

**UNIVERSITE DE LILLE**  
**ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE SANTE**

**2020**

**Thèse présentée pour l'obtention du grade de  
Docteur de l'Université de Lille**

**Spécialité**

**Pharmacie en Sciences du Médicaments et des autres Produits de Santé**

**Par Héloïse HENRY**

**EVALUATION DE LA STABILITE DE L'INSULINE HUMAINE  
DANS UN MELANGE DE NUTRITION PARENTERALE  
TERNAIRE : ETUDES *IN VITRO* ET *IN VIVO***

**Soutenue publiquement le 31 mars 2020**

**Membres du jury**

Directeur de thèse : **M. le Professeur Thierry DINE**

Rapporteurs : **Mme le Professeur Sylvie CRAUSTE-MANCIET**  
**Mme le Professeur Francisca JOLY**

Examineurs : **M. le Professeur Pascal ODOU**  
**M. le Docteur Arnaud AGIN**  
**M. le Docteur Damien LANNOY**

Invité : **Mme le Docteur Catherine FOULON**







**UNIVERSITE DE LILLE**  
**ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE SANTE**

**2020**

**Thèse présentée pour l'obtention du grade de  
Docteur de l'Université de Lille**

**Spécialité**

**Pharmacie en Sciences du Médicaments et des autres Produits de Santé**

**Par Héloïse HENRY**

**EVALUATION DE LA STABILITE DE L'INSULINE HUMAINE  
DANS UN MELANGE DE NUTRITION PARENTERALE  
TERNAIRE : ETUDES *IN VITRO* ET *IN VIVO***

**Soutenue publiquement le 31 mars 2020**

**Membres du jury**

Directeur de thèse : **M. le Professeur Thierry DINE**

Rapporteurs : **Mme le Professeur Sylvie CRAUSTE-MANCIET**  
**Mme le Professeur Francisca JOLY**

Examineurs : **M. le Professeur Pascal ODOU**  
**M. le Docteur Arnaud AGIN**  
**M. le Docteur Damien LANNOY**

Invité : **Mme le Docteur Catherine FOULON**



*Dans la vie, il n'y a pas de problèmes, il n'y a que des défis à relever.*

*Pr Bertrand Décaudin*

Je dédie cette thèse à mes parents qui ont su me transmettre leur goût du travail, leurs valeurs humaines et leur curiosité.

## Remerciements

---

A **Mesdames les Professeurs Sylvie CRAUSTE-MANCIET et Francisca JOLY**, j'exprime toute ma gratitude pour avoir manifesté un grand intérêt à l'égard de ce travail de recherche, pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de le juger et d'être les rapporteurs de ce manuscrit. Soyez assurées de mon plus profond respect.

A **Monsieur le Docteur Arnaud AGIN**, je tiens à exprimer toute ma reconnaissance pour avoir accepté d'être examinateur et me faire l'honneur de votre présence. Je vous remercie également pour vos travaux de thèse de Doctorat qui m'ont permis de me familiariser avec les immunodosages de l'insuline.

A **Monsieur le Professeur Pascal ODOU**. Vous avez accepté de juger ce travail, soyez assuré de mon plus profond respect. Je tiens également à vous remercier de m'avoir accueillie au sein de votre laboratoire depuis mon Master 2 et de m'avoir fait confiance en m'intégrant à votre équipe d'enseignants-chercheurs et de pharmaciens durant ces 3 dernières années. J'espère sincèrement avoir été à la hauteur.

A **Monsieur le Professeur Thierry DINE**, soyez assuré de toute ma reconnaissance pour avoir accepté d'assumer le rôle de Directeur de thèse. Je vous remercie très sincèrement pour votre présence bienveillante et toujours apaisante.

A **Monsieur le Docteur Damien LANNOY**. Ce fut un travail de longue haleine avec de nombreux obstacles mais l'essentiel est de persévérer et vous m'avez accompagnée jusque dans le sprint final de ce travail. Merci de m'avoir appris à être autonome et d'avoir ponctué ces 8 années de fous rires.

A **Madame le Docteur Catherine FOULON**. Un grand merci pour votre encadrement, votre expertise dans le domaine de la spectrométrie de masse et votre présence rassurante. Sans vous je n'y serais jamais arrivée ! J'espère que de nombreuses collaborations nous attendent encore.

A **Monsieur le Professeur Bertrand DECAUDIN**. Je tiens à vous exprimer toute ma gratitude pour votre gentillesse et votre disponibilité malgré un emploi du temps surchargé. Votre intervention à un moment clé m'a permis d'atteindre l'aboutissement final de ces travaux de recherche. Soyez assuré de mon plus profond respect.

**A Madame le Docteur Christine BARTHELEMY**, merci pour votre soutien moral, votre relecture de ce travail et votre énergie toujours communicative.

**A Monsieur le Professeur Nicolas SIMON**, un immense MERCI pour votre soutien sans faille et vos paroles percutantes mais toujours justes. Votre sagesse, votre humilité et vos encouragements m'ont permis de garder le cap. Je vous dois beaucoup et vous suis profondément reconnaissante pour tout ce que vous avez fait pour moi. J'espère pouvoir poursuivre notre collaboration.

Ps : « l'humilité, c'est pas quand il y a des infiltrations ? »

**A Monsieur le Professeur David SEGUY**, lorsque tu m'as proposé ce sujet de recherche, j'étais loin de me douter l'ampleur du travail qui se cachait derrière... Merci de m'avoir permis de vivre cette aventure hors du commun.

*A l'équipe du laboratoire de Biopharmacie*

**Nicole**, tu es une mère pour nous tous. Merci pour les discussions que nous avons eues et qui m'ont permis de prendre du recul sur bien des choses.

**Antho**, merci d'avoir su m'écouter et m'encourager quand j'en avais le plus besoin. Vive la Bretagne et les gariguettes.

**Morgane**, merci pour tes conseils et encouragement tout au long de cette thèse et merci de râler autant que moi, je me sens moins seule.

**Julicorne**, parce que même à l'autre bout de la France, tu feras toujours partie du labo... Nous sommes enfin libérées, délivrées de cette thèse ! Merci de m'avoir accompagnée dans cette aventure.

**Steph**, merci de m'avoir changé les idées avec des chansons pourries et de m'avoir appris à prendre du recul.

**Natacha, Manon, Laura, Sixtine**, merci pour votre bonne humeur et les nombreuses discussions que nous avons eues à propos de tout et de rien. Ces moments furent des bouffées d'oxygène.

*A l'équipe du laboratoire de Chimie analytique*

**Monsieur le Professeur GOOSSENS**, je vous suis très reconnaissante du temps et de la patience dont vous avez fait preuve lors de mon apprentissage de la rigueur analytique. Merci pour votre écoute, votre gentillesse et vos conseils.

**Marie, Cécile, Emmanuelle, Romain**, ce fut toujours un grand plaisir de vous croiser, même en coup de vent entre deux manips. Votre bonne humeur m'a aidée à supporter les moments un peu plus difficiles.

*A l'équipe du PSM GRITA*

**Monsieur le Docteur Mostafa KOUACH**. Mostafa, un très grand merci pour ta pédagogie, ta disponibilité, la transmission de ta passion et ton écoute toujours bienveillante accompagnée de conseils avisés, tant sur le plan professionnel que personnel. Jamais je n'aurais pensé aimer la masse, cette discipline obscure qui nous a pourtant fourni la clé du problème. Comme le dit l'expression : « il n'y a que les imbéciles qui ne changent pas d'avis ».

**Amandine, Paul-Emile**, merci pour votre accueil toujours souriant et votre soutien.

**A Mesdames le Professeur Nathalie AZAROUAL et le Docteur Laurence GOOSSENS**, merci infiniment pour votre aide afin de percer le mystère du MDA ainsi que pour vos encouragements enthousiastes.

*Aux équipes du Centre de Biologie Pathologie du CHU de Lille*

**A Monsieur le Professeur Thierry BROUSSEAU, Madame le Docteur Michèle D'HERBOMEZ et Monsieur le Docteur Jean-François LEGRAND** jamais ma gratitude ne sera à la hauteur du service que vous m'avez rendu en me permettant de travailler au sein du laboratoire de RIA. J'y ai découvert une équipe de biologistes et de techniciens profondément humains, avec lesquels la bonne humeur a toujours été de mise. Merci à **Fred, Paulo, Mickaël, Fabienne, Lydie, Cécile, Angèle, Claude-Marie, Marie-Jo, Lydie, Virginie, Aurélie**. Vous m'avez toujours soutenue et je vous en suis très reconnaissante.

**A Monsieur le Professeur PIGNY**, je vous remercie d'avoir présidé mes comités de suivi de thèse et de m'avoir prodigué de précieux conseils.

Aux **techniciens du secteur biochimie urgences**, merci d'avoir analysé mes (trop) nombreux échantillons.

*A l'équipe du centre de R&D Baxter de Braine l'Alleud*

**Zouaoui, Marc, Aliénor, Romain, Alexandra, Nicolas**, un grand merci pour votre disponibilité et votre gentillesse!

*A l'équipe du laboratoire de Pharmacologie*

A **Monsieur le Docteur Nicolas KAMBIA**, pour m'avoir aidée à appréhender l'expérimentation animale et accompagnée dans les essais avec les lapins, je vous remercie.

A **Monsieur le Professeur Bernard GRESSIER**, grâce à vous, je ne me suis jamais sentie seule lors des longues heures de présence tardive à l'animalerie. Merci pour vos encouragements et votre gentillesse.

A **Madame le Docteur Hélène CARRIE**, merci d'avoir partagé ta passion pour les animaux et de m'avoir fait profiter de ton expérience. Les petites attentions dont tu m'as fait bénéficier m'ont fait très plaisir.

A **Christine**, merci pour ta présence et ta gentillesse.

*A mes collègues de la Pharmacie centrale*

**Chloé, Fanny, Stéphanie, Hélène, Elodie, Agathe, Khaoula, Benjamin, Maxime, Marie, Laurine, Anne**, merci beaucoup pour vos nombreux encouragements et votre compréhension #vismavied'AHU

A tous **mes confrères et consoeurs du CHU** : merci de m'avoir soutenue dans cette démarche.

A mes collègues partis vers d'autres horizons : **Julie DiP, Terry, Gwen, Pierre, Maximilien, Julia**, ce fut un plaisir de travailler avec vous.

Aux **préparateurs en pharmacie hospitalière et agents** que j'ai pu côtoyer de près ou de loin à Lille ou lors de mes débuts à Amiens : **Stéphane, Gérard, Noémie, Christiane, Elodie, Audrey, Manon, Pascal, Elsa, Guillaume, Pauline, Virginie, Marie, Cédric, Sylvain, Pierre, Guérolé, Elodie, Sophie, Carole, Isabelle**, j'ai adoré travailler à vos côtés !

*Aux pharmaciens qui m'ont encadrée en stage* : **Monsieur DUBAELE, Anne-Françoise, Monsieur NEUVILLE, Madame COMPAGNON, Monsieur PONS**, merci de m'avoir supportée (dans tous les sens du terme) et m'avoir fait découvrir les diverses facettes du métier passionnant de pharmacien hospitalier.

**Aux internes** avec lesquels j'ai travaillé : je n'aurais pas assez de place pour tous vous citer mais je tiens à vous remercier pour les bons moments passés ensemble.

*Aux étudiants*

**Manon, Célia, Anaïs, Marina, Victoire, Marion, Anne-Sophie**, merci de m'avoir confortée dans mon choix de parcours en qualité d'enseignante. Vos retours très positifs ont apaisé mes doutes et m'encouragent à persévérer dans cette vocation de transmission.

*A mes amis*

**Céline, Nadège, Anne-Claire, Amélie, Michèle, Valérie**, même si les bancs de la fac sont déjà loin, les souvenirs n'en restent pas moins vivants. Merci pour tous les bons moments passés ensemble.

**Marine**, merci pour ta douceur et ces longs moments passés à papoter. Je te passe le flambeau, à ton tour de mener la thèse à son terme : I believe in you.

**Mathilde**, tu m'as toujours soutenue et aidée à relativiser. Merci, d'être mon amie, tout simplement.

**Camille, Delphine**, la vie et l'internat vous ont mises sur ma route. J'espère être à la hauteur de votre amitié qui est inestimable. Merci pour tout, vous me manquez.

**Aurélia, Caro, Sido, Alex, Claire**, merci de former cette bande d'amies formidables sur lesquelles je peux compter depuis déjà 16 ans. Vous êtes extraordinaires !

**Elo sans H**, les mots ne seront jamais assez forts pour te témoigner toute mon amitié et ma reconnaissance. Les galères nous rapprochent et je sais que je pourrai toujours compter sur toi. Merci d'être toi et de me soutenir en toute circonstance. Ne change surtout pas !

*A ma famille*

**Geo**, merci de me supporter. Tu es mon beau-frère préféré !

**Clémentine**, merci d'avoir compris que je consacre autant de temps et d'énergie à cette thèse. Merci aussi de m'avoir confié le plus beau des rôles, celui de marraine pour votre petit Valentin.

**Maman**, je t'ai toujours admirée, tu es un modèle pour moi. Merci de m'avoir permis de faire ce que j'aime et de m'avoir soutenue tout au long de ces années.

