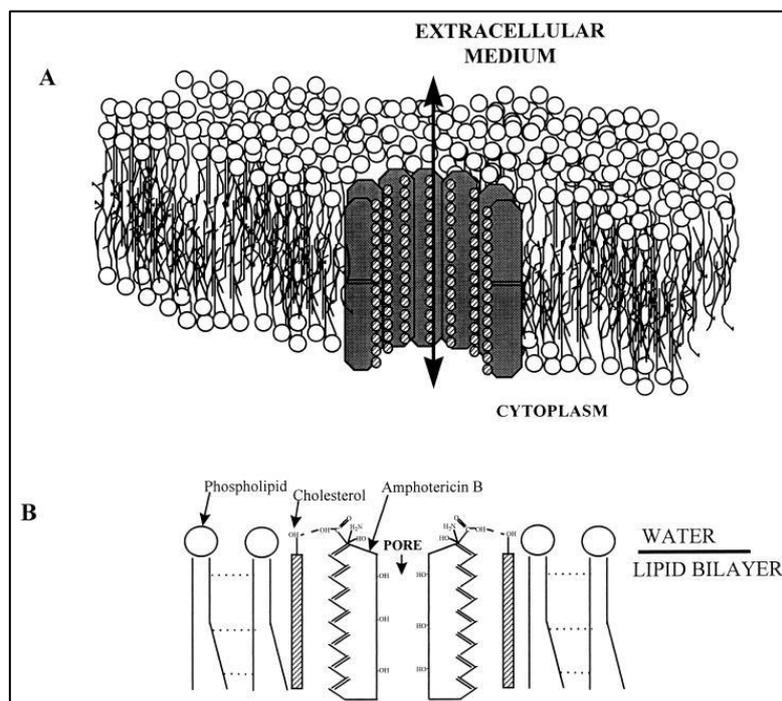


Fig. 12 Représentation schématique de l'interaction entre l'AB et le stérol de la bicouche lipidique (1999, American Society for Microbiology).

III. Matériel et méthodes

III.1 Formulation du collyre

III.1.1 Environnement technique de fabrication

III.1.1.1 Environnement de travail

Comme recommandé dans l'ensemble des référentiels en la matière dont les Bonnes Pratiques de Préparation (BPP) éditées par l'Afssaps, il est indispensable de disposer d'une ZAC pour la préparation de médicaments stériles. Ces zones sont maîtrisées d'un point de vue microbiologique et particulaire et font l'objet de contrôles réguliers.

Le collyre est préparé à la PUI, par un préparateur habilité, sous un Poste de Sécurité Microbiologique de type II. Elle représente un environnement de préparation de classe A selon les BPP (équivalent ISO 4.8) et l'environnement immédiat dans la salle est de classe B (équivalent ISO 5). [BPP 6.5.2 et Pharmaceutical Inspection Co-operation Scheme (PIC/S) annex 1 section 2. §21].

Ces zones correspondent à un niveau d'exigence en termes de contamination particulaire (au repos et en activité) et à des recommandations en termes de surveillance microbiologique en activité comme décrite dans les tableaux V et VI.

Tableau V. Caractéristiques particulières des différentes ZAC [BPP 6.4.1]

Classe	Au repos		En activité	
	Nombre maximal autorisé de particules par m ³ , de taille égale ou supérieure à			
	0,5µm	5µm	0,5µm	5µm
A	3520	20	3520	20
B	3520	29	352000	2900

Tableau VI. Recommandations pour la surveillance microbiologique des ZAC en activité [BPP chap 6.4.1]

Classe	Limites recommandées de contamination microbiologique (valeurs moyennes)			
	Echantillon d'air (ufc/m ³)	Boîtes de Pétri (diamètre 90mm) (ufc/4heures)	Géloses de contact (diamètre 55mm) (ufc/plaque)	Empreintes de gant (5 doigts) (ufc/gant)
A	< 1	< 1	< 1	< 1
B	10	5	5	5

La salle dans l'environnement immédiat du PSM II est en surpression par rapport à l'environnement extérieur, de l'ordre de 10 à 15 Pascals supplémentaires, vérifiable au moyen d'un indicateur de gradient de pression, qui doit être contrôlé chaque jour avant le début de l'activité. [BPP et PIC/S]

Des précautions pour minimiser la contamination doivent être prises lors de la préparation [PIC/S], il s'agit en effet d'un procédé de préparation aseptique associé à une filtration stérilisante, puisque nous travaillons en système ouvert et donc en risque microbiologique élevé. Une préparation est considérée en système ouvert « dès lors qu'une étape n'est pas réalisée en système clos ». [BPP 6.2.2.3.2.] Les BPP définissent donc également ce qu'est un système clos : « procédé de répartition aseptique permettant le prélèvement et le transfert d'un produit stérile vers un autre contenant stérile dans lequel les systèmes de fermeture des contenants et le matériel de transfert restent en place pendant toute la durée du processus de transfert, uniquement assuré par une aiguille stérile, une tubulure stérile ou tout autre dispositif de transfert stérile. Le transfert du produit stérile est réalisé de telle manière qu'il ne soit jamais en contact avec l'environnement ». [BPP 6.2.2.3.1.]

Les recommandations PIC/S rejoignent celles des BPP pour la préparation selon un procédé aseptique avec filtration stérilisante terminale (Tableau VII).

Tableau VII. Grades recommandés pour les différentes opérations de préparation aseptique (PIC/S, annex 1 section 2 §19.)

Grade	Exemples d'opération de procédé aseptique
A	Préparation aseptique et remplissage
C	Filtration stérilisante de la préparation
D	Stockage des composants après lavage

III.1.1.2 Articles de conditionnement

La molécule d'amphotéricine B étant reconnue photosensible, la préparation est conservée à l'abri de la lumière dans un flacon en verre brun de type III, type « flacons antibiotiques » de 15mL (Sud Ouest Flaconnage SOFLAC). La coloration est obtenue par addition d'oxydes métalliques. Le verre de type III est un verre calco-sodique, qui convient pour les « préparations en véhicule non aqueux pour usage parentéral, pour les poudres pour usage parentéral (...) et pour des préparations pour usage non parentéral » (Ph. Eur.).

Au terme de la fabrication, le flacon est doté d'un bouchon en chlorobutyl ainsi que d'un opercule en aluminium.

Ces articles de conditionnement, achetés non stériles, sont stérilisés au sein de la Stérilisation Centrale du CHU de Poitiers, dans des autoclaves avec un procédé de stérilisation par la chaleur humide avec une vapeur d'eau saturée à 134°C pendant une durée d'au moins 18 minutes.

Des bouchons compte-gouttes en emballage individuel stérile (PVC couleur ivoire) sont fournis au patient lors de la dispensation pour adapter aux flacons au moment de la première utilisation et destinés à rester en place tout au long des 4 jours d'utilisation.

III.1.1.3 Matières premières

L'amphotéricine B provient de la spécialité Fungizone® commercialisée par Bristol Myers Squibb Co.

Les excipients utilisés dans la préparation du collyre sont :

- Le Bicarbonate de sodium 4,2% (= 0,42g/10mL) distribué par Renaudin (France), il contient 0,5mmol/mL d'ions Na et CO₃H ;
- Le Glucose (anhydre) 5% PROAMP® (= 0,5g/10mL), solution pour perfusion distribué par Aguettant (France), il contient 0,278mmol/mL de glucose, a une osmolarité de 27,8 mOsm/100mL et un pH de l'ordre de 3,5-5.

III.1.2 Protocole de fabrication

Au départ, toutes les matières premières sont stériles, en effet l'utilisation de la spécialité injectable de Fungizone® est privilégiée plutôt que l'utilisation d'une poudre pure d'amphotéricine B qui ne serait pas stérile [BPP].

De plus, le matériel utilisé pour les différentes opérations de la préparation aseptique est stérile et non réutilisable. La contamination initiale microbienne est donc très réduite, d'autant plus que l'opérateur manipule de manière à limiter au maximum les risques de contamination microbienne.

Le flacon de Fungizone® est reconstitué avec 7mL de Glucose 5% puis agité jusqu'à obtenir une dissolution complète. On ajoute ensuite 0,1mL de Bicarbonate de sodium dans le flacon. La totalité du flacon est enfin prélevée à l'aide d'une seringue, qui est complétée jusqu'à 10mL avec du Glucose 5%. La solution est homogénéisée dans la seringue, sur laquelle on adapte ensuite un filtre en éthersulfone dont les pores ont un diamètre de 0,22µm (Millipore®) permettant de réaliser une filtration stérilisante.

On réalise une répartition aseptique de la solution dans les différents flacons, sur lesquels on adapte ensuite les bouchons en chlorobutyl et l'opercule en aluminium. Le tout est scellé et étiqueté ensuite selon le décret n°2012-1201 du 29 octobre 2012 relatif à l'étiquetage des préparations et d'autres produits pharmaceutiques entré en vigueur le 1^{er} avril 2013 (Fig. 14).

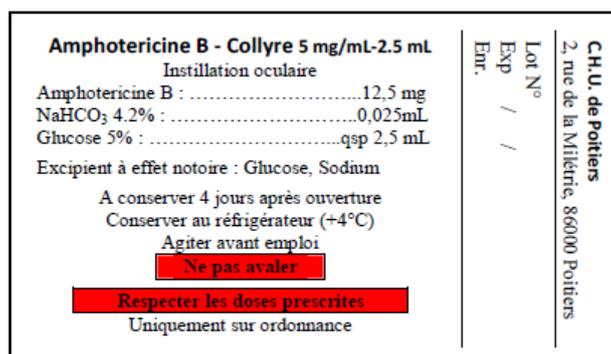


Fig. 13 Etiquetage du flacon de collyre d'AB 0.5%.

III.1.3 Données de stabilité existantes

La durée de stabilité actuellement appliquée à la PUI est de 10 jours à 4°C pour le collyre à l'Amphotéricine B 0,5%. Cette durée a été déterminée selon la bibliographie retrouvée (20).

Les autres données de la littérature concernant la stabilité de cette préparation sont partielles ou insuffisantes (21) pour pouvoir allonger la durée de conservation sur la simple bibliographie. Nous n'avons de plus retrouvé aucune donnée sur une éventuelle conservation des collyres à l'AB à -20°C.

On peut exclure la possibilité d'une conservation à température ambiante qui entraîne une apparition rapide de précipité dans la préparation (22).

III.2 Méthode de dosage

III.2.1 Mise au point

Appareillage et conditions chromatographiques retenues

Le dosage a été mis au point selon une méthode par chromatographie liquide haute performance couplée à une détection UV (HPLC-UV), cette méthode permettant en effet une analyse séparative adaptée à une étude de stabilité, et ainsi capable de mettre en évidence des produits de dégradation.

Nous avons travaillé avec le système LaChrom Elite® de VWR constitué d'un injecteur L62130, d'une lampe L62400 et d'une pompe L-2130. Une colonne chromatographique Purospher® STAR RP-18 (150mm x 4,6mm, 5µm, Merck Millipore) a assurée la séparation.

L'analyse a été réalisée en phase inverse, la colonne étant constituée d'une phase stationnaire apolaire (silice greffée de groupements C18).

La phase mobile utilisée est constituée d'un mélange Acétonitrile / Eau / Acide acétique 1M (dans les proportions suivantes : 40/54/6 v/v/v). Nous avons travaillé en mode isocratique et à température ambiante.

L'acétonitrile de qualité HPLC provient du laboratoire VWR Chemicals. L'eau ultrapure (de type 1) est obtenue via le système de purification Direct_QR 3 (Millipore). L'acide acétique 1M a été préparé par dilution à partir de la solution d'acide acétique 85% (Cooper).

Le volume d'injection est de 20µL pour une durée d'analyse de 9 min.

Au vu du spectre d'absorption dans l'UV-Visible de l'amphotéricine B, la longueur d'onde de détection de travail a été définie à 410nm.

Le traitement des données est assuré par le logiciel EzChrom Elite 3.3.

Gamme d'étalonnage

La gamme d'étalonnage a été réalisée à partir de la poudre pour solution injectable commercialisée par le laboratoire Bristol Myers et Squibb (Fungizone®) selon le mode opératoire suivant :

Une première solution (= **Solution A**) à 1mg/mL est réalisée en reconstituant le flacon de poudre avec 10mL d'eau distillée, puis en ajustant à 50mL dans une fiole jaugée. Cette solution est ensuite diluée au dixième pour obtenir une **solution B** à 100µg/mL. La gamme se réalise ensuite comme suit :

Tableau VIII. Préparation de la gamme d'étalonnage

	Blanc	20µg/mL	40µg/mL	60µg/mL	80µg/mL	100µg/mL
Eau distillée (en µL)	1000	800	600	400	200	0
Volume de solution B (en µL)	0	200	400	600	800	1000

Contrôles qualité

Pour la validation de la méthode, trois niveaux de contrôle ont été réalisés. Un contrôle bas à 25µg/mL, un contrôle au milieu de la gamme à 50µg/mL (correspondant à notre concentration cible) et un contrôle haut à 75µg/mL.

III.2.2 Validation statistique de la méthode analytique

L'objectif de la méthode analytique est d'identifier et de quantifier la molécule et, si elle est développée en vue d'une étude de stabilité, de suivre sa progression au fil du temps.

Le second objectif est de suivre l'apparition d'éventuels produits de dégradation.

