

**UNIVERSITE TOULOUSE III PAUL SABATIER
FACULTE DE SANTE
DEPARTEMENT DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES**

ANNEE: 2022

THESE 2022 TOU3 2073

THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement
par

Roxanne Audrey Jennifer DESQUINES

Née le 17 septembre 1993, à Toulouse (31)

**SPIRONOLACTONE EN PEDIATRIE: NECESSITE D'UNE FORME GALENIQUE
ADAPTEE ET DEVELOPPEMENT D'UNE NOUVELLE FORMULATION GALENIQUE
DE SUSPENSION BUVABLE**

Date de soutenance : 20 octobre 2022

Directeur de thèse : Dr Camille JURADO

JURY

Président : Pr Brigitte SALLERIN
1^{er} assesseur : Pr Pascal ODOU
2^{ème} assesseur : Dr Caroline VIARD
3^{ème} assesseur : Dr Pauline CLARAZ
4^{ème} assesseur : Dr Camille JURADO

PERSONNEL ENSEIGNANT
du Département des Sciences Pharmaceutiques de la Faculté de santé
au 4 avril 2022

Professeurs Emérites

Mme BARRE A.	Biologie Cellulaire
M. BENOIST H.	Immunologie
M. BERNADOU J.	Chimie Thérapeutique
M. CAMPISTRON G.	Physiologie
Mme NEPVEU F.	Chimie analytique
Mme ROQUES C.	Bactériologie - Virologie
M. ROUGE P.	Biologie Cellulaire
M. SALLES B.	Toxicologie

Professeurs des Universités

Hospitalo-Universitaires

Mme AYYOUB M.	Immunologie
M. CESTAC P.	Pharmacie Clinique
M. CHATELUT E.	Pharmacologie
Mme DE MAS MANSAT V.	Hématologie
M. FAVRE G.	Biochimie
Mme GANDIA P.	Pharmacologie
M. PARINI A.	Physiologie
M. PASQUIER C.	Bactériologie - Virologie
Mme ROUSSIN A.	Pharmacologie
Mme SALLERIN B.	Pharmacie Clinique
M. VALENTIN A.	Parasitologie

Universitaires

Mme BERNARDES-GENISSON V.	Chimie thérapeutique
Mme BOUTET E.	Toxicologie - Sémiologie
Mme COUDERC B.	Biochimie
M. CUSSAC D. (Vice-Doyen)	Physiologie
M. FABRE N.	Pharmacognosie
Mme GIROD-FULLANA S.	Pharmacie Galénique
M. GUIARD B.	Pharmacologie
M. LETISSE F.	Chimie pharmaceutique
Mme MULLER-STAU MONT C.	Toxicologie - Sémiologie
Mme REYBIER-VUATTOUX K.	Chimie analytique
M. SEGUI B.	Biologie Cellulaire
Mme SIXOU S.	Biochimie
M. SOUCHARD J-P.	Chimie analytique
Mme TABOULET F.	Droit Pharmaceutique

Maîtres de Conférences des Universités

Hospitalo-Universitaires		Universitaires	
M. DELCOURT N.	Biochimie	Mme ARELLANO C. (*)	Chimie Thérapeutique
Mme JUILLARD-CONDAT B.	Droit Pharmaceutique	Mme AUTHIER H.	Parasitologie
Mme KELLER L.	Biochimie	M. BERGE M. (*)	Bactériologie - Virologie
M. PUISSET F.	Pharmacie Clinique	Mme BON C. (*)	Biophysique
Mme ROUCH L.	Pharmacie Clinique	M. BOUJILA J. (*)	Chimie analytique
Mme ROUZAUD-LABORDE C	Pharmacie Clinique	M. BROUILLET F.	Pharmacie Galénique
Mme SALABERT A.S.	Biophysique	Mme CABOU C.	Physiologie
Mme SERONIE-VIVIEN S (*)	Biochimie	Mme CAZALBOU S. (*)	Pharmacie Galénique
Mme THOMAS F. (*)	Pharmacologie	Mme CHAPUY-REGAUD S. (*)	Bactériologie - Virologie
		Mme COLACIOS C.	Immunologie
		Mme COSTE A. (*)	Parasitologie
		Mme DERA EVE C. (*)	Chimie Thérapeutique
		Mme ECHINARD-DOUIN V.	Physiologie
		Mme EL GARAH F.	Chimie Pharmaceutique
		Mme EL HAGE S.	Chimie Pharmaceutique
		Mme FALLONE F.	Toxicologie
		Mme FERNANDEZ-VIDAL A.	Toxicologie
		Mme GADEA A.	Pharmacognosie
		Mme HALOVA-LAJOIE B.	Chimie Pharmaceutique
		Mme JOUANJUS E.	Pharmacologie
		Mme LAJOIE-MAZENC I.	Biochimie
		Mme LEFEVRE L.	Physiologie
		Mme LE LAMER A-C. (*)	Pharmacognosie
		M. LE NAOUR A.	Toxicologie
		M. LEMARIE A.	Biochimie
		M. MARTI G.	Pharmacognosie
		Mme MONFERRAN S	Biochimie
		M. PILLOUX L.	Microbiologie
		M. SAINTE-MARIE Y.	Physiologie
		M. STIGLIANI J-L.	Chimie Pharmaceutique
		M. SUDOR J. (*)	Chimie Analytique
		Mme TERRISSE A-D.	Hématologie
		Mme TOURRETTE-DIALLO A. (*)	Pharmacie Galénique
		Mme VANSTEELANDT M.	Pharmacognosie
		Mme WHITE-KONING M. (*)	Mathématiques

(*) Titulaire de l'habilitation à diriger des recherches (HDR)

Enseignants non titulaires

Assistants Hospitalo-Universitaires		Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche (ATER)	
M. AL SAATI A	Biochimie	Mme AMRANE Dyhia	Chimie Thérapeutique
Mme BAKLOUTI S.	Pharmacologie		
Mme CLARAZ P.	Pharmacie clinique		
Mme CHAGNEAU C.	Microbiologie		
Mme LARGEAUD L	Immunologie		
M. LE LOUEDEC F.	Pharmacologie		
Mme STRUMIA M.	Pharmacie clinique		
Mme TRIBAUDEAU L.	Droit Pharmaceutique		

REMERCIEMENTS

Aux membres du jury :

Madame la Présidente Brigitte SALLERIN, je vous remercie de m'avoir fait l'honneur d'accepter de présider ce jury et vous suis reconnaissante d'avoir coordonné mon parcours internat et de m'avoir soutenue dans mon projet avorté d'inter-CHU à Montréal.

Monsieur le Professeur Pascal ODOU, je suis honorée que vous ayez accepté de juger ce travail et vous témoigne toute ma gratitude pour vos recommandations d'une grande aide pour optimiser la formulation galénique.

Madame le Docteur Caroline VIARD, je te remercie d'avoir accepté de prendre part à ce jury et de m'avoir appris toute la complexité de la population pédiatrique. Je n'oublierai jamais ta disponibilité notamment en ce qui concerne les appels en garde.

Madame le Docteur Pauline CLARAZ, je te remercie d'avoir accepté de prendre part à ce jury et d'avoir partagé avec moi les prémices de mon internat en tant que FFI.

Madame le Docteur Camille JURADO, je te remercie d'avoir été à l'initiative de ce projet. Merci pour la confiance que tu m'as accordée en me proposant ce travail et je te suis reconnaissante pour ta gentillesse, tes conseils et ta disponibilité.

Je remercie toutes les personnes ayant participé de près ou de loin à ce projet :

Céline VERDIER et **Thibaut JAMME** en biochimie sur Purpan et Rangueil pour leur collaboration dans la mesure de l'osmolalité.

Acil JAAFAR du service des Explorations Fonctionnelles Physiologiques pour sa collaboration dans la mesure de la densité.

Camille CHAGNEAU et **Laurent CAVALIE** du service de Bactériologie Hygiène pour leur collaboration à l'étude de stabilité microbiologique.

Sandrine CAVALIE et **Fabien BROUILLET** du service de galénique de la Faculté des Sciences pharmaceutiques de Toulouse pour leur collaboration dans la mesure de la viscosité.

A l'ensemble du **personnel soignant de la réanimation néonatalogie et des soins intensifs** de néonatalogie pour leur participation à l'étude sur la dose administrée théorique d'une suspension buvable de spironolactone.

Thomas LANOT pour son aide et sa disponibilité pour toutes les questions qu'on a eues concernant le dosage et l'HPLC.

Pierre VERHAEGHE pour avoir pris le temps de répondre à mes questions toujours plus nombreuses.

Fabrice PIROT pour avoir pris le temps de répondre à mes questions

Romain GALLISSOT pour avoir accepté d'utiliser les résultats de son travail avec les services de réanimation et de soins intensifs dans ce projet de thèse

Zoubeir RAMJAUN pour ses conseils. Outre ce projet de thèse, merci de m'avoir donné envie de me diriger vers la pharmacotechnie. C'est toujours un plaisir de travailler avec toi et d'apprendre au travers de ton expérience. Tu es un puit de connaissances !

A tous les co-internes avec qui j'ai pu travailler :

A la team de Limoges, **Khévin (alias Keen'V)**, **Sarah**, **Wendy (alias Wendoche)** , **Stéphanie** et **Yoann**

Khévin et Sarah N merci pour les sessions ragots au McDo!

Wendy, ma tahitienne préférée. Merci pour ta bonne humeur et ton esprit visionnaire à voler un carton de SHA un an avant la pandémie covid #connaispaslarupture. A chaque fois que j'entends Aya Nakamura je pense à toi.

Stéphanie, merci pour ton oreille attentive et ton soutien.

Yoann, merci pour ton humour sarcastique. J'ai attendu d'être à Limoges pour te connaître et c'est dommage. On peut toujours compter sur toi. #baseaccessforever

A la team Rangueil (covid et gastro), **Lucile, Solène S, Clara, Solène I, Cyrielle, Claire, Pauline**
Quel semestre! Ces 7 mois de stage ont été « presque » un vrai plaisir en votre compagnie. Grace à vous, je garde malgré tout un bon souvenir de cette période difficile. On se souviendra des fameux sandwiches pâté beurre, des séances de sport de 5min, de notre aide ultime pour les services en période covid #voussavezpasfaireaveclesservices.

J'ai essayé de vous divertir au maximum avec mes embrouilles téléphoniques.

Ps : pas de question par curiosité, svp.

A la team UMFA, **Marianne et Jamal**

Merci de m'avoir laissée râler dans mon coin et d'attendre patiemment que la tempête se calme. Ce fut un stage intense. Merci pour votre bonne humeur.

A la team Neuro, **Chloé, Justine et Mehdi**

Merci de m'avoir acceptée avec un peu de retard dans votre bureau. J'ai découvert qu'on avait tous une passion commune : la nourriture. Que ce soit celle du relais H ou celle des restaurants qu'on se fait régulièrement. Hâte de faire le prochain escape game !

Merci les filles (et Rémimi) pour ce voyage en Crète. J'espère que ce n'est que le début.

A la team loft de l'UPCO, **Solène, Pauline, Léa et Claudia**

Merci les filles pour votre entraide et notre solidarité tout au long de ce stage. Ce stage n'a pas toujours été facile mais derrière les coups de gueule de Solène et moi, il y avait quand même beaucoup de rires. Merci d'avoir rendu ce stage meilleur.

A la team Logipharma, **Léa S, Sammy, Lucile, Audrey, Thomas et Léa V**

Merci d'avoir partagé avec moi les fameux plateaux repas de logi (vive les pasta box). Merci d'avoir supporté les nombreux gros mots entre Sammy et moi. Merci aux DM pour m'avoir laissée me réchauffer dans votre bureau.

A la team de préparatrices à Logipharma, **Aude, Stéphanie et Aurore**

Merci les filles pour la super ambiance ! On aura bien rigolé con. Vous êtes des filles super, ne changez pas. C'est un plaisir de travailler avec vous.

A la team du bâtiment Lavoisier, **Pauline, Aglaé, Aurélie et Nicolas (alias José)**

Merci de partager avec moi ce dernier stage.

Merci Agla pour ton dossier « autre » sur le serveur qui me fait beaucoup rire.

Merci Aurélie pour m'avoir laissé du temps pour ma thèse, pour m'avoir aidé en informatique.

On se souviendra tous de ta facilité à dire « j'en ai rien à foutre ».

Merci José Boulet pour m'avoir supporté moi et mes nombreuses attaques à ton encontre.

Merci Pauline pour ton soutien et pour ton répertoire musical digne d'une personne âgée (sauf en ce qui concerne Disney bien sûr).

A mes camarades de promo :

A **Maeva**, ma meilleure pote de PACES

Merci de m'avoir permis de garder un très bon souvenir de la PACES, à toutes les personnes en amphi qu'on a renommées... Merci d'être ma confidente toujours bienveillante.

Et surtout merci d'avoir accepté d'aller te les peler en Laponie alors que tu es frileuse (clairement le voyage le plus appréciable avant le début des confinements).

A **Laurène**, mon binôme de TP

Merci de m'avoir fait découvrir ce que c'est d'avoir un bon partenaire de TP. Merci de t'être occupé des calculs de dilution et de m'avoir laissé manipuler.

A **Nastassia**, alias Nastacrotte

Merci de m'avoir accompagné pendant ces études de pharma et de m'avoir toujours offert un hébergement post soirée. Quel est le meilleur souvenir de ces soirées ? Le rock n roll avec JB ? Le karaoké à 3h du matin pour tes voisins ? Thomas qui attend encore qu'on vienne prendre la relève avec Gabi ? L'after improbable chez des potes à Aurélien ? ^^ Il y en a beaucoup trop !

A Victor, Vincent et Mélanie, ma team révision internat

Merci de m'avoir accompagnée pendant les révisions de l'internat. Sans vous les choses n'auraient pas été pareilles. J'ai tenu moralement grâce à vous.

Je ne te remercierai jamais assez Victor de m'avoir accompagnée à Rungis pour ne pas me lâcher au dernier moment.

Je me souviendrai toujours que c'est toi Mélanie qui m'a annoncé qu'on avait réussi le concours. Je me rappelle encore cette conversation : « tu es sûre que c'est bien moi ? ».

Heureusement que tu n'es pas partie de Rungis.

On ne remercie pas Vincent pour ses mephisto.

A Claire H, ma conseillère en para préférée

Merci de toujours rire à mes blagues nulles sur le caca. Merci pour ton compte instagram qui me fait voyager et ton compte snap qui me fait mourir de rire (« est-ce cette dame qui a pété ? »).

A Sarah N, ma biologiste préférée

Merci pour m'avoir suivie et supportée dans ce road trip incroyable au Canada (J2 : RIP à la louche); Merci pour toutes tes expressions atypiques et imagées qui me font toujours rire.

Merci d'être toujours de très bons conseils, que ce soit pour des conseils pro ou perso (principalement du type « tu t'en bats les couilles »). Et surtout merci pour ton fameux fou rire sur la vidéo du feu d'artifice dans un gymnase.

A mes amis d'enfance :

A Johanna, mon amie d'enfance,

Merci pour ta folie, ta joie de vivre et tes potins sur tout et tout le monde.

Tu as surmonté avec courage et beaucoup de force des épreuves difficiles et tu as tout mon respect pour cela.

A **Aurélié**, ma meilleure amie

Merci pour ton soutien tout au long de ces années (on ne compte même plus à ce stade), pour cette complicité qui résiste à la distance. Merci pour tous les moments improbables qu'on a pu vivre ensemble (comme le fait de me retrouver à l'église un mardi soir).

Merci pour tes merveilleux enfants grâce à qui j'ai pu acquérir de l'expérience, ce qui m'a servi pour m'occuper de mon neveu.

Tu es la famille que j'ai choisie.

A ma famille :

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

Merci pour tous les moments heureux passés et à venir. Si j'en suis là c'est aussi grâce à votre soutien. Vous ne m'entendrez plus dire « je ne peux pas, je dois réviser ».

A toi Stéphanie, qui a su rester forte face à la SPA sans jamais te laisser abattre.

Une pensée particulière à Mémé Rose qui nous manque tant <3

A **Carole**, ma belle-sœur,

Merci de m'avoir chouchoutée pendant les 2 semaines où vous étiez à la maison cet été pour me laisser me consacrer à la thèse. Et merci pour mon adorable neveu et ta merveilleuse fille.

A **William**, mon frère

Merci pour ton soutien, merci de m'avoir toujours protégé et merci pour nos nombreuses chamailleries (pardon papa et maman) . Mais surtout merci pour mon neveu qui est beaucoup trop mignon.

A mes Parents,

Merci pour votre soutien, votre amour inconditionnel et pour votre patience pendant les périodes difficiles des concours. Ma réussite est aussi votre réussite. Je n'aurais pu rêver meilleurs parents (ce n'est pas pour rien que je vis encore chez vous).

Bref merci d'être vous.

Table des matières

REMERCIEMENTS	5
LISTE DES ABREVIATIONS	14
LISTE DES TABLEAUX	16
LISTE DES FIGURES.....	17
LISTE DES ANNEXES	18
INTRODUCTION	19
PARTIE 1 : PROBLEMATIQUES DE LA MISE A DISPOSITION D'UNE FORME PHARMACEUTIQUE ADAPTEE A LA PEDIATRIE – CAS DE LA SPIRONOLACTONE.....	21
I. Particularités de la population pédiatrique.....	22
1) Spécificités physiologiques et pharmacocinétiques chez la population pédiatrique	23
a) L'absorption.....	23
b) La distribution.....	24
c) Le métabolisme	25
d) L'élimination	25
2) Pharmacodynamie.....	26
3) Les défis de l'adaptation de la galénique pour la voie orale en pédiatrie	27
a) La formulation orale liquide	27
b) La formulation orale solide.....	32
c) Les excipients en pédiatrie	33
II. Règlementations associées au développement de médicaments à visée pédiatrique	34
PARTIE 2 : ETUDE DE LA DOSE ADMINISTREE THEORIQUE D'UNE SUSPENSION BUVABLE DE SPIRONOLACTONE PAR LES INFIRMIERS EN REANIMATION PEDIATRIQUE ET SOINS INTENSIFS DE NEONATALOGIE.....	36
I. Place de la spironolactone en pédiatrie au CHU de Toulouse	36
II. Étude de la dose administrée théorique par les infirmiers en vie réelle dans les services de réanimation pédiatrique et de soins intensifs de néonatalogie du CHU de Toulouse.....	37
1) Contexte	37
2) Objectif	37
3) Matériel et méthode	37
4) Résultats	39
5) Discussion et conclusion.....	40
PARTIE 3 : OPTIMISATION D'UNE FORMULATION GALENIQUE DE SUSPENSION BUVABLE DE SPIRONOLACTONE.....	42

I.	Formulation galénique	42
1)	Propriétés physico-chimiques de la spironolactone	42
2)	Choix du véhicule universel pour préparation buvable	43
a)	Tests de formulation	43
b)	Bénéfices/risques des différents véhicules	43
c)	Conclusions.....	46
3)	Etudes de pré formulation	47
a)	Polysorbate 80 (Polyoxyethylene Sorbitan Fatty Acid Esters)	47
b)	Agent de viscosité.....	49
II.	Etude de stabilité de la nouvelle formulation	51
1)	Objectifs.....	51
2)	Matériels et méthodes	52
a)	Méthode analytique indicatrice de stabilité	52
b)	Mode opératoire de fabrication d'un lot de suspension buvable.....	57
c)	Evaluation de la stabilité chimique de la suspension buvable	58
d)	Evaluation de la stabilité physique de la suspension buvable	59
e)	Evaluation de la stabilité microbiologique de la suspension buvable.....	61
f)	Modalités de prélèvements des échantillons selon les études réalisées.....	63
3)	Résultats	63
a)	Validation de la méthode analytique indicatrice de stabilité	64
b)	Validation de la stabilité chimique de la suspension buvable.....	67
c)	Validation de la stabilité physique de la suspension buvable	68
d)	Evaluation de la stabilité microbiologique de la suspension	74
4)	Discussion – Conclusion.....	75
	DISCUSSION	77
	CONCLUSION	81
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	82
	ANNEXES.....	86
	SERMENT DE GALIEN	96

LISTE DES ABREVIATIONS

BPP : Bonnes Pratiques De Préparation

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

PUI : Pharmacie A Usage Intérieur

AMM : Autorisation De Mise Sur Le Marché

CIV : Communication Inter-Ventriculaire

ICH : International Council For Harmonisation Of Technical Requirements For Pharmaceuticals For Human Use

UE : Union Européenne

AUC : Area Under The Curve (Aire Sous La Courbe)

CYP : Cytochromes P450

DFG : Débit De Filtration Glomérulaire

PA : Principe Actif

ANSM : Agence Nationale De Sécurité Des Médicaments Et Des Produits De Santé

AFSSAPS : Agence Française De Sécurité Sanitaire Des Produits De Santé

ESNEE : European Study Of Neonatal Exposure To Excipient

STEP : Safety And Toxicity Of Excipients For Paediatrics

EMA : European Medicines Agency

FDA : Food And Drug Administration

MHLW : Ministry Of Health, Labour And Welfare

BPCA : Best Pharmaceuticals For Children Act

PREA : Pediatric Research Equity Act

PIP : Plan d'Investigation Pédiatrique

PUMA : Pediatric Use Marketing Authorization

PDCO : Paediatric Committee (Comité Pédiatrique)

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PRN : Paediatric Regulatory Network

IQR: Interquartile Range

HPLC : Chromatographie Liquide Haute Performance

UV : Ultraviolet

TA : Température Ambiante

CV : Coefficient De Variation

FI : Fidélité Intermédiaire

IDE : Infirmier Diplômé d'Etat

SF : Sugar-Free

SF1 : Solution Fille 1

R : Taux de recouvrement

Vs : Standards de Validation

LD : Limite de Détection

DGAT : Dénombrement Pour Les Germes Aérobieux Totaux

DMLT : Dénombrement Pour Les Moisissures Et Levures Totaux

UFC : Unité Formant Colonie

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Résumé des propriétés d'un système floculé et défloculé (17)	28
Tableau 2: Comparaison des différents dispositifs d'administration pour une forme buvable pédiatrique (20).....	32
Tableau 3: Dispersion des résultats de mesures de la spironolactone dans les seringues dans les services de soins intensifs et réanimation pédiatrique en 2020 et 2022. (La moyenne et l'écart-type sont notés à titre indicatif pour mieux illustrer la variabilité).	39
Tableau 4 : Comparaison des différents véhicules universels sans sucre pour préparation buvable à pH acide.....	45
Tableau 5 : Protocole de préparation finale des points de gamme à partir de la SF1	52
Tableau 6: Protocole de dégradation forcée.....	56
Tableau 7: Plan expérimental de l'étude de stabilité chimique	58
Tableau 8: : Plan expérimental de l'étude de stabilité physique (mesure viscosité, densité, pH, osmolalité).....	61
Tableau 9: Plan expérimental de l'étude de stabilité microbiologique (dénombrement microbien) ..	63
Tableau 10: Paramètres de calibration J1,J2 et J3	64
Tableau 11: Concentration en µg/ml en spironolactone pour différents flacons non agités à différents temps post production. L'analyse à 3 semaines +2+8°C n'a pas été faite à la suite d'un oubli.....	69
Tableau 12: Mesures de la viscosité en mPa.s au cours de l'étude de stabilité après ouverture	70
Tableau 13: Mesures de la densité au cours de l'étude de stabilité après ouverture	71
Tableau 14: Mesures du pH au cours de l'étude de stabilité après ouverture	72
Tableau 15: Mesures de l'osmolalité en mOsm/kg au cours de l'étude de stabilité après ouverture .	73
Tableau 16: Résultats de la validation de méthode pour l'étude de stabilité	74
Tableau 17: Résultats de l'étude de stabilité microbiologique avant ouverture	74
Tableau 18: Résultats de l'étude de stabilité microbiologique après ouverture	75

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Schéma d'une dispersion flocculée et déflocculée (18)	28
Figure 2: Couche électrique à l'interface solide-liquide dans un système dispersé (17)	30
Figure 3: Initiatives réglementaires au développement de médicament à visée pédiatrique dans les états membres ICH (2,28,29).....	35
Figure 4: Répartition des dispensations de spironolactone 5mg/ml en 2020 et 2021 au chu de Toulouse	36
Figure 5: Structure chimique de la spironolactone (35).....	43
Figure 6: Tests de pré-formulation avec InOrpha® + Polysorbate 80 (différentes concentrations) + spironolactone 5mg/ml	48
Figure 7: Aspect des flacons (quantité de mousse) après remise en suspension du sédiment.....	49
Figure 8 : Illustration de la fidélité, justesse et exactitude (49)	55
Figure 9: Chromatogramme type de la suspension de spironolactone	64
Figure 10: Droite de calibration de la méthode analytique	65
Figure 11: Profil d'exactitude de la méthode	66
Figure 12: Evolution de la concentration moyenne de spironolactone avant ouverture rapportée à la concentration initiale en % en fonction du temps et du mode de stockage	68
Figure 13: Evolution de la concentration moyenne de spironolactone après ouverture rapportée à la concentration initiale en % en fonction du temps et du mode de stockage	68
Figure 14: Evolution de la viscosité au cours de l'étude de stabilité avant ouverture	70
Figure 15: Evolution de la densité au cours de l'étude de stabilité avant ouverture	71
Figure 16: Evolution du pH au cours de l'étude de stabilité avant ouverture	72
Figure 17: Evolution de l'osmolalité au cours de l'étude de stabilité avant ouverture	73

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1: Affiche ANSM « ne vous mélangez pas les pipettes ».....	86
Annexe 2: Fiche reflexe étude de la dose administrée de spironolactone 5mg/ml	87
Annexe 3: Résultats des analyses par HPLC des prélèvements de suspension buvable de spironolactone 5mg/ml avant administration à l'enfant, en 2020.	88
Annexe 4: Résultats des analyses par HPLC des prélèvements de suspension buvable de spironolactone 5mg/ml avant administration à l'enfant, en 2022.	89
Annexe 5: Résultats des analyses par HPLC des seringues contrôles à J40, après un premier dosage conforme à JO	90
Annexe 6: Chromatogrammes de la spironolactone soumise aux conditions de dégradation forcée .	91
Annexe 7: Chromatogrammes de la matrice soumise aux conditions de dégradation forcée	92
Annexe 8: Chromatogrammes de la suspension de spironolactone (InOrpha + 0,2% de gomme de xanthane) soumise aux conditions dégradation forcée	93
Annexe 9: Mesure de la teneur au cours de l'étude de stabilité avant ouverture	94
Annexe 10: Mesures de la viscosité au cours de la stabilité avant ouverture	94
Annexe 11: Mesures de la densité au cours de la stabilité avant ouverture	95
Annexe 12: Mesures du pH au cours de la stabilité avant ouverture	95
Annexe 13: Mesures de l'osmolalité au cours la stabilité avant ouverture	95

INTRODUCTION

Les besoins en médicaments pédiatriques ne sont pas totalement couverts par l'industrie pharmaceutique. On estime que 30 à 90% des enfants hospitalisés reçoivent au moins un traitement non autorisé en pédiatrie (1). Des mesures réglementaires et incitatives ont été prises au niveau international pour faciliter le développement et l'accessibilité aux médicaments en pédiatrie. Le but étant d'assurer l'accès à des médicaments qui sont de qualité et appropriés, et de fournir de l'information sur les médicaments en pédiatrie (2). L'utilisation d'un médicament insuffisamment étudié pour la population pédiatrique présente un risque accru d'inefficacité, de toxicité, et peut induire à des erreurs d'administration (3). Le faible nombre d'essais cliniques chez les enfants conduit un nombre réduit d'indications validées mais surtout de posologies pédiatriques validées (3). De plus, la population pédiatrique est une population très hétérogène et fragile.

Pour pallier ce manque de médicament pédiatrique, une des alternatives consiste à avoir recours à des médicaments destinés à l'adulte, qui sont souvent inadaptés tant par leur forme galénique que leur dosage. L'autre alternative est le recours à la réalisation de préparations pharmaceutiques par les officines ou les Pharmacies à Usage Intérieur (PUI) (1). Cependant, ces préparations doivent répondre à un niveau d'exigence suffisant pour assurer la qualité et la sécurité d'emploi de la préparation. Pour aider les officines et les PUI à garantir ces exigences, les préparations doivent être réalisées en conformité avec les Bonnes Pratiques de Préparation (BPP) et la Pharmacopée Européenne.

Chez les enfants de moins de 6 ans, les formes orales solides ne sont pas recommandées devant le risque de fausse route. Dans ces conditions, il convient de favoriser les formes orales liquides (3). La spironolactone est commercialisée en France uniquement sous la forme de comprimés sécables dont le plus petit dosage est 25mg (12,5mg pour un demi comprimé). Ainsi, les adaptations de posologie pour convenir à la population pédiatrique sont possibles uniquement par pallier de 12,5mg *a minima*. La forme commerciale ne permet donc pas un ajustement optimal de la posologie (la posologie recommandée chez l'enfant variant de 1 à 3mg/kg/jour). Pour répondre à cette problématique, le préparatoire du Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Toulouse fabrique une préparation hospitalière de suspension buvable de spironolactone à 5mg/ml permettant de couvrir les doses à administrer chez l'enfant. Cependant, cette préparation a la particularité de former rapidement un sédiment compact (phénomène de « caking ») au fond du flacon. Pour remettre en suspension le sédiment, il est nécessaire d'agiter le flacon vigoureusement pendant 2 minutes. La longue durée d'agitation est une condition limitante au bon usage de la préparation.