**Papa**, tu me manques, j'espère que tu es fier de moi.

# Table des matières

---

<b>Remerciements</b> .....	<b>4</b>
<b>Table des matières</b> .....	<b>9</b>
<b>Liste des abréviations</b> .....	<b>15</b>
<b>Liste des figures</b> .....	<b>17</b>
<b>Liste des tableaux</b> .....	<b>21</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>23</b>
<b>Présentation du contexte</b> .....	<b>25</b>
<b>I. La dénutrition</b> .....	<b>25</b>
A. Définition .....	25
B. Causes, prévalence et conséquences de la dénutrition.....	26
C. Dépistage et diagnostic .....	27
D. Prise en charge de la dénutrition .....	28
<b>II. La nutrition parentérale</b> .....	<b>29</b>
A. Généralités.....	29
B. Les mélanges de nutrition parentérale.....	30
C. Modalités d'administration de la nutrition parentérale.....	37
D. Supplémentation de la nutrition parentérale .....	38
1. Electrolytes .....	38
2. Eléments-trace.....	39
3. Vitamines .....	41
4. Ajouts spécifiques : les médicaments .....	42
<b>III. Stabilité des mélanges de nutrition parentérale</b> .....	<b>43</b>
A. Stabilité des mélanges.....	43
1. Stabilité physique des mélanges nutritifs.....	45
a. Stabilité des émulsions.....	45
i. Facteurs et conséquences de déstabilisation d'une émulsion.....	46
ii. Méthodes d'étude de la stabilité d'une émulsion.....	49
(a) Taille des globules.....	49
(i) Référentiels .....	49
(ii) Méthodes de détermination du diamètre et de la distribution de taille des globules.....	50
(b) Potentiel zêta.....	51

(i) Référentiels .....	52
(ii) Méthodes de détermination potentiel zêta .....	52
b. Autres paramètres de stabilité physique des mélanges nutritifs .....	52
2. Stabilité chimique des mélanges de nutrition parentérale .....	54
a. Précipitation phosphocalcique .....	54
b. Stabilité des acides aminés .....	57
c. Stabilité des lipides.....	59
B. Stabilité des mélanges avec les ajouts habituels.....	59
1. Stabilité des vitamines .....	59
2. Stabilité des éléments-trace.....	60
C. Stabilité des mélanges de nutrition parentérale en présence de médicaments.....	61
1. Etudes de stabilité des médicaments et nutrition parentérale : état des lieux et limites.....	64
2. Recommandations concernant l'administration conjointe de mélanges de nutrition parentérale et de médicaments .....	73
<b>IV. Complications de la nutrition parentérale .....</b>	<b>74</b>
A. Hypoglycémie.....	74
B. Hyperglycémie.....	76
<b>V. Nutrition parentérale et insuline : une relation complexe .....</b>	<b>82</b>
A. Prise en charge de l'hyperglycémie : pourquoi ? .....	82
1. Cibles glycémiques.....	83
2. Quand débiter l'insuline ?.....	87
B. Types d'insuline employés et modalités d'administration.....	88
1. Modalités d'administration de l'insuline.....	89
a. Essais cliniques concernant l'efficacité de l'insuline dans la prise en charge de l'hyperglycémie chez les patients traités par nutrition parentérale .....	89
b. Essais in vitro sur la stabilité de l'insuline dans la nutrition parentérale : revue de la littérature.....	99
<b>Objectifs.....</b>	<b>107</b>
<b>Partie expérimentale .....</b>	<b>108</b>
<b>I. Etude de stabilité physique de l'émulsion de nutrition parentérale après ajout d'insuline .....</b>	<b>108</b>
A. Introduction.....	108
B. Matériels et méthodes .....	108
1. Nature et préparation du milieu nutritif.....	108
2. Instruments d'analyse .....	110
3. Méthode.....	111
a. Préparation des milieux testés et prélèvements.....	111

i.	Mesure du PFAT5 et du pH .....	111
ii.	Mesure de l'osmolalité.....	113
iii.	Inspection visuelle .....	113
b.	Interprétation / analyse des résultats.....	113
C.	Résultats .....	113
D.	Discussion.....	114
<b>II.</b>	<b>Validation d'une méthode immunométrique de quantification de l'insuline humaine dans un mélange de nutrition parentérale ternaire .....</b>	<b>119</b>
A.	Introduction.....	119
B.	Matériels et méthodes.....	120
1.	Matériels.....	120
2.	Méthodes.....	120
a.	Méthodes immunométriques .....	120
i.	Principe général des méthodes immunométriques de dosage de l'insuline .....	120
ii.	Méthode chimiluminescente de quantification de l'insuline .....	122
b.	Préparation des échantillons avant analyse .....	123
c.	Essais de validation de méthode : profil d'exactitude.....	124
C.	Résultats .....	124
1.	Effet matrice .....	124
2.	Validation de la méthode de dosage.....	124
D.	Discussion.....	125
<b>III.</b>	<b>Etude de stabilité <i>in vitro</i> de l'insuline humaine dans un mélange de nutrition parentérale ternaire.....</b>	<b>127</b>
A.	Introduction.....	127
B.	Matériels et méthodes.....	127
1.	Matériels.....	127
2.	Méthodes.....	128
a.	Préparation des mélanges étudiés .....	128
b.	Protocole de prélèvement et de traitement des échantillons .....	129
c.	Analyses statistiques : étude de stabilité dans le mélange ternaire.....	130
C.	Résultats .....	130
D.	Discussion.....	131
<b>IV.</b>	<b>Etude des facteurs influençant la stabilité de l'insuline dans un mélange de nutrition parentérale ternaire.....</b>	<b>133</b>
A.	Introduction.....	133
B.	Matériels et méthodes.....	133
1.	Matériels.....	133
2.	Méthodes.....	134

3.	Etude statistique .....	138
a.	Détermination du modèle cinétique d'évolution de la concentration .....	138
b.	Analyse de la covariance pour mesurer l'impact des facteurs.....	139
C.	Résultats .....	139
1.	Détermination du modèle cinétique d'évolution de la concentration.....	140
2.	Analyse de la covariance pour mesurer l'impact des facteurs.....	140
3.	Etude de l'influence du pH dans les compartiments séparés et le mélange binaire .....	141
4.	Etude de l'influence d'une étape de pré-conditionnement des contenants.....	143
5.	Etude de l'influence d'une étape de conditionnement des contenants.....	143
6.	Influence du zinc.....	144
7.	Influence de la nature et la concentration des lipides.....	144
D.	Discussion.....	145
<b>V.</b>	<b>Glycation de l'insuline dans un mélange de nutrition parentérale binaire .....</b>	<b>151</b>
A.	Introduction.....	151
B.	Optimisation et validation d'une méthode HPLC-MS/MS pour la quantification de l'insuline et l'identification d'insuline glyquée .....	152
1.	Matériels et méthodes.....	152
a.	Réactifs et solvants.....	152
i.	Produits commerciaux.....	152
ii.	Glycation de l'insuline : préparation .....	155
b.	Méthodes .....	155
i.	Préparation des solutions d'insuline et d'étalon interne utilisées au cours de l'optimisation de la méthode.....	155
ii.	Instrumentation et conditions opératoires.....	156
iii.	Validation de la méthode HPLC-MS/MS.....	159
(a)	Quantification de l'insuline .....	159
(i)	Préparation des solutions standards de calibration et de validation .....	159
(ii)	Méthode de validation.....	160
(b)	Identification d'une forme glyquée de l'insuline .....	161
2.	Résultats et discussion .....	161
a.	Optimisation des conditions opératoires pour le dosage de l'insuline native .....	161
i.	Paramètres du spectromètre de masse pour la détection de l'insuline et des étalons internes potentiels en introduction directe.....	162
(a)	Sélection des ions précurseurs .....	162
(b)	Choix des transitions ion précurseur / ion fils.....	165
ii.	Paramètres de séparation.....	167
(a)	Conditions d'élution .....	168
(b)	Etalon interne .....	169
b.	Détection de l'insuline glyquée.....	170

i.	Paramètres du spectromètre de masse pour la détection de l'insuline glyquée.....	170
(a)	Sélection des ions précurseurs.....	171
(b)	Choix des transitions ion précurseur / ion fils.....	172
ii.	Paramètres de séparation.....	172
(a)	Conditions d'élution.....	172
(b)	Contrôle de la suppression ionique.....	173
c.	Optimisation de la composition du diluant pour la préparation des solutions standards et des échantillons à analyser.....	173
i.	Etude de la stabilité de l'insuline dans différents diluants.....	173
d.	Validation de la méthode HPLC-MS/MS – dosage de l'insuline native.....	177
i.	Dosage de l'insuline.....	177
(a)	Spécificité.....	177
(b)	Erreur de prédiction de la méthode.....	179
(c)	Linéarité.....	180
(d)	Exactitude : justesse et fidélité.....	181
e.	Mise en évidence de l'insuline glyquée.....	182
C.	Etude de stabilité de l'Umuline® en présence de glucose.....	184
1.	Introduction.....	184
2.	Matériels et méthodes.....	184
a.	Réactifs et solvants.....	184
b.	Instrumentation et conditions d'analyse.....	185
c.	Protocole expérimental d'étude de la stabilité de l'insuline.....	185
i.	Préparation des milieux nutritifs nécessaires à l'étude.....	185
ii.	Protocole d'étude de la stabilité de l'insuline.....	186
iii.	Protocole d'analyse des échantillons issus de l'étude de stabilité.....	187
iv.	Exploitation des résultats.....	187
3.	Résultats et discussion.....	188
a.	Etude de la stabilité de l'Umuline® dans un mélange binaire Olimel® (pH 6,3) : impact des conditions de dilution des échantillons.....	188
i.	Profil de stabilité après dilution par une solution <b>avec acide formique</b> (pH = 2,70)..	188
(a)	Suivi de l'Umuline®.....	188
(b)	Suivi de l'insuline glyquée par HPLC-MS/MS.....	189
ii.	Profil de stabilité après dilution <b>par une solution de pH neutre</b> (pH = 7,35).....	190
b.	Etude de l'influence du pH du milieu nutritif sur la stabilité de l'insuline.....	193
c.	Influence de la présence d'acides aminés dans le milieu nutritif.....	194
D.	Etude de la stabilité de l'insuline glyquée selon le pH - Réversibilité.....	196
1.	Introduction.....	196
2.	Matériels et méthodes.....	197
a.	Milieu nutritif et concentration en insuline.....	197

b. Mode opératoire.....	197
3. Résultats.....	197
4. Discussion.....	199
E. Discussion et perspectives .....	208
<b>VI. Etude <i>in vivo</i> de l'activité hypoglycémiante de l'insuline après ajout dans un mélange de nutrition parentérale ternaire .....</b>	<b>209</b>
A. Introduction.....	209
B. Matériels et méthodes.....	210
1. Procédure expérimentale .....	210
2. Mélange de nutrition parentérale et insuline.....	212
3. Animaux.....	212
4. Montage de perfusion.....	212
5. Paramètres évalués au cours de la procédure.....	213
a. Dosage de la glycémie .....	213
b. Dosage de l'insulinémie .....	214
i. Essais préliminaires.....	214
ii. Dosage de l'insulinémie pour la procédure.....	215
6. Prélèvements et traitement pré-analytique .....	215
7. Exploitation des résultats .....	216
C. Résultats .....	217
1. Résultats des essais préliminaires .....	217
2. Protocole 1 .....	219
a. Représentation graphique .....	219
b. Simulation de la relation entre insulinémie et glycémie .....	220
i. Comparaison des Cm .....	221
ii. Comparaison des Gly <sub>50</sub> .....	221
3. Protocole 2 .....	222
D. Discussion.....	223
<b>Conclusions et perspectives.....</b>	<b>229</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>231</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>258</b>

## Liste des abréviations

---

AA	Acides aminés
ACN	Acétonitrile
Ac	Anticorps
Ag	Antigène
AG	Acide gras
ANCOVA	Analyse de covariance
ASPEN	<i>American society of parenteral and enteral nutrition</i>
CAN	<i>Critical aggregation number</i>
CHU	Centre hospitalier universitaire
DEHP	Di-ethyl-hexyl-phthlate
EC	Energie de collision
EI	Etalon interne
ESPEN	<i>European society of parenteral and enteral nutrition</i>
ET	Éléments-trace
EVA	Ethylène acétate de vinyle
GLIM	<i>Global leadership initiative on malnutrition</i>
HAS	Haute autorité de santé
HPLC	Chromatographie liquide haute performance
IECL	Immunoélectrochimiluminescence
IMC	Indice de masse corporelle
IRMA	<i>Immunoradiometric assay</i>
IV	Intraveineuse
MDA	Malondialdéhyde
MNA-SF	<i>Mini nutritional assessment- short form</i>
MNP	Mélange de nutrition parentérale
MRM	<i>Multiple reaction monitoring</i>
MS	Spectrométrie de masse
MUST	<i>Malnutrition universal screening tool</i>
NE	Nutrition entérale
NP	Nutrition parentérale

NPAD	Nutrition parentérale à domicile
NRS	<i>Nutritional risk screening</i>
PE	Polyéthylène
PFAT5	Proportion de globules de taille > 5 µm
pH	Potentiel d'hydrogène
PNNS	Programme national nutrition santé
PTFE	Polytétrafluoroéthylène
PVC	Polychlorure de vinyle
RCP	Résumé des caractéristiques du produit
RIA	Radioimmuno assay
SAB	Sérum albumine bovine
SAB <sub>P</sub>	Sérum albumine bovine en solution dans du tampon phosphate
SFNCM	Société francophone nutrition clinique et métabolisme
SFNEP	Société francophone de nutrition entérale et parentérale
SI	Soins intensifs
TCL	Triglycérides à chaîne longue
TCM	Triglycérides à chaîne moyenne
TG	Triglycérides
t <sub>R</sub>	Temps de rétention
USP	<i>United States Pharmacopeia</i> (Pharmacopée Américaine)
UV	Ultraviolet
Vit	Vitamines
Zn	Zinc

## Liste des figures

---

Figure 1 : Arbre décisionnel du soin nutritionnel [38] .....	29
Figure 2 : Poche tri compartimentée dun MNP industriel ternaire avant reconstitution	33
Figure 3 : Exemple de poche de nutrition "à la carte" avant reconstitution.....	34
Figure 4 : Principales fonctions des éléments-trace [56].....	39
Figure 5 : Orientation de la lécithine à la surface des globules huileux après émulsification (d'après [99]).....	46
Figure 6 : Phases d'instabilité d'une émulsion (d'après [102]).....	49
Figure 7 : Phénomènes physiques survenant avec les films plastiques .....	53
Figure 8 : Cristaux de précipité phosphocalcique isolés d'un MNP. L'image représente des cristaux observés par microscopie à lumière polarisée [112] .....	55
Figure 10 : Perfusion concomitante d'un médicament et d'un MNP <i>via</i> un montage en Y [174] .....	62
Figure 11 : Ajout direct de médicament dans une poche de MNP [174] .....	62
Figure 12 : Relation entre mortalité et glycémie chez les patients de soins intensifs [211] .....	85
Figure 13 : Mélange nutritif de référence supplémenté en vitamines et éléments-trace .....	109
Figure 14 : Montage de perfusion utilisé lors de l'étude de stabilité de l'émulsion. La flèche pointe le site d'injection de la poche de NP, l'accolade souligne la tubulure de perfusion et le cadre indique le filtre. ....	112
Figure 15 : Principe général du dosage immunométrique de l'insuline.....	121
Figure 16 : Reconnaissance de l'insuline par le couple d'Ac du kit « Elecsys Insulin »..	122
Figure 17 : Principe du dosage par IECL de l'insuline .....	123
Figure 18 : Profil d'exactitude obtenu avec la méthode Elecsys de quantification d'Umuline rapide® (diluant SAB <sub>P</sub> 40 g/L).....	125
Figure 19 : Protocole de préparation des fioles en verre et poches EVA pour l'étude de stabilité.....	129
Figure 20 : Evolution sur 24 heures de la teneur en Umuline rapide® par rapport à la concentration initiale dans des fioles en verre et dans des poches en EVA.....	131