La méthode de dosage de l'amphotéricine B a été validée selon les recommandations du Guide méthodologique des études de stabilité des préparations, issu de la collaboration entre la Société Française de Pharmacie Clinique (SFPC) et le Groupe d'Evaluation et de Recherche sur la Protection en Atmosphère Contrôlée (GERPAC). Nous avons tenu compte également des recommandations de la Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques (SFSTP) et de l'International Conference on Harmonisation (ICH).

Ainsi, selon ces recommandations nous avons déterminé les limites de détection et de quantification et étudié les conditions de spécificité, de linéarité, d'exactitude et de fidélité.

III.2.2.1 Limite de détection (LOD) ou seuil de détection (SD)

Selon les recommandations de la SFSTP, le seuil de détection peut être estimé à partir du bruit de fond du chromatogramme du « blanc » selon la formule :

$$SD = 3 \times h_{\max} \times R$$

Où :

- h_{\max} est l'amplitude maximale du signal sur une distance égale à 20 fois la largeur à mi-hauteur du pic d'amphotéricine B sur un chromatogramme d'échantillon de collyre,
- R le facteur de réponse quantité / signal exprimé en hauteur.

III.2.2.2 Limite de quantification (LOQ)

Il s'agit de la plus petite valeur qui peut être fournie pour un échantillon dosé, qui correspond à la concentration du plus petit point de gamme.

III.2.2.3 Spécificité

a. Définition

La détermination de la spécificité permet de s'assurer que le signal mesuré dans les conditions opératoires retenues, provient seulement de la substance à analyser, c'est-à-dire qu'il n'existe pas d'interférences provenant d'autres substances telles que des excipients, des produits de dégradation potentiels...

b. Protocole

Trois essais peuvent être réalisés :

- **Essai 1** : Injection d'un blanc contenant tous les excipients sauf la molécule d'intérêt, à savoir le diluant : glucose 5% et le bicarbonate de sodium 4,2%. Le chromatogramme obtenu est ensuite comparé au chromatogramme obtenu après l'injection d'un échantillon de collyre.
 - Cet essai permettra ainsi de faire la discrimination entre l'analyte et les éventuelles substances interférentes qui seraient apportées par les excipients du collyre (Solution de glucose à 5% ou bicarbonate de sodium) ou les solvants destinés à diluer le collyre avant l'analyse chromatographique.
 - S'il existe un pic de même temps de rétention que l'AB, il sera significatif s'il est supérieur au seuil de détection (SD) de l'AB, défini précédemment.
- **Essai 2** : Etudes des produits de dégradation
 - Nous avons suivi les recommandations du guide de la SFPC pour réaliser l'essai de dégradation : une solution équivalente à 4 fois la concentration du milieu de gamme (soit une solution mère S_m de concentration équivalente à $4 \cdot 50 \mu\text{g/mL}$ soit $200 \mu\text{g/mL}$) a été réalisée puis soumise à des variations de pH (plusieurs concentrations en acide et en base) puis neutralisée avec l'acide ou la base correspondant.
 - L'essai a été mené comme suit :

Tableau IX. Détail de l'essai de dégradation

Solution n°	1	2	3	4	5	6
Volume de S_m	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL
HCl 0,1N	1mL			NaOH 0,1N	1mL	
HCl 0,5N		1mL		NaOH 0,5N	1mL	
HCl 1N			1mL	NaOH 1N		1mL
>>> Chauffer à 80°C pendant 1 heure puis neutraliser avec :						
NaOH 0,1N	1mL			HCl 0,1N	1mL	
NaOH 0,5N		1mL		HCl 0,5N	1mL	
NaOH 1N			1mL	HCl 1N		1mL

Une solution témoin a été réalisée en parallèle avec 1mL de S_m et 3mL de phase mobile pour obtenir la même dilution que pour les solutions 1 à 6.

Les essais sous contraintes peuvent aider à déterminer la stabilité intrinsèque de la molécule et valider la capacité des méthodes d'analyse à détecter les produits de dégradation. Les méthodes sont choisies en fonction de la nature de la substance et du type de produit. [ICH Q1A : essais de stabilité de nouveaux produits et substances médicamenteux]

- Essai 3 : Analyse statistique

Pour vérifier que les excipients de la forme liquide n'interfèrent pas dans le dosage, il faut démontrer que la droite de régression obtenue avec le principe actif seul et celle obtenue en présence des excipients sont similaires. Il s'agit pour cela de :

- Comparer les pentes de chacune des droites,
- Comparer leurs ordonnées à l'origine,
- Comparer chacune des ordonnées à l'origine avec zéro.

c. Critères

Pour l'essai 1, on tiendra compte des temps de rétention, de la hauteur des pics retrouvés sur le chromatogramme des différents blancs et leur significativité par rapport au seuil de détection.

Pour l'essai 2, il s'agira de repérer l'apparition d'éventuels produits de dégradation, et leur positionnement par rapport au pic de l'AB afin de vérifier une absence d'interférences sur les chromatogrammes.

Pour l'essai 3, la p-value obtenue pour chacun des tests statistiques sera le critère pour conclure.

d. Acceptabilité des paramètres de spécificité

L'essai 1 sera satisfaisant si aucun pic n'est retrouvé au même temps de rétention que le pic de l'AB, ou, s'il est situé au même temps de rétention, à une hauteur négligeable par rapport au seuil de détection de la méthode de dosage.

L'essai 2 sera satisfaisant si les éventuels produits de dégradation apparus au cours de l'essai ont un temps de rétention différent de l'AB.

L'essai 3 sera satisfaisant si l'on n'observe pas de différence significative entre les pentes des deux gammes, c'est-à-dire que l'on ne retrouve pas d'effet matrice. On entend par « effet matrice » l'influence du milieu analysé sur l'élément dosé.

De même, on ne doit pas observer de différence significative entre les ordonnées à l'origine de chacune des droites de régression, c'est-à-dire que l'on n'aura pas observé d'erreur systématique/biais. On entend par erreur systématique la différence entre la valeur théorique et la valeur mesurée ; elle dépend de la méthode, de l'opérateur et de l'instrument.

III.2.2.4 Linéarité

a. Définition

La linéarité d'une méthode correspond à la capacité de la méthode, dans un intervalle donné, d'obtenir des résultats de dosage directement proportionnels à la concentration ou à la quantité d'analyte dans l'échantillon.

b. Protocole

Nous avons réalisé trois gammes d'étalonnage en 5 points, la concentration cible ($C_{\text{cible}} = 50\mu\text{g/mL}$ correspondant au collyre dilué au $1/100^{\text{ème}}$) se trouvant au centre de la gamme. Cette étape a donc nécessité la constitution de 15 échantillons ($n=15$), à savoir 3 répétitions ($j=3$) le même jour de chacune des 5 concentrations ($i=5$).

Nous avons réalisé une seconde série de gammes d'AB selon le même procédé (3 répétitions de chacune des concentrations, soit un total de $n = 15$ échantillons), mais constituées avec la matrice Glucose + Bicarbonate de sodium.

L'analyse statistique consistera en plusieurs étapes :

- Vérification préalable de l'hypothèse d'homogénéité des variances
- L'étude de linéarité des gammes d'étalonnage :
 - Equation de la droite (déterminée par la méthode des moindres carrés) de la forme $y = b.x + a$;
 - Détermination du coefficient de corrélation r ;
 - Analyse des résidus : test de la pente, test de l'ordonnée à l'origine ;
 - Régression linéaire simple.

c. Critères

L'homogénéité des variances sera vérifiée par le test de Cochran, pour lequel nous pourrons conclure au vu des valeurs du C de Cochran et de la p-value.

Au moment de la détermination de la droite d'étalonnage, les critères retenus pour l'essai de linéarité sont le coefficient de corrélation r , les valeurs du t de Student ainsi que les p -value associées lors de la réalisation des tests de comparaison à zéro de la pente et de l'ordonnée à l'origine.

Enfin, la valeur du paramètre F de Fisher ainsi que la p -value seront prises en compte dans le test de régression linéaire simple.

d. Acceptabilité des paramètres de linéarité

Une p -value supérieure à 0,05 pour le test de Cochran doit être obtenue pour conclure à l'homogénéité des variances.

Le coefficient de corrélation calculé pour la droite de régression doit être supérieur à 0,998. Pour le test de Student de comparaison de la pente de la droite de régression à zéro, une p -value inférieure à 0,05 permet de conclure à une pente significative. Il faudra qu'elle soit supérieure à 0,05 pour le second test de Student pour pouvoir conclure que l'ordonnée à l'origine est proche de zéro.

Enfin, une p -value inférieure à 0,05 au test de Fisher permet de conclure qu'il n'y a pas d'écart significatif à la linéarité. La régression linéaire n'est envisageable que si les variances à chaque concentration sont homogènes (=similaires).

III.2.2.5 Exactitude/justesse

a. Définition

L'exactitude d'une méthode est l'étroitesse d'accord entre la valeur moyenne obtenue à partir d'une série de résultats d'essais et d'une valeur théorique considérée comme vraie (23). Elle traduit l'erreur systématique d'une méthode de dosage, c'est-à-dire celle que l'on peut imputer à l'appareillage, au manipulateur ...

b. Protocole

Chaque point de gamme est préparé avec une concentration théorique X connue.

On détermine ensuite une concentration Z calculée à partir de l'intensité du signal Y selon l'équation de la droite telle que $Z = (Y - a) / b$, où a est l'ordonnée à l'origine de la droite et b la pente. [Selon guide sfpc/gerpac]. On utilise les données des trois gammes de la même série réalisées avec le principe actif seul.

On calcule à partir de ces concentrations X et Z, les taux de recouvrement R.

La formule du taux de recouvrement est la suivante :

$$R = \frac{\widehat{x}_{ij}}{x_{ij}} \cdot 100$$

Avec \widehat{x}_{ij} : la concentration prédite pour chaque point de la gamme d'étalonnage avec l'équation de la droite de régression tel que : $\widehat{x}_{ij} = \frac{y_{ij}-a}{b}$.

Au préalable, et de façon identique à l'essai de linéarité, on teste l'homogénéité des variances des valeurs prises par les taux de recouvrement. Ensuite un test de Fisher de validité des moyennes est réalisé pour démontrer que les variances inter- et intra-groupes ne sont pas significativement différentes. Enfin, l'intervalle de confiance des taux de recouvrement est déterminé.

c. Critères

L'homogénéité des variances pourra être établie au vu des valeurs prises par le C de Cochran et la p-value.

On pourra conclure à une différence non significative des variances inter- et intra-groupes au vu de la p-value obtenue au test de Fisher.

d. Acceptabilité des paramètres d'exactitude

Les variances seront considérées comme homogènes (= similaires) si la p-value du test de Cochran est supérieure à 0,05. Les variances inter et intra-groupes ne sont pas significativement différentes si la valeur de la p-value du test de Fisher est supérieure à 0,05.

Enfin, l'intervalle de confiance des taux de recouvrement doit comprendre la valeur 100% pour satisfaire au critère d'exactitude.

III.2.2.6 Fidélité

a. Définition

La fidélité d'une méthode d'analyse est l'étroitesse d'accord (ou degré de dispersion) entre une série de mesures provenant de multiples prises d'un même échantillon homogène

dans les conditions décrites dans la technique. Elle renseigne donc sur les erreurs aléatoires, dues au hasard. Elle est évaluée à plusieurs niveaux : répétabilité et fidélité intermédiaire.

III.2.2.6.a.1 Répétabilité

III.2.2.6.a.1.1 Protocole

L'essai de répétabilité est réalisé dans des conditions de variabilité minimale : échantillons identiques, à de courts intervalles de temps, dans un même laboratoire, par un même opérateur employant le même équipement.

Nous avons donc préparés 3 niveaux de contrôle (CQ1 à 25µg/mL, CQ2 à 50µg/mL et CQ3 à 75µg/mL) en 6 exemplaires (les manipulations étant réalisées par le même opérateur) afin de réaliser 6 déterminations le même jour.

III.2.2.6.a.1.2 Critères

Il s'agit de calculer l'écart-type de répétabilité s_r et le coefficient de variation de répétabilité (CV_r).

III.2.2.6.a.1.3 Acceptabilité

L'essai de répétabilité de la méthode sera satisfait si les coefficients de variation sont inférieurs à 5%.

III.2.2.6.a.2 Fidélité intermédiaire

III.2.2.6.a.2.1 Protocole

L'essai de fidélité intermédiaire (aussi appelé parfois reproductibilité intralaboratoire) est réalisé dans des conditions fortement variables : échantillons identiques au sein d'un même laboratoire, mais les analyses sont effectués à des jours différents, par des opérateurs différents.

Nous avons préparé pour cela à nouveau 3 niveaux de concentrations (CQ1, CQ2 et CQ3) en 6 exemplaires, et ce, répétés à 5 jours différents, avec 2 opérateurs différents.

III.2.2.6.a.2.2 Critères

Il s'agit de calculer l'écart-type de fidélité intermédiaire s_R et le coefficient de variation de fidélité intermédiaire (CV_R).

III.2.2.6.a.2.3 Acceptabilité

L'essai de fidélité intermédiaire sera satisfait si les coefficients de variation CV_R sont inférieurs à 5%.

NB : tout au long de l'étude menée, les 3 niveaux de contrôle qualité ont été régulièrement injectés afin de vérifier la validité de la gamme au cours du temps.