La première partie de ce mémoire aborde la problématique de la mise à disposition d'une forme pharmaceutique adaptée à la pédiatrie. Le cas de la spironolactone y sera précisé. La deuxième partie évalue le bon usage de la dose administrée de suspension buvable de spironolactone dans une étude en vie réelle auprès des infirmiers des services de réanimation pédiatrique et de soins intensifs de néonatalogie.

La dernière partie propose, à la lumière de ces résultats, l'optimisation de la formulation galénique avec une étude de pré formulation et une étude de stabilité physico-chimique et microbiologique afin de s'assurer de la qualité et de la sécurité d'emploi de la nouvelle formulation.

PARTIE 1 : PROBLEMATIQUES DE LA MISE A DISPOSITION D'UNE FORME PHARMACEUTIQUE ADAPTEE A LA PEDIATRIE – CAS DE LA SPIRONOLACTONE

La spironolactone est un diurétique antagoniste compétitif du récepteur de l'aldostérone (hormone stéroïdienne minéralocorticoïde) présent au niveau du tube contourné distal et du tube collecteur du néphron (4).

Sa principale indication en réanimation néonatale et en soins intensifs de néonatalogie est la prise en charge de l'insuffisance cardiaque de stade III ou IV (hors Autorisation de Mise sur le Marché (AMM)) dans un contexte de cardiopathie congénitale. Les cardiopathies congénitales sont les malformations les plus fréquentes de l'enfant (1% des naissances vivantes) et la première cause de mortalité infantile (13%) (5,6). La communication interventriculaire (CIV) occupe la deuxième place parmi les cardiopathies congénitales les plus fréquentes au niveau national (6) et concerne 65% de patients ayant eu une dispensation de suspension buvable de spironolactone aux rétrocessions du CHU de Toulouse entre 2020 et 2021. La spironolactone prescrit dans le cadre d'une prise en charge d'une CIV, concerne des nouveaux né et nourrissons ayant majoritairement moins de 1 ans. Leur prise en charge consiste à stabiliser l'insuffisance cardiaque via un traitement médical comprenant des diurétiques (le plus souvent du furosémide à forte dose associé à un diurétique d'épargne potassique comme la spironolactone) et un inhibiteur de l'enzyme de conversion (captopril le plus souvent). Le traitement médical est mis en place dès la naissance, avant la chirurgie cardiaque réparatrice ou pour temporiser dans le cas de communication interventriculaire de taille modérée susceptible de se fermer spontanément au cours du temps (5,6).

Les autres indications possibles de la spironolactone en pédiatrie sont le traitement de l'hyperaldostéronisme primaire, l'hypertension artérielle essentielle, l'état œdémateux pouvant s'accompagner d'un hyperaldostéronisme secondaire à une insuffisance cardiaque, à syndrome néphrotique ou à ascite cirrhotique. La myasthénie est une des indications possibles de la spironolactone en permettant de maintenir le capital potassique nécessaire au fonctionnement du muscle (7).

Ces médicaments, anciens, présentent un service médical rendu important dans les indications de leur AMM le plus souvent restreintes à l'adulte. On estime que plus de la moitié des médicaments utilisés en pédiatrie n'a pas fait l'objet d'études clinique, pharmacocinétique ou pharmacodynamique spécifique, ni d'autorisation spécifique à ces tranches d'âge (1,2,8). Les médicaments sont le plus souvent prescrits hors AMM, (c'est le cas de la spironolactone dont on retrouve l'usage hors AMM en pédiatrie dès 1964) avec des formes pharmaceutiques peu adaptées à l'enfant (comprimés, gélules) et des posologies empiriques issues le plus

souvent de recommandations de sociétés savantes ou de la littérature (8,9). L'absence de médicaments adaptés à la pédiatrie concoure à un risque d'effet indésirable accru (1,2). En effet, les caractéristiques physiologiques des enfants à différentes tranches d'âge ne sont pas les mêmes que celles de l'adulte (1,2).

Historiquement, les entreprises pharmaceutiques étaient réticentes à mener des études spécifiques chez l'enfant et à développer des formes pharmaceutiques adaptées. Cela s'explique par (i) le faible effectif de la population pédiatrique (20% de la population générale, et donc la faible rentabilité financière de cette population et (ii) par les difficultés à mener des essais cliniques chez l'enfant notamment d'ordre éthique jusque dans les années 1980 avec le consentement éclairé élargi aux parents et l'utilisation discutée du placebo (1,2,8). Depuis, *l'International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use* (ICH) a publié en 2000 une ligne directrice, l'ICH E11 intitulée « Clinical Investigation of Medicinal Products in the Paediatric Population » dont l'objectif est de promouvoir la recherche clinique en pédiatrie avec des études de tolérance, d'efficacité et de qualité aux Etats-Unis, dans l'Union Européenne (UE) et au Japon. Ces 3 régions ont dû alors transposer dans leur propre système juridique, selon leurs exigences nationales, la ligne directrice E11 afin de répondre à son objectif et d'harmoniser les pratiques (2).

I. Particularités de la population pédiatrique

La population pédiatrique est hétérogène. On peut la différencier par catégories d'âge. Selon la ligne directrice ICH E11, on retrouve 5 catégories :

- Prématurés
- Nouveau-nés : 0 à 27 jours
- Nourrissons : 28 jours à 23 mois
- Enfants : 2 à 11 ans
- Adolescents : 12 à 18 ans

Chaque catégorie d'âge correspond à une étape du développement physiologique avec ses particularités (1). L'immaturation organique et métabolique implique qu'on ne puisse pas extrapoler les données de pharmacocinétique de l'adulte à l'enfant (1,3). En effet, la pharmacocinétique des médicaments chez les enfants est différente de celle des adultes sur les 4 phases ADME (*i.e.* Absorption, Distribution, Métabolisme, Elimination). Ces différences conduisent à une importante variabilité inter- et intra-individuelle au fil des ans, rendant difficile l'extrapolation des posologies adultes à celles des enfants par une simple proportion dose/masse corporelle ou dose/surface (3).

Les médicaments devraient être évalués pour chaque classe d'âge afin de déterminer la dose appropriée. Le faible nombre d'essais cliniques chez les enfants a pour conséquence l'absence d'indications validées, de posologies et de forme galénique adaptées.

L'absence d'AMM pédiatrique peut créer une disparité de prise en charge. A cela s'ajoute le nombre limité de présentations disponibles imposant d'adapter la galénique. Cette adaptation passe soit par le biais du pharmacien par la réalisation de préparations magistrales, soit par les infirmières via la dilution des formes adultes pour un usage pédiatrique (3).

1) Spécificités physiologiques et pharmacocinétiques chez la population pédiatrique

La connaissance des particularités physiologiques de chaque tranche d'âge permet d'appréhender les différences de dose, de mode et de fréquence d'administration et de biodisponibilité en pédiatrie par rapport à l'adulte (10). Outre la capacité de déglutition qui s'acquiert avec l'âge, il existe également des modifications pharmacocinétiques impactant l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'élimination des médicaments (11).

D'après les connaissances acquises lors des études adultes et des données physico-chimiques, il est probable que chacune des 4 phases ADME de la spironolactone soient également touchées.

a) L'absorption

La déglutition

Première particularité physiologique, la capacité de déglutition de la population pédiatrique. Entre 2 et 6 ans, l'enfant passe progressivement d'une phase de motricité réflexe à une phase de motricité volontaire. Cela est assuré grâce à la maturation du système nerveux central. Ainsi l'enfant acquiert petit à petit la coordination nécessaire pour déglutir de manière forcée des formes orales solides. C'est pourquoi ces formes sont contre-indiquées avant l'âge de 6 ans à cause du risque de fausse-route qu'ils peuvent engendrer. Il faut alors privilégier les formes buvables (12).

Le résumé des caractéristiques du produit de la spironolactone propose une posologie pédiatrique variant de 1.5 à 3mg/kg/jour en 1 à 2 prises par jour et jusqu'à 100mg/ jour maximum. Il mentionne pour les enfants de moins de 6 ans, qu'il est nécessaire d'écraser le(s) comprimé(s) (les comprimés disponibles sont sécables et dosés à 25, 50 et 75mg) de manière à faire une suspension dans un liquide (7). Cette pratique n'assure pas la bonne maîtrise de la dose à administrer quand elle est réalisée par une personne non sensibilisée à ce type de disposition. Ainsi, une forme pharmaceutique buvable serait plus adaptée pour faciliter et sécuriser l'administration. CMP Pharma a développé une suspension buvable de spironolactone dosée à 5mg/mL (CaroSpir®) pour la population gériatrique américaine présentant des difficultés de déglutition (13)). Cette forme, non disponible en France, n'a par ailleurs pas d'AMM pour la pédiatrie. Une étude de modélisation pharmacocinétique de population de cette formulation a été développée pour une part de cette population pédiatrique (2-17 ans) en 2021 (9). Elle affine les recommandations posologiques des sociétés

savantes et prédit notamment la posologie selon la prise alimentaire de cette catégorie de patients.

Le tube digestif

L'absorption par voie orale est sujette à de nombreuses variations physiologiques selon l'âge. La vidange gastrique et la motilité intestinale ne sont pas comparables à celles de l'adulte par l'immaturité intestinale. Il existe une réduction de la vidange gastrique et de la motilité intestinale notamment avant l'âge de 3 mois (11).

Le pH gastrique évolue au cours de l'enfance. Il est proche de la neutralité à la naissance du fait d'une faible sécrétion acide par les cellules pariétales et atteint les valeurs proches de l'adulte au plus tard vers 4 ans. Des variations de pH gastriques au cours de l'enfance conduisent à des ratios de formes ionisées/moléculaires variables au fil des ans, conduisant à une variabilité inter et intra-individuelle de l'absorption des médicaments (1,11).

Les cytochromes (*i.e.* CYP3A) et transports actifs transcellulaires (*i.e.* Pgp pour l'efflux ; OATP pour l'influx) interviennent, par leur distribution entérocytaire, dans la phase d'absorption des médicaments. Au cours de l'enfance, l'expression de ces protéines dans les entérocytes évolue et est susceptible de conduire à des modifications de la biodisponibilité des médicaments substrats (11).

Par leur fonction exocrine, la vésicule biliaire, le pancréas et le foie sont impliqués dans la solubilisation et l'absorption des médicaments lipophiles. Or cette fonction est immature à la naissance et peut donc limiter l'absorption de certaines substances (11).

Ainsi, il existe de nombreux facteurs de variabilité susceptibles de jouer sur la phase d'absorption des médicaments et donc sur leur exposition dans l'organisme. Par conséquent, cette variabilité peut toucher aussi bien l'efficacité que l'innocuité des médicaments (1).

Dans le cas de la spironolactone, faiblement soluble dans l'eau, des études chez l'adulte évoquent l'amélioration de la biodisponibilité de la molécule par la prise d'un repas riche en graisse (jusqu'à 90%, mesurée par la valeur d'AUC_{0-∞}) (33). Compte tenu des éléments présentés précédemment, il est délicat de prédire les capacités d'absorption de la spironolactone pour toutes les catégories d'âges.

b) La distribution

La distribution d'un médicament dépend (i) de ses propriétés physico-chimiques comme sa lipophilie, son poids moléculaire, son état d'ionisation et (ii) des paramètres physiologiques du patient qui varient avec l'âge comme le taux de certaines protéines plasmatiques, la composition du corps et la perfusion des organes (1,11).

Au cours de l'enfance, il existe des variations qualitatives et quantitatives des protéines plasmatiques, ce qui modifie le pourcentage de liaison des médicaments à ces protéines plasmatiques. De la période prénatale aux premières semaines de vie, les concentrations d'alpha-1glycoprotéine acide et d'albumine sont respectivement inférieures de plus de 50 % et 20 % aux valeurs physiologiques adultes. On retrouve également chez le nouveau-né et le

nourrisson une concentration élevée en acides gras et en bilirubine ce qui peut être responsable d'une augmentation de la fraction libre des médicaments fortement liés aux protéines plasmatiques (11).

Le volume de distribution des médicaments hydrophiles est augmenté chez les nouveau-nés en raison d'une augmentation du volume hydrique. En effet, le nouveau-né est caractérisé à la naissance par un compartiment hydrique important (75 à 80 % de son poids corporel total vs 60 % poids total chez l'adulte). A l'âge d'un an, le volume hydrique sera proche de celui de l'adulte (11).

Concernant la spironolactone, le volet distribution n'est pas évoqué pour la population pédiatrique.

c) Le métabolisme

Le métabolisme des médicaments a lieu au sein de plusieurs organes exprimant des enzymes spécifiques. Le foie est le principal acteur même si le tube digestif, les poumons et les reins interviennent également dans le métabolisme (11). Le métabolisme hépatique varie avec l'âge. L'immaturation hépatique à la naissance existe aussi bien pour les réactions de phase I (oxydation, réduction, hydrolyse) que les réactions de phase II (glucuroconjugaison, acétylation, méthylation)(1). Seules les réactions de sulfoconjugaison sont opérationnelles dès la naissance et peuvent compenser en partie les réactions de glucuroconjugaison (1,11).

La répartition des cytochromes P450 chez le sujet jeune n'est pas du tout comparable à celle l'adulte. Le CYP3A7 est le principal cytochromes P450 à la naissance puis sa proportion diminue progressivement. La proportion de CYP2D6 augmente après la naissance pour atteindre le même niveau que chez l'adulte à partir de 10 ans. Les CYP3A4, 2C9 et 1A2 apparaissent dans les 1ers mois de vie avec des périodes au cours de l'enfance où leur activité peut dépasser celle de l'adulte. L'activité 2C19 apparait dans les premiers mois de vie pour atteindre rapidement le niveau d'activité de l'adulte (3,11). Les variations du métabolisme hépatique au cours du temps sont responsables d'une variation de clairance des médicaments et donc une variabilité des demi-vies d'élimination (1).

Sur le plan métabolique, la spironolactone est, chez l'adulte, rapidement métabolisée en un certain nombre de métabolites, dont le principal à 70% est la canrénone métaboliquement active. Les mécanismes de métabolisme sont peu décrits (9). Aux concentrations thérapeutiques, la spironolactone et la canrénone sont fortement liées aux protéines plasmatiques.

d) L'élimination

L'élimination d'un médicament et de ses métabolites se fait majoritairement soit par la bile, soit par les reins (11). C'est le cas de la spironolactone et de la canrénone (7).

L'élimination rénale dépend du taux de liaison aux protéines plasmatiques, du débit sanguin rénal, du taux de filtration glomérulaire, de la sécrétion tubulaire et de la réabsorption tubulaire (1,11).

À la naissance, la filtration glomérulaire représente 35 % de celle chez un adulte à la fonction rénale normale ; elle atteint 90% des valeurs de l'adulte à l'âge d'un an (11). Il existe aussi une maturation progressive des transporteurs rénaux impactant la sécrétion tubulaire (11). Ainsi l'immaturation du rein est responsable d'une moindre élimination rénale des médicaments excrétés par cette voie. Les doses prescrites seront moindres et l'interdose souvent augmentée par rapport à la posologie adulte (1). Ainsi, le calcul du débit de filtration glomérulaire (DFG) diffère de celui de l'adulte, et sera estimé par la formule de Schwartz :

$$DFG = 36,5 \times \frac{T}{Cr}$$

(DFG : en mL/min/1,73 m² ; Cr : créatininémie en µmol/L ; T : taille en cm) (3).

2) Pharmacodynamie

Quant à la pharmacodynamie chez le sujet jeune, les connaissances sont peu nombreuses sur les différences liées à l'âge. Il est le plus souvent admis que la zone de concentrations thérapeutiques est similaire chez les enfants et chez les adultes (14).

La spironolactone entraîne une diminution de l'expression des canaux sodiques et de pompe Na/K ATPases responsable de l'inhibition de la réabsorption de sodium et de l'inhibition de la sécrétion de potassium et de protons. Un des effets indésirables de la spironolactone est donc l'hyperkaliémie par inhibition de la sécrétion urinaire des ions K⁺ (effet épargneur de potassium) et l'acidose métabolique par diminution indirecte de la sécrétion urinaire de protons. L'élimination urinaire du sodium favorise l'élimination urinaire d'eau pouvant être responsable d'une déshydratation extra cellulaire, comme tous les autres diurétiques (15,16).

Son effet antagoniste est dit non spécifique. Elle peut se fixer en moindre proportion sur d'autres récepteurs aux hormones stéroïdiennes. C'est pourquoi, il existe de possible effets indésirables "hormonaux" type gynécomastie, ... (4,15,16)

La population pédiatrique est une population hétérogène dont le niveau de réponse thérapeutique pourra varier au cours de l'évolution de l'enfant par le simple effet de la maturation d'organes.

Face à ce premier constat, s'ajoute la galénique partiellement adaptée des médicaments disponibles pour les traiter. Cet écueil participe au risque d'erreurs médicamenteuses pour cette population. En effet, les doses peuvent varier jusqu'à 400 fois entre un patient de néonatalogie et un patient adolescent (1). Dans une étude en 2013 portant sur les préparations de dose chez l'enfant les infirmières disaient manipuler des traitements non

adaptés à l'enfant dans 55% des cas et concédaient avoir un souci avec l'exactitude de la dose préparée dans 35% des cas (1).

3) Les défis de l'adaptation de la galénique pour la voie orale en pédiatrie

La mise à disposition de formes galéniques adaptées à l'enfant est essentielle pour assurer l'observance et la sécurité d'administration.

La forme orale liquide est intuitivement la plus adaptée notamment chez les enfants en bas âge (moins de 6 ans) (3). Cette forme présente les avantages :

- d'être facile à administrer, sous réserve de dispositifs d'administration adaptés
- de résoudre les problèmes de fausse route digestive
- de permettre un ajustement de posologie précis en fonction de l'âge et du poids de l'enfant.

En revanche, ces formulations liquides sont un défi en termes de stabilité, d'acceptabilité et de tolérance. Le principe actif (PA) peut subir une dégradation chimique (hydrolyse, oxydo-réduction, photolyse) impactant la stabilité de la préparation. Le goût, l'odeur, la couleur et la texture (quatre paramètres rassemblés sous le terme de palatabilité) influencent la compliance et l'acceptabilité du traitement. L'alternative à la forme orale liquide est la forme solide avec les gélules et comprimés notamment après 6 ans. Enfin, l'innocuité et la tolérance des excipients seront particulièrement recherchés pour cette population (1).

Ainsi, sur la base des avantages apportés par la forme orale liquide, et considérant l'âge de la population nécessitant cette thérapeutique, nous avons décidé d'adopter cette galénique pour l'administration de la Spironolactone chez l'enfant au CHU de Toulouse.

a) La formulation orale liquide

Précisions galéniques

Il existe des sirops (désormais plutôt délaissés en raison de leur potentiel cariogène par la présence de saccharose), des solutions buvables, des suspensions buvables et des émulsions. Lorsque le PA et les excipients sont solubles entre eux, on parle de solution buvable. Lorsque le PA n'est pas soluble avec les excipients alors on obtient une dispersion dénommée soit suspension buvable, soit émulsion. La suspension est une dispersion de fines particules solides (phase dispersée) dans une phase liquide (phase dispersante). L'émulsion correspond à une phase grasse et une phase aqueuse avec des émulsions « huile dans eau » ou « eau dans huile » (17).

La spironolactone étant peu soluble dans l'eau, nous allons détailler plus particulièrement les suspensions buvables et le défi technique qu'elles représentent. Les suspensions buvables sont préparées lorsque le PA n'est pas soluble dans le solvant de la formulation et/ou lorsque

le PA présente un goût désagréable. Elles présentent l'avantage d'une concentration en PA plus importante que les solutions et donc une administration d'un moindre volume de préparation (3). Mais elles ont l'inconvénient d'être thermodynamiquement instables. Les particules solides représentent une grande surface d'interface avec le milieu liquide et possèdent une grande quantité d'énergie libre à leurs surfaces. Ainsi, le système a tendance à s'agglomérer afin de réduire la surface et donc l'excès d'énergie libre (17).

Une suspension bien formulée doit se redisperser uniformément dans la phase liquide, sous une agitation modérée, pendant une période suffisante permettant ainsi d'avoir une dose reproductible à chaque administration (17).

Une suspension buvable peut être dit « flocculée » ou « déflocculée ». La suspension flocculée sédimente plus rapidement et se redisperse facilement, tandis qu'une suspension déflocculée sédimente lentement et est difficilement redispersable. Avec un système flocculé, il peut y avoir des problèmes de sédimentation si rapide qu'il n'est pas possible d'obtenir une dose précise et sera fortement dépendant de la force et la durée pendant lesquelles la suspension est secouée. Le surnageant est clair dans les suspensions flocculées contrairement aux suspensions déflocculées qui restent troubles en raison de très fines particules dispersés dans le milieu. Dans le cadre d'un développement de formulation de suspension buvable, si la suspension est amenée à sédimenter au cours de sa conservation alors on cherche à tendre vers un système flocculé (17).

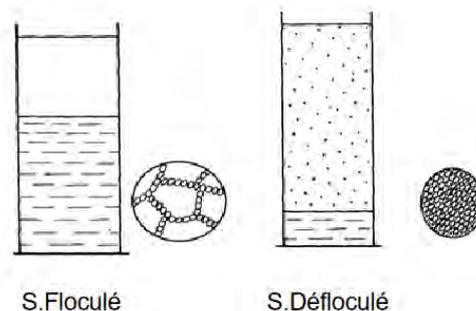


Figure 1: Schéma d'une dispersion flocculée et déflocculée (18)

Propriétés	Dispersion flocculée	Dispersion déflocculée
Particules	Forme des agrégats lâches	Entités distinctes
Vitesse de sédimentation	Rapide	Lente
Structure du sédiment	Volumineux et poreux	Peu volumineux et compact
Redispersions	Rapide	Difficile
Aspect du surnageant	Limpide	Opalescent

Tableau 1: Résumé des propriétés d'un système flocculé et déflocculé (17)

La notion de vitesse de sédimentation joue un rôle fondamental dans la stabilité physique d'une suspension buvable. La vitesse de sédimentation des particules peut être déterminée par la loi de Stokes. La **loi de Stokes** est une équation qui décrit comment certains facteurs affectent le taux de sédimentation dans les systèmes dispersés :

$$V = \frac{d^2(\rho_1 - \rho_2)g}{18\eta}$$

Dans l'équation, V représente est la vitesse de sédimentation en cm/s, d est le diamètre de la particule en cm, ρ_1 et ρ_2 sont respectivement les densités des particules en suspension et du milieu liquide, g est l'accélération due à la pesanteur en cm/s^2 , et η est la viscosité du milieu en Pa.s (sachant que la température affecte la viscosité du milieu de dispersion) (17).

En jouant sur un ou plusieurs des paramètres de l'équation, il est possible de réduire la vitesse de sédimentation et donc d'augmenter la stabilité physique de la suspension.

- Ainsi, en réduisant la taille des particules (d), par tamisage ou broyage, il est possible de diminuer la vitesse de sédimentation des particules en suspension. Il ne faut cependant pas trop réduire la taille des particules au-delà d'une certaine limite car cela peut conduire à l'apparition du phénomène de « caking » (littéralement gâteau compact) lors de la sédimentation. Ce phénomène est responsable d'un sédiment compact très difficile, voire impossible, à remettre en suspension.
- L'augmentation de la viscosité permet aussi de diminuer la vitesse de sédimentation. Il est important de ne pas trop augmenter la viscosité pour ne pas rendre l'administration trop difficile.
- On peut également jouer sur la différence de densité entre la phase dispersée et le milieu liquide. Une différence de zéro signifie qu'il n'y a pas de sédimentation. Comme la densité de la phase dispersée ne peut pas être modifiée, on ne peut qu'augmenter la densité du milieu liquide. Cependant, il est rarement possible d'augmenter la densité du milieu bien au-dessus de 1,3. La différence de densité entre les 2 phases ne peut pas être complètement éliminée. En utilisant certains excipients modifiant la densité (par exemple, le sorbitol et le mannitol), la différence peut être réduite (17).

Ainsi, un seul paramètre ou une combinaison de paramètres de l'équation de Stokes peut être modifiés pour réduire la sédimentation.

Il existe également un équilibre électrostatique au sein d'une suspension buvable qu'on peut appréhender via le potentiel zêta. Ce potentiel représente la différence de potentiel électrique entre la surface de la particule (recouverte d'ions opposés et solidement fixés) et le point de neutralité (17).

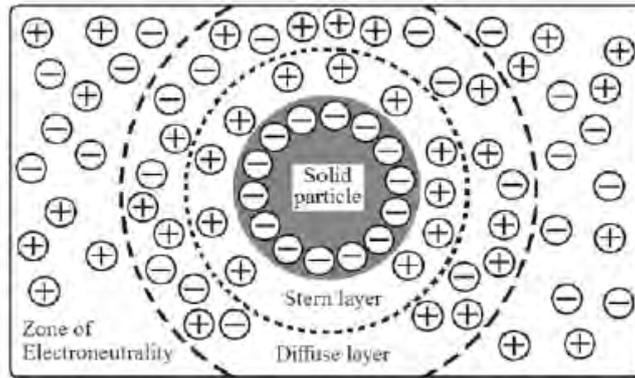


Figure 2: Couche électrique à l'interface solide-liquide dans un système dispersé (17)

Ce potentiel zêta régit l'intensité de répulsion ou d'attraction électrostatique entre particules. Si le potentiel zêta est réduit en dessous d'une certaine valeur, les forces d'attraction entre les particules surmontent les forces de répulsion et les particules se rassemblent pour former des flocons. Ce phénomène est connu sous le nom de floculation. En revanche, dans un système défloculé, le potentiel zêta est supérieur à la valeur critique ce qui signifie que les forces répulsives prennent le pas sur les forces attractives permettant aux particules de rester en suspension pendant une longue période. Une petite partie des particules forment un sédiment en raison de la force de gravitation. Au fur et à mesure, de plus petites particules remplissent le vide entre les plus grosses particules du sédiment. Alors, les particules les plus basses dans le sédiment sont progressivement pressées par le poids des particules au-dessus, ce qui est responsable du phénomène de « caking » (17).

Pour éviter ce phénomène, il est possible, en ajoutant une petite quantité d'électrolyte, de réduire le potentiel zêta en dessous de la valeur critique. Ainsi les forces attractives remplacent les forces répulsives et sont responsables de la floculation. Les particules rentrent alors en collision formant des agrégats. Ces agrégats sont plus gros et plus lourds que les particules individuelles leur permettant de décanter plus rapidement que dans un système défloculé sans pour autant former un caking.

En résumé, pour faciliter la dispersion du sédiment l'utilisation d'agents floculants (par exemple, les surfactants ioniques et non ioniques, les électrolytes, les polymères) peut s'avérer nécessaire. Ainsi, les changements entre état floculé et défloculé peuvent être obtenus par les changements de pH qui influencent la charge électrique autour des particules et les interactions particule-particule (17).

Finalement, pour obtenir une vitesse de sédimentation optimale et une redispersion facile, il faudrait un système contenant un agent viscosant (par exemple, les dérivés de la cellulose, les gommes naturelles) et un agent floculant (à concentrations établies) avec une taille de particules suffisamment petite.

Toute suspension devra être obligatoirement agitée avant emploi pour une remise en suspension homogène du sédiment et une administration de la dose attendue. Il existe un risque de sous ou surdosage en cas d'agitation inadéquate.

Enfin, le choix de la concentration en PA est primordial et doit permettre l'administration d'un volume réduit. On estime que le volume de liquide maximum toléré est de 5 mL pour un enfant de moins de 5 ans et 10 mL au-delà de cet âge (3). La problématique du choix du système d'administration doit être évoquée.

Des enjeux/risques en termes d'administration

Cette problématique couvre plusieurs sujets :

- Le risque d'accidents causés par l'enfant

En 2004, on estime que 18 000 décès d'enfants par an sont causés par le mésusage des médicaments par les enfants. Parmi ces décès, 50 % sont dus aux conditionnements non « child proof », c'est-à-dire non résistants aux enfants. Ce type de bouchon inventé en 1968 par Wallgreen et al, à l'épreuve des enfants, répond aux critères suivants : au moins 85 % des enfants ne doivent pas ouvrir le flacon en moins de 5 minutes ; 90% des adultes doivent y parvenir en moins d'une minute (19).

- Le risque de mésusage en lien avec la multiplicité des dispositifs d'administration

Les formes buvables multidoses disposent de différents types de dispositifs d'administration. Leurs principaux avantages et inconvénients ont été listés par J Walsh et al en 2011 et sont présentés dans le tableau ci-après (20).