Figure 22 : Coefficients des variables prises en considération dans l'ANCOVA selon le modèle cinétique d'ordre 2 .....	141
Figure 23 : Evolution de la concentration résiduelle en insuline sur 24 heures en fonction du milieu nutritif étudié et du niveau de pH. Les courbes en trait plein correspondent au niveau de pH bas (3,6) tandis que le niveau de pH élevé (6,3) est représenté en traits pointillés.....	142
Figure 24 : Stabilité de l'insuline dans le MNP ternaire : contenant ayant subi 72 heures de pré-conditionnement.....	143
Figure 25 : Stabilité de l'insuline dans le MNP ternaire avec conditionnement .....	143
Figure 26 : Evolution de la concentration résiduelle en insuline en présence ou absence de supplémentation en zinc dans le mélange nutritif.....	144
Figure 27 : Evolution de la concentration en insuline selon la nature et la concentration de l'émulsion lipidique .....	145
Figure 28 : Représentation schématique de la réaction de glycation d'une protéine ....	151
Figure 29 : Séquences peptidiques de l'insuline humaine (a), de la chaîne B de l'insuline bovine (b) et de l'insuline détémir (c).....	154
Figure 30: Gradient d'élution pour le dosage de l'insuline.....	157
Figure 31 : Spectre de masse en mode «full scan» ESI positif de l'insuline humaine-std ( $m_1$ et $m_2$ sont les rapports masse/charge respectifs des ions de charges $n_1$ et $n_2$ ). .....	163
Figure 32 : Ion immonium de la TyrB26 .....	165
Figure 33 : Spectre de masse de l'ion précurseur $m/z = 968,8$ Da/UC de l'insuline en mode « Product Ion Scan ».....	166
Figure 34 : Chromatogrammes de (a) l'insuline humaine-std, (b) la chaîne B de l'insuline bovine et (c) de la Levemir® à 0,40 mg/L dans les conditions optimisées.....	170
Figure 35 : Chromatogrammes d'une solution d'insuline glyquée.....	172
Figure 36 : Evolution du rapport $A_{insuline}/A_{EI}$ en fonction du temps (4 analyses successives du même échantillon).....	174
Figure 38 : Chromatogramme en mode « full scan » (700-1250 Da) d'une solution de SAB à 0,3% dans ACN/H <sub>2</sub> O-20/80 (v/v) à 0,1% en acide formique.....	175
Figure 38 : Chromatogrammes en mode MRM de l'insuline humaine-std et de la chaîne B de l'insuline bovine à 0,40 mg/L en solution dans le mélange ACN/H <sub>2</sub> O-20/80 (v/v)à 0,1% en acide formique enrichi en SAB 0,3%.....	176

Figure 39 : Spécificité de la méthode d'analyse en mode MRM.....	178
Figure 40 : Profil d'exactitude de l'insuline en HPLC-MS/MS.....	182
Figure 41 : Spécificité de la méthode d'analyse en mode MRM pour la détection de l'insuline monoglyquée : chromatogramme du :.....	183
Figure 42 : Evolution du ratio $C_t/C_0$ en insuline dans le mélange binaire Olimel® à pH 6,3 (milieu 1; n = 3) : dosage par HPLC-MS/MS ou IECL.....	189
Figure 43 : Evolution du rapport $A_{\text{soluté d'intérêt}}/A_{\text{EI}}$ pour les pics caractéristiques de l'insuline et de l'insuline glyquée dans le milieu binaire à base de glucose provenant d'une poche d'Olimel®, pH 6,3 (milieu 1 ; n = 3) : analyse par HPLC-MS/MS aux transitions des analytes considérés.....	190
Figure 44 : Evolution du ratio $C_t/C_0$ en insuline dans le mélange binaire Olimel® à pH 6,3 (milieu 1 ; n = 3) : dosage pas HPLC-MS/MS ou par IECL.....	191
Figure 45 : Evolution du rapport $A_{\text{soluté d'intérêt}}/A_{\text{EI}}$ pour l'insuline et les deux pics Ins-gly P1 et Ins-gly P2, caractéristiques de l'insuline glyquée dans le milieu binaire Olimel® à pH 6,3 (milieu 1 ; n = 3) : analyse par HPLC-MS/MS.....	192
Figure 46 : Evolution du ratio $C_t/C_0$ en insuline dans le mélange binaire Olimel® à pH 3,6 (milieu 2) et 6,3 (milieu 1) : analyse par HPLC-MS/MS.....	193
Figure 47 : Evolution du ratio $C_t/C_0$ en insuline dans le mélange binaire Olimel® (milieu 1) et dans la solution de glucose Olimel® à 17,5% (milieu 3) à pH 6,3 : analyse par HPLC-MS/MS. ....	194
Figure 48 : Evolution du rapport $A_{\text{soluté d'intérêt}}/A_{\text{EI}}$ pour l'insuline et les deux pics Ins-gly P1 et Ins-gly P2, caractéristiques de l'insuline glyquée dans (a) le milieu binaire Olimel® (milieu 1) et (b) la solution de glucose Olimel® à 17,5% (milieu 3) à pH 6,3 : analyse par HPLC-MS/MS. ....	195
Figure 49 : Evolution du rapport $A_{\text{soluté d'intérêt}}/A_{\text{EI}}$ pour l'insuline et les deux pics Ins-gly P1 et Ins-gly P2 (caractéristiques de l'insuline glyquée) à une concentration d'Umuline® de 35 mg/L; pH du milieu de glycation = 6,3 (n=1).....	198
Figure 50 : Evolution du rapport $A_{\text{soluté d'intérêt}}/A_{\text{EI}}$ pour l'insuline et les deux pics Ins-gly P1 et Ins-gly P2 (caractéristiques de l'insuline glyquée) à une concentration d'Umuline® de 35 mg/L ; pH du milieu de glycation = 6,3 (n=1).....	198
Figure 51 : Etapes de la réaction de glycation de l'insuline .....	201
Figure 52 : Réaction de glycation de l'insuline en conditions réductrices ( $\text{NaBH}_3\text{CN}$ ) et non réductrices.....	202

Figure 53 : Séquences peptidiques de l'insuline humaine (a) et de l'insuline bovine (b)	204
.....	
Figure 54 : Description de la procédure d'expérimentation animale.....	210
Figure 55 : Montage de perfusion pour l'administration du MNP dans les essais chez l'animal.....	213
Figure 56 : Principe du dosage de la glycémie selon la technique à l'hexokinase.....	214
Figure 57 : Cinétique d'évolution de la glycémie (dosage par la méthode à l'hexokinase) au cours de la perfusion dans le protocole 1 .....	219
Figure 58 : Cinétique d'évolution de l'insulinémie de lapin calculée selon la formule (insulinémie IRMA – insulinémie IECL) au cours de la perfusion dans le protocole 1 .....	220
.....	
Figure 59 : Quantification de l'insuline humaine par IECL pour les parties 2 et 3 du protocole 2. Représentation de la concentration calculée correspondant à 60% de l'insulinémie humaine de la partie 2.....	222

## Liste des tableaux

---

Tableau I : Composition des émulsions lipidiques [9].....	31
Tableau II : Nutriments entrant de manière obligatoire ou facultative dans la composition des MNP en fonction de leur origine .....	36
Tableau III : Electrolytes et leur principale fonction physiologique .....	38
Tableau IV : Répartition des vitamines selon leur solubilité et leur fonction.....	42
Tableau V : Classification des réactions physico-chimiques d'instabilité des éléments entrant dans la composition d'un mélange de NP.....	45
Tableau VI : Etudes de compatibilité / stabilité physique entre médicaments et MNP....	67
Tableau VII : Etudes de stabilité de médicaments dans les MNP.....	71
Tableau VIII : Hyperglycémie et mortalité chez les patients recevant de la NP.....	79
Tableau IX : Recommandations des sociétés savantes pour les cibles glycémiques.....	86
Tableau X : Etudes cliniques portant sur l'utilisation d'insuline dans la prise en charge de l'hyperglycémie induite par la nutrition parentérale .....	91
Tableau XI : Etudes <i>in vitro</i> concernant la stabilité de l'insuline dans les mélanges de nutrition parentérale.....	100
Tableau XII : Valeurs de PFAT5 (n=2), pH (n = 3) et osmolalité (n = 3) obtenus au cours de l'étude de stabilité de l'émulsion de NP avec ou sans insuline (n=2). Pour le PFAT5, les valeurs sont données pour les prélèvements dans la poche et en sortie de filtre 1,2µm .....	114
Tableau XIII: Natures et concentrations des émulsions testées dans l'étude de stabilité .....	135
Tableau XIV : Synthèse des différentes conditions expérimentales et paramètres d'influence étudiés pour la stabilité de l'insuline .....	137
Tableau XV : Détail des données quantitatives et qualitatives utilisées dans l'ANCOVA .....	139
Tableau XVI : Variables retenues pour l'analyse finale par ANCOVA .....	140
Tableau XVII: Valeurs nominales de pH de chaque compartiment de la poche de NP et du mélange binaire, après supplémentation en vitamines et éléments-trace.....	142
Tableau XVIII : Paramètres de la source d'ionisation.....	158
Tableau XIX : Transitions suivies en mode MRM – ESI+.....	158
Tableau XX : Transitions obtenues en mode MRM pour l'insuline et les EI potentiels..	167

Tableau XXI : Temps de rétention des composés d'intérêt .....	168
Tableau XXII : Paramètres de validation de la méthode HPLC-MS/MS .....	180
Tableau XXIII : Milieux nutritifs utilisés pour l'étude de stabilité de l'insuline en présence de glucose.....	186
Tableau XXIV : Sites de glycation décrits pour l'insuline en fonction des conditions opératoires.....	202
Tableau XXV : Descriptif des conditions testées lors des essais préliminaires d'expérimentation animale.....	215
Tableau XXVI : Valeurs d'insulinémie de lapin obtenues dans 2 conditions d'administration du MNP, selon le kit de dosage employé (IRMA ou IECL) et calcul de la réactivité croisée de l'insuline de lapin.....	218
Tableau XXVII : Résultats des tests statistiques de comparaison des concentrations maximales en insuline de lapin par un test de Mann et Whitney au risque $\alpha = 10\%$ .....	221
Tableau XXVIII : Comparaison des Gly <sub>50</sub> selon le test de Mann et Whitney au risque $\alpha =$ 10%.....	222

## Introduction

---

La prévalence de la dénutrition en milieu hospitalier peut atteindre 50% selon les paramètres et les seuils de dépistage choisis. Des travaux ont montré que la dénutrition allongeait la durée de séjour, augmentait le risque de complications médicales ainsi que la morbidité et la mortalité. Pour cette raison, la prise en charge de la dénutrition fait l'objet d'une politique de santé publique, basée à la fois sur la prévention mais également sur la correction de la dénutrition.

La nutrition artificielle fait partie de la stratégie de prise en charge de la dénutrition. Elle est basée sur 2 modes de nutrition : entérale ou parentérale. La nutrition parentérale (NP) constitue le dernier recours en raison des nombreux effets indésirables que son utilisation comporte (*i.e.* risque infectieux, complications techniques, complications métaboliques et nutritionnelles). L'apport massif de glucose provenant de la NP est susceptible de provoquer des hyperglycémies chez des patients, même non diabétiques, en particulier ceux hospitalisés en unités de soins intensifs. Les hyperglycémies étant possiblement délétères (augmentation de la survenue d'infections,...), il peut donc apparaître indispensable de les prendre en charge, en administrant de l'insuline conjointement à la NP par exemple.

L'une des méthodes employées consiste à ajouter l'insuline directement dans le mélange de NP. Cependant, selon les recommandations des sociétés savantes européenne et américaine de nutrition entérale et parentérale (respectivement ESPEN et ASPEN), cette démarche n'est possible que si les stabilités à la fois de l'insuline et du mélange de NP ont été préalablement démontrées.

L'objectif de ce mémoire est de décrire les travaux de recherche visant à établir un profil de stabilité de dérivés de l'insuline humaine dans les mélanges de nutrition parentérale. La partie introductive décrit les modalités de recours à la nutrition parentérale en médecine : les indications, les effets indésirables et les problèmes de stabilité physicochimique réciproque relatifs à l'introduction des médicaments injectables dans les mélanges de NP (MNP).

La partie expérimentale a consisté dans un premier temps à évaluer la stabilité de l'émulsion lipidique que constitue un MNP industriel ternaire. Dans un second temps, nous avons procédé à la validation d'une méthode de quantification de l'insuline humaine dans le milieu lipidique complexe. Cette méthode a ensuite été employée afin d'effectuer une étude de stabilité physicochimique de l'insuline dans ce milieu.

A l'issue de cette étude de stabilité de l'insuline menée dans le MNP ternaire, la stabilité de la protéine a été de nouveau investiguée en faisant varier différents paramètres (nature et paramètres physico-chimiques du milieu, ajouts exogènes...). Les résultats obtenus lors de ces études complémentaires ont été approfondis à l'aide d'une méthode analytique de type chromatographie liquide haute performance couplée à de la spectrométrie de masse en tandem.

Enfin une étude a été menée *in vivo* chez l'animal pour évaluer les impacts de l'ajout de l'insuline dans le MNP sur l'activité biologique de l'insuline.

La synthèse des résultats de ces différents travaux a permis d'aboutir à l'émission de recommandations concernant le mode d'administration de l'insuline avec les MNP ternaires.

# Présentation du contexte

---

## I. La dénutrition

### A. Définition

En 2003, l'Agence Nationale d'Accréditation et d'Evaluation en Santé (ANAES), qui deviendra en 2005 la Haute Autorité de Santé (HAS), définissait la dénutrition dans son rapport intitulé « évaluation diagnostique de la dénutrition protéino-énergétique des adultes hospitalisés » comme suit : « *la dénutrition protéino-énergétique résulte d'un déséquilibre entre les apports et les besoins protéino-énergétiques de l'organisme. Ce déséquilibre entraîne des pertes tissulaires ayant des conséquences fonctionnelles délétères. Il s'agit d'une perte tissulaire involontaire* » [1].