III.3 Etude de stabilité

III.3.1 Définition

La stabilité d'une préparation est l'aptitude « à conserver ses propriétés chimiques, physiques, microbiologiques et biopharmaceutiques dans des limites spécifiées pendant toute sa durée de validité ». [ICH]

III.3.1.1 Planification

Selon les recommandations du guide méthodologique des études de stabilité des préparations et pour une durée totale de 2 mois d'étude de stabilité, nous avons réalisé des **prélèvements intermédiaires à J7, J15, J30 et J60**, ainsi que :

- Comme recommandé également lors de l'étude d'un produit conservé au congélateur, des points de **prélèvements à 24h post décongélation** (choix d'une décongélation lente dans des conditions réfrigérées entre 4 et 8°C) ;
- Des **prélèvements journaliers les 4 jours suivants la décongélation de J30 et de J60**, afin de se placer en conditions d'utilisation chez le patient, à savoir décongélation du flacon au réfrigérateur et utilisation limitée à 4 jours post-décongélation avec conservation au réfrigérateur ;

La planification de l'étude de stabilité est résumée dans le tableau X, avec les essais de stabilité physique et microbiologique.

Tableau X. Tableau récapitulatif des prélèvements et essais réalisés lors de l'étude de stabilité

	Flacons pour essai de stabilité chimique			Flacon pour essais de stabilité physique					
	Flacon 1	Flacon 2	Flacon 3	pH	Osmolalité	Coloration / turbidimétrie			
						λ350nm	λ410nm	λ530nm	Limpidité
J0	X	X	X	X	X	X	X	X	X
J7	X	X	X						X
J7+1	X	X	X						X
J14	X	X	X	X		X	X	X	X
J14+1	X	X	X						X
J28	X	X	X	X	X	X	X	X	X
J28+1	X	X	X	X		X	X	X	X
J60	X	X	X	X	X	X	X	X	X
J60+1	X	X	X	X		X	X	X	X
J60+2	X	X	X	X		X	X	X	X
J60+3	X	X	X	X		X	X	X	X
J60+4	X	X	X	X	X	X	X	X	X

III.3.1.2 Sélection des lots

En conformité avec les exigences de l'ICH (et comme le préconise l'OMS dans son recueil de documents concernant l'assurance qualité des produits pharmaceutiques) : les essais portent sur 3 unités de préparation par temps de prélèvement (= triplicat) à partir d'un lot unique, de même formulation, avec un emballage identique à celui proposé au patient, issus d'un procédé de fabrication identique à celui qui sera utilisé ultérieurement. Cette façon de procéder est recommandée pour les produits facilement dégradables et pour lesquels on dispose de données de stabilité limitées.

Cette précaution permet de s'affranchir de nombreux facteurs pouvant influencer sur la stabilité de la préparation (modification de la surface de contact contenu-contenant en cas d'utilisation d'une seule unité pour tous les temps de prélèvement, rupture d'étanchéité du conditionnement...).

III.3.2 Spécifications de l'étude de stabilité

L'ICH propose une liste de tests, de méthodes analytiques et de limites d'acceptation (Q6A, Q6B) ainsi que des spécifications relatives aux produits de dégradation d'un produit médicamenteux (ligne directrice Q3B).

L'étude de stabilité doit comprendre l'évaluation des caractéristiques du produit susceptibles de changer pendant la conservation et susceptibles d'influer sur la qualité, l'innocuité et/ou l'efficacité.

III.3.2.1 Chimique

Il s'agit ici de mesurer chromatographiquement la teneur en AB retrouvée dans le collyre au cours des différents temps de prélèvement, la valeur de référence étant celle obtenue à J0, c'est-à-dire immédiatement après la fabrication et avant congélation.

Nous avons réalisé trois unités de préparation par temps de prélèvement, sauf pour les 4 jours post-décongélation pour lesquels les prélèvements ont été réalisés chaque jour sur le flacon initialement décongelé. Ceci permet de mimer les conditions réelles de stockage et d'utilisation chez le patient et de mettre en évidence une éventuelle dégradation lors de l'ouverture du flacon pour placer le bouchon compte-gouttes et lors des administrations répétées au patient.

En pratique, 250 μ L ont été prélevés dans chacun des trois flacons concernés, et dilués ensuite au 1/100^e en les transférant dans une fiole jaugée de 25mL complétée jusqu'au trait de jauge avec de l'eau distillée, ceci afin d'atteindre une concentration de l'ordre de 50 μ g/mL compatible avec la gamme d'étalonnage. Un volume suffisant a été ensuite transféré dans un vial, déposé dans l'échantillonneur de l'appareil pour dosage.

La stabilité chimique est définie comme la période pendant laquelle la concentration en médicament se maintient à plus de 90% par rapport à la concentration initiale.

III.3.2.2 Physique

a. Mesure du pH

Les mesures de pH ont été réalisées sur un pH-mètre 5/6 Ecoscan (Eutech Instruments), elles ont été réparties sur l'ensemble de la durée de l'étude de J0 à J60, et une mesure a été faite quotidiennement lors de la conservation post décongélation du flacon correspondant à J60 (Tableau 10).

b. Osmolalité

L'osmolalité est une façon globale de mesurer la contribution des différents solutés présents dans une solution à la pression osmotique de cette solution. [pharmacopée 8.0 chap 2.2.35]

Elle s'exprime en osmole par kilogramme, mais plus généralement en milliosmole par kilogramme (mOsm/kg). Elle représente alors la quantité de molécules osmotiquement

actives par unité de masse. L'osmolalité ξ_m est déterminée par la mesure de l'abaissement du point de congélation, selon la formule :

$$\xi_m = \frac{\Delta T}{K_c} \times 1000 \text{ mosmol/kg}$$

Avec K_c , la constante cryoscopique propre à chaque type de solution et ΔT : l'abaissement cryoscopique en °C.

Les mesures d'osmolalité ont été réalisées tout au long de l'étude de stabilité sur un micro osmomètre automatique de type 15 Löser Messtechnik. Une variation significative de ce paramètre au cours de l'essai signifierait une modification chimique significative de la solution (comme l'apparition de produits de dégradation par exemple).

c. Coloration / Turbidimétrie

Une solution pharmaceutique colorée – en l'occurrence le collyre à l'AB qui présente une intense coloration jaune – ne doit pas voir de modification de sa coloration au cours de sa conservation. Elle est évaluée dans l'étude par spectrophotométrie UV-Visible à des longueurs d'onde différentes.

En effet, le signal mesuré est directement proportionnel à la concentration du soluté, selon la loi de Beer-Lambert telle que :

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot C$$

Où A représente l'absorbance, ε le coefficient d'absorption molaire, l la largeur de la cuve et C la concentration molaire de la solution.

d. Autres

L'odeur et la viscosité, dont l'évaluation est préconisée dans le guide méthodologique des études de stabilité pour une préparation ophtalmique, n'ont pas été analysées dans cette étude, hormis une appréciation subjective de la viscosité lors de chacun des prélèvements effectués.

L'ensemble des autres qualités requises pour une préparation ophtalmique est donc évalué ici : la stérilité (voire le chapitre traitant de la stabilité microbiologique plus loin), la limpidité (évaluée visuellement à chaque prélèvement), l'isotonie, le pH.

III.3.2.3 Microbiologique (essai de stérilité)

a. Le concept de la stérilité

La stérilité est un critère obligatoire pour toutes les formes ophtalmiques, elle assure la sécurité microbiologique de la préparation. La stérilité est obtenue par l'utilisation d'une technique de fabrication respectant des règles d'asepsie. Ce processus permet ainsi d'assurer un état initial stérile mais n'assure en aucun cas la conservation de l'état stérile au cours de l'utilisation du collyre. Il s'agit alors dans l'étude de stabilité de montrer la conservation dans le temps de la stérilité de la préparation jusqu'à et pendant son utilisation.

Les conséquences possibles d'une contamination microbiologique de la préparation sont multiples : modification du pH, altération des principes actifs, contamination ultérieure de l'œil ...

Pour éviter cela, il est possible d'utiliser des conservateurs mais de nombreux problèmes de tolérance peuvent apparaître, c'est pourquoi la pharmacopée européenne n'y oblige pas si le principe actif est doté lui-même d'une activité antimicrobienne.

Le contrôle de la contamination microbiologique des préparations ne peut être effectif que si l'environnement est contrôlé lui aussi, ceci étant régi par de nombreuses normes (NF EN ISO 14644-1, BPP chap 6, PIC/S ...).

Ainsi, comme le stipulent les BPP (6.8.), « l'essai de stérilité appliqué à la préparation terminée est considéré comme le dernier d'une série de contrôles permettant de garantir la stérilité". Cette série de contrôle inclut notamment les qualifications régulières des installations et équipements, un suivi de la qualité des matières premières et des articles de conditionnement, la maîtrise des procédés, des contrôles microbiologiques et particuliers environnementaux, etc. ...

L'essai de stérilité est une validation du processus de stérilisation ou des procédés de préparation aseptique. En aucun cas, cet essai n'assure qu'un produit est stérile, mais plutôt qu'aucun germe n'a pu être décelé avec la méthode utilisée dans l'échantillon testé. Celle-ci doit donc être sensible.

Selon les référentiels consultés, le risque microbiologique de la préparation n'est pas le même.

En effet, selon les BPP (6.3.1.1.2.), le risque de contamination microbiologique peut être qualifié d'**élevé**, puisque 2 étapes sont réalisées en système ouvert lors des prélèvements des ampoules de Glucose et de Bicarbonate de sodium.

Les BPP s'accordent sur ce point avec le guide de bonnes pratiques des PIC/S (Annex 1§4.), lequel considère que les préparations oculaires présentent un risque de croissance microbienne spécifique et classe donc ces préparations comme à **haut risque microbiologique**.

La Pharmacopée américaine (USP <797>), elle, semble classer les collyres comme des « Low risk Compounding Sterile Preparation », c'est-à-dire en préparation à **risque microbiologique faible**, car réalisée de façon aseptique en environnement ISO 5, avec des matières premières stériles, les opérations se limitant à des transferts, mesure et mélange de volumes de 3 ingrédients ou moins.

Ce nivellement du risque microbiologique impose un certain niveau de contrôle de la contamination microbiologique et particulière de l'environnement de travail.

La définition du niveau de risque de la préparation permet aussi de proposer (USP), en dehors de tout essai de stérilité, une durée de stabilité microbiologique en fonction des températures de conservation (sous réserve bien sûr des données de stabilité physico-chimiques) de la préparation avant utilisation. Ainsi, notre collyre d'AB aurait une stabilité microbiologique de 45 jours au congélateur (-10 à -25°C) avant utilisation, 14 jours si elle était conservée au froid (+2 à +8°C).

b. Protocole

Il s'agit donc ici de vérifier la conservation de l'état stérile du collyre au cours de la conservation et l'utilisation chez le patient. Nous avons réalisé une mise en culture des collyres à J0 et J0 + 4j d'utilisation simulée en ouvrant le flacon pour placer le bouchon compte-goutte et en simulant une instillation du collyre environ toutes les heures de 9h à 22h. Les échantillons ont ensuite été incubés pendant 48h ou 14 jours selon les milieux.

Nous avons utilisé la méthode par ensemencement directe, plus facile à réaliser et moins coûteuse en matériel que la méthode par filtration préconisée par la pharmacopée.

III.3.2.3.b.1 Echantillonnage

Les conditions d'échantillonnage sont précisées par la pharmacopée [Ph. Eur. 7^{ème} édition, ch. 2.6.1] et les BPP [chap 6.8.], à savoir :

- pour une préparation liquide de 1 à 40mL, la quantité minimale à utiliser pour chaque milieu est de la moitié de chaque récipient mais pas moins de 1mL
- le nombre minimal d'unités du lot de fabrication à examiner par milieu sera de 5%, et au minimum 2.

III.3.2.3.b.2 Milieux de culture employés

Les milieux utilisés habituellement en routine ont été utilisés : Schaedler (Thermoscientific), MHS (Mueller Hinton 2 + 5% sang de mouton) et MH2 (Mueller Hinton 2) (Biomérieux). Après ensemencement, ils sont incubés dans une étuve à 37°C, avec lecture tous les jours et rendu du résultat à 48h à la recherche d'un trouble dans le tube Schaedler, et recherche d'éventuelle de colonie sur les milieux solides MHS et MH2.

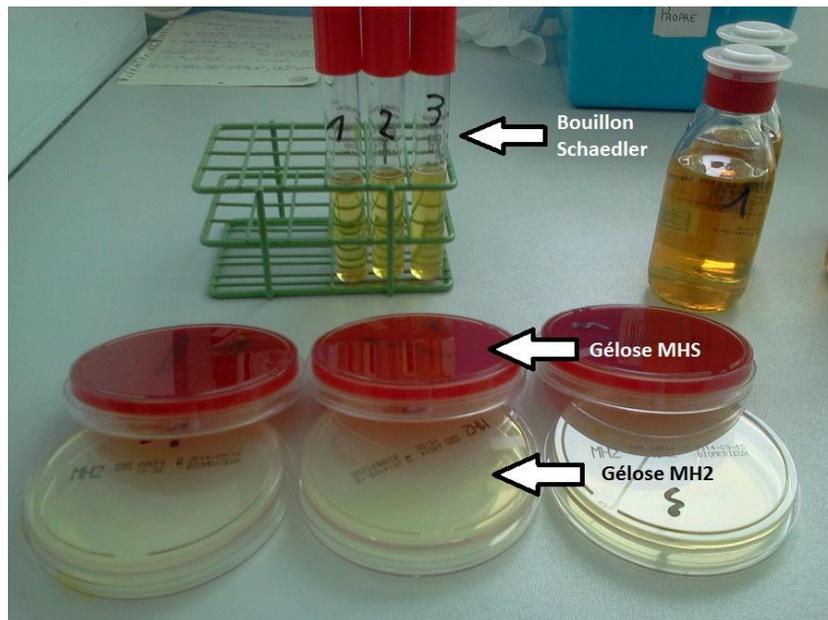


Fig. 14 Géloses MHS etMH2 et bouillon Schaedler utilisés pour l'étude

Nous avons également testé en parallèle les milieux liquides type pharmacopée Thioglycolate et Trypticase soja (SteritestTM MEDIA and Rinse Fluids) de Biomérieux. Après ensemencement, ils sont incubés respectivement à 37 et 22°C, avec examen visuel quotidien à la recherche d'un trouble pendant 14 jours.