Dispositif administration pour voie orale	Avantages	Inconvénients
Cuillère mesure	Facile à utiliser Très répandue	Volume ≤ 5ml Variabilité des volumes Imprécision graduations Possible perte du produit lors administration (à risque pour les médicaments à marge thérapeutique étroite)
Gobelet doseur	Alternative à la cuillère mesure pour des volumes >5ml Très répandue	Risque surdosage Graduation multiple Volume résiduel après administration

		Possible perte du produit lors administration (à risque pour les médicaments à marge thérapeutique étroite)
Compte-goutte	Utilisable pour des très petits volumes Très répandue	Précision dépendante de la verticalité du produit et variabilité de la taille des gouttes selon de la température
Seringue orale	Dosage plus précis et moins variable Flexibilité de volume prélevé	Coût élevé Nécessite souvent un bouchon adaptateur Précision de la mesure assujettie à la compétence du manipulateur

Tableau 2: Comparaison des différents dispositifs d'administration pour une forme buvable pédiatrique (20)

En 2013, l'ANSM se saisit du dossier et lance une campagne d'information et de sensibilisation destinée aux patients et à leurs proches rappelant les règles de bon usage pour limiter le risque d'erreur. Elle précise notamment le caractère captif du système médicament / dispositif d'administration (l'annexe 1 présente ladite affiche) (21). Les rôles de conseil et d'éducation thérapeutique par le professionnel de santé sont alors appuyés (21). En 2016, l'ANSM poursuit ces travaux sur le volet industriel cette fois en émettant des recommandations relatives aux dispositifs d'administration des spécialités sous forme buvable en multidoses (hors produits homéopathiques)(22).

In fine, la formulation buvable séduisante pour la jeune population pédiatrique, reste un défi technique pour assurer sa stabilité. Elle nécessite par ailleurs, lors de sa mise à disposition, une éducation des professionnels et des parents qui assureront l'administration. Une autre forme orale peut être proposée.

b) La formulation orale solide

Devant les difficultés de la mise en œuvre de formulation orale liquide, une des alternatives est l'utilisation de formes sèches destinées initialement à la population adulte. Cette pratique consiste en la dispersion extemporanée de formes sèches adultes dans un liquide (l'eau ou le lait majoritairement) et le prélèvement d'une partie de la dilution (3).

Une des limites de cette pratique réside dans la galénique de la forme sèche. En effet, pour réaliser la dispersion, les comprimés sont le plus souvent broyés. Mais cette pratique ne pourra être mise en œuvre pour les comprimés gastro-résistants ou à libération prolongée. De même, toutes les gélules ne peuvent pas être ouvertes (3).

Une autre limite de cette forme réside dans la solubilité du PA dans le véhicule choisi pour l'administration. La solubilité conditionnera la proportion de la dose administrée. Cette pratique est à risque et n'est pas recommandée car ne permet pas une bonne maîtrise de la dose à administrer et peut générer des erreurs dans le traitement de l'enfant (1).

Enfin, cette pratique expose potentiellement la personne qui assure le broyage de la forme sèche à des substances potentiellement Cancérigène, Mutagène, Reprotoxique et/ou sensibilisant des voies respiratoires, si elle n'utilise pas les équipements de protection individuels adéquats.

L'alternative à cette première option est le recours aux Pharmacies (officines et PUI) qui proposent des préparations magistrales voire hospitalières à visée pédiatrique sous forme de gélules au dosage adapté. Les formes orales solides présentent l'avantage d'être plus stables que les formes liquides.

Utilisées avant 6 ans, le risque de fausse route étant majoré, les gélules seront ouvertes et dissoutes dans un volume (eau, lait ou compote). Ce mode d'administration connaît ses limites notamment liées à des défauts d'exhaustivité de la dose administrée (en cas de défaut de solubilisation du principe actif, de pertes en PA lors de l'ouverture des gélules ou sur des critères de palatabilité défavorables) (3).

c) Les excipients en pédiatrie

La formulation d'un médicament, qu'il soit une forme sèche ou liquide, s'appuie sur un certain nombre d'excipients. Les excipients sont des matières premières sans effet thérapeutique direct permettant d'améliorer l'aspect ou le goût, d'assurer la conservation, d'améliorer la mise en forme du PA et l'administration du médicament.

Dénués d'effet thérapeutique, ils peuvent toutefois être responsables d'effet indésirable dépendant ou non de la dose. Une liste d'excipients à effet notoire a été établie par l'Afssaps en 2008, selon des recommandations européennes définies en 2003 et révisées à plusieurs reprises dont la dernière version date de 2019 (23). Ces excipients ont la particularité d'être mal tolérés chez les patients sensibles (allergiques, présentant un syndrome d'intolérance particulier ou population vulnérable comme la pédiatrie) et nécessitent certaines précautions d'emploi.

Plus particulièrement, la population pédiatrique est la cible d'intolérances à certains excipients notamment par l'immaturation de leur métabolisme (comme évoqué plus tôt) ou par toxicité (cas de l'éthanol dans les formulations orales liquide ou l'alcool benzylique dans les formulations intraveineuses par exemple).

Pour étoffer ces listes, des groupements d'intérêt académiques se sont positionnés. Une étude sur l'exposition aux excipients en néonatalogie a débuté au niveau européen depuis 2011 : Etude ESNEE (*European Study of Neonatal Exposure to excipient*) a permis de définir

une liste prioritaire d'excipients documentés comme toxiques (propylène glycol, éthanol et ses métabolites, propyl-hydroxybenzoate et autres parabènes, sodium benzoate/acide benzoïque /alcool benzylique, polysorbate 80, Sorbitol (24). Sous la direction de l'ESNEE, une étude de prévalence d'exposition aux excipients à l'échelle Européenne, avec la participation de 21 pays et 89 unités de soins intensifs de néonatalogie, a permis d'identifier qu'au total 27% des médicaments prescrits contenaient au moins un excipient potentiellement nocif. Des différences régionales importantes dans l'exposition aux excipients suggèrent des possibilités de substitution vers des médicaments ne contenant pas d'excipient potentiellement nocif (25).

Par ailleurs, une base de données sur la sécurité et la toxicité des excipients pour la pédiatrie (« STEP ») a été lancée en 2014 dans le cadre des Initiatives de Formulation Pédiatrique (PFI) des organisations européennes et américaines. Elle est gratuite et accessible au public via le site Web EuPFI (European Paediatric Formulation Initiative) (26). Cette base de données compile des informations sur la sécurité et la toxicité des excipients extraites manuellement de sources d'informations sélectionnées. Il existe des procédures de contrôle de la qualité à trois niveaux depuis la recherche d'informations jusqu'à l'entrée des données dans la base STEP. Elle est mise à jour tous les trimestres. Actuellement, il y a près de 80 excipients répertoriés dans la base (27).

Les particularités physiologiques de la population pédiatrique et sa susceptibilité à certains types d'excipients en font un véritable challenge quant à la formulation galénique. L'investissement de l'industriel dans une telle niche d'activité n'est donc pas spontané. Fort de ce constat, les organisations intergouvernementales se sont emparées de ce sujet pour favoriser la recherche en pédiatrie.

II. Règlementations associées au développement de médicaments à visée pédiatrique

A l'international, les initiatives réglementaires n'ont pas attendu les préconisations de l'ICH E11 (2). Les incitations de cette dernière ont néanmoins permis l'harmonisation des démarches mises en place par les différents Etats impliqués. Des plans de développement des médicaments à visée pédiatrique sont menés par les Etats membres (dénommé par exemple, Plan d'investigation Pédiatrique en Europe). Par volonté de simplification, ces initiatives seront résumées par le schéma ci-après.

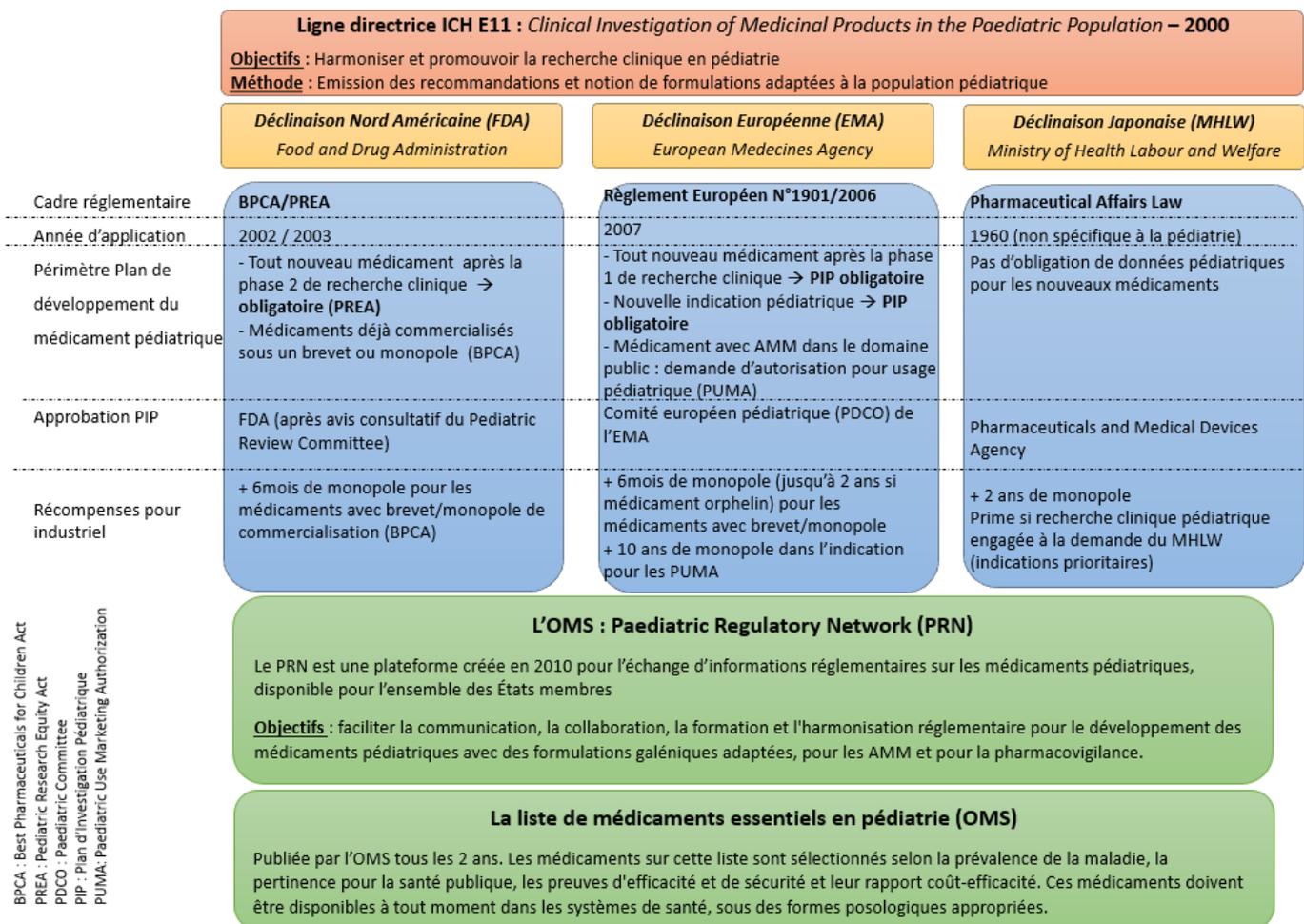


Figure 3: Initiatives réglementaires au développement de médicament à visée pédiatrique dans les états membres ICH (2,28,29)

En Europe, depuis l'instauration du règlement Européen encadrant la recherche clinique en pédiatrie, on comptait en 2016, plus de 260 nouveaux médicaments à usage pédiatrique (nouvelles autorisations de mise sur le marché et nouvelles indications) autorisés (30). La proportion d'essais cliniques concernant des enfants avait augmenté de 50 % (31). Cependant, ces études ne sont pas réparties uniformément dans tous les domaines thérapeutiques. Seulement trois nouvelles indications pédiatriques, dites Pediatric Use Marketing Authorization (PUMA) ont été accordées en 2017 (31).

Aux Etats-Unis, depuis 2007, plus de 680 plans d'études pédiatriques ont été réalisés dans le cadre de la réglementation en vigueur (BPCA et PREA) et plus de 275 médicaments ont obtenu l'exclusivité pédiatrique dans le cadre du BPCA (32).

Enfin, au Japon, contrairement aux Etats-Unis ou à l'UE, aucune réglementation spécifique n'a été mise en place pour le développement de médicaments à usage pédiatriques. La réalisation d'étude pédiatrique n'est pas obligatoire. En 2012, près de 40% des médicaments autorisés sont des médicaments avec une indication pédiatrique (2).

PARTIE 2 : ETUDE DE LA DOSE ADMINISTREE THEORIQUE D'UNE SUSPENSION BUVABLE DE SPIRONOLACTONE PAR LES INFIRMIERS EN REANIMATION PEDIATRIQUE ET SOINS INTENSIFS DE NEONATALOGIE

I. Place de la spironolactone en pédiatrie au CHU de Toulouse

Initialement, le préparatoire du CHU de Toulouse produisait des préparations hospitalières de gélules de spironolactone à 2,5mg et 10mg pour la pédiatrie mais aussi des préparations magistrales de dosages intermédiaires. En 2018, le préparatoire démarre la production d'une suspension buvable pour faciliter l'administration et permettre un ajustement de posologie au poids de l'enfant. Après une étude des doses couramment administrées, le projet est présenté aux équipes médicales. La formule retenue a une concentration de 5mg/ml et est produite à partir du véhicule de suspension buvable commercial InOrpha®. Les stabilités physico-chimique et bactériologique ont été validées pour 4 mois avant ouverture et un mois après ouverture. Elle nécessite une agitation vigoureuse avant ouverture.

Depuis sa mise à disposition, la préparation est dispensée sur un large secteur : hors CHU, en lien avec des conventions de sous-traitance pour les établissements de la région. Au sein du CHU de Toulouse, deux services sont particulièrement demandeurs (la réanimation pédiatrique et les soins intensifs de néonatalogie). Ces deux services cumulent une consommation de 60 flacons par an soit 27% de la production de cette suspension. La répartition des dispensations est représentée dans la figure 4.

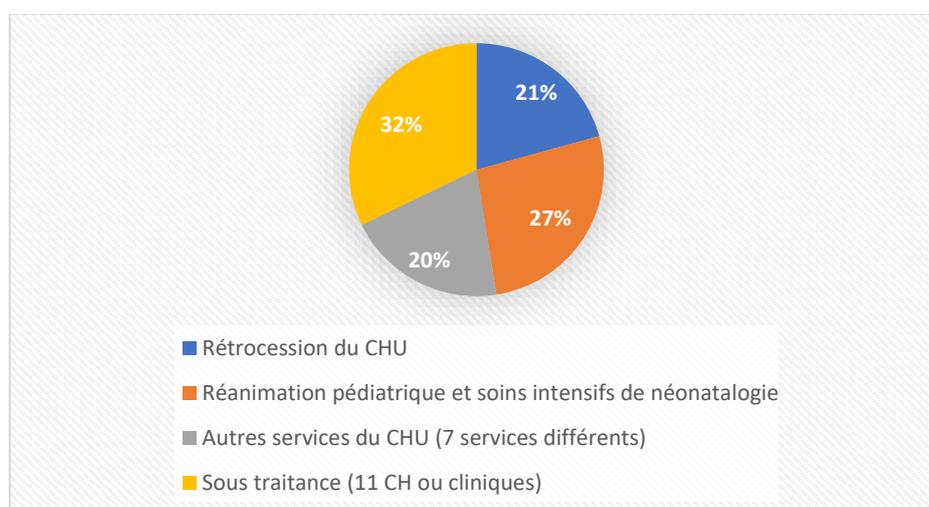


Figure 4: Répartition des dispensations de spironolactone 5mg/ml en 2020 et 2021 au CHU de Toulouse

II. Étude de la dose administrée théorique par les infirmiers en vie réelle dans les services de réanimation pédiatrique et de soins intensifs de néonatalogie du CHU de Toulouse

1) Contexte

Les avantages d'une suspension buvable de spironolactone dans l'InOrpha[®], détaillés dans la partie 3 du manuscrit, reposent notamment sur l'innocuité des excipients et de la formulation. Cependant, en moins de 24h, un sédiment compact apparaît, rendant difficile la remise en suspension (phénomène de *caking*). Pour son bon usage, l'étiquette de la préparation recommande une agitation vigoureuse de 2 minutes avant emploi. Cette durée d'agitation peut paraître longue, notamment pour les équipes infirmières, et *a fortiori*, pour l'entourage de l'enfant à domicile. Nous avons donc voulu vérifier que la dose administrée théorique était bien celle attendue.

2) Objectif

Le but de l'étude est d'évaluer le bon usage de la suspension buvable de spironolactone 5mg/ml dans deux unités de soins utilisant quotidiennement cette formule en deux temps ; évaluation de la dose prélevée en vue de l'administration au patient à (i) 2 ans et (ii) à 4 ans après la mise en place de cette suspension.

3) Matériel et méthode

L'étude a été menée dans les 2 services du CHU qui consomment le plus cette suspension buvable (réanimation néonatale et soins intensifs de néonatalogie) sur une période d'un mois (en mars 2020¹ et mars 2022). Pour conduire cette évaluation et s'assurer d'observer une variabilité dans la dose théorique, nous souhaitons travailler à partir de 15 doses théoriques par service.

Chaque service a reçu une boîte étiquetée au nom de l'étude. Cette boîte contenait une quinzaine de seringues à remplir de 1ml, une quinzaine de bouchons et la notice explicative de l'étude. La consigne était de prélever 1ml de la suspension buvable avant chaque administration aux patients sans modifier leur façon d'agiter le flacon. La date du prélèvement et le numéro de lot de la suspension buvable utilisée étaient notés sur le dispositif de prélèvement. Les prélèvements étaient datés, numérotés et anonymes. Une fiche reflexe à

¹ L'étude réalisée en 2020 a été effectuée par un interne du service et n'a pas été réalisée par mes soins. Avec son accord, nous présentons les résultats obtenus, non publiés à ce jour, afin d'étayer la situation.

destination des infirmières pour résumer l'étude et la conduite à tenir était fournie (annexe 2).

A l'issue des périodes de recueil, les prélèvements ont été dosés sur deux sessions (en 2020 et en 2022) par chromatographie liquide haute performance couplé à un détecteur UV (HPLC-UV). La méthode de dosage validée comprend une phase stationnaire en C18 250 x 4,6 mm (5 µm) et une phase mobile composée d'eau à 30% et d'acétonitrile à 70%. La longueur d'onde de détection utilisée est 254 nm. La concentration cible des prélèvements est de 50µg/mL (± 10% soit entre 45 et 55 µg/mL), en cohérence avec les résultats d'uniformité de teneur qui ont permis de libérer les lots produits et dispensés.

Lors de l'étude réalisée en 2022, 3 seringues contrôles de 1ml ont été prélevées au préparatoire à l'issue du contrôle de teneur d'un lot conforme. Ces prélèvements ont été conservés dans des seringues en polypropylène pendant 5 semaines. L'objectif était de mimer le temps le plus long entre le prélèvement par les infirmières et le dosage, afin d'exclure une éventuelle interaction contenant/contenu pouvant impacter les résultats du dosage.

L'analyse consiste à évaluer les pratiques des 2 services et de comparer l'évolution de leur pratique dans le temps. En cas de non-conformité, à l'issue de la première session, une sensibilisation par l'équipe pharmaceutique dédiée à ces services serait mise en œuvre. Si la dose est sous dosée ou sur dosée cela signifie que la durée d'agitation n'est pas respectée et que la formulation pharmaceutique n'est pas compatible avec un bon usage du médicament.

Pour évaluer la dispersion des résultats de mesures de la spironolactone dans les seringues, les données ont été exprimées en moyenne (m) et coefficient de variation (CV%) dans les groupes « services et années de l'étude ».

$$\text{Avec } CV = \frac{\text{écart-type}}{\text{moyenne}} \times 100.$$

Afin de pouvoir exploiter l'ensemble des données, les concentrations de spironolactone inférieures à la limite de détection étaient transformées arbitrairement à une concentration de 0,5 µg/mL. Les données de justesses étaient exprimées en médiane rang interquartile (IQR[25 ;75]). La justesse (%) est définie par l'équation suivante :

$$\text{Justesse} = \frac{\text{concentration théorique} - \text{concentration cible}}{\text{concentration cible}} \times 100.$$

4) Résultats

	2020		2022	
	Néonatalogie	Réanimation	Néonatalogie	Réanimation
Nombre de prélèvements	18	15	16	16
Concentration moyenne (µg/mL)	37,47	42,20	19,41	54,89
Ecart-type (µg/mL)	15,63	42,10	10,69	11,18
Coefficient de Variation %	41,71	99,76	55,08	20,36
Justesse moyenne (%)	-25,07	-15,61	-61,18	9,77
Médiane de la justesse	-20,47	-36,18	-57,18	17,27
Etendue interquartile IQR[25 ;75]	[-32,87 ; -2,70]	[-54,99 ; -12,18]	[-64,31 ; -48,02]	[-7,85 ; 27,36]

Tableau 3: Dispersion des résultats de mesures de la spironolactone dans les seringues dans les services de soins intensifs et réanimation pédiatrique en 2020 et 2022. (La moyenne et l'écart-type sont notés à titre indicatif pour mieux illustrer la variabilité).

Les résultats bruts sont présentés en annexes 3-4-5.

En 2020, les moyennes entre les deux services sont assez proches. Néanmoins, les doses théoriques du groupe réanimation sont beaucoup plus dispersées que dans le groupe néonatalogie. Ainsi, les doses administrées variaient plus d'un groupe à l'autre. Une importante variabilité entre les résultats avec un CV à 41% pour la Néonatalogie et à 99% pour la réanimation. Ces résultats sont non conformes comme en témoigne les différences de justesse entre les services (médiane -20.47% IQR_[25% ;75%] = [-32,87; -2,70] pour néonatalogie et médiane -36.18% IQR_[25% ;75%] = [-54,99 ; -12,18] pour la réanimation).

À la suite des résultats de cette première étude, les équipes pharmaceutiques du pôle pédiatrie ont mené une action de bon usage de la suspension buvable de spironolactone. Elles ont rappelé l'importance de la durée d'agitation avant administration. Un mail aux médecins prescripteurs et aux cadres de santé de ces deux services présentait les résultats de l'étude et rappelait l'importance de la durée d'agitation. En parallèle, un rappel oral avait été fait aux infirmières des services.

Une deuxième étude a été menée 2 ans plus tard pour objectiver l'effet de l'action de bon usage à long terme. Lors de cette étude, la tendance n'est plus la même. Cette fois, la dispersion des mesures est moins grande, avec une amélioration pour la réanimation avec un CV à 20%. En revanche, en Néonatalogie la tendance s'inverse, avec un CV à 55%. La différence entre les deux services s'explique par le défaut de justesse dans le service de Néonatalogie (-61% de la cible).

L'échange avec le service de Néonatalogie sur leur pratique courante a révélé la conservation systématique des formes buvables pédiatriques à température réfrigérée. Cette pratique peut rendre la redispersion du PA difficile. Cette hypothèse a été testée au laboratoire de contrôle et n'a pas permis de conclure formellement sur un effet du froid sur la vitesse de redispersion.

Au cours de cette deuxième étude, l'interaction contenu/contenant a été explorée. Le dosage de 3 seringues prélevées au préparatoire stockées dans les conditions de l'étude dans les services (40 jours) reste conforme (annexe 5). Ce contrôle élimine l'hypothèse d'interaction contenant/contenu qui aurait pu expliquer les résultats non conformes.

5) Discussion et conclusion

Notre étude a révélé l'importante variabilité dans les doses théoriques administrées, avec des doses quasi systématiquement inférieures à la cible. L'hypothèse d'un défaut dans l'agitation de la suspension a été retenue. En effet, (i) aucune dégradation n'a été observée dans l'étude de stabilité et (ii) la spironolactone ne s'adsorbe pas dans la seringue.

Une des limites méthodologiques de l'étude est de ne pas avoir suivi le volume approximatif de suspension dans le flacon. En effet, la dispersion du sédiment dans un flacon plein est plus longue que dans un flacon entamé de moitié. Des concentrations supérieures à la cible, rencontrées notamment en réanimation pourrait être liées à un flacon présentant un volume moindre et une redispersion facilitée.

Sur le plan pédagogique, la formation semble avoir eu plus d'effet en réanimation à long terme. Pour une évaluation plus fine de la formation, il aurait été préférable de refaire cette étude à court terme (1 mois) puis moyen terme (6 mois) pour évaluer l'effet de cette formation. L'effet de la formation initiale a probablement été limité par le turn over important des équipes IDE dans ces services et le nombre de tâches à accomplir dans ces services de soins intensifs.

Par ailleurs, si des équipes soignantes formées et habituées à administrer des formulations pédiatriques ne sont pas en mesure de donner une dose juste et reproductible, il est possible que les doses administrées par l'entourage de l'enfant à domicile ne soient également pas appropriées.

Au niveau clinique, les effets pouvant être attendus vont varier avec le niveau de liquide dans le flacon. Si le flacon est mal agité à la première utilisation du flacon, la dose administrée sera faible et conduira à une inefficacité, entraînant potentiellement des modifications itératives des posologies. Et en fin de flacon, une dose accrue par le prélèvement du sédiment pourrait conduire à un risque de surdosage et de toxicité.

Les médecins prescripteurs des services interrogés à la suite de l'étude n'ont pas constaté d'impact clinique direct de la majorité des sous dosages de l'étude. Néanmoins, cette réponse n'était pas objectivée par un suivi chiffré. La spironolactone étant une des différentes lignes thérapeutiques de prise en charge des patients traités, il semble difficile d'imputer un impact clinique à la seule dose de spironolactone.

La formulation proposée montre donc ses limites dans le cadre d'une utilisation dans les services de soins. Une réflexion sur l'optimisation de la formulation galénique pour limiter le phénomène de caking s'avère nécessaire. Cette nouvelle formulation devra sédimenter

moins rapidement et avoir une meilleure dispersion. Une nouvelle étude de la dose administrée dans les 2 services pourra être conduite à moyen terme afin de voir l'impact en vie réelle de cette nouvelle formulation galénique.

PARTIE 3 : OPTIMISATION D'UNE FORMULATION GALENIQUE DE SUSPENSION BUVABLE DE SPIRONOLACTONE

I. Formulation galénique

Au regard des conclusions de la deuxième partie de la thèse, nous souhaitons optimiser la formulation galénique de la suspension buvable de spironolactone à 5mg/ml, avec une stabilité permettant de réaliser une campagne de production par mois. L'objectif est donc de parvenir à une formulation stable sur les plan physico-chimique et microbiologique à 4 mois.

Lors des premiers travaux de formulation de la suspension buvable de spironolactone, en vue du remplacement des gélules de spironolactone, les médecins prescripteurs avaient été consultés pour le choix du véhicule pour préparation buvable. En effet, la stratégie du préparatoire était d'utiliser un véhicule universel prêt à l'emploi pour optimiser le rendement de préparation. Des laboratoires pharmaceutiques commercialisent ces véhicules pour les préparations buvables en vue de faciliter la formulation de préparations buvables pour de nombreux principes actifs. L'InOrpha® avait été choisi par rapport au SyrSpend® SF pH4 Liquide en raison de la présence de benzoate de sodium dans ce dernier. En effet, cet excipient peut conduire à un ictère chez les nouveau-nés de moins de 4 semaines, hors une partie de la population cible est susceptible à ce syndrome.

Cette formule présentant ses limites, une nouvelle étude de faisabilité technique est mise en œuvre. Après un bref rappel de la physico-chimie de la spironolactone, (i) nous sélectionnerons tout d'abord un ou plusieurs des véhicules disponibles puis (ii) nous conduirons des études de pré-formulation jusqu'à (iii) l'étude de stabilité de la formule retenue.

1) Propriétés physico-chimiques de la spironolactone

La spironolactone est une molécule développée en 1957 (33). C'est un composé stéroïdique (noyau pregnane) comprenant un ester cyclique lactone de formule brute $C_{24}H_{32}O_4S$ (S-[(2'R)-3,5'-Dioxo-3',4'-dihydro-5'H-spiro[androst-4-ene-17,2'-furan]-7 α -yl] ethanethioate), de la famille des lactones à squelette stéroïdique de masse moléculaire de 416.6g/mol, et stable en milieu acide (stabilité maximale décrite à pH 4.5 (34)). Sa monographie dans la Pharmacopée Européenne la présente comme une poudre blanche à jaunâtre pratiquement insoluble dans l'eau (35). Il est possible de la doser par HPLC-UV (détection à 254nm).

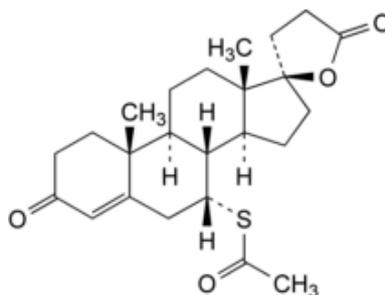


Figure 5: Structure chimique de la spironolactone (35)

Dans sa voie de dégradation chimique, la spironolactone est susceptible à l'hydrolyse basique de son cycle lactone (36). Elle est également sensible à l'hydrolyse acide et dans une moindre mesure, au stress oxydatif. La photolyse et la chaleur ont peu d'impact sur cette molécule (36).

2) Choix du véhicule universel pour préparation buvable

Sur le marché français, il existe en 2022, 4 gammes de mélange d'excipients constituant un véhicule universel pour préparations buvables : InOrpha® (INRESA), ORA Blend®(PERRIGO), SyrSpend® SF pH4 Liquide et SyrSpend® SF pH4 ou alka poudre (FAGRON). Ils sont sans sucre (dits *Sugar-Free*), (le saccharose étant un excipient à effet notoire(37)) et stables à pH acide (la spironolactone étant stable à pH acide). Ces véhicules sont aromatisés permettant de masquer le goût du principe actif et d'en améliorer la palatabilité.