Dans le cadre de ces travaux, nous nous concentrerons sur la dénutrition et sa prise en charge.

Le 1er avril 2016, l'Assemblée générale des Nations Unies a proclamé 2016 – 2025 décennie d'action des Nations Unies pour la nutrition. A l'échelle nationale, la dénutrition fait partie des enjeux majeurs de santé publique puisqu'elle s'inscrit depuis 2001 dans le cadre d'un Programme National Nutrition Santé (PNNS). Cette dernière comprend parmi ses objectifs, celui de dépister, diagnostiquer et prendre en charge les patients souffrant de pathologies nutritionnelles.

C'est à l'issue du PNNS2 (2006-2010), que la Société Francophone de Nutrition Entérale et Parentérale (SFNEP) devenue depuis Société Francophone Nutrition Clinique et Métabolisme (SFNCM), a élaboré une brochure intitulée « Dénutrition, une pathologie méconnue en société d'abondance ». En effet, bien qu'obésité et dénutrition soient distinguées dans la définition de la malnutrition, elles peuvent parfois être concomitantes [2,3].

La dénutrition se définit comme un état pathologique résultant d'apports nutritionnels insuffisants en regard des dépenses énergétiques de l'organisme et peut être qualifiée de malnutrition lorsque les apports sont inadaptés en plus d'être insuffisants.

L'étude internationale nutritionDay menée depuis 2011 par la Société Européenne de Nutrition Entérale et Parentérale (ESPEN), regroupe jusqu'à 7000 établissements de

santé dans 64 pays. L'objectif de cette étude est d'améliorer les connaissances et la prise en compte de la dénutrition et d'en limiter la survenue dans les établissements de santé, notamment en améliorant la qualité des soins nutritionnels [4].

## **B. Causes, prévalence et conséquences de la dénutrition**

La dénutrition peut résulter de plusieurs situations endogènes ou exogènes. La dénutrition endogène est d'origine pathologique (ex : liée à des cancers, des défaillances d'organe chroniques ou sévères, des pathologies liées à l'âge – démence, problèmes bucco-dentaires...). La dénutrition exogène est en revanche liée à un contexte social entraînant une diminution des apports alimentaires. C'est notamment le cas chez les personnes âgées isolées, en perte d'autonomie qui ne bénéficient pas d'une aide.

Des apports nutritionnels adaptés sont nécessaires pour maintenir un bon état de santé et prévenir certaines maladies chroniques (ex : maladies cardiovasculaires, diabète de type 2, ostéoporose...). Certaines études ont montré que la dénutrition était associée à une augmentation de la mortalité, en ville comme à l'hôpital, chez le patient âgé et chez l'adulte [5-7], mais les données de prévalence dépendent des critères de définition sélectionnés ainsi que des seuils retenus [1,8].

La prévalence de la dénutrition en milieu hospitalier a très largement été étudiée au cours des dernières décennies : elle atteint 40 à 60% des patients hospitalisés, dont 30 à 40% des patients adultes à leur admission à l'hôpital, 10-15% chez l'enfant [9] et jusque 50% chez les patients hospitalisés dans le cadre d'une prise en charge chirurgicale gastro-intestinale [10].

Concernant les patients hospitalisés, la dénutrition a une origine multifactorielle mettant en cause l'hospitalisation en elle-même (modification des horaires des repas, mauvaise qualité gustative des plateaux repas) mais aussi des facteurs de risque liés au patient. En conséquence, la dénutrition en milieu hospitalier peut constituer un état pathologique quelle que soit la typologie des services de soins (soins intensifs [11], chirurgie [10,12], unités de médecine [13]). Il peut en résulter des conséquences cliniques délétères, une augmentation des complications (notamment des complications post opératoires graves, septiques [14] ou non survenant en chirurgie générale [15]), un

allongement de la durée de séjour [16], une augmentation de la morbidité et de la mortalité [11–13,17] et une diminution de la qualité de vie.

En situation préopératoire, 40% des patients sont à risque nutritionnel. Il existe une corrélation entre dénutrition préopératoire d'une part et morbidité et mortalité post opératoires d'autre part [18,19]. Des études cliniques ont porté sur l'utilisation d'indicateurs nutritionnels pour prédire la durée d'hospitalisation, et la probabilité de ré hospitalisation dans les 30 jours suivant la sortie [20]. Cette démarche a ensuite amené à rendre systématique le dépistage nutritionnel préopératoire et la prise en charge nutritionnelle, notamment en périopératoire [21,22] ou en gériatrie [23]. Cependant, pour le moment cela n'a montré qu'un léger effet dans les populations de patients de médecine [24], portant uniquement sur la durée de séjour mais pas sur la mortalité [25].

Enfin, la dénutrition peut également impacter des fonctions physiologiques, entraînant par exemple une dysfonction immunitaire [26,27]. Cette dernière est d'autant plus importante que la dénutrition est profonde. Elle est principalement due à une dénutrition protéino-énergétique s'accompagnant fréquemment d'une carence en vitamines et minéraux, ces deux caractéristiques ayant pour effet de diminuer la prolifération cellulaire, en particulier la fonction lymphocytaire [28–32]. Cette relation entre dénutrition protéino-énergétique et immunodéficience est particulièrement marquée chez les personnes âgées fragiles [33].

### **C. Dépistage et diagnostic**

Comme décrit précédemment, la dénutrition à l'hôpital ou en milieu institutionnel est un facteur aggravant la morbidité et la mortalité. Dans ce cadre, elle est susceptible d'augmenter les dépenses de santé. Dès lors un dépistage semble indispensable. L'Organisation Mondiale de la Santé a émis en 1968 des principes afin d'aider à la décision de démarche de dépistage [34].

Le dépistage repose sur différents outils décrits dans les recommandations élaborées par le GLIM (*Global Leadership Initiative on Malnutrition*, affilié à l'American Society of Parenteral and Enteral Nutrition (ASPEN))[35] ou l'European Society of Parenteral and

Enteral Nutrition (ESPEN) [36,37]. Les outils de dépistage les plus employés sont le Nutritional Risk Screening 2002 (NRS2002), le Malnutrition Universal Screening Tool (MUST), le Mini Nutritional Assessment – Short Form (MNA-SF). Ils reposent sur des paramètres tels que la perte de poids, l'indice de masse corporelle (IMC), les difficultés d'alimentation. L'ESPEN recommande le MUST, puisqu'il a démontré une sensibilité et une spécificité supérieures au NRS 2002 [36].

En cas de diagnostic, l'ESPEN recommande d'utiliser les paramètres suivants : l'Indice de Masse Corporelle, la circonférence brachiale, la composition corporelle (masse maigre et masse grasse), la perte de poids, l'anorexie, la réduction d'apport alimentaire, des indicateurs biochimiques (concentration en albumine sérique, paramètres de l'inflammation) ainsi que l'évaluation subjective du professionnel de santé effectuant le diagnostic [37]. L'une des alternatives proposées est d'adopter les règles suivantes pour diagnostiquer la dénutrition :

- 1)  $IMC < 18,5 \text{ kg/m}^2$
- 2) Perte de poids non intentionnelle  $> 10\%$  quelle que soit la période ou  $> 5\%$  sur les 3 derniers mois

ET

- $IMC < 20 \text{ kg/m}^2$  pour les patients  $< 70$  ans ou  $IMC < 22 \text{ kg/m}^2$  pour les patients de 70 ans ou plus
- Ou un indice de masse maigre  $< 15$  ou  $17 \text{ kg/m}^2$  chez les femmes et les hommes respectivement.

#### **D. Prise en charge de la dénutrition**

La prise en charge de la dénutrition doit être organisée selon 2 grands axes : la prévention et le traitement. Cette prise en charge est globale et s'étend de l'adaptation de l'environnement encadrant les repas, à la nutrition parentérale, en passant par de l'enrichissement alimentaire.

Le choix de la stratégie de prise en charge nutritionnelle se fait en suivant les recommandations de la SFNCM (Figure 1). Elle dépend essentiellement du degré de gravité de la dénutrition et de l'état de fonctionnalité du tube digestif.

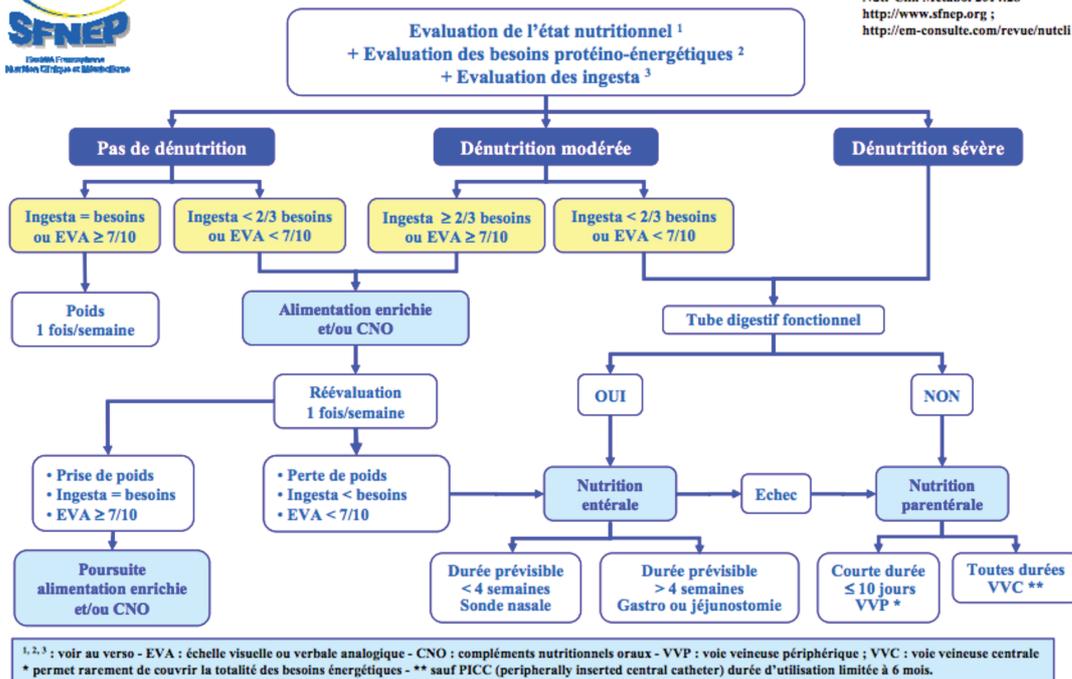


Figure 1 : Arbre décisionnel du soin nutritionnel [38]

Les principales stratégies nutritionnelles décrites sont la nutrition orale (reposant sur l'enrichissement de l'alimentation ou les compléments nutritionnels oraux), ou la nutrition artificielle (entérale ou parentérale). Seule la nutrition parentérale sera abordée dans ce manuscrit.

## II. La nutrition parentérale

### A. Généralités

Le principe de la nutrition parentérale (NP) repose sur l'administration par voie intraveineuse (IV) centrale ou périphérique de nutriments dont le glucose, les acides aminés, les lipides, les électrolytes, les vitamines et les éléments-trace. Comme précédemment illustré dans la figure 1, la nutrition parentérale n'est pas indiquée en première intention chez les patients modérément ou sévèrement dénutris. Elle est réservée aux patients pour lesquels la nutrition entérale (NE) est inefficace ou insuffisante, ainsi qu'aux patients dont le tube digestif n'est pas fonctionnel. C'est le cas notamment lors de chirurgies majeures des voies digestives hautes [38], d'une

péritonite, de l'obstruction intestinale [39] notamment mécanique due à des tumeurs malignes, d'un iléus, de l'ischémie gastro-intestinale ou encore de diarrhées et/ou vomissements incoercibles [40] et parfois dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin [41].

Dans la majorité des cas, la NP présente un caractère transitoire et un relais vers la NE doit être opéré dès que possible. Cependant, certains patients ayant des maladies entraînant des insuffisances intestinales (syndrome du grêle court, cancer, complications chirurgicales, maladies inflammatoires de l'intestin, maladies neuromusculaires,...) nécessitent une administration prolongée de NP pouvant même devenir définitive [42,43]. Dans ce dernier cas, l'administration est réalisée au domicile du patient afin de faciliter le retour à une qualité de vie acceptable [44].

## **B. Les mélanges de nutrition parentérale**

La nutrition parentérale permet d'apporter au patient dénutri les macronutriments et les micronutriments nécessaires à la restauration d'un état nutritionnel satisfaisant.

Le choix de la formulation du mélange de nutrition parentérale (MNP) est primordial puisque chaque substrat peut exercer une influence sur le pronostic du patient.

Les MNP se composent de plusieurs éléments :

- les **macronutriments** constitués
  - d'une part, par les substrats énergétiques (glucides et lipides),
  - d'autre part, par les substrats azotés (acides aminés (AA)).
- les **micronutriments** :
  - minéraux (sous forme d'électrolytes contenant sodium, potassium, calcium, magnésium, phosphate, acétate et chlorure),
  - éléments-trace,
  - vitamines.

La préparation de MNP est réalisée à partir de médicaments sources tous stériles et apyrogènes (qualité injectable).

Les macronutriments employés pour la fabrication des MNP se présentent sous la forme :

- De **solution de glucose** : afin de limiter le volume final du MNP à administrer tout en permettant un apport de glucose suffisant pour couvrir les besoins énergétiques requis, les solutions entrant dans la composition des MNP sont concentrées (de 20 à 70%). L'osmolarité étant intimement liée à la concentration en glucose, elle représente le facteur limitant lors de la fabrication et de l'administration des MNP, notamment *via* une voie veineuse périphérique.
- De **solution d'acides aminés** : de composition variables, les spécialités pharmaceutiques disponibles sur le marché présentent des concentrations finales en AA variables (principal critère de choix) fournissant une concentration azotée variable également. Ces solutions contenant *a minima* les AA essentiels ont leur composition qui permet également de les distinguer et d'orienter le choix de la solution à employer pour le MNP.
- **D'émulsion lipidique** : en leur sein, les acides gras sont présentés sous la forme de triglycérides (TG) émulsifiés par des phospholipides. Ces émulsions sont préparées à partir d'une ou plusieurs huiles de différentes origines (végétales, comme les huiles de soja ou d'olive, animales comme l'huile de poisson). Elles peuvent contenir des TG à chaîne longue (TCL) uniquement ou un mélange de TG à chaîne longue et moyenne (TCM) (l'émulsion est dans ce cas qualifiée de mixte) (Tableau I). Il existe deux concentrations d'émulsions lipidiques employées pour la fabrication des MNP (10 ou 20%), correspondant à la concentration en TG.