III.3.2.3.b.3 En pratique

Fort de ces recommandations, nous avons donc testé 3 flacons de collyre (réalisés à partir d'un même lot de fabrication) à J0 (jour de fabrication) et J0+4 (après "utilisation" pendant 4 jours), avec la répartition suivante :

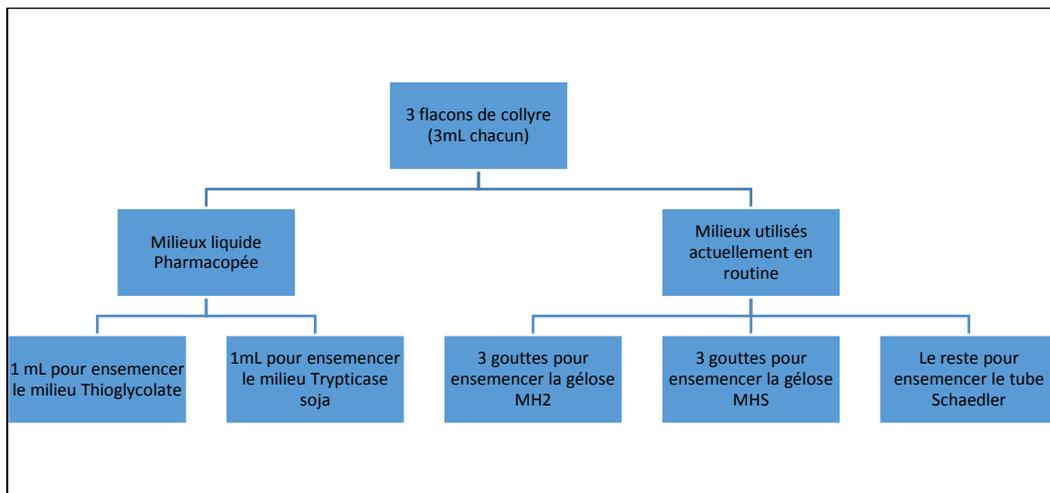


Fig. 15 Schéma de la répartition du contenu du collyre dans les différents milieux à ensemencer.



Fig. 16 Ensemencement sous Poste de Sécurité Microbiologique de type II

L'ensemencement est réalisé sous PSM II au sein du Laboratoire d'Hygiène du CHU.

III.3.2.3.b.4 Interprétation de l'essai de stérilité

Le produit satisfait à l'essai de stérilité si aucune croissance microbienne n'est observée après 14j d'incubation.

III.3.2.4 Autres essais sur le produit fini

Ces paramètres supplémentaires sont importants à analyser car ils font partie des critères requis pour assurer la qualité d'un collyre.

La limpidité est indispensable à évaluer pour un collyre, elle est citée dans la Pharmacopée européenne (2.2.1.) qui préconise que les collyres sous forme de solutions soient « pratiquement limpides et pratiquement exempts de particules ».

Dans l'étude de stabilité, la vérification visuelle de la limpidité permet de vérifier premièrement que le produit est correctement dissout et, deuxièmement, qu'il n'existe pas de modification de l'aspect au cours du temps qui témoignerait d'une altération de la préparation traduite par un trouble ou un précipité.

IV. Résultats

IV.1 Validation statistique de la méthode analytique de dosage

IV.1.1 Limite de détection (LOD) / Seuil de détection (SD)

Le seuil de détection est de 6.8 µg/mL (ce qui équivaut à 57 mAU).

IV.1.2 Limite de quantification (LOQ)

La plus petite valeur pouvant être fournie lors du dosage d'un échantillon est le premier point de gamme, c'est-à-dire 20µg/mL.

Lors de l'essai d'exactitude, il a en effet été démontré un taux de recouvrement proche de 100% pour chacun des points de gamme. La méthode est donc capable de déterminer de façon exacte une concentration supérieure ou égale à 20µg/mL.

IV.1.3 Spécificité

- Essai 1 : Etude du blanc

Le chromatogramme ci-dessous représente l'injection du "blanc excipient" (tracé vert), à savoir une solution contenant Glucose 5% et Bicarbonate de sodium 4,2% dans des proportions identiques à celles de l'échantillon de collyre.

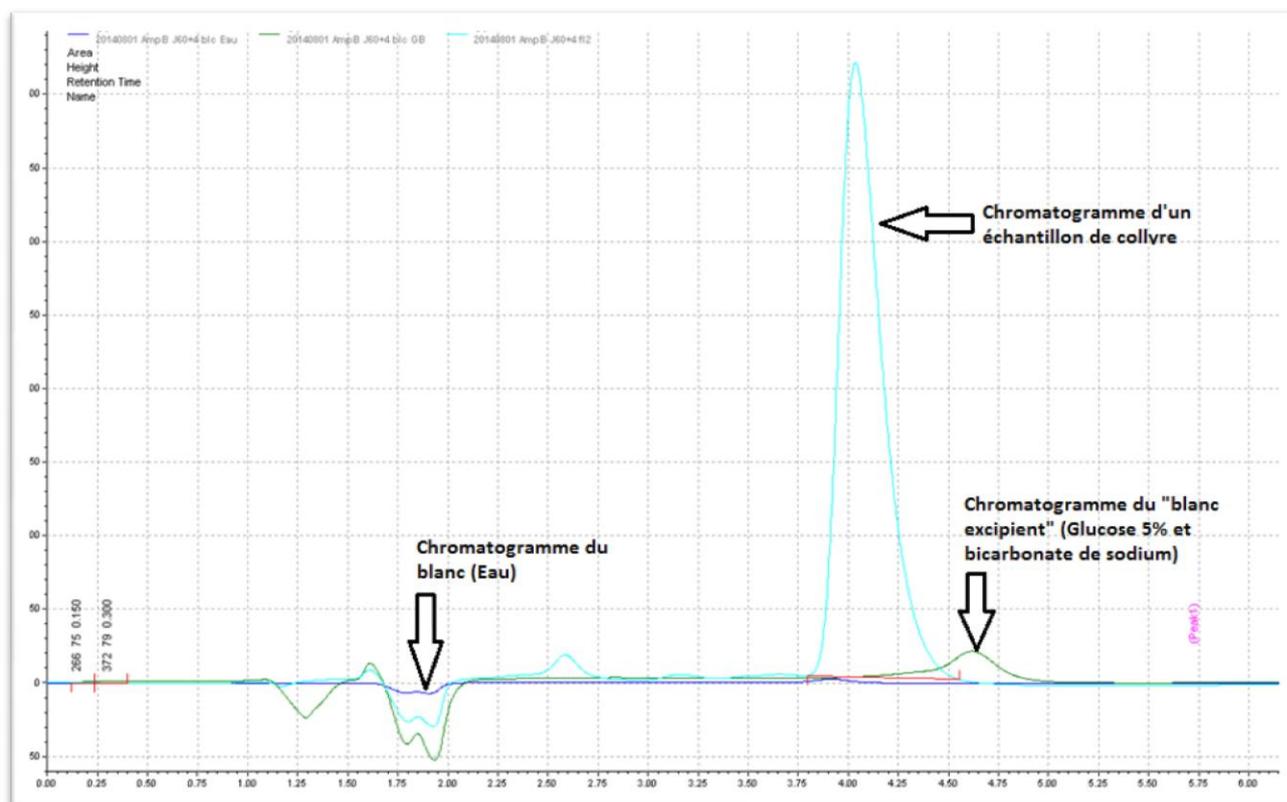


Fig. 17 Chromatogrammes de l'échantillon de collyre (tracé bleu clair), du blanc « eau » (tracé bleu foncé) et du blanc « matrice » (tracé vert).

Un échantillon de collyre, injecté plus tard dans la séquence (tracé bleu), montre un temps de rétention (t_R) de l'amphotéricine B à 4,037 min. Le pic retrouvé sur le chromatogramme du "blanc excipient" se situant à un temps de rétention de 4,618 min, il n'interfère donc pas avec celui de l'AB.

De plus, même si celui-ci apparaissait au même temps de rétention, il serait considéré comme négligeable par rapport au seuil de détection. L'amplitude de ce pic est de 21,43mAU, alors que le SD est à 57mAU.

- Essai 2 : Etude des produits de dégradation

Les résultats obtenus après le traitement d'une heure est très agressif et dégrade totalement l'amphotéricine B. On ne retrouve aucun pic au même temps de rétention que le pic de la solution non dégradée.

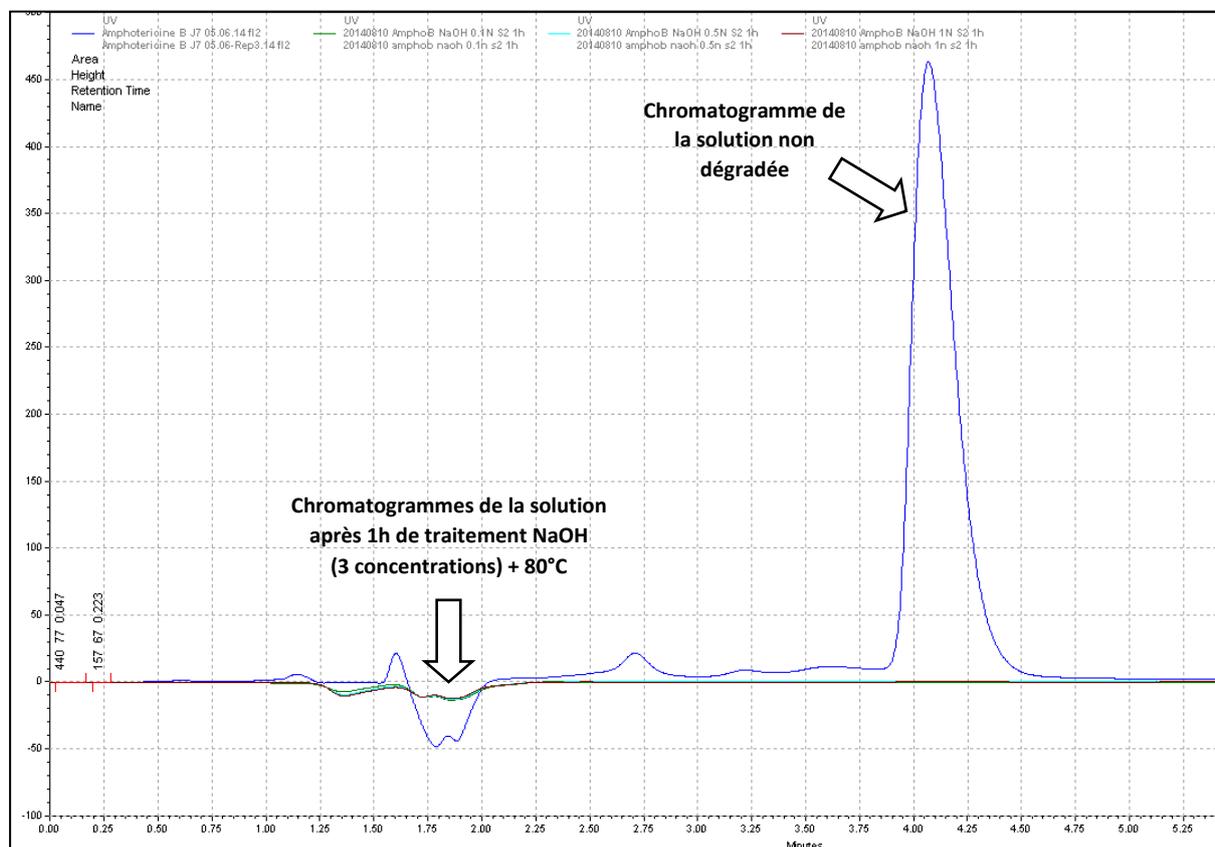


Fig. 18 Chromatogrammes (vert, bleu clair et marron) obtenus après une heure de traitement par la soude (de concentration 0,1N, 0,5N et 1N respectivement) à une température de 80°C et chromatogramme de la solution non dégradée (bleu marine).

Si on applique seulement 10min de chauffage à 80°C après ajout des réactifs acides ou basiques, l'amphotéricine B est tout autant dégradée, mais on voit apparaître sur le chromatogramme les produits de dégradation ou impuretés, en concentration plus importantes, présentes dans la solution.