Il n'existe pas toujours d'étude de stabilité entre le véhicule et les différents principes actifs. Une étude de stabilité en interne doit alors être réalisée.

a) Tests de formulation

Dans un premier temps, ces 4 véhicules commerciaux ont été testés à la concentration de 5mg/ml de spironolactone. Pour l'ensemble des expérimentations, nous avons utilisé la poudre de Spironolactone micronisée (Inresa®), Matière Première à Usage Pharmaceutique. Les préparations ont ensuite été comparées entre elles. Comme évoqué dans la partie II, avec l'InOrpha® (notre témoin), il apparaît rapidement un sédiment au fond du flacon (24h) tandis qu'avec les autres véhicules il n'apparaît pas de sédiment, même au bout d'un mois de conservation.

b) Bénéfices/risques des différents véhicules

Dans un second temps, nous avons réalisé une comparaison de la composition et des caractéristiques physico-chimiques des différents véhicules (tableau 4). Une analyse des excipients à effet notoire pour la voie orale a été effectuée en croisant la liste des excipients

à effet notoire de l'ANSM/EMA et la base de données STEP pour les 4 véhicules commercialisés prêts à l'emploi étudiés. Les excipients à effet notoire de l'ANSM sont surlignés en gris dans le tableau et les excipients référencés dans la base STEP présentent un astérisque (*). Le but est de choisir une formulation galénique avec le moins d'excipients à effet notoire.

Véhicule	InOrpha®	ORA Blend® SF	SyrSpend® SF Liquide	SyrSpend® SF pH4 Poudre
Conditionnement	Flacon de 1L	Flacon 473mL	Flacon de 500mL	Pot de 6,5g pour 100mL de suspension ou 13g pour 200mL de suspension
Conservation	3 mois après ouverture	2 mois après ouverture	12 mois après ouverture	12 mois après ouverture
Composition				
Nombre de composants	9	17	9	4
Phase liquide	Eau purifiée	Eau purifié	Eau purifiée	
Agents épaississants	Hydroxyéthylcellulose	Cellulose microcristalline*, carboxyméthylcellulose sodique* , gomme xanthane*, carraghénane	Amidon de maïs*	Amidon de maïs*
Anti-cristallisation	Glycérol<1%*	Glycérol*		
Edulcorants	Sucralose*	Saccharine sodique* , Sorbitol*	Sucralose*	Sucralose*
Aromatisants	Masquant d'amertume et arôme caramel	Arôme agrumes et baie	Cerise « cherry » ou goût neutre	
Agents de tampon	Acide citrique* Citrate de sodium	Acide citrique*, citrate de sodium , phosphate de sodium , sulfate de calcium	Citrate de sodium , acide citrique*, acide malique	Citrate de sodium , acide citrique*
Agents anti mousse		Diméticone	Simeticone	
Conservateur	Sorbate de potassium*	Méthylparabène* , Propylparabène , sorbate de potassium*	Benzoate de sodium<0.1%*	

pH	4,2 à 5,0	4 à 4,5	4,0 à 4,4	4,0 à 5,0
Viscosité	20 à 60 mPa/s	1000mPa/s	>>1000mPa/s	
Osmolalité	170mOsm /kg	1027 mOsm/kg	<50 mOsmol/kg	<50 mOsmol/kg
Densité	1,001 à 1,010	1,018 à 1,958	1,00 à 1,04	
Prix (HT)	36 € /L	30 € /473mL	39,90 € /500mL	14 € / 13g
Etude de stabilité spironolactone	Oui dosage 5mg/ml stable 4 mois TA et 1 mois après ouverture (données non publiées)	Oui dosage 25mg/ml stable 3 mois TA (38)	Oui dosages 2 ;2.5 ;25mg/ml Stable 3 mois TA, frigo (39)	Oui dosages 2 ;2.5 ;25mg/ml Stable 14 jours frigo et 5mg/ml stable 21j après ouverture(39,40)

Tableau 4 : Comparaison des différents véhicules universels sans sucre pour préparation buvable à pH acide.

Parmi, les excipients à effet notoire, on retrouve alternativement dans les formules (37) :

- qui peut provoquer des troubles digestifs (diarrhées) et des maux de tête par voie orale. La présence de cet excipient doit être mentionnée si seuil $\geq 10\text{g/dose}$.
- Le sorbitol qui est une source de fructose. Il convient de mentionner la quantité de sorbitol dans la formulation. Les patients présentant une intolérance héréditaire au fructose ne doivent pas recevoir ce médicament. A partir de 140 mg/Kg/jour, le sorbitol peut causer une gêne gastro-intestinale et un effet laxatif léger.
- Le parahydroxybenzoate (méthylparaben) qui peut provoquer des réactions allergiques.
- L'acide benzoïque/le sel de benzoate qui peut accroître le risque d'ictère chez les nouveau-nés (jusqu'à 4 semaines). En effet, ils n'ont pas l'enzyme permettant sa conjugaison avec la Glycine ce qui engendre une accumulation d'acide benzoïque qui se fixe fortement à l'albumine. Cela engendre une augmentation de la bilirubinémie secondairement à son déplacement de l'albumine d'autant plus en cas d'hyperbilirubinémie. Il y a alors un risque d'acidose métabolique et de neurotoxicité. Il convient alors de mentionner la quantité en mg d'acide benzoïque/de sel de benzoate par dose ou par volume unitaire avec une dose max de 5mg/kg en pédiatrie.
- Le sel de sodium : Il convient de préciser la quantité de sodium par dose administrée. Si la quantité est de moins de 1 mmol (23 mg) de sodium par dose il est considéré comme essentiellement « sans sodium ».
- Le sel de potassium : Il convient de préciser la quantité de potassium par dose administrée avec un seuil de 1mmol par dose administrée par voie oral. La quantité est à prendre en compte chez les patients insuffisants rénaux ou chez les patients contrôlant leur apport alimentaire en potassium.
- Les excipients répertoriés dans la base STEP (sucralose, saccharine sodique, cellulose microcristalline, carboxyméthylcellulose sodique, gomme xanthane, amidon de maïs,

acide citrique) ne font pas l'objet d'alerte particulière en termes de sécurité d'emploi en pédiatrie pour la voie orale (41).

Outre les excipients à effets notoires, d'autres critères physico-chimiques tels que l'osmolalité et la viscosité doivent être pris en compte pour le choix du véhicule. Une viscosité élevée peut conduire à une mauvaise redispersion du sédiment et donc à une variabilité de la dose prélevée. Par ailleurs, des effets indésirables gastro-intestinaux surviennent pour une osmolalité supérieure à 500 mOsm/kg dans des préparations orales chez les nourrissons de faible poids à la naissance (42).

c) Conclusions

Aux vues des résultats des tests de formulation et des composants de chacun de ces véhicules, chaque formule présente ses limites :

- La formule dans l'InOrpha® sédimente en 24h, la redispersion de la spironolactone est lente et objectivée par l'étude menée dans les services de soins (partie 2 de la thèse). En revanche, sa faible osmolalité et sa faible teneur en excipients à effet notoire en font un véhicule d'intérêt.
- La formule dans l'ORA Blend® est convenable sur le plan visuel, en lien avec une viscosité élevée, mais sa très forte osmolalité et la présence de plusieurs excipients à effet notoire nous ont conduit à ne pas retenir cette formule à visée pédiatrique (population cible de nouveau-nés, nourrissons).
- La formule dans le SyrSpend® SF liquide présentait une viscosité importante. Cette caractéristique nous a fait craindre des difficultés de prélèvement. Par ailleurs, la présence de benzoate de sodium était un élément limitant pour les prescripteurs.
- Enfin la formule dans le SyrSpend® SF pH4 poudre n'a pas été retenue malgré une composition exempte de tout excipient à effet notoire. En effet, les études de stabilité (à dosages 2 ; 2.5 ; 25mg/ml) limitées à 14 jours à température réfrigérée sont un frein dans notre volonté d'optimisation de production (une campagne mensuelle de production). En effet, l'absence de conservateur étant un facteur de risque microbiologique sur de courte durée. Hors, nous souhaitons une nouvelle formulation galénique avec la même durée de stabilité que celle déjà validée (4 mois).

En l'état, retenir une de ces quatre formules ne paraît pas opportun dans notre organisation. Des travaux suggèrent l'optimisation de certains véhicules commerciaux pour la mise en suspension de certains principes actifs (43). Nous optons pour une stratégie d'optimisation de la formule actuelle, à base d'InOrpha® en raison de sa formule épurée. Deux hypothèses de travail seront testées (i) améliorer la solubilité de la spironolactone ou (ii) réduire sa vitesse de sédimentation.

3) Etudes de pré formulation

Pour optimiser la formulation de la suspension buvable de spironolactone 5mg/ml, nos recherches s'orientent vers les agents de suspension. Le premier axe d'amélioration nous a conduit à étudier l'intérêt des tensioactifs (ou agents mouillants). Ainsi pour une formulation proche, Fuss et al ont décrit l'utilisation de polysorbate 80 dans une formulation de Nicardipine 2mg/ml dans l'InOrpha® (43).

a) Polysorbate 80 (Polyoxyethylene Sorbitan Fatty Acid Esters)

Cet excipient est un tensioactif non ionique qui possède des propriétés d'agent solubilisant, d'agent de suspension et d'agent mouillant (44). Comme agent solubilisant, il peut être utilisé dans la fourchette de concentration allant de 1 à 15% (44).

En termes d'innocuité pour la population pédiatrique, cet excipient n'est pas caractérisé par des effets notoires. Toutefois à ce jour, il y a peu de recul sur son utilisation chez le nouveau-né. Il fait partie de la liste prioritaire d'excipients documentés comme toxiques par l'étude ESNEE (24). Les principaux effets indésirables rapportés ont été décrits dans le cadre d'une administration parentérale. L'OMS a fixé une dose journalière admissible maximale estimée à 25 mg/kg de poids corporel pour les polysorbates (44).

Des essais ont été conduits pour une même concentration de spironolactone 5mg/ml dans l'InOrpha® avec des proportions croissantes de polysorbate 80 (Cooper) : 0,5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 7%, 10% et 12%. Pour ces essais, le polysorbate était ajouté à l'InOrpha® (volume final 40ml). Cette solution est mise sous agitation magnétique 10 minutes. Puis dans un second temps, on ajoute 200mg de spironolactone. Le mélange sera mis à l'agitation magnétique pendant 1heure.

Quel que soit la proportion de polysorbate, un sédiment au fond du flacon avec une suspension floquée (surnageant clair) sont observés (figure 6). Par ailleurs, pour les concentrations en polysorbate élevées, un voile apparaît au-dessus du sédiment (cf photo des flacons à 10% et 12%). On formule l'hypothèse que ce phénomène corresponde au polysorbate qui s'adsorbe à la surface des particules de spironolactone par encombrement stérique.

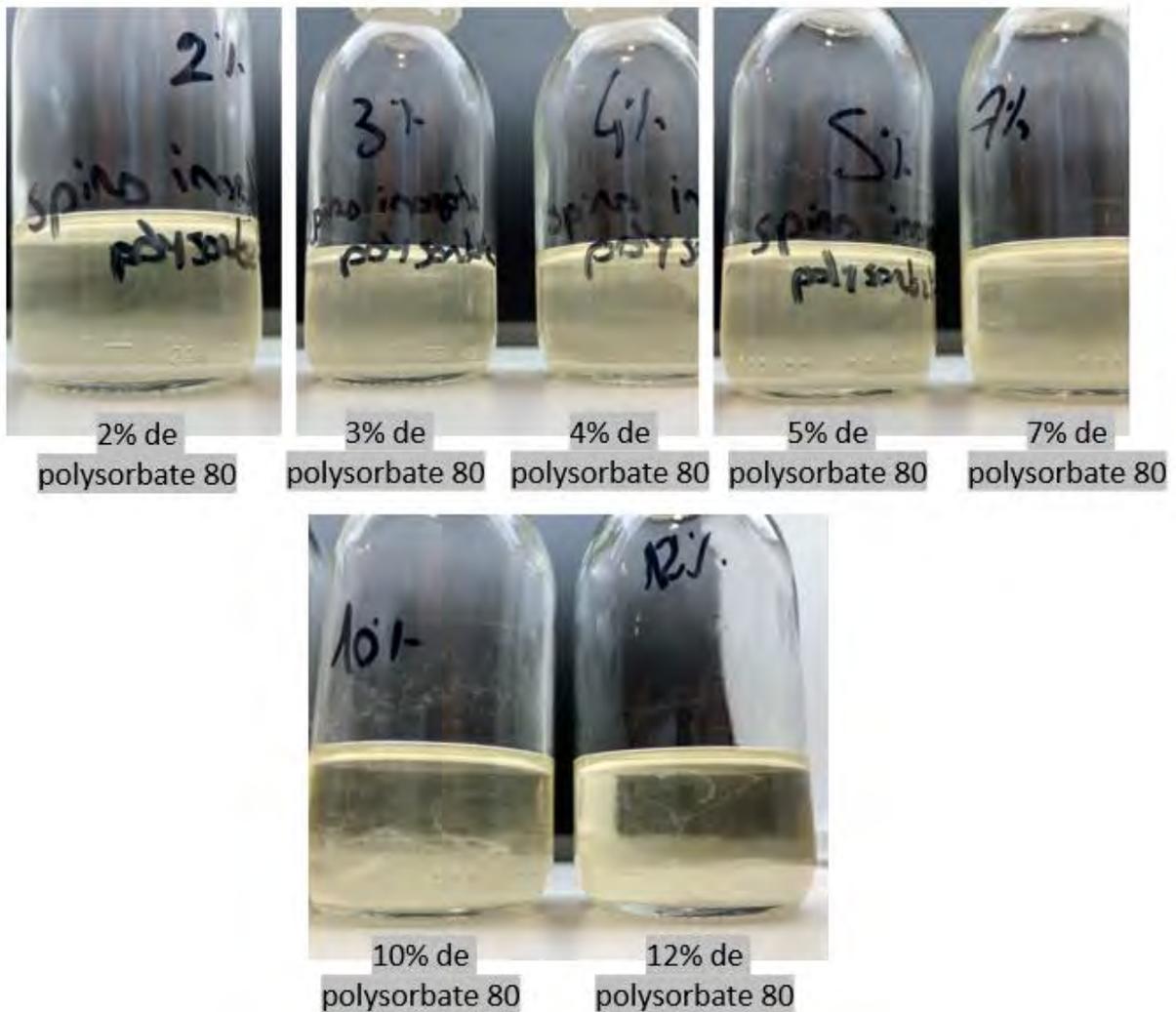


Figure 6: Tests de pré-formulation avec InOrpha® + Polysorbate 80 (différentes concentrations) + spironolactone 5mg/ml

L'ajout de polysorbate 80 (jusqu'à 12%) ne permet pas de solubiliser la spironolactone qui sédimente rapidement. Le temps d'agitation pour remettre en suspension le sédiment de spironolactone est diminué d'un facteur 3 en présence de polysorbate 80 + InOrpha® versus InOrpha® seul. Ce phénomène s'accompagne de l'apparition de mousse (dont la proportion augmente avec la teneur en polysorbate, figure 7). En effet, il n'y a pas d'anti mousse dans l'InOrpha® et l'ajout de forte concentration de polysorbate 80 augmente la quantité de mousse à l'agitation.

Si le temps d'agitation réduit est un élément positif dans la formulation, la formation de mousse est problématique pour assurer l'uniformité des doses prélevées (par la présence « d'air » pour un volume donné).

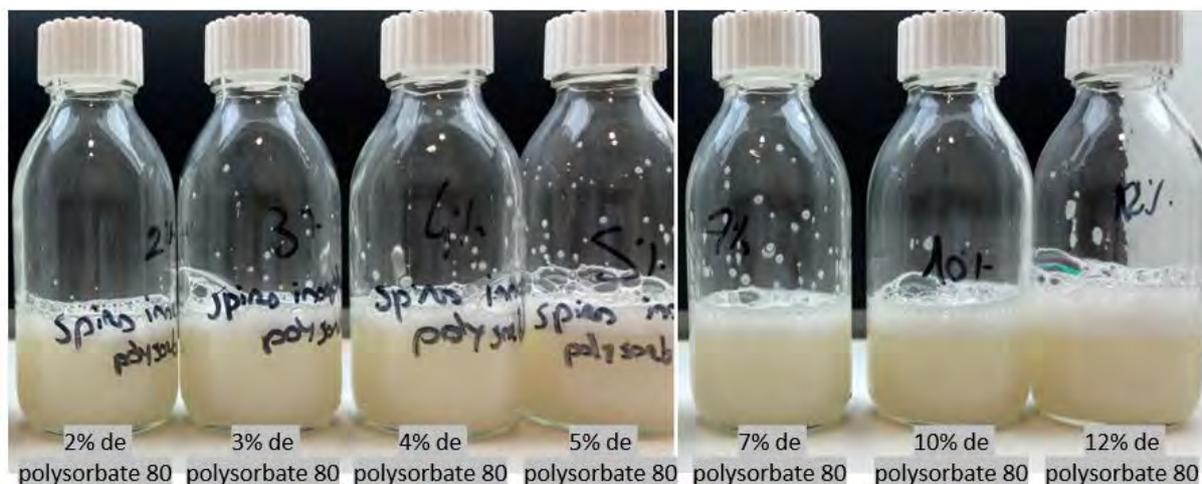


Figure 7: Aspect des flacons (quantité de mousse) après remise en suspension du sédiment

Enfin, afin d'évaluer une éventuelle concentration saturante en spironolactone, on teste une formule à 2mg/ml de spironolactone dans l'InOrpha® contenant 1% de polysorbate 80. Aucune différence n'est observée sur le sédiment au fond du flacon ou sur le temps d'agitation. L'ajout du polysorbate 80 n'est pas satisfaisant pour notre formule.

L'absence de recul sur une utilisation chronique du polysorbate et ces essais conduisant à l'apparition de mousse nous ont orienté vers une autre alternative visant à réduire la vitesse de sédimentation de la spironolactone dans l'InOrpha®. Nous avons donc réalisé des essais avec des agents épaississants (qui améliorent la viscosité de la suspension et réduisent la vitesse de sédimentation).

b) Agent de viscosité

En augmentant la viscosité de la suspension, nous avons pour objectif de diminuer la vitesse de sédimentation et d'augmenter la stabilité physique de la suspension. Pour cela des essais ont été réalisés avec 2 types de gommes d'origine naturelle : la gomme xanthane et la carraghénane (carraghénane iota). Ces gommes sont présentes dans la formulation de l'ORA Blend® pour laquelle aucun sédiment n'a été observé, même au bout d'un mois. En termes de sécurité d'utilisation, la base STEP ne fait pas ressortir d'alerte particulière concernant la sécurité d'emploi en pédiatrie par voie orale de ces deux gommes (26). Peu de données sont disponibles pour décrire les quantités recommandées de gomme xanthane pour optimiser la mise en suspension. Le laboratoire OPELLA HEALTHCARE qui commercialise la suspension buvable de Doliprane® 2,4% nous a indiqué avoir une quantité de gomme xanthane d'environ 0,7%. En ce qui concerne la quantité recommandée de carraghénane iota pour les suspensions, elle est comprise entre 0,5% et 1% (44). Les fiches de données de sécurité de l'Ora-Blend® évoquent des teneurs < 1% pour chacune de ces gommes. Une revue de la base

Thériaque (45) indique l'utilisation de ces gommes dans les médicaments avec AMM. La carraghénane est peu retrouvée dans la formulation de médicaments, principalement des formes gélules ou comprimés ; la gomme xanthane est quant à elle utilisée dans un bon nombre de médicaments, dont des formes suspensions buvables pédiatriques (Advil®, Amoxicilline, Doliprane® notamment).

Comme pour le polysorbate, des préparations de spironolactone à 5mg/ml dans l'InOrpha® et avec une concentration croissante en gomme xanthane (0,2%, 0,5%, 0,7%) ou en carraghénane (0,2% et 0,5%) ont été évaluées sur leur capacité à limiter la sédimentation de la spironolactone. La carraghénane n'est pas testée à des teneurs supérieures devant le faible recul sur sa sécurité d'emploi et son utilisation en pédiatrie et plus souvent retrouvée dans les formes solides.

Pour ces tests, on ajoute l'agent de viscosité à 60ml d'InOrpha®, on agite pendant 10 minutes avec un barreau aimanté puis on ajoute 300mg spironolactone. On met alors la suspension à l'agitation magnétique pendant 1heure.

Visuellement, pour des concentrations équivalentes en gommes, la préparation avec la carraghénane s'est avérée être moins visqueuse que celle avec la gomme xanthane. Au bout de 24 heures, on voit apparaître un sédiment pour les préparations avec la carraghénane pour les 2 concentrations (0,2% et 0,5%). Cette sédimentation n'a pas été observée avec les préparations à base de gomme xanthane.

Devant ces résultats et le faible recul en pédiatrie, la carraghénane n'a pas été retenue pour la suite du développement de la suspension.

Quinze jours après la préparation (conservée à température ambiante (TA)), un très léger sédiment a pu être observé pour les préparations contenant la gomme xanthane à la concentration de 0,2%. Néanmoins, la remise en suspension était facile. Aucune sédimentation n'a été constaté pour les concentrations de 0,5% et 0,7%. La suspension avec 0,7% de gomme xanthane était cependant très visqueuse et donc susceptible de rendre difficile le prélèvement d'une dose à l'aide d'une seringue entérale. Cette concentration n'a donc pas été retenue pour la suite des tests.

A partir de la gomme xanthane, et pour différentes proportions nous avons réalisé des essais de production avec des volumes supérieurs (300 ml) en vue d'optimiser la qualité du mélange par l'utilisation d'un mélangeur de laboratoire TURBOTEST®. Les concentrations en gomme xanthane évaluées sont limitées à 0,2%, 0,3%, 0,4% et 0,5%. La durée d'agitation une fois la spironolactone ajoutée est de 3h à 600 tours/min pour la concentration de 0,2% et 0,3%. La vitesse d'agitation augmente avec la viscosité pour maintenir une qualité optimale du mélange. Ainsi pour les concentrations de 0,4% et 0,5% la vitesse d'agitation était de 800 tours/min.

Après 15 jours de conservation à TA, aucun sédiment n'a été observé quelle que soit la concentration testée. La vitesse développée par le mélangeur de laboratoire permet l'obtention d'un vortex qui améliore le mélange de la gomme à l'InOrpha®. L'ajout de la spironolactone à cette matrice (matrice constituée après environ 1 heure de mélange) lui permet une meilleure mise en suspension.

Plus la concentration en gomme xanthane est élevée, plus la suspension obtenue est visqueuse avec visuellement une fracture dans le comportement de la suspension entre les concentrations 0,2%/0,3% et 0,4%/0,5%. En effet, à la concentration 0,4% et 0,5% la suspension est très visqueuse contrairement à la concentration 0,2% et 0,3% où la suspension est plus fluide. Le choix de la proportion de gomme xanthane à introduire dans la suspension a mis en balance (i) la viscosité (ii) la quantité de gomme introduite, compte tenu du faible recul sur son utilisation sur cette population et (iii) la stabilité de la suspension physico-chimique sur le long terme.

Notre postulat est d'évaluer la formulation qui introduit la plus faible quantité efficace de gomme pour la mise en suspension de la spironolactone pour limiter l'impact éventuel sur la stabilité de l'InOrpha® à long terme. Des industriels utilisant la gomme xanthane dans des suspensions ont été sollicités pour connaître la proportion utilisée. Ils ont indiqué que les concentrations étaient souvent supérieures à celle retenue ici (voisin de 0.7%). Néanmoins, il y avait plus d'excipients dans leur formule, comparé à notre suspension basée sur l'InOrpha®. Il n'était donc pas possible de se baser sur les teneurs moyennes de ces laboratoires pour nos formulations. En effet, les recommandations préconisent une approche holistique lors de la formulation d'une suspension buvable, l'interaction qualitative et quantitative des différents excipients permettant d'assurer la stabilité du mélange (17) .

Pour évaluer la nouvelle formulation de spironolactone 5mg/ml dans l'InOrpha®, il a donc été décidé d'incorporer 0.2% de gomme xanthane. Cette proportion est la plus faible concentration efficace pour réduire la vitesse de sédimentation de la suspension et augmenter la stabilité physique de celle-ci.

II. Etude de stabilité de la nouvelle formulation

1) Objectifs

Dans un premier temps, l'objectif a été de développer et valider une méthode analytique indicatrice de stabilité par chromatographie liquide haute performance couplé à un détecteur UV à barrette de diode (HPLC-UV DAD). Cette méthode doit permettre d'identifier et de quantifier le principe actif et de voir l'apparition d'éventuels produits de dégradation.

Dans un deuxième temps, nous allons évaluer la stabilité physico-chimique et microbiologique de la nouvelle formulation galénique pour définir la durée de conservation et les conditions de stockage optimales permettant une mise à disposition d'une préparation hospitalière conforme aux exigences des Bonnes Pratiques de Préparation (BPP).

2) Matériels et méthodes

a) Méthode analytique indicatrice de stabilité

Méthode de dosage

La concentration-cible pour le dosage des échantillons était de 50 µg/ml. Une gamme en 5 points a été réalisée avec un intervalle de concentrations compris entre 60 et 140% de la concentration-cible (46).

Chaque point de gamme a été préparé de manière indépendante : chaque point est issu d'une pesée de 20mg de spironolactone introduite dans une fiole jaugée remplie à 20ml d'acétonitrile grade HPLC. Les solutions mères obtenues (1mg/ml) sont diluées au 1/10^{ème} avec de l'acétonitrile pour donner des solutions filles 1 (SF1) à 100µg/ml. Les SF1 sont vortexées.

La dilution des points de gamme est réalisée dans un mélange de solvants 50:50 eau/acétonitrile (grade HPLC) selon le protocole présenté au tableau 5.

Concentration en Spironolactone des points de gamme (µg/ml)	30	40	50	60	70
Volume de SF1 (µL) [SF1] = 100µg/ml	300	400	500	600	700
Volume mélange de solvant (µL)	700	600	500	400	300

Tableau 5 : Protocole de préparation finale des points de gamme à partir de la SF1

Conditions chromatographiques

Les analyses ont été conduites par HPLC-UV à l'aide de l'appareil Ultimate 3000 à barrette de diodes (Thermoscientific®). L'étude a été faite en phase inverse avec une phase stationnaire greffée en C18, PRONTOSIL SPHERIBOND C18 250x4,6 mm (5 µm) thermostatée à 30°C. La phase mobile est composée d'un mélange acétonitrile et eau (70:30 v/v). Le pompage est en mode isocratique au débit de 1 ml/min. Le volume d'injection de l'échantillon était de 10 µL. La longueur d'onde de détection utilisée est 254 nm.

Critères de validation de la méthode de dosage

La méthode de dosage est validée selon les directives de l'ICH Q2 (R1) (46). Pour cela, elle doit répondre à différents critères : fonction de calibration, spécificité, exactitude, fidélité avec la répétabilité et la fidélité intermédiaire.

La **fonction de calibration** représente la réponse analytique en fonction de la concentration. Ici, le modèle retenu est une droite à 5 points (réponse linéaire) et permet d'obtenir des résultats directement proportionnels à la quantité en analyte présent dans l'échantillon pour l'intervalle de concentrations donné (47).

L'équation de la droite de calibration obtenue est au format $Y = aX + b$ avec $Y =$ aire sous le pic de la réponse du détecteur (AUC en $\text{mAU}\cdot\text{min}^{-1}$) et $X =$ concentration obtenue de l'analyte ($\mu\text{g}/\text{ml}$) et a et b , variables aléatoires. Elle est associée à un coefficient de détermination r^2 , qui indique la force d'adéquation entre le modèle de cette régression et les données collectées. D'après la SFSTP (*Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques*), le coefficient de détermination r^2 doit être au moins supérieur à 0,9900 (48). Sa cible est retenue au laboratoire de contrôle est de 0.995.

La validation de la fonction de calibration est conditionnée au passage successif de trois gammes indépendantes analysées par HPLC-UV (chaque point de gamme étant préparé à partir d'une pesée indépendante, les 3 gammes étant réalisées sur 3 jours par deux opérateurs différents au total).

La **justesse** exprime l'étroitesse de l'accord entre la valeur moyenne obtenue à partir d'une série de résultats d'essais et la valeur théorique considérée comme vraie. Il s'agit d'une mesure de l'erreur systématique (biais). La justesse sera étudiée à partir des données obtenues avec les standards de validation (Vs). La justesse est exprimée en termes de biais absolu ($\mu\text{g}/\text{ml}$), de biais relatif (%) ou de taux de recouvrement (%) pour un niveau de concentration. Le biais relatif est défini à 5% avec un seuil de rejet à 10% au laboratoire de contrôle. Le taux de recouvrement (R%) est rapport entre les concentrations obtenues et les concentrations théoriques de la gamme, il est défini par l'équation suivante : $R\% = 100 \cdot X / \text{concentration théorique}$ (47,49). Ses valeurs de référence au laboratoire sont comprises entre 95 et 105%.