**Tableau I** : Composition des émulsions lipidiques [9]

100% de TCL (huile de soja)	50% de TCL (soja) et 50% de TCM	80% huile d'olive et 20% TCL (soja)	Huile de poisson
Intralipide®	Médialipide® Lipofundin®	ClinOléic®	Omegaven®: 100% Smoflipid®: 15% poisson, 30% soja, 30% TCM, 25% olive

TCL : Triglycérides à chaîne longue; TCM : Triglycérides à chaîne moyenne

A partir de ces macronutriments de base, les MNP peuvent avoir une composition finale différente, définissant ainsi :

- les **mélanges binaires** correspondant à un mélange de solutions de glucose et d'acides aminés. Ces mélanges sont donc des solutions.
- les **mélanges ternaires** correspondant à un mélange binaire auquel est ajoutée une émulsion lipidique. Les mélanges obtenus sont par conséquent des émulsions.

A ces mélanges de macronutriments, il est nécessaire d'ajouter des micronutriments (vitamines, éléments-trace ± électrolytes), à conditions que ces ajouts soient réalisés dans des conditions aseptiques (ceci permettant de maintenir la stérilité du MNP afin de limiter le risque infectieux). Ces ajouts seront détaillés dans le paragraphe suivant.

En parallèle du caractère binaire ou ternaire (se référant à la composition en macronutriments d'un MNP), il est possible de définir deux grandes catégories de MNP :

- Les mélanges de composition standardisée (dont la composition est fixe) comprenant
  - les MNP industriels (spécialités pharmaceutiques présentant des formules très variées selon les références et les fournisseurs),
  - les préparations hospitalières standards, développées dans un établissement de soins donné.
- Les MNP « à la carte » qui sont des médicaments ayant le statut de préparation magistrale ou extemporanée, prescrits et préparés pour un patient déterminé dans un contexte clinique et/ou métabolique particulier, lorsque les MNP industriels ou standards hospitaliers sont inadaptés.

Lorsqu'il est question d'un MNP, il est nécessaire de distinguer 2 temps dans le circuit de ce médicament : la phase de stockage et la phase d'administration. En fonction du type de MNP (industriel, hospitalier ou « à la carte »), la composition au moment du stockage (présentation avant emploi) et la composition finale obtenue juste avant l'administration au patient peuvent différer ou non.

La stabilité d'un MNP dépend majoritairement de la forme galénique sous laquelle il se présente (solution ou émulsion) et donc également des nutriments mis en contact. Sachant que cette stabilité peut être remise en cause selon des mécanismes physiques

ou chimiques, elle est intimement liée à la complexité du mélange. La séparation des nutriments (principalement des macronutriments) représente par conséquent le meilleur moyen de garantir la stabilité pendant le stockage, mais elle n'est pas toujours possible selon l'origine du MNP.

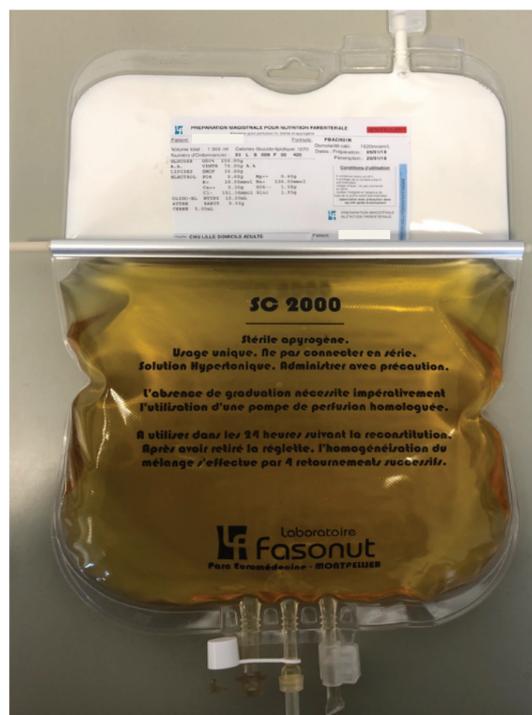
Les **MNP industriels** sont présentés avant reconstitution en poches multi compartimentées (2 ou 3 compartiments pour les mélanges binaires et ternaires respectivement). Ces poches sont généralement en éthylène-acétate de vinyle (EVA). Les différents compartiments renfermant chacun un macronutriment, sont séparés par des soudures semi-permanentes (Figure 2).



**Figure 2 :** Poche tri compartimentée dun MNP industriel ternaire avant reconstitution

Les éléments nutritifs n'étant pas en contact pendant la durée de conservation des poches, cela permet de garantir une date limite d'utilisation d'environ 18 à 24 mois. La reconstitution du MNP ainsi que sa supplémentation (en vitamines et éléments-trace) doivent être réalisées juste avant l'administration au patient. La durée de stabilité après reconstitution (dont l'étude sera décrite dans le paragraphe III de la partie expérimentale) est définie par la composition du mélange

Les **mélanges « à la carte »** sont façonnés pour répondre aux besoins d'un patient. Ils sont préparés en mettant en présence tous les macro et micronutriments nécessaires, dans une poche adaptée à la perfusion puis sont ensuite administrés sans aucun ajout. Cependant pour la population de patients bénéficiant d'une nutrition parentérale à domicile (NPAD), des mélanges ternaires (émulsions) sont façonnés un jour donné pour couvrir les besoins en MNP correspondant à une semaine (jusqu'à 7 poches), avec une durée de stabilité d'environ 7 jours. C'est cette période de stabilité restreinte à une semaine qui impose une fréquence hebdomadaire de préparation. Afin d'améliorer la stabilité des MNP « à la carte » destinés aux patients de NPAD, les MNP peuvent alors être préparés dans des poches divisées en 2 compartiments séparés : l'un contenant l'émulsion lipidique seule, l'autre contenant tous les autres nutriments (solutions de glucose, d'acides aminés, vitamines, éléments-trace) (Figure 3).



**Figure 3** : Exemple de poche de nutrition "à la carte" avant reconstitution

Ces MNP sont conservés entre 2 et +8°C. Au moment de l'administration, le mélange ternaire est reconstitué en ôtant la baguette, permettant ainsi de réunir les deux compartiments.

Les **MNP standards hospitaliers** qui ont une durée de stabilité plus longue que les MNP « à la carte » destinés aux patients de NPAD précédemment cités, sont destinés à être façonnés puis stockés à une température entre +2 et +8°C. Les émulsions étant par définition moins stables, ces MNP standards hospitaliers sont uniquement des mélanges binaires. Lorsqu'un apport lipidique est nécessaire (notamment en néonatalogie), il est possible d'administrer ce mélange binaire et d'apporter l'émulsion lipidique via un montage de perfusion dit « en Y » [45,46] (ce type de montage sera détaillé dans un paragraphe ultérieur) mais il est susceptible de comporter un risque infectieux plus important que l'administration d'un mélange 3 en 1 (autrement dit, un mélange ternaire), puisqu'il entraîne un nombre de manipulations de la ligne de perfusion plus élevé. Une étude ayant comparé les 2 modalités d'administration n'a cependant pas retrouvé de différence dans l'incidence des infections, ni dans les souches infectieuses incriminées [47].

Les paramètres d'une étude de stabilité d'un MNP doivent être adaptés aux conditions réelles de stockage et/ou d'utilisation (étude avant ou après reconstitution, durée, nature du MNP, volume et matériau du conditionnement...)

Le [Tableau II](#) récapitule les nutriments présents de manière obligatoire ou facultative dans les MNP selon leur origine (industrielle, hospitalière ou « à la carte ») après reconstitution.

**Tableau II:** Nutriments entrant de manière obligatoire ou facultative dans la composition des MNP en fonction de leur origine

Provenance	Type	Glucose	Acides aminés	Lipides	Electrolytes	Vitamines	Éléments-trace	Forme galénique après reconstitution
MNP industriels	Binaire	X	X	O	±	A	±/A	Solution
	Ternaire	X	X	X	±	A	A	Emulsion
MNP standards hospitaliers	Binaire	X	X	O	X	±	±	Solution
	Binaire	X	X	O	X	X	X	Solution
MNP « à la carte »	Ternaire	X	X	X	X	X	X	Emulsion

X : présence obligatoire

O : absence

± : présence facultative selon la formule choisie

A : ajout extemporané

Une revue de la littérature menée par l'ASPEN [48] encourage, d'après des critères étudiés (taux d'infection, coût, paramètres cliniques), à privilégier l'emploi de mélanges industriels. Une autre revue de la littérature menée spécifiquement dans la population néonatale sur l'emploi de ce type de mélange (avec des poches prêtes à l'emploi) confirme une diminution du risque d'infection, un apport nutritionnel adapté dans des conditions simples d'utilisation, une diminution des coûts et des erreurs de prescription [49].

Le choix du type de mélange (et par conséquent de sa composition) doit reposer en priorité sur des facteurs relatifs au patient en premier lieu (besoin nutritionnels, type de nutrition associée ou non), mais également organisationnels. Ainsi, d'autres paramètres notamment les conditions d'administration ainsi que les notions de stabilité et de compatibilité qui seront détaillées dans les paragraphes suivants, doivent obligatoirement être pris en compte dans ce choix.

### **C. Modalités d'administration de la nutrition parentérale**

Selon les services cliniques et les circonstances, il est possible de trouver deux types de schémas d'administration des MNP :

- en continu : le contenu de la poche est perfusé sur 24 heures,
- selon une rythmicité cyclique : cette seconde méthode présente l'avantage de limiter la durée de perfusion du MNP sur la période nocturne. La perfusion dure alors entre 10 et 16 heures. Ce schéma cyclique permet au patient de conserver son autonomie dans la journée (améliorant ainsi sa qualité de vie), tout en assurant une meilleure efficacité nutritionnelle. L'administration cyclique est particulièrement employée pour les patients bénéficiant d'une NPAD.

D'autre part, les MNP peuvent être administrés :

- selon une perfusion par gravité (méthode réservée à l'adulte en milieu hospitalier),
- ou à l'aide d'une pompe péristaltique. Cette méthode qui assure un débit programmable et constant doit être privilégiée. De plus, les pompes de NP possèdent des alarmes qui permettent de signaler au soignant en milieu

hospitalier ou au patient à son domicile, la présence de bulles d'air (pouvant provoquer une embolie gazeuse) ou une obturation de la tubulure, améliorant la sécurité d'administration des MNP. L'utilisation d'une pompe est obligatoire pour les patients de NPAD.

#### D. Supplémentation de la nutrition parentérale

Les minéraux (électrolytes et éléments-trace) sont normalement apportés par une ration alimentaire quotidienne équilibrée. Leurs concentrations dans l'organisme sont principalement régulées par la sécrétion rénale qui équilibre le ratio entrées/sorties.

Les patients bénéficiant de NP présentent parfois des pertes anormales (d'origine digestive ou cutanée par exemple) et leur équilibre métabolique et hormonal est souvent modifié.

##### 1. Electrolytes

A partir de dosages plasmatiques simples, il est facile d'ajuster les apports journaliers en électrolytes. Cette supplémentation est importante, car les carences peuvent avoir de lourdes conséquences (Tableau III).

**Tableau III** : Electrolytes et leur principale fonction physiologique

Electrolyte	Nature	Principale fonction physiologique
Sodium	Principal cation extracellulaire	Conditionne la volémie
Potassium	Principal cation intracellulaire	Gradient électrochimique transmembranaire
Chlorure	Anion extracellulaire majeur	Associé au sodium
Magnésium	Cation intracellulaire	Minéralisation osseuse, métabolisme des sucres
Phosphore		Minéralisation osseuse, équilibre acido-basique
Calcium		Rôle prépondérant dans l'excitabilité des membranes

Certains MNP contiennent déjà des électrolytes (qu'il s'agisse de mélanges industriels ou façonnés) mais lorsque les besoins en électrolytes sont supérieurs à la normale ou qu'un déficit est constaté au décours d'un dosage plasmatique, il est possible dans une certaine mesure de rajouter des électrolytes dans le MNP avant son administration. Lors de cette démarche, il est indispensable de prendre plusieurs précautions : prendre en compte les apports électrolytiques provenant d'autres sources que la NP (certains médicaments injectables contiennent du sodium ou d'autres électrolytes en grande quantité), respecter les indications contenues dans les notices des fabricants sur l'ajout d'électrolytes dans les mélanges industriels, respecter les instructions de façonnage [50] et les sels de calcium employés lors de la préparation aseptique [51,52], afin de limiter la survenue de précipités phosphocalciques pouvant être délétères s'ils sont administrés au patient. En effet, ces derniers peuvent être visibles à l'œil nu (notamment dans les mélanges binaires) dans ce cas ils entraînent un risque d'obstruction des cathéters d'administration, mais d'autres sont invisibles et comportent un risque embolique non négligeable [53,54].

## 2. Éléments-trace

Les éléments-trace (également appelés oligoéléments) interviennent dans les fonctions physiologiques et biologiques de l'organisme (Figure 4), telles que l'immunité les fonctions cognitives ou les équilibres d'oxydo-réduction. Les éléments-trace (ET) d'intérêt sont : le zinc (Zn), le cuivre (Cu), le manganèse (Mn), le fluor (F), l'iode, (I) , le sélénium (Se), le molybdène (Mo), le chrome (Cr) et le fer (Fe).