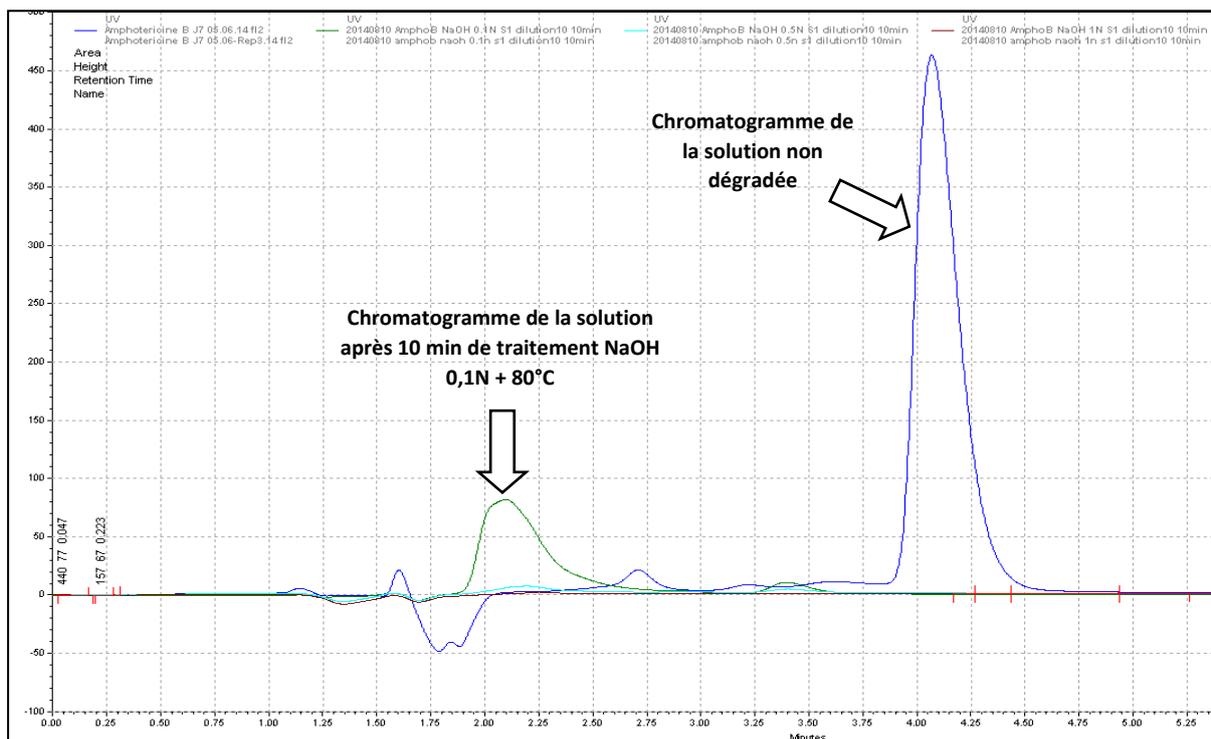


Fig. 19 Chromatogramme (vert) obtenu après 10 minutes heure de traitement par la soude 0,1N à une température de 80°C et chromatogramme de la solution non dégradée (bleu).

On n'observe donc aucune interférence des produits de dégradation ou des impuretés au niveau du temps de rétention de l'amphotéricine B.

- Essai 3 : Analyse statistique

Pour vérifier que les excipients de la forme liquide n'interfèrent pas dans le dosage, il faut prouver que la droite de régression obtenue avec le principe actif seul (D_{PA} d'équation $Y = \beta_{PA} \cdot X + \alpha_{PA}$) et celle obtenue en présence des excipients (D_{EX} d'équation $Y = \beta_{EX} \cdot X + \alpha_{EX}$) sont similaires. Les termes α et β sont estimés dans l'échantillon par a et b .

Des tests de Student bilatéraux ont été réalisés avec un risque α de 5% et 26 degrés de liberté ($ddl = n_1 + n_2 - 4$; avec $n_1 = n_2 = 15$).

- Test sur l'ordonnée à l'origine α :

On teste les hypothèses suivantes :

$$\{ H_0 : \alpha_{PA} = \alpha_{EX} \} \text{ versus } \{ H_1 : \alpha_{PA} \neq \alpha_{EX} \}$$

On calcule la valeur t de Student telle que :

$$t = \frac{|a_{PA} - a_{Ex}|}{\sqrt{s_{aPA}^2 + s_{aEx}^2}}$$

Avec

$$s_a = \frac{s_y \sqrt{(1 - r^2) \cdot \sum x_i^2}}{s_x \sqrt{n \cdot (n - 2)}}$$

On obtient les résultats suivants :

Tableau XI. Résultats du test de Student sur l'ordonnée à l'origine α

Gamme avec le principe actif seul (PA)	Gamme avec le principe actif et les excipients (Ex)
$a_{PA} = 150005,07$	$a_{Ex} = -412152,87$
$s^2 a_{PA} = 9,625 \cdot 10^{10}$	$s^2 a_{Ex} = 1.200 \cdot 10^{11}$
$t_{\text{calc}} = 1,209$	
$t_{\text{table}} (\alpha = 5\% \text{ et } 26 \text{ ddl}) = 2,056$	
p-value = 0,24	

La valeur t_{calc} obtenue est inférieure à $t_{\text{table}} (\alpha; n_1+n_2-4 \text{ ddl})$ et la p-value est supérieure au seuil de signification de 0,05, on ne peut donc pas rejeter l'hypothèse H_0 d'égalité des ordonnées à l'origine. Les ordonnées à l'origine α_{PA} et α_{Ex} ne sont donc pas significativement différentes, nous ne mettons donc pas en évidence d'erreur systématique.

- Test sur la pente β :

On teste les hypothèses suivantes :

$$\{ H_0 : \beta_{PA} = \beta_{Ex} \} \text{ versus } \{ H_1 : \beta_{PA} \neq \beta_{Ex} \}$$

On calcule la valeur t de Student telle que :

$$t = \frac{|b_{PA} - b_{Ex}|}{\sqrt{s_{bPA}^2 + s_{bEx}^2}}$$

Avec

$$sb = \frac{s_y \sqrt{1 - r^2}}{s_x \sqrt{n - 2}}$$

On obtient les résultats suivants :

Tableau XII. Résultats du test de Student sur la pente β

Gamme avec le principe actif seul (PA)	Gamme avec le principe actif et les excipients (Ex)
$b_{PA} = 471868,04$	$b_{Ex} = 479243,22$
$s^2b_{PA} = 21875396,16$	$s^2b_{Ex} = 27275154,01$
$t_{calc} = 1,052$	
$t_{table} (\alpha = 5\% \text{ et } 26 \text{ ddl}) = 2,056$	
p-value = 0,30	

La valeur t_{calc} obtenue est inférieure à $t_{table} (\alpha ; n_1 + n_2 - 4 \text{ ddl})$ et la p-value est supérieure au seuil de signification de 0,05, on ne peut donc pas rejeter l'hypothèse H_0 d'égalité des pentes. Les pentes β_{PA} et β_{Ex} ne sont donc pas significativement différentes, nous ne mettons donc pas en évidence d'effet matrice.

IV.1.4 Linéarité

- La vérification de l'homogénéité des variances par le test de Cochran a été réalisée avec le logiciel XLStat, qui nous a permis de déterminer les variables C de Cochran.

Les hypothèses étaient les suivantes :

{ H_0 : Les variances sont identiques } versus { H_1 : Au moins une des variances est supérieure aux autres }

Les résultats pour ce test de Cochran, équilibré, bilatéral sont les suivants :

Tableau XIII. Résultats du test de Cochran

	Gamme avec le principe actif seul (PA)	Gamme avec le principe actif et excipients (Ex)
C	0,341	0,337
p-value	0,339	0,306
α	0,05	0,05

Ainsi, étant donné que la p-value calculée est supérieure au niveau de signification seuil $\alpha = 0.05$, on ne peut pas rejeter l'hypothèse nulle H_0 . On peut donc affirmer que les variances sont statistiquement homogènes au risque alpha de 5%.

- Estimation des coefficients α et β des droites de régression par la méthode des moindres carrés.

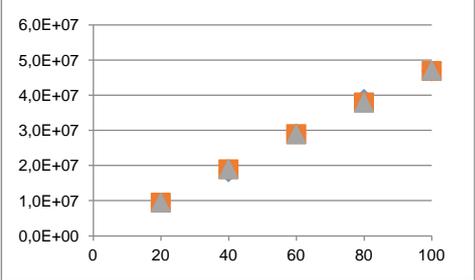
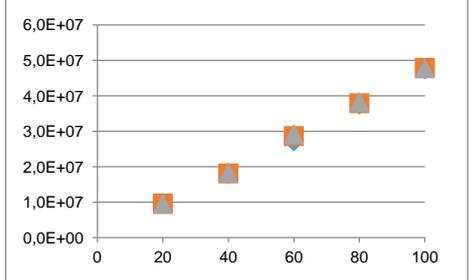
Il s'agit ici d'estimer l'équation de la droite de régression $Y = \alpha + \beta \cdot X$ et de déterminer ainsi l'équation $Y = aX + b$ pour chacune des droites de régression D_{PA} et D_{Ex} , avec :

$$b = \frac{\sum x_{ij}y_{ij} - \frac{1}{n}(\sum x_{ij})(\sum y_{ji})}{\sum x_{ij}^2 - \frac{1}{n}(\sum x_{ij})^2}$$

$$a = \frac{\sum y_{ij}}{n} - b \cdot \frac{\sum x_{ij}}{n}$$

Les nuages de points ainsi que l'équation des droites de régression de l'aire sous la courbe (AUC) sur la concentration de chacune des gammes sont retrouvées dans le tableau XIV.

Tableau XIV. Représentations des nuages de points des AUC en fonction des concentrations et leur équation correspondante

Gamme avec le principe actif seul (PA)	Gamme avec le principe actif et excipients (Ex)
	
<p>$Y_{PA} = 150005.07 + 471868.04 X_{PA}$</p> <p>avec :</p> <p>a = 150005.07</p> <p>b = 471868.04</p>	<p>$Y_{Ex} = -412152.87 + 479243.22 X_{Ex}$</p> <p>avec :</p> <p>a = -412152.87</p> <p>b = 479243.22</p>

- Estimation des coefficients de corrélation ρ :

Ils sont calculés selon la formule :

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n x_i y_i - \frac{1}{n}(\sum_{i=1}^n x_i)(\sum_{i=1}^n y_i)}{\sqrt{[\sum_{i=1}^n x_i^2 - \frac{1}{n}(\sum_{i=1}^n x_i)^2][\sum_{i=1}^n y_i^2 - \frac{1}{n}(\sum_{i=1}^n y_i)^2]}}$$

On obtient alors pour les gammes dans l'eau et avec excipients des coefficients de corrélation r respectivement de 0,99936 et de 0,99923. Ceux-ci sont donc supérieurs à la valeur seuil que nous avons définie au laboratoire à 0.998. Un test de Student bilatéral de risque $\alpha = 5\%$ et à $n-2 = 13$ degrés de liberté a permis de conforter le caractère significatif de la corrélation ($p\text{-value} < 0.01$).

La détermination de r n'est cependant pas suffisante, elle doit s'accompagner d'une étape de vérification de la linéarité.

- Analyse des résidus :

- Test de la pente : existe-il une pente significative?

En d'autres termes, il s'agit ici de comparer les valeurs prises par b (déterminées précédemment pour chacune des 2 droites de régression) à zéro. On utilise pour cela le test de Student, bilatéral, avec un risque $\alpha = 5\%$, les hypothèses étant les suivantes :

{ $H_0 : \beta = 0$ } versus { $H_1 : \beta \neq 0$ }

On calcule le paramètre t de Student tel que :

$$t = \frac{b}{\sqrt{s_b^2}}$$

Avec :

$$s_b = \frac{s_y \sqrt{1 - r^2}}{s_x \sqrt{n - 2}}$$

Et

$$s_x^2 = \frac{\sum x_{ij}^2 - \frac{1}{n} (\sum x_{ij})^2}{n - 1}$$

$$s_y^2 = \frac{\sum y_{ij}^2 - \frac{1}{n} (\sum y_{ij})^2}{n - 1}$$

Tableau XV. Résultats du test de Student de significativité de la pente

Gamme avec le principe actif seul (PA)	Gamme avec le principe actif et excipients (Ex)
$s_b^2 = 21875396.16$	$s_b^2 = 27275154.01$
$t_0 = 100.89$	$t_0 = 91.76$
p-value = 3.34.10-20	p-value = 1.14.10-19

Les p-value obtenues sont inférieures au seuil de signification α de 0,05, on rejette donc l'hypothèse H_0 et on conclut que les pentes β des 2 droites de régression sont significativement différentes de zéro.

- Test des ordonnées à l'origine : sont-elles proches de zéro ?

Les ordonnées à l'origine a de chacune des droites ont été comparées à 0 par un test de Student bilatéral sur le même principe que précédemment pour le test de la pente ($\alpha = 5\%$, $ddl = n-2 = 13$).

Les hypothèses sont les suivantes :

{ $H_0 : \alpha = 0$ } versus { $H_1 : \alpha \neq 0$ }

On calcule le t de Student tel que :

$$t = \frac{a}{\sqrt{s_a^2}}$$

Avec

$$s_a = \frac{s_y \sqrt{(1 - r^2) \cdot \sum x_i^2}}{s_x \sqrt{n \cdot (n - 2)}}$$

Tableau XVI. Résultats du test de Student sur l'ordonnée à l'origine α

Gamme avec le principe actif seul (PA)	Gamme avec le principe actif et excipients (Ex)
$s_a^2 = 96251743108$	$s_a^2 = 1.20011 \cdot 10^{11}$
$t_0 = 0.48$	$t_0 = -1.19$
p-value = 0.637	p-value = 0.255

Les p-values étant supérieures au seuil de signification α , on ne peut donc pas rejeter l'hypothèse H_0 , les ordonnées à l'origine α de chacune des droites ne sont donc pas significativement différentes de 0, au risque $\alpha = 5\%$.