La **fidélité** exprime le coefficient de variation d'une série de mesures provenant d'un même échantillon homogène (résultats d'essais indépendants) dans des conditions fixées. La fidélité communique une information sur la distribution des erreurs aléatoires (47,49). Elle est analysée par l'intermédiaire des standards de validation (Vs).

Ici, un seul niveau de concentration sera réalisé qui représente 100 % de la concentration cible de spironolactone ($50\mu\text{g}/\text{ml}$) dans la matrice InOrpha® et gomme xanthane à 0,2%. Le choix d'une seule concentration s'explique par (i) le niveau de difficulté de réalisation la solution

mère ([1] Matière première très électrostatique à introduire dans la fiole jaugée de 100 ml, [2] difficulté d'obtenir un niveau juste dans la fiole jaugée (formation de bulles et produit qui reste sur les parois en lien avec sa viscosité), [3] difficulté d'homogénéisation de la suspension dans la fiole) et (ii) notre volonté de produire des préparations à une seule concentration finale et (iii) l'adéquation avec le référentiel ICH Q2 (R1) (46).

Chaque jour pendant 3 jours, on prépare un volume suffisant de matrice InOrpha® contenant 0,2% de gomme xanthane pour faire les 6 Vs. Ce mélange sera agité 1 heure au mélangeur de laboratoire TURBOTEST®.

Les 6 Vs sont préparées à partir de 6 pesées de spironolactone indépendantes. La poudre de chaque pesée sera introduite dans une fiole jaugée à laquelle sera ajoutée le volume adéquat de matrice pour obtenir une solution mère de spironolactone à 5mg/ml. Chaque solution mère est ensuite diluée au 1/5^{ème} avec de l'acétonitrile pur pour donner une première solution fille (SF1) à 1mg/ml qui sera vortexée, puis agitée pendant 8min à l'aide de l'agitateur automatique et enfin centrifugée à 3500 tours/min pendant 5 min à 20°C. On récupère alors 100µL du surnageant de SF1 que l'on dilue dans 1900µL du mélange ACN/Eau à 50/50 (dilution au 1/20^{ème}) pour obtenir la concentration finale d'un Vs de 50µg/ml.

La fidélité est évaluée à différents niveaux :

- Le 1^{er} niveau correspondant à la répétabilité qui exprime la précision dans les mêmes conditions opératoires sur une court intervalle de temps (précision intra-jour avec la préparation de 6 VS indépendant le même jour).
- Le 2nd niveau correspond à la fidélité intermédiaire qui exprime les variations intra-laboratoires : jours différents, différents analystes, etc (précision inter-jour avec la répétition des préparations sur 3 jours différents et deux manipulateurs différents) (47,49).

Chaque Vs est passé en dupliqué dans l'HPLC-UV.

La mesure de la fidélité est effectuée par la détermination des coefficients de variation pour la répétabilité et la fidélité intermédiaire (47,49). Sa limite d'acceptation est définie au laboratoire à 5%.

L'**exactitude** est le paramètre qui inclus à la fois l'erreur systématique et l'erreur aléatoire (c'est-à-dire justesse et fidélité). On parle alors d'erreur totale. L'exactitude représente la finalité d'une validation de procédure analytique car elle permet de garantir la fiabilité de chacune des mesures (49,50).

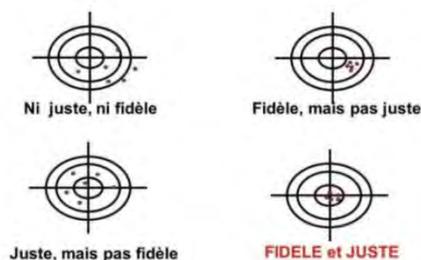


Figure 8 : Illustration de la fidélité, justesse et exactitude (49)

Le profil d'exactitude est un outil graphique qui permet de dire si la méthode analytique est capable de fournir des résultats dans les limites d'acceptation fixées *a priori* par le manipulateur.

La **limite de détection** (LD) correspond à la plus faible quantité de la substance analysée que la méthode permet de détecter, sans nécessairement fournir la valeur exacte. Elle peut être estimée de différentes manières. Elle est définie ici par l'approche de l'écart-type de la réponse et de la pente de la courbe d'étalonnage avec (51) :

$$LD = 3,3 \frac{s}{p}; \text{ avec } s = \text{écart-type résiduel et } p = \text{pente de la courbe d'étalonnage}$$

Spécificité, les critères pour définir une méthode indicatrice de stabilité

L'effet matrice et la spécificité sont également évalués dans le cas des méthodes indicatrices de stabilité.

L'**effet matrice** doit être évalué. La spironolactone est ajoutée à un mélange d'excipients (InOrpha® et gomme xanthane à 0,2%), il est donc nécessaire de vérifier que ces excipients n'interfèrent pas dans le dosage de la spironolactone. Pour réaliser ce test, nous avons utilisé une méthode alternative à la méthode habituelle. En effet, au vu de la viscosité de la matrice constituée d'InOrpha® et gomme xanthane et de la longue durée d'agitation pour homogénéiser la poudre de spironolactone (1h à l'agitateur magnétique), il était trop lourd de comparer des gammes de calibration en 5 points avec et sans matrice. Nous avons choisi de préparer 5 standards de validation à 100% de la concentration cible avec et sans matrice le 1^{er} jour de l'analyse et de les comparer en se basant sur la droite de calibration obtenue le 1^{er} jour. Une éventuelle interférence au temps de rétention de la spironolactone a été recherchée par analyse spectrale et l'effet matrice a été analysé par un test d'ANOVA.

La **dégradation forcée** permet de valider la capacité indicatrice de stabilité de la méthode analytique développée. Ce type de procédure analytique doit permettre de distinguer le principe actif à analyser de ses produits de dégradation potentiellement formés ou impuretés durant l'étude de stabilité dans les conditions de stockage définies. Il n'existe pas à notre

connaissance dans la littérature de méthode indicatrice de stabilité pour la formulation galénique que nous utilisons.

Ce procédé consiste à exposer le principe actif et/ou le produit fini (*i.e.* suspension buvable) à une hydrolyse acide et alcaline, et des conditions de stress d'oxydation, thermique et photolytique. Le but n'est pas de détruire toute la molécule mais de détruire environ 20 % de la molécule dans le but d'éviter la formation de produit de dégradations secondaire (47).

Le protocole de dégradation forcée de la molécule et du produit fini (suspension buvable) suit les recommandations du guide de la SFPC-GERPAC, selon le tableau 6. Les échantillons de spironolactone et suspension de spironolactone sont préparés à une concentration initiale de 20mg/ml.

Conditons dégradations	Type d'échantillon	Condition opératoire	Neutralisation
Dégradation acide	1ml de spironolactone dans ACN + 1ml HCL 0,1N	60°C pendant 2h	1ml NaOH 0,1N + ACN
	1ml de spironolactone dans ACN + 1ml HCL 0,5N		1ml NaOH 0,5N + ACN
	1ml de spironolactone dans ACN + 1ml HCL 1N		1ml NaOH 1N + ACN
	1ml de matrice InOrpha + gomme xanthane 0,2% + 1ml HCL 1N		1ml NaOH 1N + ACN
	1ml de suspension de spironolactone + 1ml HCL 0,1N		1ml NaOH 0,1N + ACN
	1ml de suspension de spironolactone + 1ml HCL 0,5N		1ml NaOH 0,5N + ACN
	1ml de suspension de spironolactone + 1ml HCL 1N		1ml NaOH 1N + ACN
Dégradation basique	1ml de spironolactone dans ACN + 1ml NaOH 0,1N	60°C pendant 2h	1ml HCL 0,1N + ACN
	1ml de spironolactone dans ACN + 1ml NaOH 0,5N		1ml HCL 0,5N + ACN
	1ml de spironolactone dans ACN + 1ml NaOH 1N		1ml HCL 1N + ACN
	1ml de matrice InOrpha + gomme xanthane 0,2% + 1ml NaOH 1N		1ml HCL 1N + ACN
	1ml de suspension de spironolactone + 1ml NaOH 0,1N		1ml HCL 0,1N + ACN
	1ml de suspension de spironolactone + 1ml NaOH 0,5N		1ml HCL 0,5N + ACN
	1ml de suspension de spironolactone + 1ml NaOH 1N		1ml HCL 1N + ACN
Dégradation oxydative	250µL de spironolactone dans ACN + 2,25ml d'H2O2 6%	70°C pendant 3h	
	250µL de spironolactone dans ACN + 2,25ml d'H2O2 15%		
	250µL de spironolactone dans ACN + 2,25ml d'H2O2 30%		
	250µL de matrice InOrpha + gomme xanthane 0,2% + 2,25ml d'H2O2 6%		
	250µL de matrice InOrpha + gomme xanthane 0,2% + 2,25ml d'H2O2 15%		
	250µL de matrice InOrpha + gomme xanthane 0,2% + 2,25ml d'H2O2 30%		
	250µL de suspension de spironolactone + 2,25ml d'H2O2 6%		
	250µL de suspension de spironolactone + 2,25ml d'H2O2 15%		
250µL de suspension de spironolactone + 2,25ml d'H2O2 30%			
Photodégradation	2ml de spironolactone dans ACN	5j à 15cm d'une lampe à UVA	
	2ml de matrice InOrpha + gomme xanthane 0,2%		
	2ml de suspension de spironolactone		
Témoins	Spironolactone dans ACN	70°C pendant 3h	
	Matrice InOrpha + gomme xanthane 0,2%		
	Suspension de spironolactone		

Tableau 6: Protocole de dégradation forcée

Une fois les échantillons soumis aux conditions de dégradation, ils sont dilués puis analysés selon la méthode de dosage validée. Ces essais ont pour objectif de mettre en évidence les principaux produits de dégradation pour pouvoir suivre leur apparition au cours de l'étude de stabilité.

b) Mode opératoire de fabrication d'un lot de suspension buvable

Nombre de lots nécessaires à l'étude de stabilité

La stabilité de la suspension buvable de spironolactone 5mg/ml est étudiée pour deux cas : la durée de conservation flacon fermé et la durée de conservation après ouverture pour mimer une utilisation en conditions réelles.

Deux conditions de conservation sont testées pour ces deux cas :

- un stockage au réfrigérateur (2-8°C)
- un stockage à température ambiante.

Il a été produit un lot pour chaque condition de stockage et chaque lot était constitué de flacons en verre brun type I de 60ml.

Mode opératoire de préparation d'un lot « stabilité avant ouverture »

La phase liquide est d'abord préparée. Elle est réalisée dans un bécher de 2L à partir d'1.2L d'InOrpha® (Inresa®) à laquelle nous ajoutons sous agitation avec le mélangeur de laboratoire TURBOTEST® 0,2% de gomme xanthane (Cooper®) (soit 2,4g).

Lorsque la gomme xanthane est suffisamment hydratée et que la phase liquide est homogène (t = 1 heure), nous y ajoutons 6 g de spironolactone micronisée, (Inresa®).

La préparation est mise à l'agitation avec le mélangeur de laboratoire pendant 3h à 1200tr/min pour permettre une dispersion totale de la spironolactone. On obtient ainsi une suspension légèrement visqueuse, opaque, laiteuse, blanchâtre voire légèrement jaunâtre. Cette suspension est répartie dans 24 flacons en verre brun type I remplis à 50ml.

Mode opératoire de préparation des lots « stabilité après ouverture »

Le principe est le même, seules les quantités diffèrent :

InOrpha® (Inresa®)	300ml
Gomme xanthane (Cooper®)	600mg
Spironolactone (Inresa®)	1500mg

La suspension obtenue est répartie dans 6 flacons en verre remplis à 50ml dont la moitié sera destinée à être conservée à température ambiante et l'autre moitié entre 2-8°C.

A chaque temps d'analyse trois flacons sont analysés ce qui correspond à une analyse en tripliqué du lot initial.

Chaque flacon est soumis aux différentes analyses définies par le plan expérimental présenté aux paragraphes c) et d) ci-après (teneur, viscosité, densité, pH, osmolalité, microbiologie).

c) Evaluation de la stabilité chimique de la suspension buvable

Une dégradation par réactions chimiques, le plus souvent par des réactions d'hydrolyse ou d'oxydoréduction peut être observée pour certains PA. D'autres facteurs peuvent affecter la stabilité chimique comme les rayons UV par photolyse ou interaction contenu/contenant avec les articles de conditionnement (47). Une fois la méthode analytique indicatrice de stabilité validée, l'étude de stabilité de la préparation dans le temps peut commencer.

La stabilité chimique doit être démontrée tout au long de la conservation du produit. Pour cela, la teneur en PA doit être maintenue au cours du temps avec une variation acceptable de $\pm 10\%$ (90% à 110 % de la teneur initiale) (47). Cette limite est appropriée pour les substances comme la spironolactone qui n'est pas un PA à marge thérapeutique étroite et dont les produits de dégradation ne sont pas connus pour être toxiques. Les résultats seront présentés par le pourcentage moyen de la concentration par rapport à J0 ainsi que l'intervalle de confiance (IC) à 95% autour de cette moyenne.

Cas du lot « stabilité avant ouverture »

Trois flacons de chaque lot (un lot « frigo » entre 2°C et 8°C et un lot « température ambiante ») sont dosés à chaque temps d'analyse soit J0 (valeur de référence), J15, J30, J60 selon la méthode analytique validée. Les éventuels produits de dégradation sont recherchés. A chaque prélèvement, les flacons sont préalablement agités.

Cas du lot « stabilité après ouverture »

Trois flacons sont conservés au frigo entre 2°C et 8°C et les 3 autres flacons sont conservés à température ambiante. Un volume de 0,5mL est retiré chaque jour après une agitation rapide de quelques secondes pour mimer une utilisation en conditions réelles pour une durée de traitement d'un mois. Les flacons sont dosés à J0 (valeur de référence), J15, J30, J37 selon la méthode analytique validée. Les éventuels produits de dégradation sont recherchés.

Température stockage	Condition	J0	J15	J30	J37	J60
25°C	Stabilité avant ouverture	X	X	X		X
	Stabilité après ouverture	X	X	X	X	
2 - 8°C	Stabilité avant ouverture	X	X	X		X
	Stabilité après ouverture	X	X	X	X	

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

Les prélèvements de J0 ont été réalisés dans les 24 heures qui ont suivi la préparation en raison de la durée de la préparation (4 heures). Nous avons estimé que la durée du mélange et la répartition immédiate dans les flacons assure l'homogénéité du mélange. Ce phénomène est observé en routine lors de la production des lots de suspension buvable de spironolactone sans ajout de gomme xanthane. Le prélèvement des 3 flacons dosés à J0 correspond à un échantillon représentatif de tous les flacons du lot.

d) Evaluation de la stabilité physique de la suspension buvable

Une potentielle instabilité de la formulation peut survenir au cours du temps. Comme détaillé précédemment, il peut y avoir une instabilité thermodynamique de la suspension par formation d'un sédiment avec l'apparition d'un système qui peut être floculé ou défloculé.

Contrôle visuel des caractères organoleptiques et recherche d'une sédimentation au cours du temps

Les caractères organoleptiques (couleur, odeur, aspect) ont été évalués au cours du temps (J0, J15, J30, J45, J60). La modification au cours du temps d'un de ces paramètres (notamment couleur, odeur) peut inaugurer le changement de composition du mélange.

Pour suivre l'éventuelle apparition d'un sédiment, 6 flacons « fermés » de suspension buvable de spironolactone sont conservés dans des flacons en verre transparent, à l'abri de la lumière. Trois flacons sont conservés à température ambiante et trois flacons sont conservés à 2-8°C.

Outre le contrôle visuel, la recherche d'une sédimentation a été réalisée par dosage des flacons non agités à J21, J35, J56, J70 et J90. A chaque jour de prélèvement, des prélèvements ont été réalisés dans le haut et bas du flacon. Ces prélèvements ont été dosés selon la méthode présentée sur un lot dédié à cet effet différent des autres lots produits pour l'étude de stabilité. La teneur en PA ne doit pas varier entre le haut et le bas du flacon de $\pm 5\%$.

Les autres paramètres de la stabilité physique

Outre les caractères organoleptiques (couleur, odeur, aspect), d'autres paramètres sont évalués : la viscosité, la densité, le pH, l'osmolalité. Les échantillons utilisés sont les mêmes que ceux employés pour l'étude de stabilité chimique.

L'ensemble des mesures a été conduite à J0, J15, J30, J60 sur trois flacons issus de chaque lot pour la stabilité avant ouverture pour les 2 conditions de conservation.

Les mesures ont été réalisées à J0 et J30 sur trois flacons ambiant et frigo issus du lot pour la stabilité après ouverture.

Comme pour le dosage, la variation de la viscosité, la densité, le pH et l'osmolalité au cours du temps doit être inférieure à $\pm 10\%$.

Les résultats de chaque série seront présentés par leur moyenne et intervalle de confiance à 95%.

La **viscosité** correspond aux forces de frottement qui s'opposent à l'écoulement des couches de liquide les unes par rapport aux autres. La viscosité d'une suspension est propre à sa composition et varie avec la température. L'apparition de produits de dégradation peut entraîner une modification de viscosité du mélange (47).

La mesure de la viscosité (en mPa.s) a été effectuée avec un rhéomètre rotatif Thermo Scientific™ HAAKE™ MARS™. Nous avons eu recours à un système de mesure cône/plan avec une géométrie de 60mm pour un angle de cône de 1°. L'appareil applique un gradient (« vitesse ») de cisaillement de 0 à 100 s⁻¹ pendant 180 secondes avec un entrefer de 0,051mm. L'appareil est thermostaté à la température souhaitée (*i.e.* 25°C pour mimer les conditions TA et 4°C pour mimer les conditions frigo) pendant 240 secondes.

La mesure de la viscosité est réalisée au cours de l'application de la vitesse de cisaillement pendant 180 secondes avec 200 points d'acquisition. La valeur de viscosité est retenue pour une vitesse de 100 secondes⁻¹ au plateau dans la courbe d'écoulement (stabilité du comportement de la suspension à cette vitesse) selon la méthode développée par Nora Provenza Bernal et al (52). Les mesures ont été enregistrées à 25°C et à 4°C.

Ne disposant pas des équipements matériels au CHU, ce contrôle a été effectué en collaboration avec le laboratoire de galénique de la Faculté des sciences pharmaceutiques de Toulouse.

La **densité** d'une suspension mesure le rapport entre la masse d'un volume donné de cette suspension et la masse du même volume d'eau, à la même température. Pour cette étude, la mesure de la densité a été effectuée avec un réfractomètre à main (Master- α , Atago®) destiné habituellement à mesurer la densité urinaire par la méthode de l'indice de réfraction par lecture visuelle.

Ce contrôle a été effectué en collaboration avec le laboratoire du service des explorations fonctionnelles physiologiques du CHU.

Le **pH** de la formulation et ses modifications au cours du temps constituent une piste à étudier au cours de l'étude de stabilité. Plusieurs causes peuvent induire une modification de pH : une dégradation du principe actif ou d'un excipient, une interaction contenant/contenu... (47). La

détermination du pH se fait par mesure de la différence de potentiel entre deux électrodes plongeant dans la solution à examiner. La mesure du pH a été effectuée avec le titreur potentiométrique 905 Titrande Metrohm qui permet aussi de mesurer le pH via une électrode calibrée à l'aide de solutions tampons.

L'**osmolalité** représente la capacité d'une molécule osmotiquement active à attirer les molécules d'eau au travers d'une membrane. Elle s'exprime en mOsm/kg (47). Sa mesure a un double objectif :

- Valider l'osmolalité initiale qui doit être limitée à 300mOsm/kg pour limiter la survenue d'effets indésirables gastro-intestinaux.
- Veiller à l'absence de variation de l'osmolalité dans le temps, témoin d'une dégradation de la composition de la suspension.

L'osmomètre Advanced® 3320 mesure l'abaissement du point de congélation δc et estime l'osmolalité d'une solution à partir de l'équation suivante :

$$C_{osm} = \frac{\delta c}{Kc} \times 1000$$

Avec C_{osm} qui correspond à Osmolalité en mOsm/kg, Kc qui est la constante cryoscopique ($Kc = 1,86$ pour une solution aqueuse) et δc qui correspond à la valeur de l'abaissement cryoscopique en °C.

Ce contrôle a été sous-traité au laboratoire de biochimie du CHU.

Tests réalisés	Température stockage	Condition	J0	J15	J30	J60
Aspect, Viscosité, Densité, pH, Osmolalité	25°C	Stabilité avant ouverture	X	X	X	X
		Stabilité après ouverture	X		X	
	2 - 8°C	Stabilité avant ouverture	X	X	X	X
		Stabilité après ouverture	X		X	

Tableau 8: : Plan expérimental de l'étude de stabilité physique (mesure viscosité, densité, pH, osmolalité)

e) Evaluation de la stabilité microbiologique de la suspension buvable

La présence de certains microorganismes dans des préparations non stériles peut modifier l'activité thérapeutique du produit, et constitue un danger potentiel pour la santé du patient selon les germes en présence. Il faut donc assurer une faible biocharge dans les formes pharmaceutiques finies non stériles (47). Des essais sont prescrits dans la Pharmacopée

Européenne pour encadrer la charge microbienne tolérée dans les préparations buvables. Les véhicules pour formes buvables contiennent des conservateurs à l'exception du Syrspend Dry. Ne disposant pas des équipements pour faire ces analyses, elles ont été sous-traitées au laboratoire d'Hygiène du CHU.

L'essai de dénombrement microbien selon la Pharmacopée Européenne (monographie 2.6.12) et la recherche de micro-organismes spécifiés (monographie 2.6.13) aux temps d'analyses fixés permet de répondre à la question de la stabilité microbiologique de ces préparations.

Validation de la fertilité des milieux (Ph Eur 2.6.12)

Etape préliminaire à la réalisation de la méthode de dénombrement microbien de la préparation, cette validation consiste à démontrer que la méthode mise en œuvre est capable de détecter une éventuelle contamination microbiologique du produit testé.

Les essais de validation sont effectués à l'aide d'un panel de cinq micro-organismes : *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Aspergillus brasiliensis*, *Candida albicans*. Nous avons ajouté *Escherichia coli* car nous devons démontrer l'absence d'*Escherichia coli* au cours de l'étude de la stabilité microbiologique (dans le cadre de la recherche des micro-organismes spécifiés prescrit par la Pharmacopée Européenne pour les formes orales). La préparation est délibérément contaminée par l'ajout d'un inoculum ≤ 100 UFC de ces micro-organismes et le dénombrement est ensuite effectué.

Un témoin positif qui ne contient pas la préparation mais qui est également contaminé et un témoin négatif, sans produit et non contaminé sont utilisés pour montrer que la préparation n'empêche pas la croissance des micro-organismes du fait de la présence de conservateurs et que la méthode n'est pas source de contamination bactérienne.

Critères de validation de la méthode : la méthode doit permettre d'obtenir entre 10 et 250 UFC pour le dénombrement des Germes Aérobie Totaux (DGAT) et 10 et 50 UFC pour le dénombrement des Moisissures/Levures Totales (DMLT) (Ph Eur 2.6.12). Les géloses trypticase-soja (pour les bactéries) sont incubées 3 jours à 35°C et les milieux de Sabouraud (pour les champignons) 5 jours à 20-25°C.

Dénombrement des germes

Nous avons opté sur avis des microbiologistes du service d'Hygiène du CHU pour la méthode de filtration sur membrane, une des 3 méthodes de référence de la Pharmacopée Européenne. Cette méthode consiste à filtrer au travers d'une membrane filtrante (diamètre de pores de la membrane 0,45 μm), une quantité définie d'échantillon (1ml). Le filtre est rincé avec un volume approprié de diluant. Il est déposé sur un milieu gélosé adapté au type de micro-organismes recherchés avant incubation pour 5 jours.

En parallèle, on ensemence 100µl de la préparation à tester sur une gélose pour objectiver une éventuelle croissance de microorganisme en cas de biocharge faible ou en cas de saturation de la filtration sur membrane aboutissant à un faux négatif.

Les critères de validation de la qualité microbiologique sont décrits à la monographie 5.1.4 de la Pharmacopée Européenne. Les seuils dépendent de la voie d'administration. Une préparation aqueuse destinée à la voie orale ne doit pas dépasser les seuils suivants :

- Germes aérobies totaux < 10² UFC/ml
- Moisissures et levures < 10¹ UFC/ml
- Absence d'*Escherichia coli*

Les échantillons utilisés pour la stabilité microbiologique sont issus des même flacons que ceux employés pour l'étude de stabilité physico-chimique.

Température stockage	Condition	J0	J15	J30	J37	J60
25°C	Stabilité avant ouverture	X	X	X		X
	Stabilité après ouverture	X	X	X	X	
2 - 8°C	Stabilité avant ouverture	X	X	X		X
	Stabilité après ouverture	X	X	X	X	

Tableau 9: Plan expérimental de l'étude de stabilité microbiologique (dénombrement microbien)

f) Modalités de prélèvements des échantillons selon les études réalisées

Pour l'étude de la stabilité avant ouverture, les flacons sont préalablement agités avant prélèvement. Chaque prélèvement est mis dans un falcon à l'exception du prélèvement pour la microbiologie qui est réparti dans un vacutainer BD stérile avec bouchon rouge. Les volumes prélevés sont les suivants :

- 5ml pour le dosage
- 5ml pour la viscosité
- 1 ml pour la densité
- 8ml pour le pH
- 4ml pour l'osmolalité
- 3ml pour la microbiologie

3) Résultats

a) Validation de la méthode analytique indicatrice de stabilité

Fonction de réponse et linéarité

Les conditions analytiques sélectionnées dans le cadre de ce travail sont le fruit d'une étude antérieure validée pour une suspension de spironolactone 5mg/ml dans l'InOrpha®. La modification de la matrice conduit à réévaluer les conditions analytiques.

Dans ces conditions, le temps de rétention de la spironolactone a été observé à environ 3,6 minutes et celui de l'InOrpha® à 1,8minutes (figure 9).

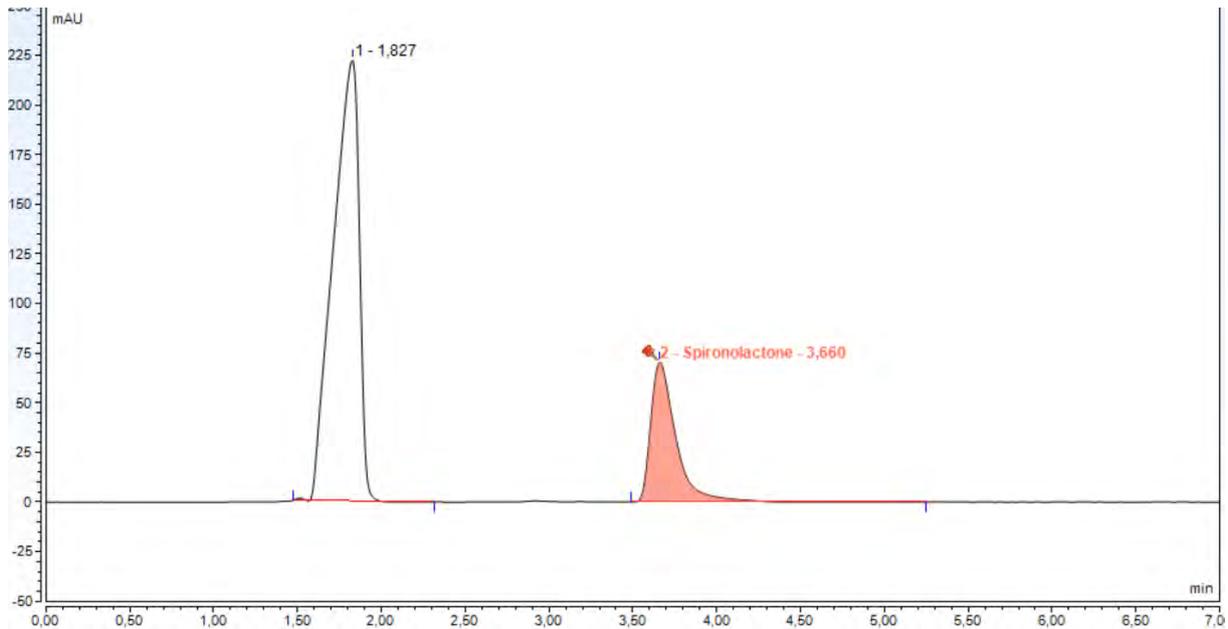


Figure 9: Chromatogramme type de la suspension de spironolactone

La linéarité de la fonction de réponse a été défini pour un intervalle de dosage de spironolactone compris entre 30 et 70 µg/ml selon les paramètres décrit ci-dessous tableau 10 et figure 10. La linéarité de notre méthode est donc satisfaisante (r^2 moyen = 0,995).