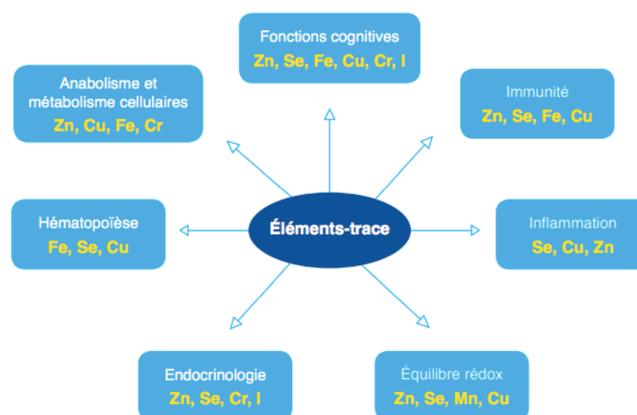


Figure 4 : Principales fonctions des éléments-trace [56]

Comme leur nom l'indique, les éléments-trace sont présents en faible quantité dans l'organisme, leurs réserves sont limitées et il n'existe pas de synthèse endogène, d'où la nécessité d'un apport quotidien. Les apports nutritionnels dépendent de l'alimentation mais également de facteurs individuels (pathologies chroniques, âge, grossesse) et environnementaux (alcoolisme, surpoids...). Dès lors, les apports nutritionnels recommandés ont été établis par l'ESPEN pour les patients bénéficiant de nutrition parentérale à domicile [55], ceux qui sont hospitalisés en soins intensifs en particulier les grands brûlés [56,57], la population pédiatrique [58], les patients souffrant d'insuffisance intestinale chronique [59].

En milieu hospitalier, selon l'état physiopathologique du patient, trois stratégies peuvent être mises en place pour les éléments-trace :

- Prévention de la survenue de déficits par un apport adéquat.
- Correction des déficits déjà existants par apport de doses modérément supra nutritionnelles d'ET. Cette démarche, qualifiée de réplétion, consiste donc à compenser les pertes. La recherche des déficits repose sur des signes cliniques (ex : troubles des phanères ou signes d'anémie)[60] mais également des contrôles biologiques [61].
- Administration de doses pharmacologiques à visée thérapeutique, sans déficit préalable démontré. Cette méthode, appelée supplémentation, doit être réservée à des situations particulières (ex : syndrome de détresse respiratoire aiguë). En effet, il existe une courbe effet-dose lorsque l'on s'intéresse aux ET [62]. Si l'apport est trop faible, il y aura installation d'une carence, en revanche si au contraire l'apport est trop important, un risque d'effet délétère apparaît [63-70].

Les ET ne sont généralement pas présents dans les spécialités pharmaceutiques industrielles de MNP. Leur ajout est recommandé dès que la durée prévue de la NP est supérieure à une semaine, si le patient présente des pertes digestives importantes ou en cas de carence préalable à l'instauration de la NP. Afin de répondre aux recommandations d'apport par voie IV [60,71,72], cet apport est généralement assuré par l'ajout dans les poches de NP d'un flacon d'une spécialité pharmaceutique contenant un mélange de 9 ou 10 éléments-trace (ex : Nutryelt®, Nonan® ou Tracutil®).

Certains ET peuvent nécessiter un apport isolé ou une quantité supérieure à celle contenue dans les spécialités commercialisées afin que la prescription de NP soit cohérente avec l'état physiopathologique du patient [73]. C'est le cas notamment du sélénium qui est administré à fortes doses dans le sepsis du patient de soins intensifs dans le cadre d'une démarche de pharmaconutrition [74], bien que cette méthode soit à ce jour controversée [75,76].

Par ailleurs, une supplémentation en zinc doit rapidement être réalisée chez les patients traités par NP car cet ET n'est presque pas stocké dans l'organisme [77]. Les recommandations d'apport diffèrent en fonction des sources consultées [78,79].

Malgré toutes ces recommandations, des cas de déficit en ET cliniquement significatifs survenant à la suite d'une NP de longue durée sont encore décrits à ce jour [80], parfois en raison de ruptures de spécialités pharmaceutiques [81,82].

En résumé une surveillance est nécessaire concernant les taux plasmatiques d'ET chez les patients bénéficiant d'une NP de longue durée et avant l'instauration d'une NP [83].

### 3. Vitamines

A la différence des électrolytes et des ET qui sont des minéraux, les vitamines sont des substances organiques. Bien que dénuées de valeur énergétique intrinsèque, elles possèdent des qualités physiologiques indispensables à la vie humaine. Leur caractère hydro- ou liposoluble permet de les séparer en deux groupes ([Tableau IV](#)).

En fonction des vitamines, les réserves physiologiques varient de quelques mois à quelques années. La supplémentation vitaminique n'est indiquée qu'en cas de carence avérée ou de risque de déficit.

Sachant qu'elles ne sont pas synthétisées par l'organisme pour la plupart, elles doivent par définition être fournies par un apport extrinsèque, notamment dans les MNP. En effet, les MNP industriels ne contiennent aucune vitamine. Ces dernières doivent par conséquent être ajoutées dans les MNP lorsqu'une supplémentation vitaminique est indiquée. C'est le cas lors d'une NP exclusive (lorsque tout l'apport nutritionnel repose sur la NP) qui peut être amenée à durer un certain temps, ou lorsqu'une carence est mise en évidence par un dosage biologique spécifique.

**Tableau IV : Répartition des vitamines selon leur solubilité et leur fonction**

<b>Vitamines</b>	<b>Solubilité</b>	<b>Fonction biochimique</b>
A	Liposoluble	Action génomique
B1	Hydrosoluble	Coenzyme
B2	Hydrosoluble	Coenzyme
B3 ou PP*	Hydrosoluble	Coenzyme
B5	Hydrosoluble	Coenzyme
B6	Hydrosoluble	Coenzyme
B8	Hydrosoluble	Coenzyme
B9	Hydrosoluble	Transfert moléculaire
B12	Hydrosoluble	Transfert moléculaire
C	Hydrosoluble	Antioxydant
D*	Liposoluble	Action génomique
E	Liposoluble	Antioxydant
K	Liposoluble	Cofacteur de carboxylation

\* synthèse endogène possible

Des spécialités pharmaceutiques telles que Soluvit<sup>®</sup>, Cernevit<sup>®</sup>, Vitalipide A<sup>®</sup> ou E<sup>®</sup> sont des mélanges permettant un apport poly-vitaminique aux patients adultes ou pédiatriques. D'autres spécialités permettent un apport vitaminique ciblé via des solutions injectables de vitamine K notamment.

#### **4. Ajouts spécifiques : les médicaments**

Chez les patients bénéficiant d'une NP, que ce soit dans un contexte d'hospitalisation ou à domicile, il peut être nécessaire de disposer de traitements médicamenteux à administrer. Or, l'insuffisance des voies d'accès veineux limite généralement la possibilité de dédier une voie à une catégorie de médicament [84,85]. Dès lors, les médecins nutritionnistes, les pharmaciens hospitaliers responsables d'une unité de nutrition ainsi que les infirmiers réalisant l'administration de la NP doivent être sensibilisés à la notion de compatibilité médicamenteuse entre MNP et médicaments qui peuvent être administrés conjointement [86]. En effet, dans ce cas, de nouvelles réactions physicochimiques (pouvant compromettre la stabilité et l'efficacité à la fois du médicament mais également du MNP) sont mises en jeu. Cette notion sera développée dans le chapitre suivant.

### III. Stabilité des mélanges de nutrition parentérale

Les réactions d'incompatibilité peuvent avoir de multiples conséquences, parmi lesquelles une obstruction du filtre présent sur la ligne de perfusion ou du cathéter servant à l'administration de la NP, la perte d'efficacité du MNP ou du médicament qui y est adjoind, la formation de dérivés toxiques, la survenue de syndrome inflammatoire de réponse systémique, de phlébites, de granulomes pulmonaires, de sepsis ou de défaillances d'organes chez les patients auxquels ces médicaments incompatibles sont administrés.

Dans un premier temps, nous allons aborder la problématique de la stabilité du MNP seul. Ensuite, nous détaillerons les adaptations d'études de stabilité des mélanges suite à des ajouts courants (tels que les vitamines et éléments-trace). Enfin, la problématique de l'incompatibilité médicamenteuse sera traitée.

#### A. Stabilité des mélanges

Comme décrit précédemment, un MNP complet contient généralement les nutriments suivants : glucose, acides aminés, lipides, électrolytes, vitamines et éléments-trace. Après reconstitution du mélange, l'ensemble de ces éléments subit des réactions physicochimiques qui sont à l'origine de leur stabilité et compatibilité. La composition du MNP ainsi que l'ordre d'introduction des différents nutriments lors de la préparation ou de la supplémentation influent sur la stabilité du mélange final [87].

Historiquement, les différents composants de la NP étaient administrés indépendamment les uns des autres *via* un système multi-flacons. Le mélange des éléments nutritifs avait alors lieu directement dans la circulation sanguine. Cependant, depuis l'avènement des mélanges « tout-en-un », l'ensemble des nutriments est présent dans un seul et même contenant après reconstitution du mélange. Bien que présentant une stabilité considérablement allongée avant reconstitution (c'est le cas des systèmes « tout-en-un » prêts à l'emploi [88]), le MNP a une stabilité limitée à 24 heures après reconstitution. La complexité de composition ainsi que la forme galénique (solution ou émulsion) imposent de prendre des précautions pour garantir l'efficacité et la sécurité d'emploi du MNP : la compatibilité pharmaceutique devient une préoccupation majeure [89].

Outre les interactions contenant-contenu, les incompatibilités peuvent être de 2 types [90–92] :

- physique : basée sur des problèmes de solubilité générant des substances non ionisées insolubles ou des co-précipités d'ions. Ces incompatibilités sont généralement visibles à l'œil nu (par formation d'un précipité, d'un gaz, ou un changement de couleur). Cependant dans le cas des MNP ternaires, l'opacité du milieu peut rendre leur détection difficile. L'une des conséquences graves d'incompatibilité physique peut être la rupture de l'émulsion. La stabilité de cette dernière peut être contrôlée par observation visuelle (séparation de phases), mesure de la taille des globules lipidiques de diamètre élevé par diffusion dynamique de lumière (notamment le PFAT5 correspondant au pourcentage de globules de taille > 5µm) [50,93,94],
- chimique [95] : basée sur des réactions d'oxydo-réduction (notamment catalysées par les éléments-trace présents dans le mélange de NP, tels que le fer ou le cuivre) ou d'hydrolyse. Non visibles à l'œil nu, les réactions chimiques rendent nécessaire la quantification des différents composants du mélange nutritionnel ou du/des médicament(s) ajouté(s) dedans.

Les facteurs influençant la stabilité des éléments en présence sont clairement identifiés. Il s'agit principalement du pH (potentiel d'hydrogène), de la concentration, de la lumière, de l'oxygène et de la température.

L'ensemble de ces réactions physico-chimiques ainsi que des facteurs susceptibles de les influencer est détaillé dans le [Tableau V](#).

Outre cette différenciation physique vs chimique, il est possible de distinguer pour les MNP ternaires, les interactions se produisant dans la phase aqueuse (*i.e.* précipitation phosphocalcique, inactivation des vitamines, dégradation des acides aminés), par rapport à celles ayant lieu dans la phase lipophile ou encore avec les contenants.

**Tableau V** : Classification des réactions physico-chimiques d'instabilité des éléments entrant dans la composition d'un mélange de NP

Réactions physiques	Réactions chimiques
Précipitation (solubilité du produit)	Oxydation et réduction
Rupture d'émulsion	Complexation
Réactions photo-induites	Hydrolyse
Réactions thermiques	Condensation et polymérisation
Sorption	Racémisation
Perméation	Réactions d'élimination (décarboxylation)
Facteurs influençant	Facteurs influençant
Exposition à la lumière	pH
Matériau du conditionnement	Température
Procédé de production	Concentration des composants

Comme précédemment énoncé, les MNP étant de composition variable, il est indispensable de s'assurer de la compatibilité de tout médicament mis en contact avec le MNP. Dans le paragraphe suivant, nous allons dans un premier temps détailler les paramètres nécessaires à la tenue d'études de stabilité des MNP. La problématique de l'administration conjointe des MNP avec des médicaments sera abordée dans un second temps.

## 1. Stabilité physique des mélanges nutritifs

### a. Stabilité des émulsions

Le second phénomène d'incompatibilité physique est la séparation de phases des MNP ternaires, se traduisant par la séparation des phases de l'émulsion.

Par définition, les MNP ternaires sont des émulsions de nature huile dans eau (L/H). Elles correspondent à la dispersion de nombreux globules lipidiques dans une phase continue aqueuse. D'un point de vue galénique, une émulsion est une entité fragile, puisqu'elle résulte d'un équilibre physique. Ce dernier repose sur la répulsion électrostatique des globules, dépendant elle-même de la charge ionique de surface de



l'électronégativité, ce qui diminue progressivement la stabilité de l'émulsion. La plupart des émulsions commercialisées ont un potentiel zêta d'environ -35 mV et un pH compris entre 6,5 et 8,5. Cela semble logique, lorsque l'on sait que les forces de répulsion électrostatiques disparaissent aux alentours d'une valeur de pH de 2,5. A ce stade, le pH de la phase aqueuse devient électriquement neutre.

L'apport d'une solution concentrée de glucose, de pH acide, peut déstabiliser l'émulsion [99]. Les électrolytes, en particulier ceux de charge positive ont tendance à neutraliser les charges négatives à la surface des globules lipidiques et finissent par annuler la barrière mécanique créée par l'agent émulsifiant, entraînant par conséquent le phénomène de coalescence. Plus la valence ionique est élevée, plus le pouvoir déstabilisant est important. Dès lors, les ions trivalents comme les ions  $Fe^{3+}$  ont le pouvoir déstabilisant le plus élevé, suivis par les cations divalents tels le  $Ca^{2+}$  ou  $Mg^{2+}$ . Les cations monovalents ( $Na^+$  ou  $K^+$ ) sont à risque plus faible de déstabiliser l'émulsion. Cependant il ne faut pas négliger l'aspect quantitatif de ces électrolytes. Dès lors, leur ajout doit se faire dans une certaine limite, décrite dans le Résumé des Caractéristiques du Produit (RCP) des MNP industriels. En règle générale, les besoins électrolytiques de la plupart des patients, ne sont pas de l'ordre à déstabiliser les mélanges ternaires [100].