- Test de la linéarité de la régression

Une analyse de variance, de type ANOVA, a été réalisée afin de vérifier la régression linéaire à l'aide du logiciel XLStat. Le test de Fisher a mis en évidence une p-value < 0.0001 , on en déduit qu'il n'y a pas d'écart significatif à la linéarité, la méthode est donc linéaire entre 20 et 100 $\mu\text{g/mL}$.

Tableau XVII. Résultats du test d'ANOVA

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	1	2671913328331860,000	2671913328331860,000	10178,533	< 0,0001
Erreur	13	3412561801108,760	262504753931,443		
Total corrigé	14	2675325890132960,000			

Calculé contre le modèle $Y = \text{Moyenne}(Y)$

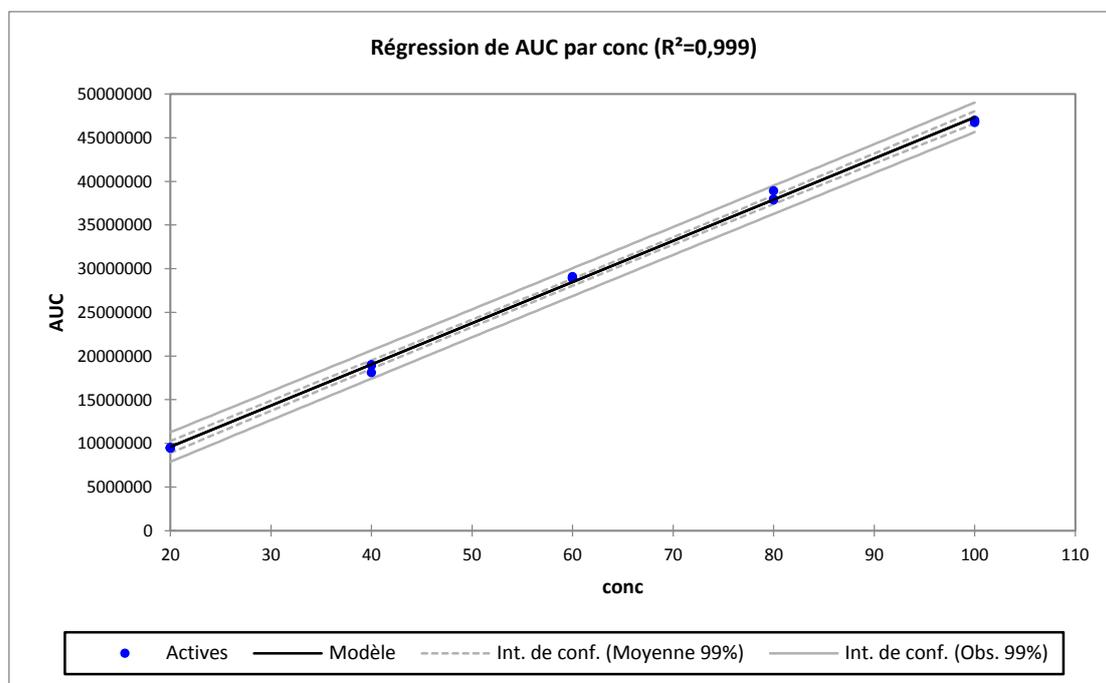


Fig. 20 Représentation de la régression de l'AUC par la concentration (XLStat)

IV.1.5 Exactitude

On travaille pour ce critère sur le taux de recouvrement, il est calculé pour chaque point ($n = 15$) des trois gammes réalisées avec le principe actif seul.

Tableau XVIII. Résultats de l'essai d'exactitude

X _{ij} (i = niveau de concentration / j = répétition)	Concentrations théoriques x _{ij} (µg/mL)	Concentrations recalculées ou prédites \hat{x}_{ij} à partir de l'équation de régression (µg/mL)	Taux de recouvrement R (%)
X ₁₁	20	19,55	97,78
X ₁₂	20	18,94	94,72
X ₁₃	20	19,44	97,23
X ₂₁	40	39,47	98,68
X ₂₂	40	40,59	101,48
X ₂₃	40	41,07	102,67
X ₃₁	60	60,81	101,36
X ₃₂	60	61,05	101,75
X ₃₃	60	60,84	101,39
X ₄₁	80	77,08	96,35
X ₄₂	80	80,92	101,15
X ₄₃	80	81,41	101,76
X ₅₁	100	99,01	99,01
X ₅₂	100	100,14	100,14
X ₅₃	100	99,66	99,66

- Homogénéité des variances des taux de recouvrement par le test de Cochran pour les variances extrêmes, équilibré, bilatéral, réalisé à l'aide du logiciel XLStat :

Tableau XIX. Résultats du test de Cochran

	Gamme avec le principe actif seul (PA)
C de Cochran	0,518
p-value (bilatéral)	0,446
α	0,05

Etant donné que la p-value calculée est supérieure au niveau de signification seuil alpha=0.05, on ne peut pas rejeter l'hypothèse nulle H₀ d'homogénéité des variances, les variances ne sont donc pas significativement différentes.

- Test de validité des moyennes :

Il s'agit de démontrer que les variances inter- et intra-groupes ne sont pas significativement différentes. Un test de Fisher est réalisé.

On calcule la valeur F de Fisher telle que :

$$F = \frac{S^2_{inter}}{S^2_{intra}}$$

Les résultats sont décrits dans le tableau XX.

Tableau XX. Résultats du test de Fisher

Variation	Somme des carrés des écarts	ddl	Variances	F
Inter-groupe	43,60	4	10,90	3,40
Intra-groupe	32,03	10	3,20	
Totale	75,63	14		

La valeur de F est inférieure au F ($\alpha = 0.05$, 4 et 10 ddl) retrouvée dans la table qui est de 3,478. On peut ainsi conclure à une différence non significative des variances inter et intra-groupes.

- Taux de recouvrement moyen

Le taux de recouvrement moyen calculé est de : 99,68%

Son intervalle de confiance à 95% de formule : $\bar{R} \pm \frac{t_{(\alpha;n-1).SR}}{\sqrt{n}}$ est de [98,39 ; 100,96], l'intervalle contenant la valeur 100%, on peut conclure à une conformité au critère d'exactitude.

IV.1.6 Fidélité

- Homogénéité des variances vérifiée à l'aide du test de Cochran

Les résultats du test de Cochran équilibré, bilatéral, réalisé sur chacun des niveaux de concentrations sont présenté dans le tableau XXIII.

Tableau XXI. Résultats des tests de Cochran.

	CQ25	CQ50	CQ75
C de Cochran	0,200	0,301	0,475
p-value	0,962	0,912	0,805
α	0,05	0,05	0,05

Les C calculés sont inférieurs au C de la table de Cochran qui est de 0,506. Les variances des 3 groupes de mesures ne sont donc pas significativement différentes, au risque alpha = 5%.

- Calcul des écart-types et coefficients de variation de répétabilité et de fidélité intermédiaire selon les formules suivantes :

- Formule de l'écart-type de fidélité intermédiaire

$$s_R = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^k (\bar{x}_i - \bar{x})^2}{n-1} + \left(1 - \frac{1}{r}\right) \cdot \frac{\sum_{i=1}^k s_i^2}{n}}$$

- Formule de l'écart-type de répétabilité

$$s_r = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^k Var_{\bar{x}_i}}{n}}$$

Avec :

$Var_{\bar{x}_i}$: Variance de la moyenne des répétitions pour un jour i donné (k = 5 jours)

\bar{x}_i : Moyenne des concentrations observées au jour i

\bar{x} : Moyenne de l'ensemble des concentrations observées pour un niveau de concentration

s_i : Variance intrasérie

Les résultats sont rassemblés dans le tableau XXIV.

Tableau XXII. Valeurs des écarts-type et CV de répétabilité et de fidélité intermédiaire

Concentrations testées	25µg/mL	50µg/mL	75µg/mL
Ecart-type de répétabilité (s_r)	0,542	1,212	0,869
CV de répétabilité (%)	2,110	2,370	1,130
Ecart-type de fidélité intermédiaire (s_R)	1,282	1,963	1,316
CV de fidélité intermédiaire (%)	4,990	3,840	1,720

Les coefficients de variation de répétabilité et de fidélité intermédiaire sont inférieurs à 5%, on peut donc conclure à la fidélité de la méthode de dosage.

Les mesures des différents contrôles qualité permettent de vérifier la validité des gammes au cours de l'étude. On observe une stabilité des valeurs de concentrations pour les CQ qui n'excèdent pas 10% d'écart par rapport à la valeur théorique.

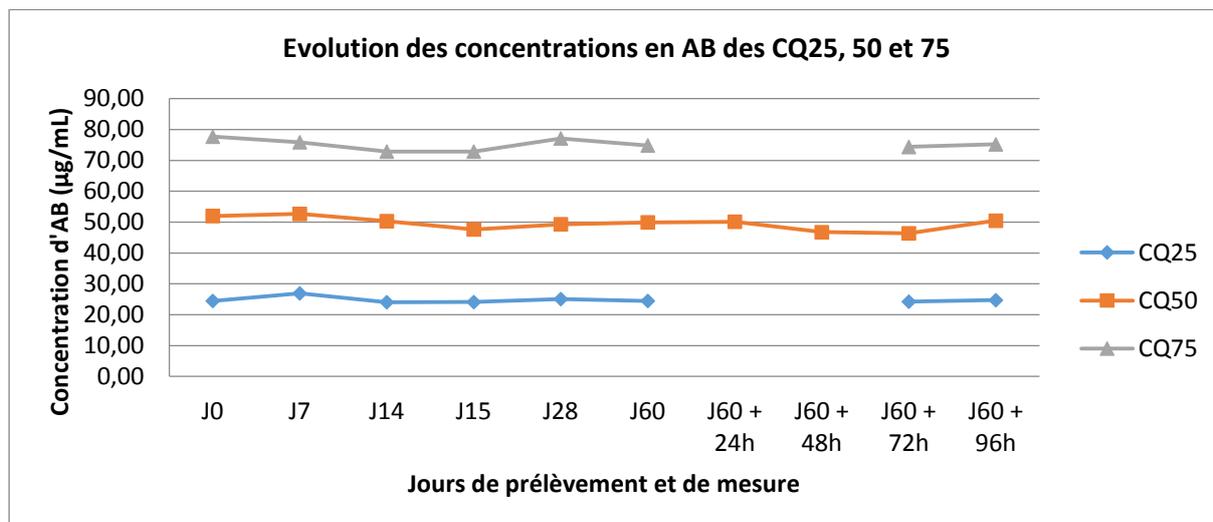


Figure 21. Evolution des concentrations d'AB des contrôles qualité au cours de l'étude

IV.2 Etude de stabilité

IV.2.1 Chimique

La figure ci-dessous illustre l'évolution de la moyenne des concentrations de chacun des trois flacons de collyre au long des 60 jours de l'étude, ainsi que pendant les 4 jours suivant la décongélation à J60.

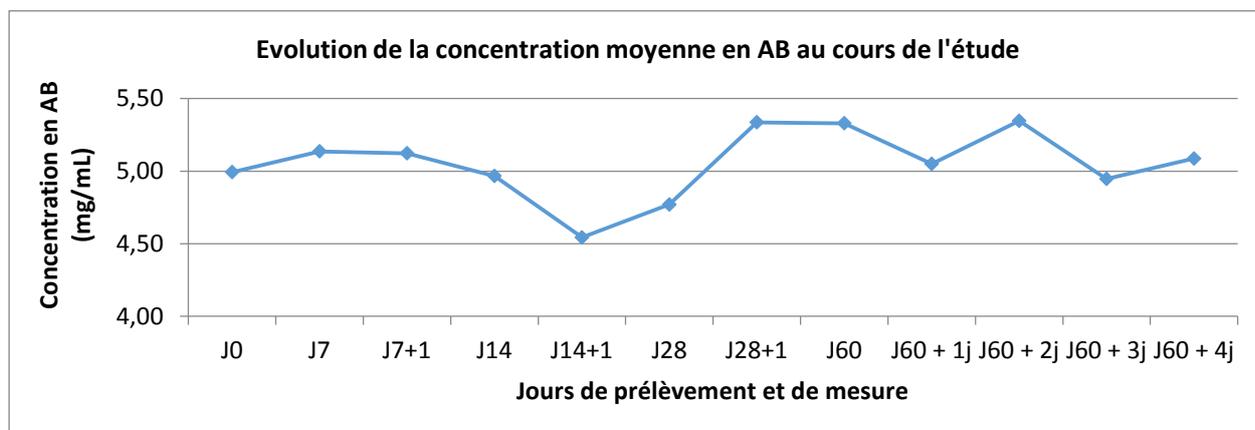


Fig. 22 Evolution de la concentration moyenne en AB au cours du temps

La concentration en AB ne varie pas de plus de 10% par rapport à la concentration initiale. La concentration moyenne retrouvée est de 5,00mg/mL (± 0.28 mg/mL).

Les variations de la concentration peuvent être expliquées par de multiples facteurs au moment des opérations de préparation du collyre, d'homogénéisation des flacons de collyre avant prélèvement, de prélèvements des échantillons, de dilutions avant dosage ...

IV.2.2 Physique

IV.2.2.1 Mesure du pH

La valeur moyenne de pH retrouvée est de 7,74 ($\pm 0,19$), les valeurs de pH s'étendent de 7,48 à 7,97.