L'équation de la droite de calibration obtenue après les 3 jours de manipulation est : $Y = 0,2478X - 0,0982$ avec Y = aire sous le pic de la réponse du détecteur (AUC) et X = concentration obtenue de l'analyte (µg/ml) et un coefficient de détermination $R^2 = 0,995$

	Jour 1	Jour 2	Jour 3	Global
Pente	0,2471	0,2430	0,2533	0,2478
Ordonnée à l'origine	0,2008	-0,0806	-0,4149	-0,0982
Coefficient de détermination	0,9981	0,9996	0,9976	0,9950

Tableau 10: Paramètres de calibration J1,J2 et J3

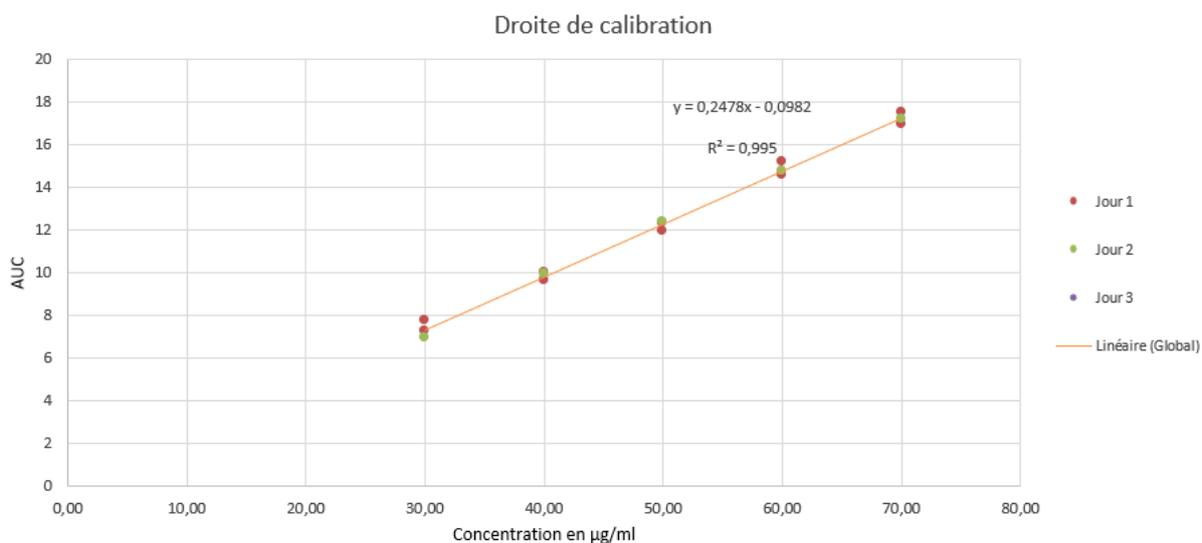


Figure 10: Droite de calibration de la méthode analytique

Justesse

La justesse, estimée au moyen des standards de validation (n = 6 échantillons) réalisés sur 3 jours pour un niveau de concentration (50µg/ml, valeur attendue après dilution de la suspension buvable de spironolactone). La concentration moyenne est de 49.68µg/ml. Le biais relatif de la méthode développée est de -0,64% et le taux de recouvrement est de 99,36%, dans les cibles définies.

Fidélité

Les coefficients de variation (CV) de la répétabilité et de la fidélité intermédiaire (FI) ne dépassent pas 1% (respectivement 0.82% et 0.96%), ils sont dans l'intervalle recommandé par le laboratoire (seuil 5%).

Exactitude

L'exactitude de la méthode est représentée à partir du profil illustré figure 11. La méthode proposée est exacte étant donné que les limites de tolérance (0,63% et -1,92%) des résultats sont incluses dans les limites d'acceptation de ±10%.

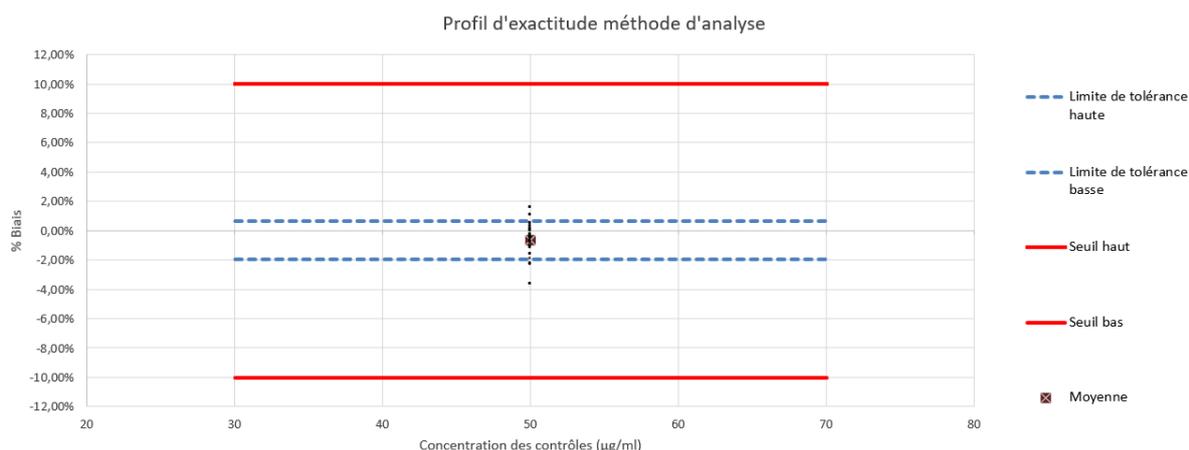


Figure 11: Profil d'exactitude de la méthode

Limite de détection

La LD a été estimée en utilisant la pente moyenne du modèle de calibration et l'écart-type résiduel de la régression. En appliquant cette méthode de calcul, la LD de la méthode vaut 6,4 µg/ml. Expérimentalement, nous avons vu avec l'étude de la partie 2 que nous avons détecté une concentration estimée à 3,99 µg/ml.

Effet matrice

L'analyse spectrale des chromatogrammes avec et sans matrice n'a pas montré d'interférence au temps de rétention de la spironolactone. Les temps de rétention de la matrice et du PA sont distincts. La comparaison des résultats a montré qu'il n'y avait pas de différence significative (Anova, p-value = 0.4100).

Dégradation forcée

Dans le cas de la spironolactone, (annexe 6) pour les différentes conditions de dégradations, des pics sont observés en plus de la spironolactone.

Dans les conditions acides, la spironolactone a été dégradée à hauteur de 33% (HCl 1N). Le pic de la principale impureté a été trouvé à 4.003 minutes. L'hydrolyse alcaline (NaOH 0.1N) a conduit à 92% de dégradation du médicament conduisant à l'apparition de produits de dégradation secondaires matérialisés par les nombreux pics adjacents.

Dans des conditions oxydatives, environ 27% du médicament s'est dégradé conduisant à l'apparition de 3 produits de dégradation.

La spironolactone a été légèrement dégradée dans des conditions photolytiques, mais reste stable dans les conditions de dégradation thermique.

Pour la matrice InOrpha® et gomme, (annexe 7) aucun pic de dégradation supplémentaire apparaît. En revanche, le temps de rétention est modifié (respectivement t=1.8min et 2.7min

avant et après dégradation, quel que soient les modes de dégradation). Ce temps de rétention étant différent de la spironolactone et des produits de dégradations de la spironolactone, l'étude de stabilité dans le mélange a pu être conduite.

La spironolactone dans l'InOrpha® et gomme est bien dégradée (à hauteur de 78% avec NaOH 0,1N et 51% avec H₂O₂ à 15% cf annexe 8), sauf dans les conditions d'acide (1% de dégradation).

Dans toutes les conditions, le suivi du spectre de la spironolactone, et l'absence de modification du spectre, a permis de conclure qu'il n'existait pas de co-élution des produits de dégradation et de la spironolactone. La méthode était donc efficace pour séparer la spironolactone d'éventuels produits de dégradation. Cependant les concentrations testées ont conduit à un niveau de dégradation supérieur aux 20% fixées.

Par ailleurs (données non exposées), en utilisant la phase mobile recommandée dans la monographie de la spironolactone de la Pharmacopée Européenne (acétonitrile, tétrahydrofurane, méthanol, eau 15:20:425:540 V/V/V/V), les différents pics des produits de dégradation sont beaucoup plus séparés qu'avec la phase mobile de notre méthode, avec un chromatogramme allongé (50 min). Cette phase mobile n'a pas été retenue pour la suite des expérimentations en raison des temps de chromatogramme et du mélange de solvants utilisés.

In fine, la méthode de dosage proposée répond aux différents critères de validation de méthode et indicatrice de stabilité.

b) Validation de la stabilité chimique de la suspension buvable

La concentration en spironolactone à J0 est conforme à la valeur cible et permet d'utiliser le lot pour l'analyse de stabilité.

Sur l'intervalle J0 à J60², les concentrations restent dans les limites d'acceptabilité fixées à ± 10% de la valeur initiale pour la conservation à température ambiante et entre 2°-8° avant ouverture (figure 12). L'ensemble des mesures sont répertoriées dans l'annexe 9.

Pour l'analyse des flacons soumis à ouverture quotidienne, l'évolution des concentrations aux différents temps d'analyse sont conformes pour les deux types d'ambiance (figure 13).

Par ailleurs, aucun produit de dégradation n'est détecté.

² La mesure à J90 pour la stabilité avant ouverture sera rendue le jour de la soutenance de thèse et les mesures à J120 et J135 seront faites ultérieurement à ce travail de thèse.

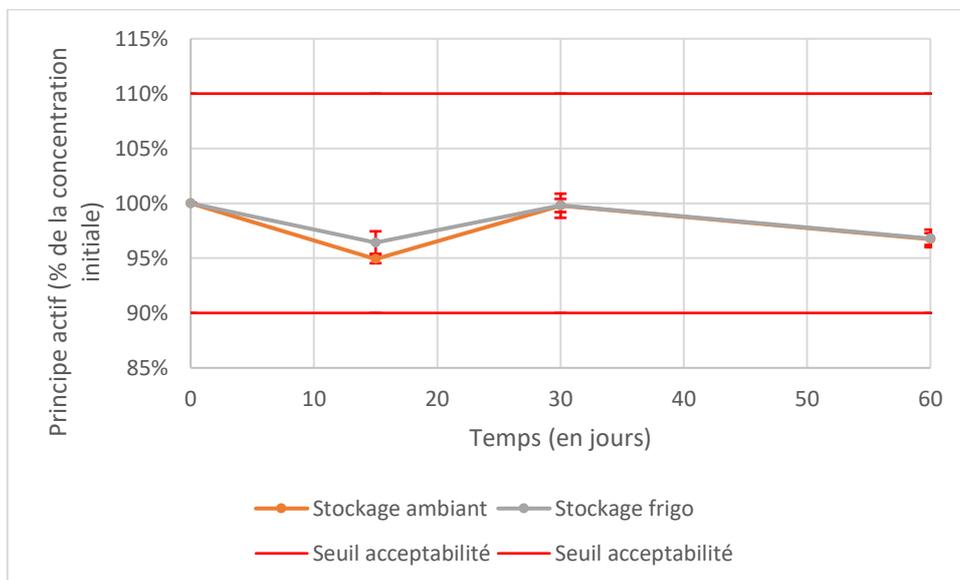


Figure 12: Evolution de la concentration moyenne de spironolactone avant ouverture rapportée à la concentration initiale en % en fonction du temps et du mode de stockage

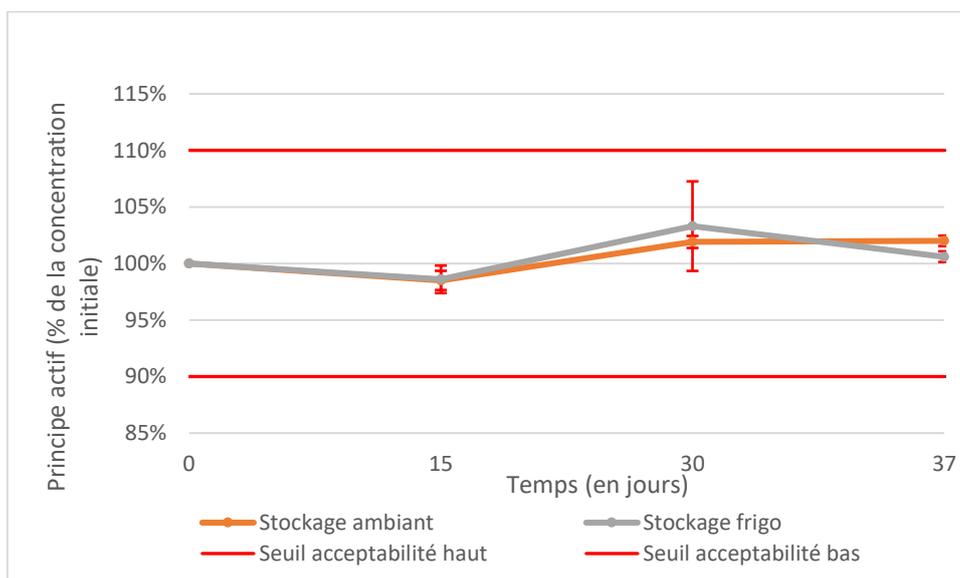


Figure 13: Evolution de la concentration moyenne de spironolactone après ouverture rapportée à la concentration initiale en % en fonction du temps et du mode de stockage

c) Validation de la stabilité physique de la suspension buvable

Les mesures présentées pour l'étude de la stabilité physique avant ouverture sont illustrées par un graphique pour l'intervalle J0 à J60³. L'ensemble des mesures sont répertoriées dans les annexes 10,11,12 et 13.

Pour l'étude de stabilité après ouverture, J0 et J30 les mesures seront directement affichées sous forme de tableau (deux séries de valeurs J0 et J30).

Caractères organoleptiques

La couleur, l'odeur ou l'aspect de la suspension buvable n'ont pas évolué au cours du temps quel que soit les conditions de conservation.

Uniformité de teneur à l'intérieur du flacon sans agitation préalable

La teneur à J0 du mélange est en moyenne à 51,95 µg/ml pour le stockage en ambiant et 51,80 µg/ml pour le stockage frigo. Au cours de l'étude, la différence de concentration entre le fond du flacon et le haut est au maximum de 2,63%. Les concentrations en spironolactone restent toujours dans les limites d'acceptabilité fixées à ± 5%. Il n'y a donc pas de sédimentation entraînant une disparité de dose dans le flacon avant agitation jusqu'à 12 semaines post production. Les analyses seront poursuivies jusqu'à 28 semaines s'il n'y a pas de différence qui apparait avant.

	3 semaines post production		5 semaines post production				8 semaines post production				10 semaines post production				12 semaines post production			
25°C	Flacon 3	Flacon 3'	Flacon 5	Flacon 5'	Flacon 6	Flacon 6'	Flacon 7	Flacon 7'	Flacon 8	Flacon 8'	Flacon 11	Flacon 11'	Flacon 12	Flacon 12'	Flacon 13	Flacon 13'	Flacon 14	Flacon 14'
Teneur en haut du flacon µg/ml	51,833	52,073	52,332	51,792	51,787	52,267	52,625	51,46	52,124	51,621	52,688	52,264	51,556	52,058	53,158	52,369	53,381	53,359
Teneur en bas du flacon µg/ml	52,752	52,288	51,686	52,585	52,714	52,425	52,249	52,385	52,358	52,521	53,013	53,35	52,813	52,464	53,9219	53,2293	53,977	54,76
Différence de teneur en %	1,77%	0,41%	-1,23%	1,55%	1,79%	0,80%	-0,71%	1,80%	0,45%	1,74%	0,62%	2,08%	2,44%	0,78%	1,44%	1,64%	1,12%	2,63%
2-8°C	Flacon 1	Flacon 1'	Flacon 5	Flacon 5'	Flacon 6	Flacon 6'	Flacon 7	Flacon 7'	Flacon 8	Flacon 8'	Flacon 11	Flacon 11'	Flacon 12	Flacon 12'	Flacon 13	Flacon 13'	Flacon 14	Flacon 14'
Teneur en haut du flacon µg/ml			52,044	51,916	52,399	52,199	51,227	51,985	51,892	52,517	52,431	52,13	52,969	51,34	52,942	53,103	53,26	52,92
Teneur en bas du flacon µg/ml			51,842	52,33	52,095	52,027	51,898	51,941	51,993	51,918	52,302	52,329	52,147	52,177	53,027	52,945	53,049	53,0089
Différence de teneur en %			-0,39%	0,80%	-0,58%	-0,33%	1,31%	-0,08%	0,19%	-1,14%	-0,25%	0,38%	-1,55%	1,63%	0,16%	-0,30%	-0,40%	0,17%

Tableau 11: Concentration en µg/ml en spironolactone pour différents flacons non agités à différents temps post production. L'analyse à 3 semaines +2+8°C n'a pas été faite à la suite d'un oubli.

Viscosité

La viscosité de l'InOrpha à température ambiante a été mesurée : elle est de 59,3 mPa.s. En ajoutant 0,2% de gomme xanthane et la spironolactone, la viscosité du mélange double s'il est conservé à TA (en moyenne 132mPa.s) et augmente d'un facteur 3.6 pour le stockage entre 2° - 8°C (en moyenne 212mPa.s).

³ Les mesures à J90 pour la stabilité avant ouverture sera rendue le jour de la soutenance de thèse et les mesures à J120 et J135 seront faites ultérieurement à ce travail de thèse.

Ce constat est illustré par la figure 14. Les valeurs ne varient pas de plus de 9% par rapport à la valeur initiale pour les deux conditions de stockage.

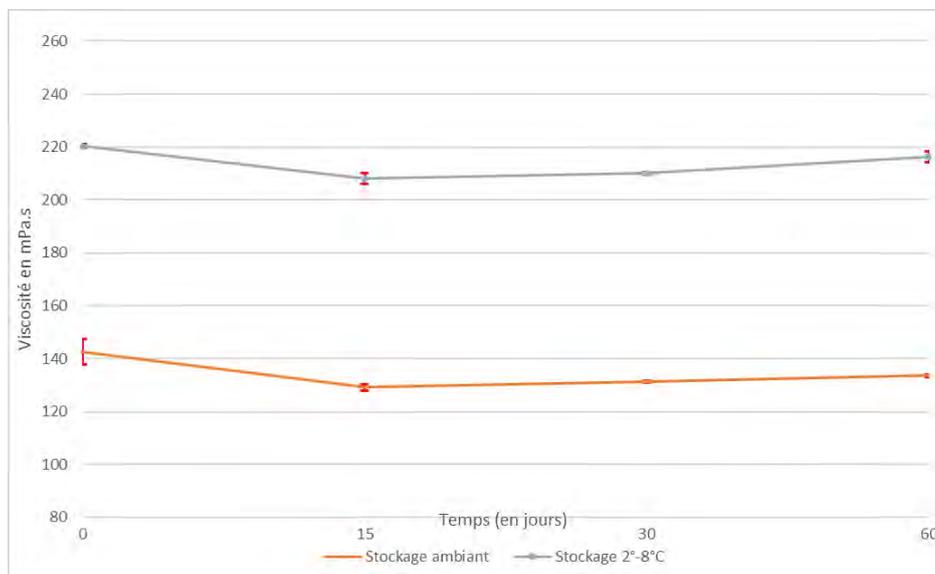


Figure 14: Evolution de la viscosité au cours de l'étude de stabilité avant ouverture

L'ouverture des flacons n'a pas d'impact sur la viscosité qui reste dans les mêmes valeurs observées (tableau 12).

	J0			J30		
Viscosité 25°C	Flacon 1	Flacon 2	Flacon 3	Flacon 1	Flacon 2	Flacon 3
	132,24	130,98	131,62	132,62	130,12	130,45
Moyenne	131,61			131,06		
Ecart type	0,63			1,36		
IC 95%	0,71			1,54		
% CV	0,48			1,04		
Viscosité 2-8°C	Flacon 1	Flacon 2	Flacon 3	Flacon 1	Flacon 2	Flacon 3
	208,91	206,06	206,35	210,31	211,81	208,97
Moyenne	207,10			210,37		
Ecart type	1,57			1,42		
IC 95%	1,78			1,60		
% CV	0,76			0,67		

Tableau 12: Mesures de la viscosité en mPa.s au cours de l'étude de stabilité après ouverture

Densité

La densité moyenne de l'InOrpha® seul à TA a été mesurée et donne une valeur à 1,013. A J0, celle du mélange à TA est en moyenne de 1,013. Il n'y a donc pas de différence de densité

lorsqu'on ajoute 0,2% de gomme xanthane et 5mg/ml de spironolactone. La température, le temps de conservation et l'ouverture quotidien du flacon n'influent pas sur la valeur de la densité au cours du temps, dans les limites des conditions de l'étude (détaillées dans la figure 15 pour les flacons fermés et tableau 13 pour les flacons ouverts quotidiennement).

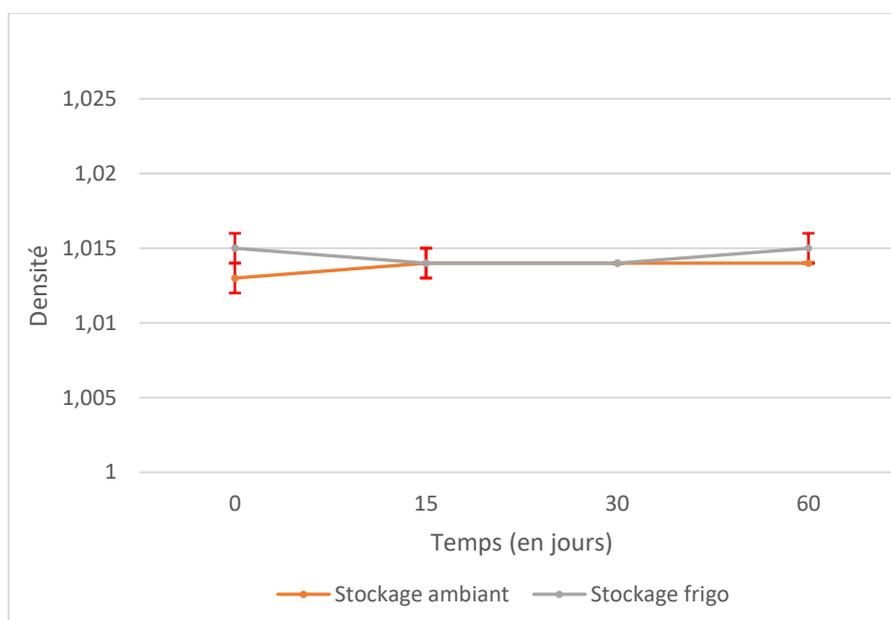


Figure 15: Evolution de la densité au cours de l'étude de stabilité avant ouverture

	J0			J30		
Densité 25°C	Flacon 1	Flacon 2	Flacon 3	Flacon 7	Flacon 8	Flacon 9
	1,013	1,014	1,013	1,014	1,014	1,014
Moyenne	1,013			1,014		
Ecart type	0,001			0,000		
IC 95%	0,001			0,000		
% CV	0,06			0,00		
Densité 2-8°C	Flacon 1	Flacon 2	Flacon 3	Flacon 7	Flacon 8	Flacon 9
	1,014	1,015	1,015	1,014	1,015	1,014
Moyenne	1,015			1,014		
Ecart type	0,001			0,001		
IC 95%	0,001			0,001		
% CV	0,06			0,06		

Tableau 13: Mesures de la densité au cours de l'étude de stabilité après ouverture

pH

La valeur de pH de l'InOrpha® seule est de 4.5. L'ajout de la gomme et de la spironolactone conduit à un pH moyen de 4.82. La température et l'ouverture quotidien du flacon n'influent pas sur la valeur du pH au cours du temps, dans les limites des conditions de l'étude (détaillées

dans la figure 16 pour les flacons fermés et tableau 14 pour les flacons ouverts quotidiennement).

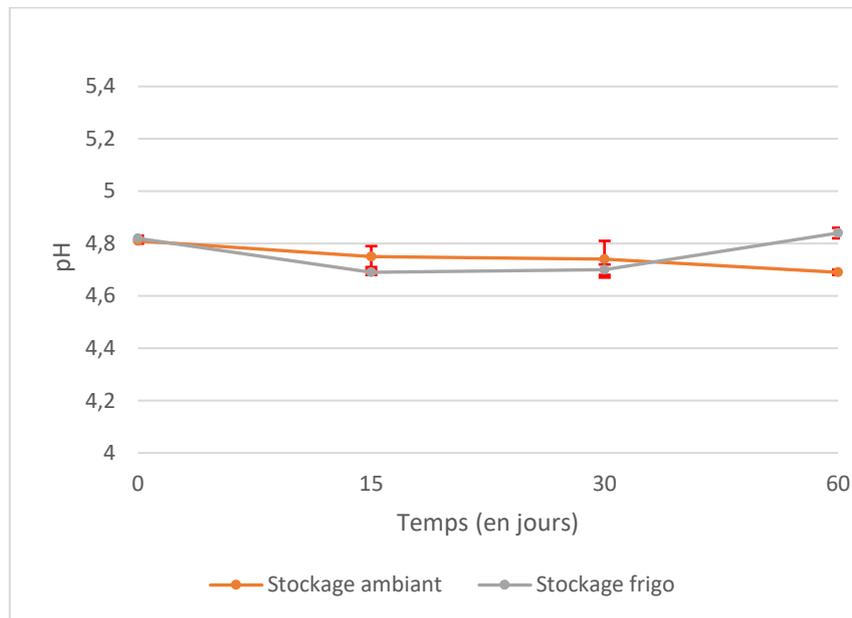


Figure 16: Evolution du pH au cours de l'étude de stabilité avant ouverture

	J0			J30		
pH 25°C	Flacon 1	Flacon 2	Flacon 3	Flacon 7	Flacon 8	Flacon 9
	4,78	4,78	4,77	4,77	4,78	4,82
Moyenne	4,78			4,79		
Ecart type	0,01			0,03		
IC 95%	0,01			0,03		
% CV	0,12			0,55		
pH 2-8°C	Flacon 1	Flacon 2	Flacon 3	Flacon 7	Flacon 8	Flacon 9
	4,78	4,8	4,82	4,83	4,79	4,87
Moyenne	4,80			4,83		
Ecart type	0,02			0,04		
IC 95%	0,02			0,05		
% CV	0,42			0,83		

Tableau 14: Mesures du pH au cours de l'étude de stabilité après ouverture

Les conditions de stockage et d'utilisation des flacons n'impactent pas la stabilité du pH.

Osmolalité

L'osmolalité de l'InOrpha® est de 170mOsm/kg. La légère augmentation de l'osmolalité à l'ajout de la gomme xanthane et de la spironolactone (maximum 12% de plus) permet quand même de rester dans les valeurs de tolérance digestives.

L'osmolalité ne varie presque pas dans le temps quel que soit le mode de conservation (figure 17). L'ouverture quotidienne des flacons n'influent pas non plus sur l'osmolalité (tableau 15).

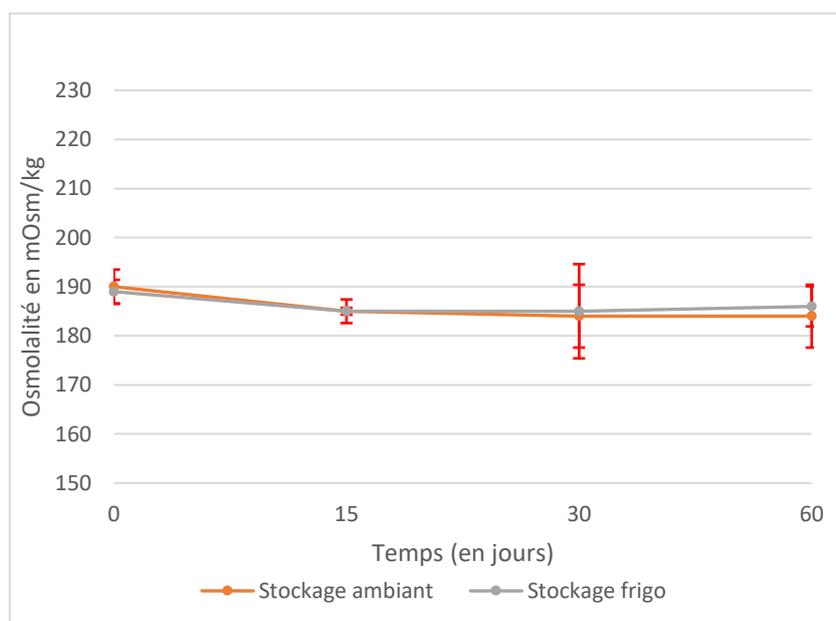


Figure 17: Evolution de l'osmolalité au cours de l'étude de stabilité avant ouverture

	J0			J30		
Osmolalité 25°C	Flacon 1	Flacon 2	Flacon 3	Flacon 1	Flacon 2	Flacon 3
	190	182	179	200	194	190
Moyenne	184			195		
Ecart type	5,7			5,0		
IC 95%	6,4			5,7		
% CV	3,1			2,6		
Osmolalité 2-8°C	Flacon 1	Flacon 2	Flacon 3	Flacon 1	Flacon 2	Flacon 3
	182	185	178	181	179	188
Moyenne	182			183		
Ecart type	3,5			4,7		
IC 95%	4,0			5,3		
% CV	1,9			2,6		

Tableau 15: Mesures de l'osmolalité en mOsm/kg au cours de l'étude de stabilité après ouverture

d) Evaluation de la stabilité microbiologique de la suspension

Validation de la fertilité des milieux (Ph Eur 2.6.12)

Le témoin négatif (non contaminé) ne génère pas de pousse microbienne. La technique mise en œuvre n'est pas source de contamination.

Les témoins positifs et les échantillons contaminés génèrent une pousse microbienne dans les limites fixées par l'essai.

Les milieux utilisés sont donc appropriés pour l'étude de stabilité (tableau 16). On note que la spironolactone et l'InOrpha® n'inhibent pas le développement des micro-organismes (malgré la présence d'un conservateur (sorbate de potassium)).