Pour ce qui concerne la préparation des MNP « à la carte », un paramètre peut être calculé afin de prédire la stabilité ou l'instabilité d'une formulation : le *Critical Aggregation Number* (CAN), dont la valeur ne doit pas dépasser X mmol/L afin de garantir la stabilité d'un mélange ternaire. Il peut être calculé à partir de l'équation de Schultz et Hardy (éq .1) et représente l'influence de la concentration globale en cations (mono- et multichargés) présents dans le mélange [101]. La valeur seuil dépend de la charge des globules, dépendant elle-même du pH et des additifs comme les acides aminés.

$$CAN = a + 64b + 729c \quad \text{éq. 1}$$

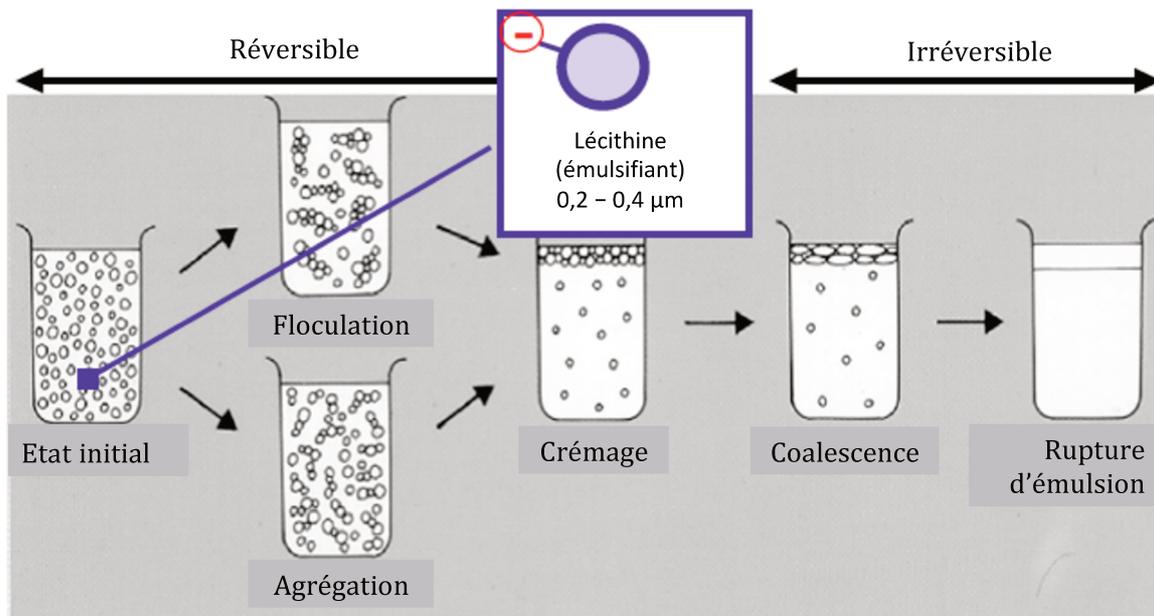
a, b et c étant les concentration respectives (en mmol/L) des cations mono-, di- et trivalents.

Sa valeur initialement fixée à 130 mmol/L dans une étude impliquant une émulsion d'Intralipid® 20% [101] a évolué vers 200 mmol/L [50,102] puis 600 mmol/L [103]. Cette dernière valeur a récemment été remise en question par des études montrant une stabilité de mélanges ternaires ayant un CAN proche de 1000 mmol/L [104]. Certains travaux ont défini plus précisément la concentration maximale acceptable pour les cations monovalents ou divalents soit  $< 130$  mmol/L et  $< 8$  mmol/L respectivement [100].

Les acides aminés en revanche auraient un effet stabilisateur de l'émulsion en améliorant le pouvoir tampon du mélange vers la neutralité et en diminuant la tendance à la coalescence [96,105].

En cas de déstabilisation de l'émulsion, plusieurs étapes peuvent se succéder (Figure 6):

- Floculation et crémage : la distance entre les globules est proche du minimum secondaire de répulsion ; ils forment alors des floculats ou amas de globules lipidiques. Ces derniers migrent vers la surface du mélange en raison de leur faible densité et de la faible viscosité du milieu. Une couche dense et blanchâtre se forme progressivement à la surface du mélange de NP et surmonte une couche moins dense. La floculation et le crémage peuvent survenir sans modification significative de la taille moyenne des globules et le mélange nutritif peut être administré s'il est précédé par une étape d'agitation douce, permettant la remise en dispersion de l'huile. Ces phénomènes sont donc réversibles.
- Coalescence : les forces de répulsion électrostatiques sont défaillantes ; les petits globules s'agrègent en globules de calibre plus important.
- Rupture d'émulsion : au fur et à mesure que la coalescence se poursuit, le nombre et la surface des agrégats de grand diamètre augmentent jusqu'à ce que les barrières mécaniques et électrostatiques se rompent définitivement. L'huile se sépare alors totalement de la phase aqueuse.



**Figure 6 :** Phases d'instabilité d'une émulsion (d'après [102])

ii. Méthodes d'étude de la stabilité d'une émulsion

La stabilité d'une émulsion peut dans un premier temps être évaluée par un examen visuel direct (macroscopique) permettant de détecter les phénomènes décrits dans la figure 6 [106,107]. Cependant une telle analyse étant insuffisante, d'autres méthodes sont validées pour la détermination de paramètres plus précis tels que la taille des globules de l'émulsion ou le potentiel zêta.

*(a) Taille des globules*

*(i) Référentiels*

La Pharmacopée Française XI<sup>ème</sup> édition comporte une monographie à propos des émulsions qui prévoit une détermination de la taille des globules (variant de 0,5 à 50 μm) à l'aide d'un micromètre [108]. Cependant celle-ci concerne la forme galénique et n'est pas spécifiquement dédiée aux émulsions injectables. La Pharmacopée Américaine (United States Pharmacopoeia (USP)) en revanche, comporte une monographie intitulée « distribution de la taille des globules lipidiques dans une émulsion injectable » [109]. L'USP propose deux critères d'évaluation des émulsions

lipidiques injectables industrielles (chapitre 729) : le diamètre moyen des globules et la population de globules de diamètre supérieur à 5  $\mu\text{m}$  (PFAT5). Le diamètre moyen des globules ne doit pas excéder 500 nm, tandis que le seuil de globules > 5 $\mu\text{m}$  est fixé à 0,05%.

Le rationnel de cette valeur maximale de taille est notamment de limiter le risque d'embolie pulmonaire [48,110], 5  $\mu\text{m}$  correspondant au diamètre minimum à partir duquel un globule est susceptible d'obstruer le plus petit capillaire pulmonaire.

Le seuil de 0,05% est fixé par la Pharmacopée Américaine pour les émulsions injectables fabriquées par l'industrie pharmaceutique et doit probablement être nuancé pour les mélanges de NP ternaire reconstitués puisque la concentration de l'émulsion est différente et que la composition en nutriments est plus complexe. Le seuil pour cette dernière catégorie doit être compris entre 0,05% et 0,4% (seuil le plus bas auquel une séparation de phase a été constatée *via* des expériences *in vitro* [111]).

(ii) *Méthodes de détermination du diamètre et de la distribution de taille des globules*

La détermination du diamètre des globules est nécessaire pour le calcul du diamètre moyen, l'élaboration du profil de distribution de la taille des globules d'une émulsion lipidique ainsi que pour la détermination du PFAT5 (en effet, ce dernier paramètre concerne les globules de grande taille). Dès lors, les méthodes analytiques employées pour ces trois paramètres reposent sur des principes analytiques similaires mais non identiques. Il s'agit principalement des méthodes décrites par la Pharmacopée Américaine dans sa monographie 729 : la diffusion dynamique de la lumière (DDL) également appelée spectroscopie par corrélation de photons, la diffusion classique (ou statique) de la lumière (également appelée diffraction laser) pour la mesure du diamètre des globules ainsi que la distribution des tailles de globules d'une part, tandis que le PFAT5 est évalué à l'aide d'une méthode de mesure des globules appelée obscuration de la lumière.

La diffusion dynamique de la lumière repose sur la fluctuation temporelle de l'intensité lumineuse d'un rayon laser qui est projeté sur l'échantillon et mesuré selon un angle de 90° par rapport au rayon incident. Les particules (dans notre cas, les globules huileux) contenues dans l'échantillon analysé possèdent un mouvement Brownien qui varie en fonction de leur taille. A ce mouvement aléatoire est associée la force exercée par la phase dispersante de l'émulsion sur les globules huileux, qui peut être déterminée par la loi de Stokes. La combinaison du mouvement Brownien et de la loi de Stokes est donnée par la loi de Stokes-Einstein.

La méthode d'obscuration de la lumière (ou extinction de lumière) correspond au passage des globules dispersés au sein de l'émulsion devant un faisceau laser. L'intensité lumineuse qui n'a pas été absorbée est ensuite mesurée par un détecteur placé de l'autre côté de l'échantillon.

D'autres méthodes non décrites à la Pharmacopée sont utilisables pour mesurer le diamètre comme la microscopie optique [52], la néphélométrie, le compteur coulter [101,112] ou encore la spectroscopie ultrasonique [112].

Lorsque ce type d'analyse est envisagé il est indispensable de connaître les valeurs attendues selon les paramètres étudiés. Au sein d'une émulsion simple (émulsions injectables définies à la Pharmacopée Américaine [113]) ou plus complexe (MNP), le diamètre moyen est de l'ordre de 200 à 300 nm [50,110].

Cependant toutes les techniques ne sont pas équivalentes [114], leurs avantages et inconvénients sont variés et certaines précautions sont nécessaires selon la technique choisie (usage de filtre absorbant la chaleur pour les analyses par microscopie).

#### *(b) Potentiel zêta*

Le potentiel zêta, aussi appelé potentiel ou charge de surface est un facteur complémentaire de la taille et de la distribution de taille des globules dans l'évaluation de la stabilité d'une émulsion.

### *(i) Référentiels*

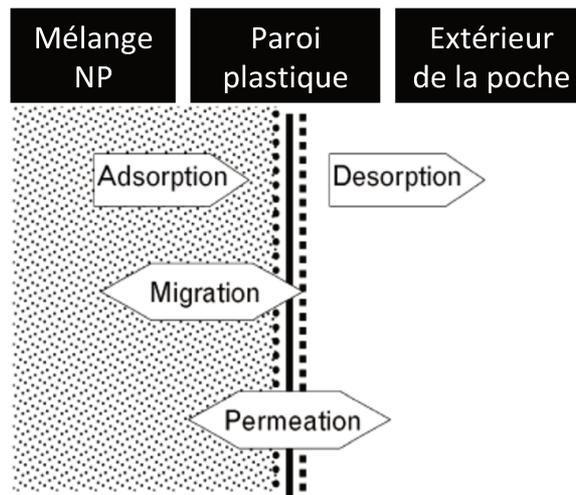
Les Pharmacopées Française et Américaine ne font pas mention du potentiel zêta dans les monographies relatives aux émulsions. Cependant ce paramètre permettant d'appréhender la contribution électrostatique (et électrocinétique) à la stabilisation de la dispersion des globules huileux dans la phase dispersante hydrophile, semble indispensable à l'évaluation de la stabilité d'une émulsion.

### *(ii) Méthodes de détermination potentiel zêta*

Etant donné que le potentiel zêta correspond à une charge de surface, la mesure de ce paramètre est effectuée par des méthodes de microélectrophorèse ou électrophorèse laser doppler. Elle repose sur la vitesse de déplacement des globules lipidiques vers la cathode lorsque l'émulsion est soumise à un champ électrique. Par conséquent, plus un globule comporte de charges à sa surface, plus il migrera rapidement vers la cathode. Dans la méthode par électrophorèse laser doppler, le principe électrophorétique est associé au principe du doppler. En effet, les particules en déplacement sous l'effet du champ électrique sont éclairées par une lumière laser et diffusent cette lumière. La fréquence de la lumière diffusée dépend de la vitesse des particules, du fait du décalage par effet Doppler.

### ***b. Autres paramètres de stabilité physique des mélanges nutritifs***

Les réactions physiques surviennent majoritairement entre composants du mélange nutritif, mais elles peuvent également faire intervenir le contenant. Historiquement, les MNP étaient conditionnés dans des bouteilles en verre mais pour des raisons pratiques et économiques, ces bouteilles ont progressivement été remplacées par des poches en polymère plastique dans les années 1960. Selon la nature du matériau plastique composant cette poche, les réactions peuvent être de différents types : adsorption, migration (ou absorption), perméation et désorption ([Figure 7](#)) [88].



**Figure 7** : Phénomènes physiques survenant avec les films plastiques

Les premières poches destinées à contenir les MNP étaient constituées de polychlorure de vinyle (PVC) ou de polyéthylène (PE). Cependant, le PVC présentait de multiples inconvénients parmi lesquels une charge particulaire élevée, une capacité d'adsorption des médicaments lipophiles et un relargage de plastifiants (les phtalates) dans les émulsions lipidiques. Certains de ces plastifiants, en particulier le di-(2-ethylhexyl)-phtalate (DEHP) sont cancérogènes. Par conséquent, ce matériau a dans un premier temps été réservé au conditionnement de mélanges binaires. Mais d'autres composants de la NP peuvent être soumis à des réactions de sorption avec le PVC ; c'est le cas du rétinol, vitamine liposoluble connue pour diffuser dans la membrane semi-perméable de la poche.

L'éthylène-acétate de vinyle (EVA) présente des propriétés très différentes du PVC. En effet, naturellement flexible, il ne contient pas de plastifiants extractibles. Cependant, sa perméation aux gaz est très élevée, ce qui engendre deux problèmes majeurs pour la conservation des MNP : un risque de perte en eau et une pénétration d'oxygène environnant provoquant des réactions chimiques d'oxydoréduction. Ce dernier écueil est limité pendant la phase de stockage des poches industrielles par l'ajout d'un absorbeur et d'un indicateur d'oxygène dans l'emballage de la poche, mais dès que la poche est déballée pour être utilisée, cette protection est levée. D'autre part, l'EVA présente des propriétés d'adsorption importantes, mais plus faibles que celles du PVC.

A l'heure actuelle, la plupart des poches contenant les MNP sont constituées d'EVA mais la recherche tend à développer de nouvelles technologies basées sur des plastiques multicouches (c'est d'ailleurs le cas des poches d'Olimel N7E®). Ces nouveaux conditionnements constitués de films plastiques en polyamides ou combinaison d'éthylvinyl alcool-éthylvinyl acétate recouvrant la surface interne ainsi que l'extérieur de la poche permettent de limiter la perméation à l'oxygène. Grâce à cette propriété ces poches multicouches ont un effet protecteur prouvé sur l'oxydation des composants du MNP par rapport à l'EVA [115].