Le pourcentage de variation du pH au cours des 2 mois de conservation par rapport à la valeur initiale à J0 n'excède pas 5%. L'évolution du pH est représentée dans la figure .

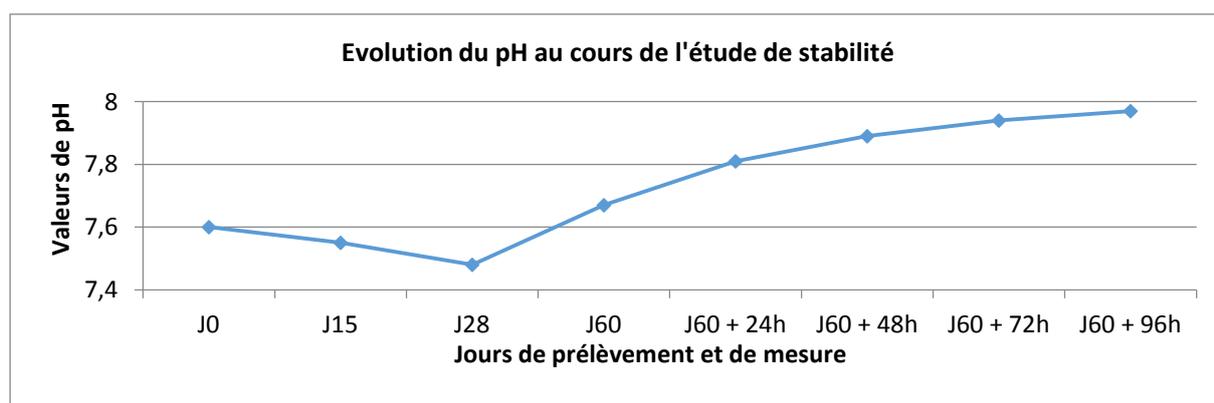


Fig. 23 Evolution du pH au cours de l'étude.

Le pH de la préparation est donc stable sur l'ensemble de la durée de l'étude.

IV.2.2.2 Osmolalité

La valeur moyenne d'osmolalité mesurée sur l'ensemble de la durée de l'étude est de 344,8mOsm/kg ($\pm 14,31$). Elle n'a pas varié de plus de 10% par rapport à la valeur initiale. On n'observe donc pas de variation significative de l'osmolalité lors des deux mois de conservation au congélateur de la préparation ni pendant les 4 jours de conservation au réfrigérateur qui suivent la décongélation.

IV.2.2.3 Coloration / Turbidimétrie

Le graphique ci-dessous représente l'évolution des valeurs d'absorbance retrouvées à différentes longueurs d'onde au cours de l'étude (Série 1 : $\lambda = 350\text{nm}$ / Série 2 : $\lambda = 410\text{nm}$ / Série 3 : $\lambda = 530\text{nm}$). Nous pouvons observer une très faible variation de ce paramètre permettant de conclure à une absence de changement de coloration du collyre au cours de la conservation.

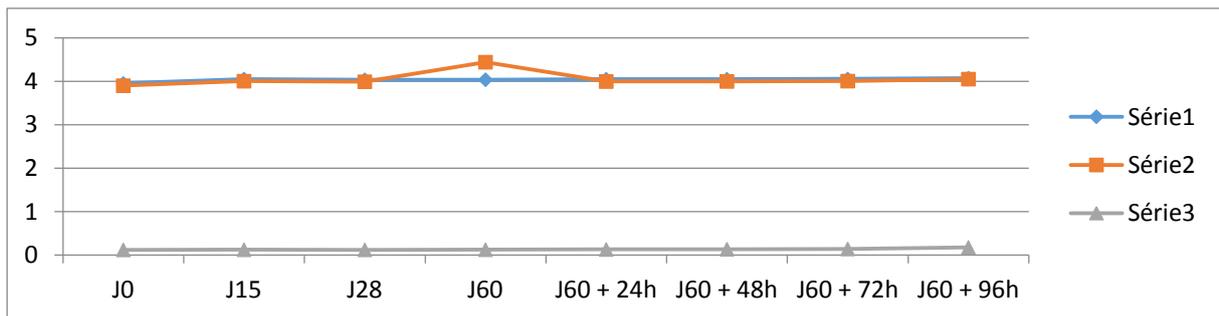


Fig. 24 Evolution des valeurs d'absorbance à 3 longueurs d'onde différentes au cours de l'étude

IV.2.3 Microbiologique

Les géloses MH2, MHS ainsi que le bouillon Schaedler sont restés stériles pendant les 48h d'incubation.

Les flacons Trypticase soja et Thioglycolate n'ont pas présenté de trouble au cours des 14 jours d'incubation.

Ainsi, que ce soit pour les flacons J0 (datés du jour de fabrication) et les flacons J0+4 (après 4 jours d'« utilisation »), aucune croissance microbienne n'a été observée.

V. Discussion

Comme lors de toute demande de préparation initiée par un prescripteur, la préparation du collyre à l'Amphotéricine B a été précédée d'une *étude de faisabilité*. Nous avons notamment étudié les alternatives disponibles.

Deux alternatives étaient envisageables :

- L'Ambisome® est une alternative plusieurs fois décrite pour la réalisation de ce collyre (21). Cependant, peu d'études publiées prouvent le réel avantage clinique de cette formulation liposomale. L'argument mis en avant dans les publications est la meilleure tolérance oculaire et donc une observance facilitée. Ces affirmations cependant ne s'appuient sur aucune donnée publiée ou essai clinique contrôlé, et nous n'avons, de plus, recensé aucun problème en termes d'administration auprès des patients suivis à la pharmacie et traités par le collyre préparé à partir de la Fungizone®. Enfin, la formulation liposomale ne serait pas plus avantageuse en termes de concentration retrouvée dans l'œil (24,25). L'Ambisome® est un produit en sus des GHS, c'est-à-dire soumis à la tarification à l'activité (T2A) et présente donc un coût nettement plus élevé que la Fungizone®. Il fait donc l'objet d'un suivi très important des indications dans lesquelles il est prescrit. La stabilité de la formulation liposomale au congélateur ainsi que de la faisabilité de son dosage en HPLC-UV sont autant d'interrogations supplémentaires qui font préférer la Fungizone®.

- La suspension ophtalmique de natamycine 5% (Natacyn®) distribuée par les laboratoires Alcon : il s'agit d'une spécialité avec Autorisation Temporaire d'Utilisation. Elle a un intérêt dans la kératite à *Fusarium* mais possède une très mauvaise pénétration transcornéenne.

Ce collyre est donc préparé à partir de la Fungizone® en l'absence de « spécialité adaptée » comme le souligne la définition de la préparation hospitalière selon le CSP, mentionnée en préambule.

Le choix de la forme topique plutôt qu'intraveineuse est guidé par la gravité de l'infection et présente de multiples avantages qui vont la faire préférer à la voie systémique : meilleure tolérance, diffusion faible systémique, risque de toxicité plus important par voie intraveineuse due à une demi-vie très longue. L'administration systémique, orale ou parentérale, permet en effet difficilement d'atteindre la concentration voulue dans l'œil, en raison de la barrière hémato-oculaire (26).

Les valeurs de pH et d'osmolalité ont été respectivement de 7,74 et 344,8 mOsm/kg au cours des 2 mois de conservation congelé. Elles sont restées stables au cours de l'étude et sont de plus compatibles avec une administration oculaire.

Dans l'idéal, un collyre doit s'approcher du pH physiologique des larmes. Le pH du liquide lacrymal est de l'ordre de 7,2-7,8 selon les auteurs, le pH du collyre doit donc être dans cette fourchette. Cependant, l'œil peut supporter des écarts supérieurs de pH, dans la mesure où le liquide lacrymal possède un pouvoir tampon (27). Ainsi l'œil tolère un pH de

3.5 à 10.5 pour les instillations de faibles volumes (28). 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 marquerait une modification de la solution initiale. Les valeurs du pH mesurées au cours de l'étude sont compatibles avec une instillation, puisqu'elles sont proches de la normalité et du pH du liquide lacrymal.

De même, sans douleur et dommage cellulaire au niveau oculaire, les pressions osmotiques de la solution ophtalmique peuvent varier de 240 à 550 mOsm/kg (27,29). Les valeurs mesurées pour notre collyre sur la durée de l'étude sont donc tout à fait tolérables au niveau oculaire.

La *méthode de dosage* décrite est spécifique, linéaire, exacte et fidèle. Elle a été validée et a donc pu être utilisée pour l'étude de stabilité, et sera utilisée ultérieurement pour les contrôles de teneur après la préparation des collyres et avant mise à disposition. Quelques sources ont pu orienter notre choix de conditions expérimentales (30–32), il a cependant été nécessaire de procéder à la validation du dosage dans nos conditions de travail propres. Quelques essais ont été nécessaires pour déterminer les volumes d'injection, les dilutions à réaliser, etc ... afin d'obtenir des chromatogrammes optimaux.

La pharmacopée décrit une méthode de dosage dans la monographie de l'amphotéricine B [01/2009 :1292], méthode qui utilise une colonne chromatographique semblable à la nôtre, mais utilise une phase mobile nettement plus complexe (mélange de méthanol, acétonitrile, acide citrique et ammoniacale concentrée) et en mode gradient au cours du temps. Nous avons choisi de simplifier cette méthode dans l'objectif de garder une composition relativement standardisée des phases mobiles au sein du laboratoire et plus facile à mettre en œuvre.

L'étude de stabilité démontre la stabilité chimique, physique et microbiologique du collyre pendant 2 mois. Elle nous permet ainsi d'allonger la durée de conservation de notre préparation de collyre à l'amphotéricine B 0,5%.

Les études de stabilité ont donc un réel intérêt pour le pharmacien dans sa pratique quotidienne. Sans celle-ci, la durée de stabilité d'une préparation se voit fixée arbitrairement selon la bibliographie, et souvent la plus courte possible. Il est de plus indispensable de se placer dans des conditions semblables à celles décrites pour pouvoir transposer les résultats, c'est-à-dire : même conditionnement primaire, même excipient, même concentration, même technique de préparation, etc ... donc en théorie peu applicable ! Cependant le

pharmacien doit souvent s'en contenter au moment de la demande pour la satisfaire le plus vite possible et dans l'intérêt du patient.

Nous avons choisis de nous affranchir de l'utilisation de *conservateurs* dans cette préparation. D'une part, les conservateurs sont sources de problèmes de tolérance, de complexité en termes de formulation (avec les risques d'interaction supplémentaires qu'apporte l'ajout d'un constituant) (33–35). D'autre part, la Pharmacopée européenne n'y oblige pas tant que le principe actif possède une activité antimicrobienne. L'amphotéricine B en elle-même présente une activité antimicrobienne. A cela s'ajoute la présence d'un excipient dans la spécialité de Fungizone® : l'acide desoxycholique, qui joue le rôle de tensioactif permettant la solubilisation de la molécule. Il possède également un rôle antiseptique qui est intéressant ici. Il s'agit d'un sel biliaire qui inhibe le développement des bactéries à Gram positif. Il est notamment utilisé pour compléter certaines géloses afin de mettre en évidence des entérobactéries (36,37). L'étude de la stabilité microbiologique pendant les 4 jours suivant la décongélation a de plus permis de démontrer que la préparation restait stérile au long des 4 jours d'utilisation.

La dispensation des préparations magistrales et hospitalières nécessite d'être accompagnée de *conseils* délivrés au patient, notamment pour garantir une *utilisation sûre* du flacon de collyre et une *bonne observance*.

Il convient de s'assurer dans un premier temps que les conditions de transport sont semblables à celles testées lors de l'essai de stabilité, en particulier chez le patient :

- La conservation congelée doit se faire dans un congélateur et non dans un freezer, qui avoisine plutôt les -6°C, voire -18°C ;
- En ce qui concerne la conservation au réfrigérateur, il est préférable d'éviter le bac à légumes ainsi que la porte où les températures sont de l'ordre de +8°C ou plus.

De plus, en raison du risque microbiologique que représenterait une éventuelle contamination d'une préparation ophtalmique, il est très important d'insister auprès du patient sur quelques règles essentielles à une utilisation optimale de son traitement. Au préalable, il est indispensable :

- De réaliser un lavage des mains pendant 30 secondes à l'eau et au savon, ou de réaliser une friction avec une solution hydro-alcoolique ;
- De préparer le matériel nécessaire sur une surface propre ou protégée par un essuie-main en papier propre : compresses, flacon de collyre (après avoir pris soin de vérifier la date de péremption ou que le flacon n'est pas ouvert depuis plus de 4 jours).

Enfin, lors de l'instillation elle-même, il s'agit de transmettre au patient quelques règles de base, comme :

- Ne pas toucher l'œil avec les doigts,
- Ne pas toucher l'embout du flacon avec les doigts,
- Ne pas toucher l'œil ou la paupière avec l'embout du flacon en plaçant par exemple le flacon de médicament sur l'arête nasale,
- Eviter de poser le bouchon de l'embout compte-gouttes, ou le cas échéant sur une surface propre.

L'instillation est à réaliser dans le cul de sac conjonctival.

Pour allonger le temps de contact du médicament et limiter au maximum une élimination trop rapide, le patient peut fermer les yeux pendant 60 secondes et appuyer en même temps sur l'angle interne de l'œil (aussi appelé canthus médial) de manière à obstruer le point lacrymal. Il a en effet été démontré que l'occlusion manuelle du point lacrymal ou des paupières amélioreraient de 46% le taux d'absorption du médicament (26,38).