	Echantillon de suspension buvable (UFC/ml en moyenne)	Témoin positif (UFC/ml en moyenne)	Témoin négatif (UFC/ml en moyenne)
<i>Staphylococcus aureus</i>	52	51	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	34	60	0
<i>Bacillus subtilis</i>	16	27	0
<i>Candida albicans</i>	61	57	0
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	58	40	0
<i>Escherichia coli</i>	30	31	0

Tableau 16: Résultats de la validation de méthode pour l'étude de stabilité

Dénombrement des germes et recherche de micro-organismes spécifiés

Les analyses sur flacons fermés et flacons ouverts quotidiennement (présentés respectivement tableaux 17 et 18) sont conformes aux seuils de validation. La qualité microbiologique de la préparation est assurée à J60 avant ouverture et permet de proposer l'utilisation d'un flacon multidose stable un mois après ouverture.

Temps d'analyse	Numéro de flacons	Dénombrement germes aérobies totaux (DGAT) UFC/ml		Dénombrement moisissures et levures (DMLT) UFC/ml		Présence <i>Escherichia coli</i>	
		Ambiant	Frigo	Ambiant	Frigo	Ambiant	Frigo
J0	Flacon 1	< 10 ²	< 10 ²	< 10 ¹	< 10 ¹	Non	Non
	Flacon 2	< 10 ²	< 10 ²	< 10 ¹	< 10 ¹	Non	Non
	Flacon 3	< 10 ²	< 10 ²	< 10 ¹	< 10 ¹	Non	Non
J15	Flacon 4	< 10 ²	< 10 ²	< 10 ¹	< 10 ¹	Non	Non
	Flacon 5	< 10 ²	< 10 ²	< 10 ¹	< 10 ¹	Non	Non
	Flacon 6	< 10 ²	< 10 ²	< 10 ¹	< 10 ¹	Non	Non
J30	Flacon 7	< 10 ²	< 10 ²	< 10 ¹	< 10 ¹	Non	Non
	Flacon 8	< 10 ²	< 10 ²	< 10 ¹	< 10 ¹	Non	Non
	Flacon 9	< 10 ²	< 10 ²	< 10 ¹	< 10 ¹	Non	Non
J60	Flacon 10	< 10 ²	< 10 ²	< 10 ¹	< 10 ¹	Non	Non
	Flacon 11	< 10 ²	< 10 ²	< 10 ¹	< 10 ¹	Non	Non
	Flacon 12	< 10 ²	< 10 ²	< 10 ¹	< 10 ¹	Non	Non

Tableau 17: Résultats de l'étude de stabilité microbiologique avant ouverture

		Dénombrement germes aérobies totaux (DGAT) UFC/ml		Dénombrement moisissures et levures (DMLT) UFC/ml		Présence <i>Escherichia coli</i>	
Temps d'analyse	Numéro de flacons	Ambiant	Frigo	Ambiant	Frigo	Ambiant	Frigo
J0	Flacon 1	< 10 ²	< 10 ²	< 10 ¹	< 10 ¹	Non	Non
	Flacon 2	< 10 ²	< 10 ²	< 10 ¹	< 10 ¹	Non	Non
	Flacon 3	< 10 ²	< 10 ²	< 10 ¹	< 10 ¹	Non	Non
J15	Flacon 1	< 10 ²	< 10 ²	< 10 ¹	< 10 ¹	Non	Non
	Flacon 2	< 10 ²	< 10 ²	< 10 ¹	< 10 ¹	Non	Non
	Flacon 3	< 10 ²	< 10 ²	< 10 ¹	< 10 ¹	Non	Non
J30	Flacon 1	< 10 ²	< 10 ²	< 10 ¹	< 10 ¹	Non	Non
	Flacon 2	< 10 ²	< 10 ²	< 10 ¹	< 10 ¹	Non	Non
	Flacon 3	< 10 ²	< 10 ²	< 10 ¹	< 10 ¹	Non	Non
J37	Flacon 1	< 10 ²	< 10 ²	< 10 ¹	< 10 ¹	Non	Non
	Flacon 2	< 10 ²	< 10 ²	< 10 ¹	< 10 ¹	Non	Non
	Flacon 3	< 10 ²	< 10 ²	< 10 ¹	< 10 ¹	Non	Non

Tableau 18: Résultats de l'étude de stabilité microbiologique après ouverture

4) Discussion – Conclusion

Les méthodes de validation du dosage de la spironolactone sont nombreuses et largement décrites par HPLC-UV. Elles utilisent pour leur phase mobile alternativement des solutions tampon, ou des mélanges de solvants plus ou moins importants (35, 38, 52, 54, 55, 56). Le choix de notre méthode de dosage se base sur plusieurs paramètres : (i) les critères de validation classiques (linéarité, justesse, fidélité, exactitude, et spécificité) mais aussi des (ii) paramètres organisationnels et (iii) environnementaux. Les temps de run relativement courts et des phases mobiles « Green chemistry » participent aux critères de choix. La méthode retenue permet distinguer les produits de dégradation de la suspension de spironolactone. En revanche, la phase mobile aurait pu être optimisée pour atteindre une meilleure séparation des composés et les concentrations des solvants utilisés auraient pu être réévalués pour limiter le niveau de dégradation à des proportions proches de 20% (47).

L'étude de stabilité réalisée présente des résultats intéressants à 60 jours. Concernant les variations de la viscosité observées sur le lot fermé, les valeurs obtenues à J0 sont différentes des valeurs mesurées ensuite. Ces valeurs ont été obtenues suite à la première mise en œuvre de la manipulation (phase de rodage), avec une suspension vortexée avant manipulation. L'agitation a conduit à la formation de bulles qui aurait pu modifier l'écoulement du fluide et la mesure de la viscosité. Les autres analyses ont été réalisées avec une agitation par retournement. La comparaison aux valeurs obtenues à J0 dans le cas des flacons ouverts tend à confirmer notre hypothèse.

L'étude de stabilité microbiologique a été sous-traitée à l'équipe d'hygiène du CHU. La validation de la fertilité des milieux a conduit à des valeurs à 1.2 fois la normale supérieure pour les levures et moisissures. Après avis des microbiologistes cela n'a pas d'impact sur la validité de la méthode. Les milieux utilisés sont appropriés pour l'étude de stabilité.

A ce stade, nous concluons à la stabilité de la suspension buvable de spironolactone 5mg/ml dans cette matrice optimisée à 60jours à température ambiante et température réfrigérée.

DISCUSSION

La nouvelle édition des Bonnes Pratiques de Préparation positionne le système qualité pharmaceutique au premier plan (53). Dans ce système, la réalisation de revues qualité des préparations pharmaceutiques est recommandée. Le préparatoire du CHU de Toulouse réalise principalement des formes solides (gélules) pour répondre aux besoins thérapeutiques non couverts par les médicaments disponibles sur le marché français. La production de ce type de forme galénique manque néanmoins de souplesse quand il convient d'adapter la dose à la population pédiatrique. Pour répondre à ces situations, la forme buvable est une bonne alternative, même s'il est important de bien adapter les excipients à la population cible.

Dans le cas de la spironolactone, un transfert vers la préparation de suspension buvable dosée à 5mg/ml dans l'InOrpha® a été opéré en 2018. Cette suspension, stable 4 mois à température ambiante, répond aux critères de validation des préparations terminées (Pharmacopée Européenne 2.9.6). Néanmoins, on observe un sédiment de spironolactone 24 heures après la préparation et la redispersion nécessite une agitation vigoureuse de 2 minutes. Les difficultés d'une telle formulation ont déjà été éprouvée : l'équipe de Nahata et al a proposé en 1993 une formulation de spironolactone 5mg/ml dans un mélange de sirop simple carboxyméthylcellulose et eau purifiée. L'échantillonnage de la préparation pour dosage a permis de constater la variabilité des concentrations mesurées (99,5-113,4 %). L'hypothèse associée à cette variabilité était très probablement attribuable à une dispersion non uniforme de particules de médicament dans la suspension (54).

Une revue qualité de cette préparation a été réalisée au travers d'une série d'études sur la dose administrée théorique dans deux services de pédiatrie du CHU. Le phénomène de « *caking* » et l'agitation inadéquate du flacon conduit au prélèvement d'une dose non conforme à celle attendue. L'impact clinico-biologique de ces non-conformités n'a pas été étudié dans le cadre de cette étude. Dans ces services, la spironolactone est principalement administrée en association avec de fortes doses de furosémide. Ainsi, l'inefficacité peut être compensée par l'efficacité du furosémide. En cas de surdosage, le patient est exposé à un risque accru d'hyperkaliémie ou acidose métabolique. La spironolactone peut être administrée en 1 ou 2 prises et ce de manière chronique. La variabilité de concentration des doses prélevées pourrait conduire à une dose totale journalière conforme et donc sans impact clinique notable.

Cette revue qualité, focalisée sur le retour d'expérience des unités de soins, nous a conduit à la réflexion d'optimiser la formulation, en conservant le véhicule pour suspension InOrpha®, plus sûr pour la population pédiatrique. En effet, la formule de l'InOrpha® est épurée. Trois excipients à effet notoire sont identifiés (*i.e.* le glycérol, le sodium et le potassium). Leur teneur est néanmoins faible d'après les données interne du laboratoire et sans impact clinique retenu. La faible concentration en glycérol (inférieure à 1%) n'expose pas à un risque de troubles digestifs. La quantité de sodium et potassium sont faibles (respectivement 0,0065mmol/ml et 0,0204mmol/ml), sous le seuil défini de 1mmol/dose par l'EMA .

C'est la gomme xanthane, agent de viscosité des suspensions, qui a retenu notre attention. La cible était d'augmenter la viscosité du milieu pour ralentir la sédimentation et augmenter la stabilité de la suspension. Cet excipient ne fait pas l'objet d'alerte particulière pour la voie orale en pédiatrie(41). On le retrouve dans de nombreuses formulations galéniques destinées à la pédiatrie (Doliprane 2,4%, Advilmed 20mg/ml, Augmentin 100mg/12,5ml, Clamoxyl buvable, Clarithromycine buvable, ...). Dosée à 0,2% dans la formule finale, aucun sédiment n'a été observé 12 semaines après la date de fabrication en comparaison avec l'aspect observé à 24h avec la formulation initiale.

Pour valider la stabilité de cette nouvelle formule, nous avons développé une méthode de dosage indicatrice de stabilité par HPLC-UV à barrette de diode (recouvrement des standards de validation 99,36 % ; CV < à 1% en intra et en inter-jour). L'HPLC-UV reste une technique séparative couramment employée pour l'analyse de spironolactone dans diverses matrices avec de bons résultats (36,54,55). Lors de la dégradation forcée, si la séparation des produits de dégradation de la spironolactone a été réalisée, l'identification des produits de dégradation n'a pas été possible. La spironolactone n'est pas connue pour avoir des produits de dégradations toxiques. La principale voie de dégradation de la spironolactone est l'hydrolyse alcaline du cycle lactone (56). Le pH de la suspension buvable d'InOrpha® est acide (en lien avec la présence d'un tampon acide) ce qui protège la spironolactone de cette voie de dégradation.

L'effet matrice n'a pas été validé selon les recommandations. Son évaluation se limite à la comparaison des standards de validation avec et sans matrice (soit 5 échantillons par milieu étudié au lieu de 15 et comparaison des variances au lieu de la comparaison des pentes et des ordonnées à l'origine). Cette limite s'explique par la complexité technique de ce type de manipulations :

- (i) la suspension est visqueuse, rendant difficile la justesse de remplissage de la fiole, et l'homogénéisation de cette dernière (1 heure d'agitation magnétique par échantillon)
- (ii) d'autant plus avec une matière première réputée insoluble dans les solvants aqueux
- (iii) les caractéristiques physiques de la poudre (électrostatique) rendant délicat son transfert dans la fiole

L'absence de différence significative dans les concentrations retrouvées avec ou sans matrice se base sur un très faible effectif à un seul niveau de concentration (concentration cible des échantillons à doser). Même si nous avons validé l'effet matrice sur un nombre de points limités, si l'on considère la faible variabilité entre les résultats, il est possible de conclure à l'absence d'effet matrice sur le dosage.

La nouvelle formulation galénique démontre une stabilité physico-chimique avant ouverture de 60 jours pour une condition de stockage à température ambiante et entre 2 °- 8°C. Aucun

produit de dégradation n'a été retrouvé dans l'intervalle. L'analyse à 90 jours sera rendue à la soutenance de thèse. Et les dernières mesures à 120 jours et 135 jours seront poursuivies au-delà de ce mémoire. La stabilité physico-chimique après ouverture est de 30 jours quelle que soit la condition de stockage.

La différence majeure entre les températures de stockage réside dans la valeur de la viscosité de la suspension. En effet, la viscosité est beaucoup plus importante au froid (212mPa.s vs 134mPa.s à TA). D'après la loi de Stokes, plus la viscosité est importante, plus la vitesse de sédimentation sera ralentie (17). En cas d'apparition d'un sédiment, sa dispersion sera rendue plus difficile par une forte viscosité.

L'uniformité de teneur des flacons de suspension buvable non agités a permis de confirmer l'absence de sédimentation de la spironolactone à 12 semaines après la fabrication. Cela constitue une amélioration majeure de la nouvelle suspension buvable. En effet, la même analyse a été effectuée sur un flacon de spironolactone 5mg/ml dans l'InOrpha[®] sans ajout de gomme de xanthane, 1 mois après sa date de fabrication. L'analyse du haut du flacon ne détecte pas de spironolactone tandis que pour le bas du flacon, on détecte une teneur très faible (6,6µg/ml en moyenne). Cela s'explique par le sédiment compact non prélevable au fond du flacon. Ce test va être réitéré jusqu'à voir apparaître une sédimentation significative (dans la limite de 4 mois d'étude).

L'étude de palatabilité n'a pas été conduite selon les recommandations (57) dans le cadre de ce mémoire. Quelques tests de goût ont été réalisés en interne, sans évaluation objective, le panel des goûteurs (n=5) n'a pas permis de faire la différence de goût avec la formule sans gomme de xanthane. La nouvelle formulation ne devrait donc pas avoir d'impact sur l'acceptabilité de la suspension.

Sur le plan microbiologique, les essais de dénombrement microbien, réalisés conformément aux recommandations de la Pharmacopée Européenne, ont conclu à la stabilité microbiologique des flacons fermés jusqu'à 60 jours et l'ouverture quotidienne des flacons pendant 30 jours n'a pas entraîné de prolifération bactérienne.

Pour résumer, notre étude a permis de valider la stabilité de la suspension buvable de spironolactone à 5mg/ml formulée dans de l'InOrpha[®] avec 0,2% de gomme xanthane pour une durée de conservation de 60 jours avant ouverture et 30 jours après ouverture pour les deux conditions de conservation.

Au terme de 4 mois et demi d'analyse (J135), nous serons en mesure de conclure quant à la stabilité finale de cette suspension. En l'absence de différence significative quelles que soient les modalités de conservation, nous validerons une conservation à TA pour simplifier son stockage dans les unités de soins et en ambulatoire. Elle viendra se positionner en alternative

intéressante des autres formes développées dans les autres véhicules commerciaux. Si aujourd'hui, sa principale limite réside dans sa stabilité, réduite à 60 jours, elle dispose comme atout, une formule simple, avec un bon profil de tolérance pour les patients les plus jeunes.

Peu de données sont disponibles sur la pharmacocinétique de la spironolactone en pédiatrie. Manasa Tatipalli et al ont développé une analyse de pharmacocinétique de population pour prédire le profil pharmacocinétique de la spironolactone dans une suspension buvable dosée à 5mg/ml disponible aux Etats-Unis (Carospir®). Néanmoins, ils limitent leurs résultats aux 2-17 ans (9). Notre population cible au CHU est essentiellement composée de nourrissons et nouveau-nés. Il serait intéressant de pouvoir mener de telles études avec la formule développée pour cette catégorie de patients.

Enfin, comme évoqué dans la première partie de ce mémoire, l'administration de toute forme buvable doit être accompagnée du dispositif adapté (21). Le dispositif retenu pour la suspension buvable de spironolactone est un kit d'administration composé d'un bouchon NUTRICAIR™ entérale pour flacon avec une seringue entérale de 1ml et de 10ml pour s'adapter aux différentes posologies. Le flacon est dispensé fermé à l'aide d'un bouchon inviolable. Au premier emploi, la personne chargée de l'administration fait le changement des bouchons pour les bouchons NUTRICAIR™. On peut toutefois noter que les bouchons retenus au CHU pour permettre l'administration ne sont pas des bouchons sécurisés. Cette limite fera l'objet d'une évaluation prochaine.

Cette formule sera présentée aux équipes médicales. Une nouvelle étude des doses théoriques administrées pourrait être proposée à moyen terme, même si l'absence de sédiment à plusieurs semaines permet d'imaginer une nette amélioration des résultats.

CONCLUSION

Formuler un médicament adapté à la pédiatrie pour un industriel fait appel à plusieurs éléments : outre les considérations financières, il lui faudra du temps pour développer une forme galénique stable dans le temps et s'investir dans des études pharmacocinétiques/dynamiques pour la population cible en prenant en compte les catégories d'âge (2). Les incitations des Etats-Unis et de l'Europe restent cependant limitées pour que la démarche soit la priorité des industriels notamment pour les « vieux » médicaments qui n'ont plus de brevet. On est donc face à une liste de médicaments jugés prioritaires pour l'OMS pour la population pédiatrique qui ne présentent pas toujours des formules adaptées (29).

La place est donc faite aux équipes pharmaceutiques pour répondre aux sollicitations des pédiatres. Cette place reste difficile à occuper devant l'investissement en temps que cela représente dans des structures souvent très sollicitées pour la routine.

Une première formule buvable de spironolactone a été réalisée pour répondre de manière plus réactive aux modifications de posologies régulières. Le choix s'est principalement basé sur la sécurité d'emploi du véhicule pour suspension (devant le type de population traitée, souvent nouveau-né). Cette formule a fait l'écueil d'un usage non adéquat dans les doses administrées. L'ajout de gomme xanthane a permis d'augmenter la stabilité du mélange et de réduire sa vitesse de sédimentation à 3 mois. L'étude de stabilité intermédiaire montre des résultats prometteurs à 2 mois que nous souhaitons démontrer jusqu'à 4 mois. Idéalement des études de pharmacocinétiques devraient être entreprises pour valider la sécurité d'emploi pour la population cible.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Joel Schlatter. Le guide Préparations orales liquides en pédiatrie. Lavoisier Médecine Sciences. 2015.
2. M. Pfliegera, D. Bertram. ICH E11 : développement d'un médicament pédiatrique : comparaison entre les Etats-Unis, l'Union Européenne et le Japon. Elsevier Masson. Aout 2014;1129-38.
3. Françoise Brion et al. Médicaments et pédiatrie. Pharmacie clinique et thérapeutique, Elsevier Masson. 2018;1119-32.
4. Anti-aldostérone et apparentés [Internet]. [cité 10 août 2022]. Disponible sur: <https://pharmacomedicale.org/medicaments/par-specialites/item/anti-aldosterone-et-apparentes>
5. Revue générale des anomalies cardiovasculaires congénitales - Pédiatrie [Internet]. Édition professionnelle du Manuel MSD. [cité 15 août 2022]. Disponible sur: <https://www.msdmanuals.com/fr/professional/p%C3%A9diatrie/anomalies-cardiovasculaires-cong%C3%A9n%C3%A9rales/revue-g%C3%A9n%C3%A9rale-des-anomalies-cardiovasculaires-cong%C3%A9n%C3%A9rales>
6. Communication interventriculaire - Pédiatrie [Internet]. Édition professionnelle du Manuel MSD. [cité 15 août 2022]. Disponible sur: <https://www.msdmanuals.com/fr/professional/p%C3%A9diatrie/anomalies-cardiovasculaires-cong%C3%A9n%C3%A9rales/communication-interventriculaire>
7. Résumé des caractéristiques du produit - ALDACTONE 25 mg, comprimé sécable - Base de données publique des médicaments [Internet]. [cité 15 août 2022]. Disponible sur: <https://base-donnees-publique.medicaments.gouv.fr/affichageDoc.php?specid=64565845&typedoc=R>
8. Ministère des Solidarités et de la santé. Les médicaments pédiatriques [Internet]. 2022 [cité 8 mai 2022]. Disponible sur: <https://solidarites-sante.gouv.fr/soins-et-maladies/medicaments/le-circuit-du-medicament/article/les-medicaments-pediatriques>
9. Manasa Tatipalli et al. Model-Informed Optimization of a Pediatric Clinical Pharmacokinetic Trial of a New Spironolactone Liquid Formulation. *Pharmaceutics*. 2021;849.
10. Committee for Medicinal Products For Human Use, (CHMP). Reflection paper : formulations of choice for the paediatric population. 2016.
11. Simon Buatois et al. Principales modifications pharmacocinétiques chez l'enfant. *Toxicol Anal Clin*. 2014;26:156-64.
12. WATON K. Formes orales chez l'enfant de moins de 6 ans : Etat des lieux des difficultés rencontrées par les différents acteurs du circuit du médicament. Thèse de doctorat en pharmacie. Université de Poitiers; 2015.
13. Manolis AA et al. Spotlight on Spironolactone Oral Suspension for the Treatment of Heart Failure: Focus on Patient Selection and Perspectives. *Vasc Health Risk Manag*. 30 déc 2019;15:571-9.
14. Gotta Verena et al. Principes du dosage médicamenteux chez les enfants. 2021 27 [Internet]. 7 juill 2021 [cité 25 juill 2022];(27). Disponible sur: <https://medicalforum.ch/fr/detail/doi/fms.2021.08771>
15. Victor Gueutin et al. Physiologie rénal. *Bull cancer*. 2012;99:237-49.

16. Bernard Lacour. Physiologie du rein et bases physiopathologiques des maladies rénales. Revue francophone des laboratoires. Elsevier Masson; 2013.
17. Alok K. Kulshreshtha et al. Pharmaceutical Suspensions From Formulation Development to Manufacturing. Springer. 2010.
18. BENABDALLAH-KHODJA.A. Les suspensions [Internet]. Pharmacie Galénique; 2021. Disponible sur: <https://facmed.univ-constantine3.dz/wp-content/uploads/2022/02/suspension-2021-2022.pdf>
19. Véronique Andrieu et Jean-Pierre Reynier. La galénique au service de la sécurité chez l'enfant. Thérapie. 2004;59:599-609.
20. Jennifer Walsha et al. Delivery devices for the administration of paediatric formulations: Overview of current practice, challenges and recent developments. Int J Pharm. 2011;221-31.
21. Pipettes et autres dispositifs d'administration des solutions buvables : attention aux erreurs - Point d'Information - ANSM [Internet]. [cité 26 juill 2022]. Disponible sur: <https://archiveansm.integra.fr/S-informer/Points-d-information-Points-d-information/Pipettes-et-autres-dispositifs-d-administration-des-solutions-buvables-attention-aux-erreurs-Point-d-Information>
22. ANSM. Dispositifs doseur / d'administration des spécialités sous forme buvable en multidose. Recommandations aux industriels [Internet]. 2016. Disponible sur: <https://archiveansm.integra.fr/content/download/88203/1110091/version/1/file/Reco-industriels-Dispositifs-administration-formes-buvables-multidoses-mai2016.pdf>
23. EMA Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). Annex to the European Commission guideline on 'Excipients in the labelling and package leaflet of medicinal products for human use' (SANTE 2017-11668). 2019.
24. Susan Graham, Mark Turner. European Study of Neonatal Exposure to Excipients (ESNEE). Infant. 2011;7:196-9.
25. Georgi Nellis et al. Potentially harmful excipients in neonatal medicines: a pan-European observational study. BMJ J. 2015;694-9.
26. Khadija Rouaz et al. Excipients in the Paediatric Population: A Review. Pharmaceutics. 2021;387.
27. Smita Salunkea et al. The STEP (Safety and Toxicity of Excipients for Paediatrics) database: Part 2 – The pilot version. International Journal of Pharmaceutics. 2013;310-22.
28. WHO Paediatric Regulatory Network [Internet]. [cité 24 juill 2022]. Disponible sur: <https://www.who.int/initiatives/gap-f/who-paediatric-regulatory-network>
29. WHO Model List of Essential Medicines for Children - 8th list, 2021 [Internet]. [cité 24 juill 2022]. Disponible sur: <https://www.who.int/publications-detail-redirect/WHO-MHP-HPS-EML-2021.03>
30. EUR-Lex. Médicaments à usage pédiatrique [Internet]. [cité 8 mai 2022]. Disponible sur: <https://eur-lex.europa.eu/FR/legal-content/summary/medicinal-products-for-paediatric-use.html>
31. Rapport de la commission au parlement Européen et au Conseil : État des médicaments pédiatriques dans l'Union - 10 ans du règlement pédiatrique de l'Union [Internet]. 2017. Disponible sur: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/?uri=celex%3A52017DC0626>

32. PREA and BPCA: Spurring Pediatric Drug Development [Internet]. [cité 26 juill 2022]. Disponible sur: <https://phrma.org/patient-support/PREA-and-BPCA-Spurring-Pediatric-Drug-Development>
33. Joël Ménard. The 45-year story of the development of an anti-aldosterone more specific than spironolactone. 2004;45-52.
34. Kenneth S. Alexander et al. An Improved High-Performance Liquid Chromatography Assay for Spironolactone Analysis. 2008;101-7.
35. Spironolactone - European Pharmacopoeia 10.8 [Internet]. [cité 1 oct 2022]. Disponible sur: <https://pheur.edqm.eu/app/10-8/content/10-8/0688F.htm?highlight=on&terms=spironolactone>
36. Hala E. Zaazaa. Synchronized stability indicating RP-LC methods for determination of metolazone with losartan potassium or spironolactone in presence of their degradation products. 2020;474-81.
37. Répertoire des médicaments génériques. Annexe III : Liste des excipients à effet notoire [Internet]. Disponible sur: <https://ansm.sante.fr/uploads/2021/03/09/47b2dc40ecb31ecacb9fcd93ed07d7ac.pdf>
38. Spironolactone Compounded Oral Suspension. US Pharmacoeia; 2022.
39. FAGRON. SyrSpend® SF Table des compatibilités. 2021.
40. Etude de stabilité physicochimique et microbiologique d'une suspension buvable de Spironolactone sans excipient à effet notoire [Internet]. [cité 1 oct 2022]. Disponible sur: <https://www.gerpac.eu/etude-de-stabilite-physicochimique-et-microbiologique-d-une-suspension-buvable-de-spironolactone-sans-excipient-a-effet-notoire>
41. EUPFI - Login [Internet]. [cité 5 oct 2022]. Disponible sur: <https://step-db.ucl.ac.uk/eupfi/appDirectLink.do?appFlag=login>
42. Dhara D. Shah et al. Osmolality of Commonly Used Oral Medications in the Neonatal Intensive Care Unit. J Pediatr Pharmacol Ther. 2021;26:172-8.
43. Damien Fuss et al. Stability study of a compounded oral solution of nicardipine for the treatment of hypertension in children. European Journal of Pharmaceutical Sciences. 2021;
44. Raymond C Rowe et al. Handbook of Pharmaceutical Excipient. Sixth edition. The Pharmaceutical Press; 2009.
45. Base de données Theriaque [Internet]. Disponible sur: https://www.theriaque.org/apps/recherche/rch_simple.php#
46. EMA. ICH Q2(R2) Validation of analytical procedures [Internet]. European Medicines Agency. 2018 [cité 6 oct 2022]. Disponible sur: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-q2r2-validation-analytical-procedures>
47. Denis BROSSARD et al. Guide méthodologique des études de stabilité des préparations. Partie 1: préparation liquide. 1 ère éd. SFPC/GERPAC; 2013.
48. Ph. Hubert et al. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures. A SFSTP proposal—Part III. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2007;82-96.

49. Validation des procédures analytiques : quelques bonnes pratiques [Internet]. A3P - Industrie Pharmaceutique & Biotechnologie. 2021 [cité 27 sept 2022]. Disponible sur: <https://www.a3p.org/bonnes-pratiques-validation/>
50. Ph HUBERT et al. Validation des procédures analytiques quantitatives Harmonisation des démarchés. STP Pharma Prat. juin 2003;13:101-37.
51. Canada S. Q2(R1) : Validation des méthodes d'analyse: Texte et méthodologie [Internet]. 2015 [cité 1 oct 2022]. Disponible sur: <https://www.canada.ca/fr/sante-canada/services/medicaments-produits-sante/medicaments/demandes-presentations/lignes-directrices/international-conference-harmonisation/qualite/validation-methodes-analyse-texte-methodologie.html>
52. Nora Provenza Bernal et al. Development, Physical-Chemical Stability, and Release Studies of Four Alcohol-Free Spironolactone Suspensions for Use in Pediatrics. Dissolution Technol. févr 2014;19-30.
53. ANSM. Bonnes Pratiques de Préparation [Internet]. 2022. Disponible sur: <file:///C:/Users/roxan/Downloads/20220920-bonnes-pratiques-de-preparation-09-2022-2.pdf>
54. Milap C. Nahata et al. Stability of spironolactone in an extemporaneously prepared suspension at two temperatures. The annals of pharmacotherapy; 1993.
55. Vijay R. Ram et al. Development and Validation of a Stability-Indicating HPLC Assay Method for Simultaneous Determination of Spironolactone and Furosemide in Tablet Formulation. Journal of Chromatographic Science. 2011;721-6.
56. Legrand P et al. Spironolactone: stability indicating method for the identification of major degradation products and pathways. Agence générale des équipements et produits de santé; 2019.
57. Liza A. Squires et al. A Systematic Literature Review on the Assessment of Palatability and Swallowability in the Development of Oral Dosage Forms for Pediatric Patients. Special Section: Maternal and Child Health Therapeutics. 2013;533-41.

ANNEXES

Annexe 1: Affiche ANSM « ne vous mélangez pas les pipettes »



Ne vous mélangez pas les pipettes !

Un dispositif d'administration = un médicament

Les seringues orales, les pipettes, les cuillères-mesure et les compte-gouttes sont des dispositifs d'administration que vous pouvez trouver dans les boîtes de certains médicaments.

Un dispositif d'administration, s'il est mal utilisé, peut délivrer une dose trop importante ou insuffisante du médicament ; il peut alors devenir dangereux ou inefficace.

Le dispositif d'administration est conçu uniquement pour le médicament qui vous a été délivré.

Des règles simples vous permettront d'éviter les erreurs :

- ◆ Gardez toujours le dispositif d'administration dans la boîte du médicament associé pour ne pas le mélanger avec un autre.
- ◆ En cas de perte du dispositif ou de doute sur son utilisation, demandez conseil à un professionnel de santé.
- ◆ Lisez toujours attentivement la notice du médicament. Cette dernière contient des informations importantes pour l'utilisation des dispositifs d'administration.

Fiche réflexe étude de la dose administrée de spironolactone 5mg/mL

A destination des IDE participant à l'étude dose administrée Spironolactone 5mg/mL

Objectif : analyser la suspension buvable Spironolactone 5mg/mL avant l'administration à l'enfant, afin de connaître la concentration de la solution après agitation.

Chaque jour pendant la période d'étude, lors de l'administration de spironolactone buvable à un enfant :



Prélever 1ml de la suspension buvable juste après la phase d'agitation du flacon. Boucher la seringue (bouchon fourni)

Remplir sur l'étiquette spécifique à l'étude : numéro de la PH et date du prélèvement

Coller l'étiquette sur la seringue.

Ranger le prélèvement au même endroit que les flacons de suspension buvable de spironolactone

Contact si problème :

Roxanne DESQUINES (interne en pharmacie): 05 61 77 75 66/

Camille JURADO (pharmacien): 05 61 77 63 61

Annexe 3: Résultats des analyses par HPLC des prélèvements de suspension buvable de spironolactone 5mg/ml avant administration à l'enfant, en 2020.

Service	Numéro prélèvement	Date prélèvement	Lot	Concentration (mg/L)	Conforme (C)/Non conforme (NC)	Pourcentage Conformité
Néonats	1	14/04/2020	PH 20 01 37	56,82	NC	28%
	2	15/04/2020	PH 20 01 37	43,98	NC	
	3	13/04/2020	PH 20 01 37	54,53	C	
	4	15/04/2020	PH 20 03 49	3,99	NC	
	5	13/04/2020	PH 20 01 37	49,46	C	
	6	14/04/2020	PH 20 01 37	46,23	C	
	7	14/04/2020	PH 20 01 37	53,85	C	
	8	14/04/2020	PH 20 01 37	51,51	C	
	9	17/04/2020	PH 20 03 49	40,4	NC	
	10	17/04/2020	PH 20 03 49	39,13	NC	
	11	15/04/2020	PH 20 03 49	14,79	NC	
	12	21/04/2020	PH 20 03 49	35,78	NC	
	13	20/04/2020	PH 20 03 49	31,31	NC	
	14	22/04/2020	PH 20 03 49	33,51	NC	
	15	18/04/2020	PH 20 03 49	35,02	NC	
	16	19/04/2020	PH 20 03 49	33,73	NC	
	17	16/04/2020	??	44,3	NC	
	18	10/03/2020	PH 19 12 28	6,03	NC	
Réa	1	27/04/2020	PH 20 01 37	6,39	NC	0%
	2	27/03/2020	PH 20 01 37	5,9	NC	
	3	05/04/2020	PH 20 02 38	20,16	NC	
	4	30/03/2020	PH 20 02 38	43,68	NC	
	5	26/03/2020	PH 20 02 38	37,51	NC	
	6	16/05/2020	PH 20 03 49	27,25	NC	
	7	17/05/2020	PH 20 03 07	24,85	NC	
	8	09/05/2020	PH 20 03 49	175,81	NC	
	9	28/04/2020	PH 20 02 38	40,2	NC	
	10	31/03/2020	PH 20 02 38	44,14	NC	
	11	27/03/2020	PH 20 01 37	16,34	NC	
	12	02/05/2020	PH 20 02 38	24,93	NC	
	13	03/05/2020	PH 20 02 38	31,91	NC	
	14	25/03/2020	PH 20 02 38	44,36	NC	
	15	06/05/2020	PH 20 02 38	89,51	NC	

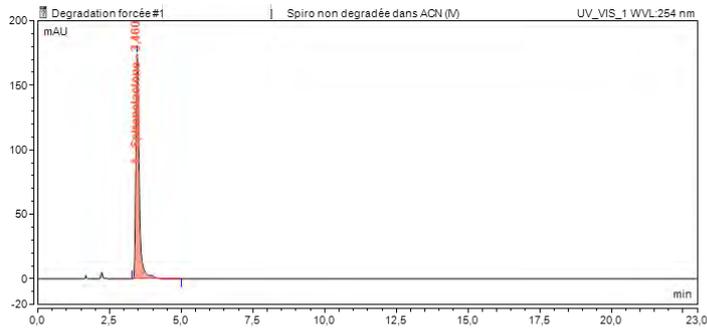
Annexe 4: Résultats des analyses par HPLC des prélèvements de suspension buvable de spironolactone 5mg/ml avant administration à l'enfant, en 2022.

Service	Numéro prélèvement	Date prélèvement	Lot	Concentration (mg/L)	Conforme (C)/Non conforme (NC)	Pourcentage Conformité
Néonats	1	15/03/2022	PH 21 12 100	NA	NC	0%
	2	16/03/2022	PH 21 12 100	NA	NC	
	3	17/03/2022	PH 21 12 100	26,56	NC	
	4	17/03/2022	PH 21 12 100	24,75	NC	
	5	18/03/2022	PH 21 12 100	35,54	NC	
	6	18/03/2022	PH 21 12 100	27,43	NC	
	7	20/03/2022	PH 21 12 100	11,33	NC	
	8	21/03/2022	PH 21 12 100	20,60	NC	
	9	24/03/2022	PH 21 12 100	20,51	NC	
	10	25/03/2022	PH 21 12 100	20,02	NC	
	11	25/03/2022	PH 21 12 100	20,63	NC	
	12	25/03/2022	PH 21 12 100	25,80	NC	
	13	26/03/2022	PH 21 12 100	24,79	NC	
	14	26/03/2022	PH 21 12 100	22,19	NC	
	15	26/03/2022	PH 21 12 100	28,89	NC	
	16	30/03/2022	PH 21 12 100	NA	NC	
Réa	1	25/03/2022	PH 22 01 53	60,37	NC	19%
	2	25/03/2022	PH 22 01 53	59,08	NC	
	3	26/03/2022	PH 22 01 53	42,04	NC	
	4	27/03/2022	PH 22 01 53	66,49	NC	
	5	27/03/2022	PH 22 01 53	37,18	NC	
	6	28/03/2022	PH 22 01 53	64,27	NC	
	7	28/03/2022	PH 22 01 53	54,27	C	
	8	01/04/2022	PH 22 01 53	61,76	NC	
	9	01/04/2022	PH 22 01 53	63,65	NC	
	10	16/04/2022	PH 22 01 53	31,28	NC	
	11	17/04/2022	PH 22 01 53	55,34	NC	
	12	17/04/2022	PH 22 01 53	45,52	C	
	13	18/04/2022	PH 22 01 53	63,76	NC	
	14	19/04/2022	PH 22 01 53	58,19	NC	
	15	?	PH 22 01 53	68,70	NC	
	16	?	PH 22 01 53	46,26	C	

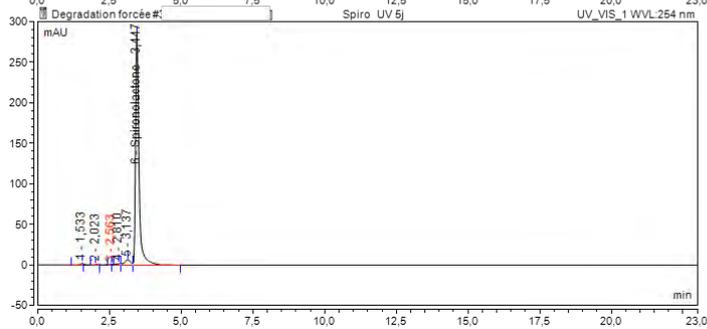
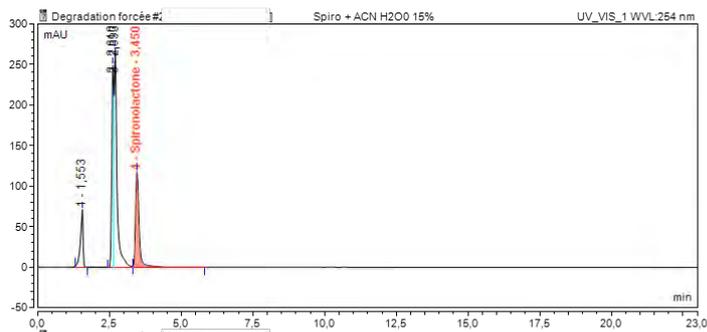
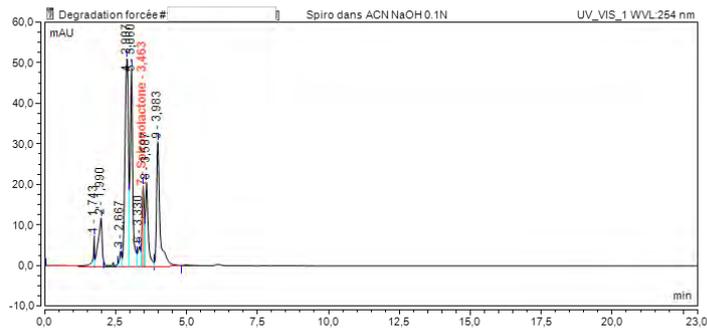
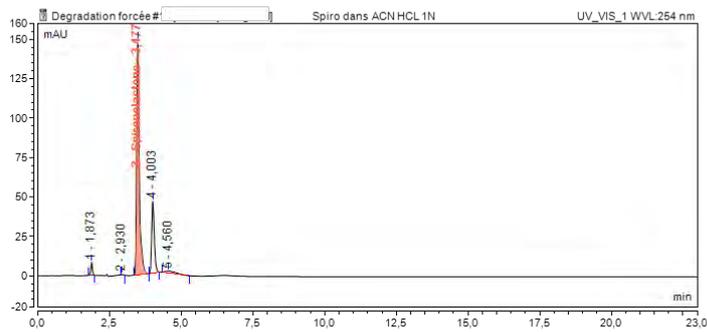
Annexe 5: Résultats des analyses par HPLC des seringues contrôles à J40, après un premier dosage conforme à JO

Service	Numéro prélèvement	Date prélèvement	Lot	Concentration (mg/L)	Conforme (C)/Non conforme (NC)	Pourcentage Conformité
Contrôles	1	20/04/2022	PH 22 04 53	48,20	C	100%
	2	20/04/2022	PH 22 04 53	49,18	C	
	3	20/04/2022	PH 22 04 53	47,02	C	

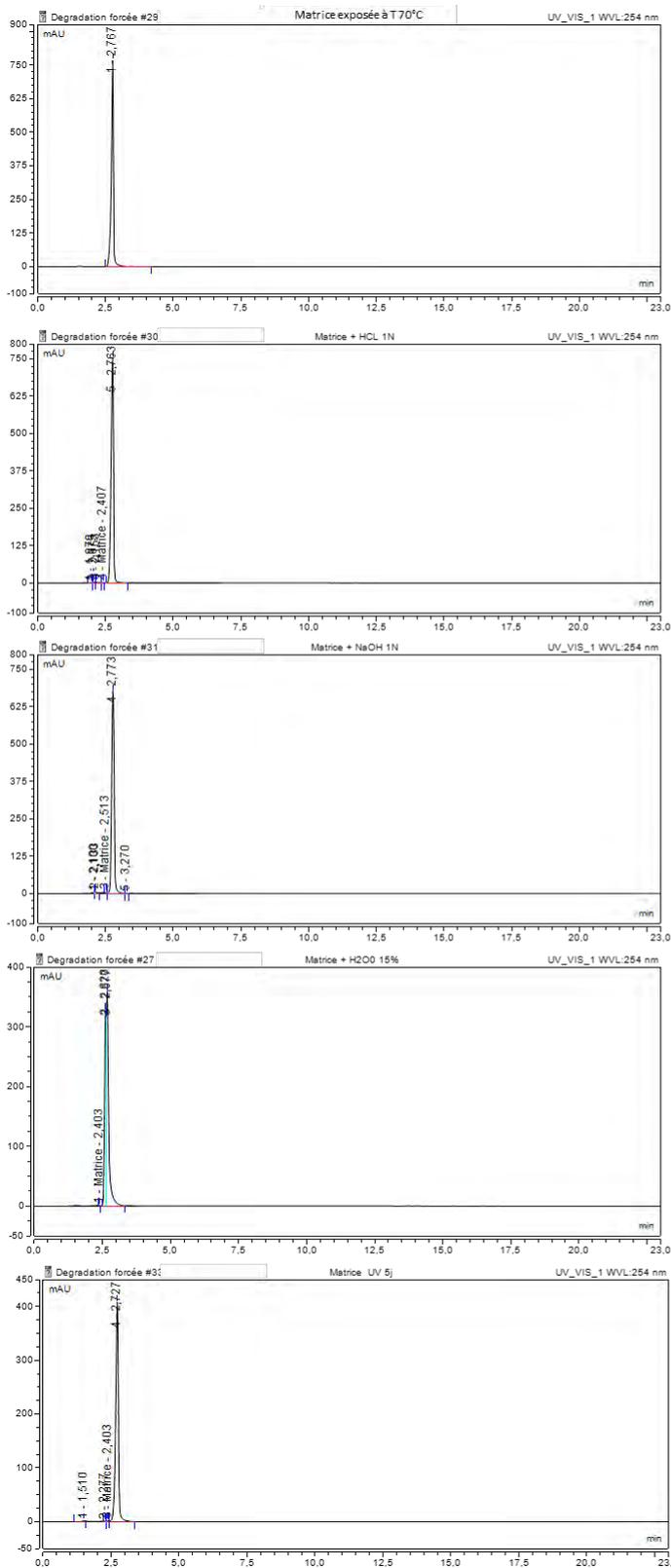
Annexe 6: Chromatogrammes de la spironolactone soumise aux conditions de dégradation forcée



De haut en bas :
 Spirolactone exposée à 70°C
 Spirolactone + HCL 1N
 Spirolactone + NaOH 0,1N
 Spirolactone + H₂O₂ 15%
 Spirolactone aux UV 5 jours

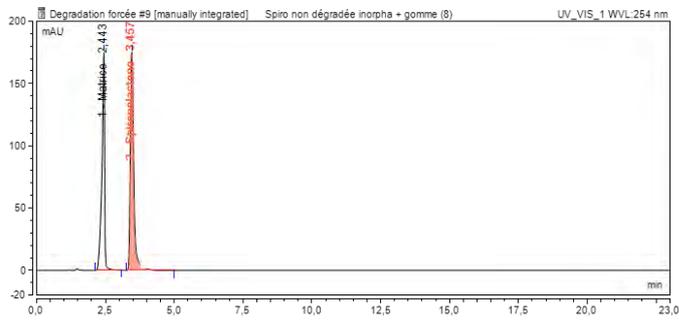


Annexe 7: Chromatogrammes de la matrice soumise aux conditions de dégradation forcée

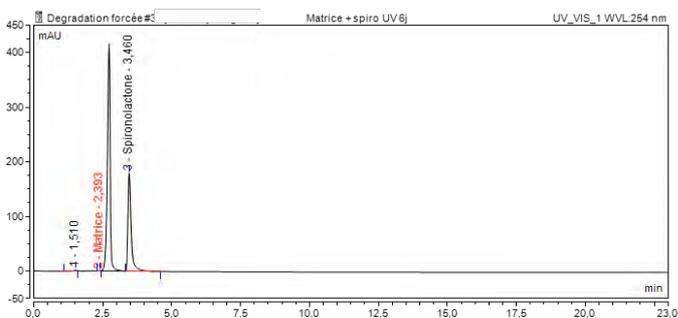
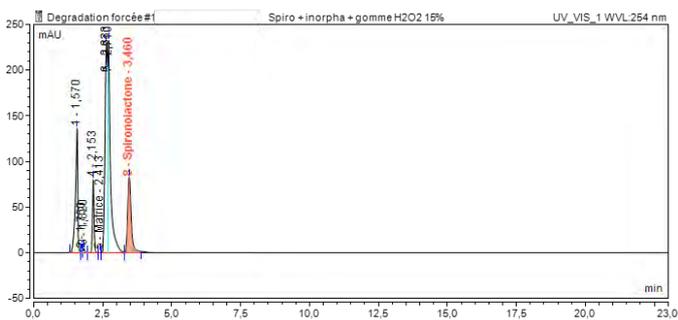
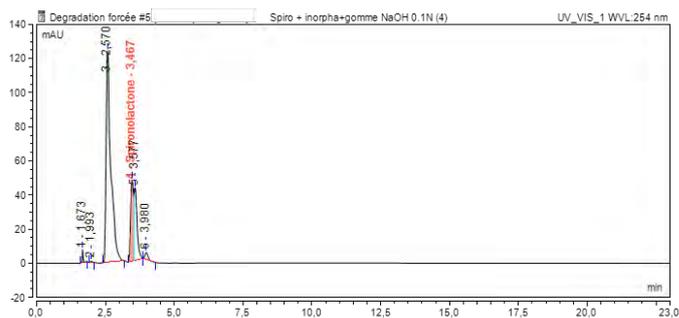
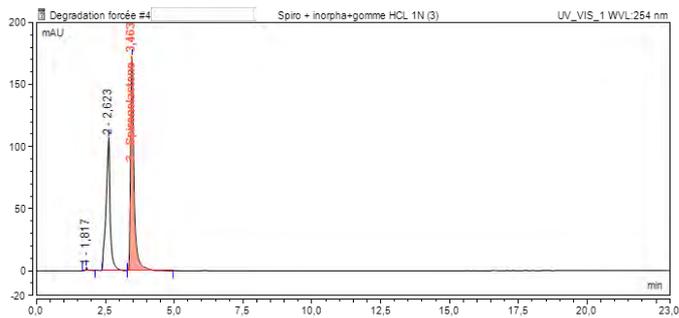


De haut en bas :
Matrice exposée à 70°C
Matrice + HCL 1N
Matrice + NaOH 1N
Matrice + H₂O₂ 15%
Matrice aux UV 5 jours

Annexe 8: Chromatogrammes de la suspension de spironolactone (InOrpha + 0,2% de gomme de xanthane) soumise aux conditions de dégradation forcée



De haut en bas :
 Suspension exposée à 70°C
 Suspension + HCL 1N
 Suspension + NaOH 0,1N
 Suspension + H₂O₂ 15%
 Suspension aux UV 5 jours



Annexe 9: Mesures de la teneur au cours de l'étude de stabilité avant ouverture

	J0			J15			J30			J60		
Teneur 25°C	Flacon 1	Flacon 2	Flacon 3	Flacon 4	Flacon 5	Flacon 6	Flacon 7	Flacon 8	Flacon 9	Flacon 10	Flacon 11	Flacon 12
	52,17	51,93	51,72	48,50	49,42	49,39	52,32	51,87	51,31	50,286	49,988	50,478
Moyenne	51,94			49,10			51,83			50,25		
Ecart type	0,22			0,52			0,51			0,25		
% CV	0,43			1,07			0,98			0,49		
% Spironolactone par rapport à J0	100,0%			94,53%	95,14%	95,09%	100,7%	99,9%	98,8%	96,8%	96,2%	97,2%
% moyen spironolactone par rapport à J0	100,0%			94,92%			99,78%			96,74%		
Ecart type du %	0,0%			0,34%			0,98%			0,48%		
IC 95%	0,0%			0,38%			1,10%			0,54%		
Teneur 2-8°C	Flacon 1	Flacon 2	Flacon 3	Flacon 4	Flacon 5	Flacon 6	Flacon 7	Flacon 8	Flacon 9	Flacon 10	Flacon 11	Flacon 12
	51,48	51,66	52,25	50,29	50,13	49,41	51,37	51,88	51,84	50,277	50,359	49,705
Moyenne	51,80			49,94			51,69			50,11		
Ecart type	0,40			0,47			0,29			0,36		
% CV	0,77			0,94			0,55			0,71		
% Spironolactone par rapport à J0	100,0%			97,09%	96,78%	95,39%	99,17%	100,16%	100,07%	97,07%	97,22%	95,96%
% moyen spironolactone par rapport à J0	100,0%			96,42%			99,8%			96,8%		
Ecart type du %	0,0%			0,91%			0,6%			0,7%		
IC 95%	0,0%			1,03%			0,6%			0,8%		

Annexe 10: Mesures de la viscosité au cours de la stabilité avant ouverture

	J0			J15			J30			J60		
Viscosité 25°C	Flacon 1	Flacon 2	Flacon 3	Flacon 4	Flacon 5	Flacon 6	Flacon 7	Flacon 8	Flacon 9	Flacon 10	Flacon 11	Flacon 12
	147,30	141,20	139,40	129,41	129,88	128,04	131,104	131,416	131,6	133,19	133,83	134,04
Moyenne	142,63			129,11			131,37			133,69		
Ecart type	4,14			0,95			0,25			0,44		
IC 95%	4,69			1,08			0,28			0,50		
% CV	2,90			0,74			0,19			0,33		
Différence par rapport à J0	0%			-9%			-8%			-6%		
Viscosité 2-8°C	Flacon 1	Flacon 2	Flacon 3	Flacon 4	Flacon 5	Flacon 6	Flacon 7	Flacon 8	Flacon 9	Flacon 10	Flacon 11	Flacon 12
	221,02	220,40	219,70	207,72	209,91	206,37	209,613	210,387	210,229	214,63	216,18	218,29
Moyenne	220,37			208,00			210,08			216,37		
Ecart type	0,66			1,79			0,41			1,83		
IC 95%	0,74			2,02			0,46			2,07		
% CV	0,30			0,86			0,19			0,85		
Différence par rapport à J0	0%			-6%			-5%			-2%		

Annexe 11: Mesures de la densité au cours de la stabilité avant ouverture

	J0			J15			J30			J60		
Densité 25°C	Flacon 1	Flacon 2	Flacon 3	Flacon 4	Flacon 5	Flacon 6	Flacon 7	Flacon 8	Flacon 9	Flacon 10	Flacon 11	Flacon 12
	1,013	1,014	1,013	1,013	1,014	1,014	1,014	1,014	1,014	1,014	1,014	1,014
Moyenne	1,013			1,014			1,014			1,014		
Ecart type	0,001			0,001			0,000			0,000		
% CV	0,06			0,06			0,00			0,00		
Densité 2-8°C	Flacon 1	Flacon 2	Flacon 3	Flacon 4	Flacon 5	Flacon 6	Flacon 7	Flacon 8	Flacon 9	Flacon 10	Flacon 11	Flacon 12
	1,014	1,015	1,015	1,013	1,014	1,014	1,014	1,014	1,014	1,015	1,015	1,014
Moyenne	1,015			1,014			1,014			1,015		
Ecart type	0,001			0,001			0,000			0,001		
% CV	0,06			0,06			0,00			0,06		

Annexe 12: Mesures du pH au cours de la stabilité avant ouverture

	J0			J15			J30			J60		
pH 25°C	Flacon 1	Flacon 2	Flacon 3	Flacon 4	Flacon 5	Flacon 6	Flacon 7	Flacon 8	Flacon 9	Flacon 10	Flacon 11	Flacon 12
	4,82	4,81	4,81	4,76	4,71	4,78	4,8	4,73	4,68	4,69	4,69	4,68
Moyenne	4,81			4,75			4,74			4,69		
Ecart type	0,01			0,04			0,06			0,01		
% CV	0,12			0,76			1,27			0,12		
pH 2-8°C	Flacon 1	Flacon 2	Flacon 3	Flacon 4	Flacon 5	Flacon 6	Flacon 7	Flacon 8	Flacon 9	Flacon 10	Flacon 11	Flacon 12
	4,82	4,82	4,81	4,69	4,7	4,69	4,7	4,68	4,72	4,82	4,86	4,84
Moyenne	4,82			4,69			4,70			4,84		
Ecart type	0,01			0,01			0,02			0,02		
% CV	0,12			0,12			0,43			0,41		

Annexe 13: Mesures de l'osmolalité au cours la stabilité avant ouverture

	J0			J15			J30			J60		
Osmolalité 25°C	Flacon 1	Flacon 2	Flacon 3	Flacon 4	Flacon 5	Flacon 6	Flacon 7	Flacon 8	Flacon 9	Flacon 10	Flacon 11	Flacon 12
	187	189	193	183	184	187	190	182	179	182	179	190
Moyenne	190			185			184			184		
Ecart type	3,1			2,1			5,7			5,7		
% CV	1,6			1,1			3,1			3,1		
Osmolalité 2-8°C	Flacon 1	Flacon 2	Flacon 3	Flacon 4	Flacon 5	Flacon 6	Flacon 7	Flacon 8	Flacon 9	Flacon 10	Flacon 11	Flacon 12
	191	188	187	184	185	185	182	195	179	189	187	182
Moyenne	189			185			185			186		
Ecart type	2,1			0,6			8,5			3,6		
% CV	1,1			0,3			4,6			1,9		

SERMENT DE GALIEN

En présence des Maitres de la Faculté, je fais le serment :

- D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle aux principes qui m'ont été enseignés et d'actualiser mes connaissances
- 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 Déontologie, de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
- De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers la personne humaine et sa dignité
- En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.
- De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession
- De faire preuve de loyauté et de solidarité envers mes collègues pharmaciens
- De coopérer avec les autres professionnels de santé

Que les Hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque.

Date

Signature de l'étudiant et du Président du jury

Version validée par la conférence des Doyens de facultés de Pharmacie le 7 février 2018

SPIRONOLACTONE IN PEDIATRICS: NEED FOR AN ADAPTED GALENIC FORM AND DEVELOPMENT OF A NEW GALENIC FORMULATION OF ORAL SUSPENSION

KEYWORDS : Spironolactone - Oral Suspension - Preparation – Pediatrics

ABSTRACT:

Spironolactone has pediatric indications. In France, it is only available in tablet form. This pharmaceutical form and its dosages are unsuitable for pediatric use in children under 6 years of age. In response, pharmacy unit prepares a suspension of spironolactone at 5mg/ml using a commercial vehicle, InOrpha®. This suspension sedimented quickly and was difficult to resuspend. A study on the dose taken to the patient showed that sedimentation did not allow a suitable use of the preparation. We have optimized the formulation by adding 0.2% xanthan gum to InOrpha® to increase viscosity and reduce sedimentation rate. An analytical method has been developed and validated to assess the chemical stability of the preparation. Physico-chemical and microbiological stability were demonstrated at 60 days (storage at 25°C and +2+8°C).

**SPIRONOLACTONE EN PEDIATRIE : NECESSITE D'UNE FORME GALENIQUE
ADAPTEE ET DEVELOPPEMENT D'UNE NOUVELLE FORMULATION GALENIQUE
DE SUSPENSION BUVABLE**

RESUME :

La spironolactone possède des indications pédiatriques. Elle est commercialisée uniquement sous forme de comprimés. Cette forme galénique et ses dosages sont inadaptés à l'usage pédiatrique chez des enfants de moins de 6 ans. Face à cette problématique, la pharmacie prépare une suspension buvable de spironolactone à 5mg/ml à l'aide d'un véhicule commercial l'InOrpha®. Cette suspension sédimente rapidement et est difficile à remettre en suspension. Une étude portant sur la dose prélevée en vue de l'administration au patient, a démontré que la sédimentation ne permettait pas un bon usage de la préparation. Nous avons optimisé la formulation galénique en ajoutant 0,2% de gomme xanthane à l'InOrpha® pour augmenter la viscosité et réduire la vitesse de sédimentation. Une méthode analytique a été développée et validée pour évaluer la stabilité chimique de la préparation. La stabilité physico-chimique et microbiologique ont été démontrée à 60 jours (conservation à 25°C et à +2+8°C).

DISCIPLINE ADMINISTRATIVE : Pharmacie

MOTS-CLES : Spironolactone – Suspension Buvable – Préparation – Pédiatrie

INTITULE ET ADRESSE DE L'UFR OU DU LABORATOIRE

Université Paul Sabatier Toulouse III
Faculté des sciences pharmaceutiques
35 chemin des maraichers
31062 Toulouse Cedex 9, France

DIRECTEUR DE THESE : Camille JURADO