Si plusieurs traitements en instillation sont prescrits, il convient de respecter l'ordre dans lesquels ils ont été prescrits ainsi qu'un intervalle de 5 minutes entre chaque administration.

Les multiples facettes du pharmacien hospitalier sont ainsi très bien représentées dans ce travail : que ce soit en termes de pharmacotechnie, de pharmacie clinique ou de conseils accompagnant chacune des dispensations. Il est en effet impliqué dans la mise au point de nouvelles formulations et dans le développement de nouvelles techniques analytiques (dans le cadre d'étude de stabilité, de contrôle de teneur). Il est de son devoir également de vérifier que la thérapeutique s'inscrit dans le cadre des consensus et des recommandations en termes de prise en charge. Cette responsabilité est d'autant plus justifiée lors de la réalisation de préparations magistrales et hospitalières, dont la fabrication est précédée d'une étude de faisabilité (absence de spécialité adaptée, intérêt dans la prise en charge du patient). Il a enfin un rôle crucial dans les conseils donnés au patient. Il vérifie ainsi la bonne compréhension du traitement, laquelle contribuera à une meilleure adhérence du patient au traitement qui va de paire avec l'efficacité et la réussite de la thérapeutique mise en place.

VI. Références bibliographiques

1. Zaouali S, Ben yahia S., Zaafour T, Khammari C, Jenzeri S, Zeghidi H, et al. 210 Kératites fongiques : aspects cliniques, thérapeutiques et pronostiques. À propos de 26 cas. J Fr Ophtalmol. 2005 Mar;28, Supplement 1(0):208.
2. Rapport d'enquête sur les kératites graves chez les porteurs de lentilles de contact [Internet]. [cited 2014 Aug 6]. Available from: file:///D:/Documents%20and%20Settings/SERVICE_0633/Mes%20documents/Downloads/Rapport-enquete-keratites-porteurs-de-lentilles-de-contact.pdf
3. Kaswin G., Labetoulle M. Mycoses oculaires : quand faut-il y penser ? Réal Ophtalmol [Internet]. 2012 Fev [cited 2014 Sep 3];190. Available from: <http://realites-ophtalmologiques.com/mycoses-oculaires-quand-faut-il-y-penser/>
4. Kodjikian L, Sève P. Oeil et Maladies systémiques. Lavoisier; 2013. 564 p.
5. Bourcier T, Sauer A, Letscher-Bru V, Candolfi E. Kératites fongiques. J Fr Ophtalmol. 2011 Oct;34(8):563–7.
6. Rondeau N, Bourcier T, Chaumeil C, Borderie V, Touzeau O, Scat Y, et al. Les kératomycoses au Centre Hospitalier National d'Ophtalmologie des Quinze-Vingts. J Fr Ophtalmol [Internet]. 2002 [cited 2014 Aug 14]; Available from: <http://www.em-consulte.com/en/article/112477>
7. Bourcier T, Chaumeil C. Prescrire les collyres antifongiques et antiambiens. J Fr Ophtalmol. 2007 Apr;30(4):431–5.
8. Upadhyay MP, Srinivasan M, Whitcher JP. Prise en charge de la kératite suppurative. Rev Santé Ocul Communaut. 2011 Jan 9;8(9):6–8.
9. O'Day DM, Head WS, Robinson RD, Clanton JA. Corneal penetration of topical amphotericin B and natamycin. Curr Eye Res. 1986 Nov;5(11):877–82.
10. O'Day DM, Head WS, Robinson RD, Clanton JA. Bioavailability and penetration of topical amphotericin B in the anterior segment of the rabbit eye. J Ocul Pharmacol. 1986;2(4):371–8.
11. Peduzzi M, Debbia A, Monzani A. Ocular Anatomy and Physiology: Its Relevance to Transcorneal Drug Absorption and to Vehicle Effects. In: Saettone M, Bucci M, Speiser P, editors. Ophthalmic Drug Delivery [Internet]. Springer New York; 1987. p. 1–5. Available from: http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4757-4175-9_1
12. RBP ophtalmologie, argumentaire - 2004-atb-locale-OPH-argu-afssaps.pdf [Internet]. [cited 2014 Aug 18]. Available from: http://www.infectiologie.com/site/medias/_documents/consensus/2004-atb-locale-OPH-argu-afssaps.pdf
13. Samet-Tran I, Saleh M, Sauer A, Bourcier T. Injections intrastromales d'agents anti-infectieux. Réflex Ophtalmol. 2012 Dec;160.
14. Lee VH, Robinson JR. Topical ocular drug delivery: recent developments and future challenges. J Ocul Pharmacol. 1986;2(1):67–108.
15. Tawfik-Schlieper H. Chapter 4: Requirements Concerning Antiseptics for Periorbital, Orbital and Intraorbital Application. 4.4.: Pharmacokinetics of Ophthalmic Drugs. In: Kramer A, Behrens-

- Baumann W, editors. *Developments in Ophthalmology* [Internet]. Basel: KARGER; 2002 [cited 2014 Aug 14]. p. 66–84. Available from: <http://www.karger.com/doi/10.1159/000065921>
16. Trejo WH, Bennett RE. *Streptomyces nodosus* sp. n., the amphotericin-producing organism. *J Bacteriol.* 1963 Feb;85:436–9.
 17. DrugBank: Amphotericin B (DB00681) [Internet]. [cited 2014 Jul 30]. Available from: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00681>
 18. Ghannoum MA, Rice LB. Antifungal Agents: Mode of Action, Mechanisms of Resistance, and Correlation of These Mechanisms with Bacterial Resistance. *Clin Microbiol Rev.* 1999 Oct;12(4):501–17.
 19. Norman AW, Demel RA, de Kruyff B, Geurts van Kessel WS, van Deenen LL. Studies on the biological properties of polyene antibiotics: comparison of other polyenes with filipin in their ability to interact specifically with sterol. *Biochim Biophys Acta.* 1972 Dec 1;290(1):1–14.
 20. Achach K, Peroux E. Solutions ophtalmiques renforcées en antibiotiques : étude de stabilité. *J Pharm Clin.* 1999 Mar;18(1):65–6.
 21. Husson M. Préparations hospitalières ophtalmiques : fabrications et utilisations thérapeutiques. Dossier du CNHIM n°1; 2012.
 22. Peyron F, Ibrahim E, Elias R, Bues-Charbit M, Balansard G. Étude de stabilité de collyres renforcés à l'amphotéricine B, à la ceftazidime et à la vancomycine. *J Pharm Clin.* 1999;18:48–52.
 23. Brossard D, Chedru-Legros V, Crauste-Manciet S, Fleury-Souverain S, Lagarce F, Odou P, et al. Guide méthodologique des études de stabilité des préparations_Partie 1 Préparations liquides. SFPC/GERPAC; 2013.
 24. Pleyer U, Grammer J, Pleyer JH, Kosmidis P, Friess D, Schmidt KH, et al. Amphotericin B--bioavailability in the cornea. Studies with local administration of liposome incorporated amphotericin B. *Ophthalmol Z Dtsch Ophthalmol Ges.* 1995 Aug;92(4):469–75.
 25. Ebrahim S, Peyman GA, Lee PJ. Applications of liposomes in ophthalmology. *Surv Ophthalmol.* 2005 Apr;50(2):167–82.
 26. Bänninger PB, Becht CN. Comment un médicament atteint-il son site d'action dans l'oeil ? *Forum Med Suisse.* 2011;11(11):192–5.
 27. Chédru-Legros V, Fines-Guyon M, Chérel A, Perdriel A, Albessard F, Debruyne D, et al. Stabilité à – 20°C des collyres antibiotiques renforcés (amikacine, ceftazidime, vancomycine). *J Fr Ophtalmol.* 2007 Oct;30(8):807–13.
 28. Sourdeau P, Evrard J-M, Remy G, Hecq J-D. Stabilité physico-chimique de solutions ophtalmiques renforcées prêtes à l'emploi : une revue de la littérature. *Ann Pharm Fr.* 2012 Mar;70(2):104–12.
 29. McNab AA. Lacrimal canalicular obstruction associated with topical ocular medication. *Aust N Z J Ophthalmol.* 1998 Aug;26(3):219–23.
 30. Lue LP, Hadman ST, Vancura A. Liquid chromatographic determination of amphotericin B in different pharmaceuticals. *J AOAC Int.* 2002 Feb;85(1):15–9.

31. Gaïes E, Ben Ali R, Trabelsi S, Jebabli N, Salouage I, Charfi R, et al. Mise au point et validation d'une méthode de dosage de l'amphotéricine B par chromatographie liquide à haute performance. *Rev Francoph Lab*. 2013 Feb;2013(449, Part 1):67–70.
32. Espada R, Josa JM, Valdespina S, Dea MA, Ballesteros MP, Alunda JM, et al. HPLC assay for determination of amphotericin B in biological samples. *Biomed Chromatogr BMC*. 2008 Apr;22(4):402–7.
33. Chibret H. Ophthalmic preservatives and preparations: reality and perspectives. *Ann Pharm Fr*. 1997;55(5):228–31.
34. Sklupalová Z. Antimicrobial agents in eyedrops. *Ceská Slov Farm Cas České Farm Spolecnosti Slov Farm Spolecnosti*. 2004 May;53(3):107–16.
35. Baudouin C. Allergic reaction to topical eyedrops. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2005;5(5):459–63.
36. Leyral G, Vierling É. *Microbiologie et toxicologie des aliments: Hygiène et sécurité alimentaires*. Wolters Kluwer France; 2007. 292 p.
37. Biochimie - Les acides biliaries [Internet]. [cited 2014 Sep 7]. Available from: http://www-lemm.univ-lille1.fr/biologie/biochim/co/ch3_04_2.html
38. Zimmerman TJ, Zalta AH. Facilitating patient compliance in glaucoma therapy. *Surv Ophthalmol*. 1983 Dec 1;28:252–7.

VII. Résumé et mots clés

STABILITY OF FROZEN 0.5% (w/v) AMPHOTERICIN B EYE DROP SOLUTION

Background and Objective:

Amphotericin B ophthalmic solutions, manufactured by the Hospital Pharmacy, are regularly administered as treatment for fungal keratitis. Until now, the stability of Amphotericin B ophthalmic solution has only been shown under refrigerated conditions and for a short period. We performed a stability study in order to assess its stability in the freezer (-20°C) over 2 months and for a further use during 4 days at 4-8°C. Such a stability length could allow us to prepare this compounding preparation beforehand, it would also facilitate the distribution and speed up the provision in order to begin the treatment as early as possible.

Setting and Method:

The quantitative analysis was performed with a HPLC-UV method previously validated according to ICH guidelines (the method has been tested in terms of specificity, linearity, accuracy and fidelity). The 0,5% (w/v) Amphotericin B eye drops were prepared from the branded product and diluted with glucose 5% and sodium carbonate, and performed according to recommendations for aseptic preparation. The vials were then placed at -20°C (monitored) and stored for up to 60 days, protected from light. Vials were analysed at 0, 7, 15, 30 days. The stability study has been conducted according to SFPC and Gerpac's Guidelines for Stability Study. After 30 and 60 days, the vials were also stored for the 4 following days under refrigerated conditions to mimic the use by the outpatients and then subsequently analysed each of these days.

Chemical stability was assessed when less than 10% difference from initial concentration was observed. Physical stability was assessed using visual inspection, osmolality, coloration using UV-Visible spectrophotometry and pH assay. As high microbiological risk compounding preparation, the sterility has also been assessed in Pharmacopoeia broths (Thioglycolate and Trypticase soja).

Results:

There were no significant differences before the storage and after 7, 15, 30 and 60 days of freezing in the concentration ($0.49 \text{ w/v} \pm 0.029$), osmolality ($344.40 \text{ mOsm/kg} \pm 14.31$), turbidimetry and pH (7.76 ± 0.17) of the solutions. There were no significant differences either in the concentration and physical parameters during the 4-days storage under refrigerated conditions.

Conclusion:

Amphotericin B eye drops can be stored for 60 days at -20 °C. After this time, these eye-drops should be stored at 4°C and safely used during 4 days following vial opening, provided it is properly used and stored.

Key words : Amphotericin B, Ophthalmic solutions, Drug stability, Keratitis, Therapeutics

VIII. ANNEXES

Annexe 1 : « Résultats obtenus lors de l'essai de fidélité »

ANNEXE 1

Jour	CQ	Nombre d'échantillon	MOYENNE ($\mu\text{g/mL}$)	Ecart-type	CV (%)
1	CQ25	6	25,12	0,59	2,35
1	CQ50	6	52,28	0,30	0,57
1	CQ75	6	77,66	0,28	0,36
2	CQ25	6	24,77	0,18	0,71
2	CQ50	6	52,35	0,61	1,17
2	CQ75	6	76,64	0,67	0,87
3	CQ25	6	26,96	0,87	3,22
3	CQ50	6	49,41	1,60	3,25
3	CQ75	6	74,96	1,58	2,10
4	CQ25	6	27,16	0,36	1,33
4	CQ50	6	52,76	0,90	1,71
4	CQ75	6	75,85	2,59	3,41
5	CQ25	6	24,94	0,60	2,40
5	CQ50	6	49,25	1,81	3,68
5	CQ75	6	77,16	0,86	1,11

NB : Les coefficients de variation (CV) pour chacun des critères sont < 5%

SERMENT DE GALIEN

En présence de mes maîtres et de mes condisciples, **je jure** :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité, 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 et méprisé de mes confrères si je manque à mes engagements.