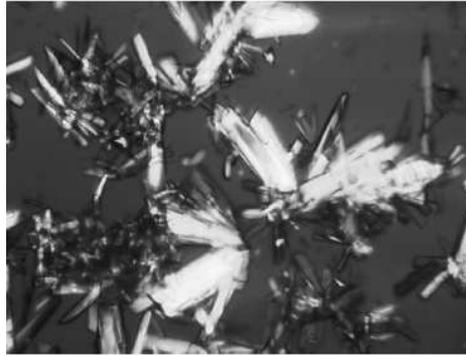
En raison de la possible adsorption des éléments entrant dans les mélanges de NP sur les plastiques des poches ou sur les dispositifs d'administration, il est important d'en étudier les interactions. Ces notions d'interaction contenant-contenu seront à prendre en compte lors de l'administration conjointe de médicaments avec la NP.

## **2. Stabilité chimique des mélanges de nutrition parentérale**

Les réactions chimiques, contrairement aux réactions physiques, sont influencées par la présence de cofacteurs. Ceux-ci doivent par conséquent être maîtrisés.

### ***a. Précipitation phosphocalcique***

L'incompatibilité chimique la plus redoutée dans les MNP est la réaction se produisant entre deux électrolytes : le calcium et les phosphates. Cette incompatibilité, très largement décrite dans la littérature met en jeu les ions calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) et les ions phosphate ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) dont la réaction aboutit à la formation d'un précipité phosphocalcique insoluble (Figure 8). Elle se déroule dans la phase aqueuse du MNP mais peut survenir tant dans les mélanges binaires que ternaires. La formation de ces précipités doit absolument être évitée car elle peut avoir des conséquences très graves, chez les patients. En effet, ces cristaux phosphocalciques peuvent se déposer dans les cathéters (y compris les cathéters centraux de plus gros calibre) [116] mais également dans le parenchyme pulmonaire et peuvent alors être responsables de pneumonies interstitielles diffuses granulomateuses [117] ou de détresses/embolies respiratoires [54,118].



**Figure 8** : Cristaux de précipité phosphocalcique isolés d'un MNP.  
L'image représente des cristaux observés par microscopie à lumière polarisée [112]

Les facteurs ayant un impact sur la formation progressive de ces précipités phosphocalciques sont [50] :

- Les concentrations de calcium et de phosphate : plus la concentration en sels de phosphate et calcium est élevée, plus le risque de précipitation est important.
- La nature des sels de calcium et de phosphate employés : l'utilisation de sels organiques de calcium (gluconate de calcium) et de phosphate (glucose-1-phosphate ou glycérophosphate de sodium) permet de réduire la réactivité chimique entre le phosphate et le calcium, et permettre d'augmenter les concentrations des deux électrolytes [119–121]. Cependant certains mélanges binaires préparés à partir de sels inorganiques de calcium en quantité importante se sont révélés être stables [104,122].
- Le pH du milieu nutritif : l'élévation du pH a été clairement identifiée comme facteur favorisant la réaction de précipitation lorsque les sels entrant dans la composition de la NP sont de nature inorganique. Puisque le phosphate dibasique ( $\text{HPO}_4^{2-}$ ) est plus disponible pour interagir avec le calcium, aboutissant à du phosphate dibasique de calcium, faiblement soluble. En présence d'un pH plus bas, la forme prédominante est le phosphate de calcium monobasique ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ), davantage soluble [123].
- La température. Lors de la conservation au réfrigérateur des poches de NP, aucun précipité n'était observé mais ce dernier se formait progressivement au cours de la période de remise à température ambiante précédant l'administration. Cela s'explique par une prédominance à température plus élevée, du phosphate dibasique ( $\text{HPO}_4^{2-}$ ) moins soluble. En cas d'utilisation de sels de calcium organique, la température plus élevée provoque également la dissociation du

gluconate de calcium en calcium libre. La conjonction de ces deux déplacements d'équilibre ionique augmente la probabilité de précipitation. Cette dernière peut d'ailleurs survenir directement dans le cathéter veineux central en raison de la température corporelle et être à l'origine de l'obstruction de ce dispositif d'administration [124].

- Le temps. Dans une étude menée *in vitro*, Schuetz *et al.* ont démontré l'existence d'un délai de formation du précipité pouvant aller jusqu'à 24 heures [125].
- La concentration en acides aminés. Les acides aminés ayant un important pouvoir tampon dans le MNP [126,127], il est indispensable que leur concentration soit suffisante dans la composition finale du mélange (au minimum 1 à 2,5% [123,128]).
- La concentration du glucose. Les solutions de glucose présentent un pH variant de 6,0 à 3,0 en fonction de leur concentration et de l'ajout éventuel d'acide chlorhydrique (dans le but de les stabiliser). Dès lors, leur ajout dans le MNP a tendance à abaisser le pH et donc à défavoriser la survenue de précipitation phosphocalcique.
- La présence de lipides. Les émulsions lipidiques commercialisées ont généralement un pH plus élevé. Leur ajout pouvant entraîner une augmentation du pH du MNP, il s'accompagne d'une augmentation du risque d'apparition d'un précipité phosphocalcique.
- La concentration finale en magnésium. En formant des sels plus solubles et plus stables avec les ions phosphates, le magnésium diminue le risque de formation des précipités phosphocalciques [125].

Le contrôle de tous ces facteurs ne pouvant pas être fait au quotidien lors de la préparation des MNP « à la carte », il est recommandé de ne pas dépasser une valeur de 72 pour le calcul  $[Ca] \times [P]$  en cas d'emploi de sels inorganiques ( $[Ca]$  et  $[P]$  étant les concentrations de calcium et phosphates en mmol/L) [100].

Outre un délai variable de formation, ce précipité peut se manifester sous la forme d'un macroprécipité ou d'un microprécipité [50]. Dès lors, il est indispensable de rechercher la présence des cristaux phosphocalciques dans les MNP au moment de leur préparation, mais également à distance (notamment avant l'administration au patient).

Le contrôle des MNP repose généralement sur une inspection visuelle pour ce qui est des particules visibles [129]. D'autres méthodes peuvent être employées pour rechercher et/ou identifier des précipités phosphocalciques : le comptage particulaire par blocage de la lumière [130,131], l'examen microscopique de la surface d'un média filtrant au travers duquel le MNP est filtré, la quantification des modifications de concentration en calcium par spectroscopie par absorption atomique, la titration potentiométrique ou la spectrophotométrie ou encore la spectroscopie dispersive d'énergie aux rayons X en microscopie électronique.

L'inspection visuelle est plus complexe dans les mélanges ternaires, l'aspect blanc laiteux rendant la recherche de cristaux quasiment impossible. Considérant que le nombre et la cinétique d'apparition de particules de phosphate de calcium sont respectivement élevés et très rapides, ils sont donc très différents du spectre d'évolution de la taille des globules lipidiques en présence d'une instabilité de l'émulsion lipidique. Cela permet donc aisément de distinguer des cristaux de phosphate de calcium d'un phénomène de coalescence de globules lipidiques à l'aide d'une méthode de comptage particulaire. Il est en revanche difficile de considérer cette approche comme étant infaillible. Lors de l'emploi de MNP ternaires, il est donc indispensable de prendre des précautions en amont, lors de la validation de la composition en phosphate et calcium.

Les autres électrolytes peuvent être dosés dans les mélanges binaires par spectrophotométrie d'absorption atomique [132].

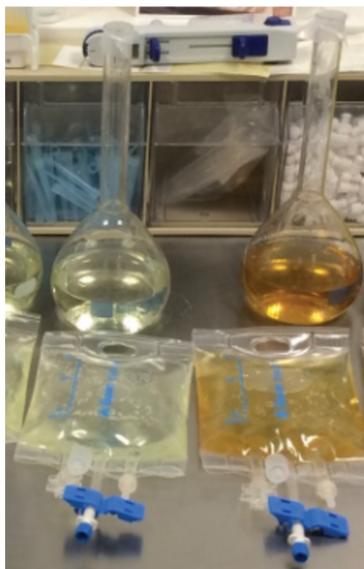
#### ***b. Stabilité des acides aminés***

Les acides aminés sont particulièrement sensibles à l'oxydation, que ce soit en solution isolée ou en mélange avec d'autres nutriments. Les facteurs influençant la stabilité des acides aminés sont l'exposition à la lumière, les variations de température pendant le stockage et l'oxygène résiduel dans le conditionnement industriel après production.

Les acides aminés en solution aqueuse subissent des réactions de décomposition [133]. Celles-ci sont visibles grâce à l'apparition d'une coloration légèrement jaunâtre, dont l'intensité est proportionnelle à la température de stockage et au temps. Des réactions

de photo-oxydation ont également été observées, notamment dans les situations d'exposition aux UV (*i.e.* photothérapie) [134,135]. L'exposition à la chaleur et à l'irradiation lumineuse conduisent par exemple à la formation d'urée ou de sulfoxydes. La Pharmacopée Européenne décrit des méthodes d'analyse des acides aminés [136]. L'analyseur à acides aminés est une méthode très répandue [137]. Les acides aminés sont séparés sur une résine échangeuse de cations utilisant des tampons à base de sodium ou de lithium puis sont dérivés en sortie de colonne chromatographique par de la ninhydrine, permettant leur détection et leur quantification aux deux longueurs d'onde de 440 et 570 nm. Cette méthode de HPLC-visible peut être employée après dérivatisation par d'autres agents chimiques [138].

Les acides aminés sont susceptibles de réagir avec les sucres, dont le glucose présent dans les mélanges de NP. En effet, ce dernier ayant des propriétés réductrices, il réagit facilement avec les acides aminés libres. Appelée réaction de Maillard, cette réaction non enzymatique est à l'origine du brunissement des solutions binaires de NP (Figure 9).



**Figure 9** : Réaction de Maillard dans un mélange binaire (à droite) entraînant l'apparition d'une coloration brune; absence de réaction de Maillard dans une solution d'acides aminés seuls (à gauche).

Les produits issus de cette réaction sont qualifiés de produits d'Amadori. Ils peuvent être détectés et quantifiés par chromatographie haute performance par exclusion d'ions [139]. La teneur en glucose peut également être déterminée à l'aide des méthodes habituellement employées pour déterminer la glycémie *in vivo* (*i.e.* méthodes enzymatiques à la glucose oxydase ou à l'hexokinase).

### **c. Stabilité des lipides**

La peroxydation lipidique est un phénomène survenant dans les mélanges de NP comme dans les émulsions injectables pures [96,133]. Les acides gras polyinsaturés subissent une réaction d'auto-oxydation radicalaire qui peut notamment être influencée par la composition en vitamines du MNP [135,140,141]. Les produits issus de cette peroxydation peuvent réagir avec les acides aminés et provoquer leur dénaturation [133]. Par définition, les patients traités par NP sont donc exposés aux produits de peroxydation lipidiques, notamment au malondialdéhyde (MDA), ce dernier étant possiblement hépatotoxique lors d'une exposition chronique [142,143]. Il existe plusieurs méthodes de détection et quantification de ces produits de dégradation. Ces méthodes sont basées sur de la HPLC [144,145,143] ou bien encore sur des réactions aboutissant à la formation de produits colorés quantifiés par spectrophotométrie UV [52,146-148].

## **B. Stabilité des mélanges avec les ajouts habituels**

### **1. Stabilité des vitamines**

Les vitamines sont des micronutriments très fortement susceptibles de subir des réactions de dégradation, ces dernières pouvant mener à leur inactivation. La riboflavine (vitamine B2) et le rétinol (vitamine A) peuvent être dégradées par photolyse sous l'action des UV.

Cependant c'est la dégradation chimique qui est la cause majeure de perte des vitamines dans les MNP. Parmi les vitamines systématiquement ajoutées dans les MNP, la vitamine C (acide ascorbique) est la plus sensible à la dégradation. Elle peut subir une dégradation thermique au cours de laquelle elle s'oxyde dans un premier temps en acide déhydroascorbique (DHA) sous l'effet d'une augmentation de la température, selon une cinétique d'ordre 1 [149]. Cette réaction est réversible et le DHA conserve une activité biologique équivalente à celle de l'acide ascorbique [150]. La seconde étape, irréversible, aboutit à la synthèse des acides thréonique et oxalique, dénués d'activité biologique. Le glucose et certains acides aminés peuvent atténuer cette oxydation thermique. La

thiamine (vitamine B1) peut subir des réactions d'oxydation ou de réduction. Cette dernière est majoritaire, faisant intervenir le métabisulfite de sodium (antioxydant parfois présent dans certaines spécialités d'acides aminés) [151]. Une étude s'est intéressée à la stabilité des vitamines B1, B2, B6 et C, souvent ajoutées dans les MNP aux différentes températures de stockage des poches contenant les MNP [152]. Cette étude a mis en évidence une stabilité de toutes les vitamines lors d'une conservation à +4°C. La vitamine C en revanche n'était pas stable après 48 heures à température ambiante. Une étude plus récente a rapporté une dégradation plus importante des vitamines C, B1 et B6 dans des MNP ternaires lorsque ces derniers étaient conditionnés dans une poche EVA ne conférant pas de protection vis à vis des UV [153]. Cependant, avec ou sans protection vis à vis des UV, les concentrations en vitamines restaient au-delà des 90% de la concentration initiale, tel que recommandé par la Pharmacopée, notamment grâce à la photo-protection apportée par l'émulsion lipidique.

Les vitamines peuvent par ailleurs favoriser la peroxydation des acides aminés (teneur en peroxydes multipliée par 10 dans les mélanges binaires) ainsi que la peroxydation lipidique (teneur en lipoperoxydes multipliée par 4 dans les mélanges ternaires) [140]. Ce phénomène est dépendant de la concentration en vitamines dans le MNP. Les vitamines les plus probablement impliquées sont la riboflavine et l'acide ascorbique [135,154]. Cette réaction chimique de peroxydation lipidique est également liée à la présence en plus des vitamines, d'éléments-trace et de fer [155]. Elle est également accentuée par l'exposition à la lumière.

Par ailleurs, la stabilité des vitamines a été démontrée en présence d'électrolytes et d'éléments-trace [156].

## **2. Stabilité des éléments-trace**

La stabilité des éléments-trace a fait l'objet de travaux de recherche depuis longtemps. En effet, ces micronutriments bien qu'en quantités très faibles n'en sont pas moins indispensables. Leur faible quantité ne laisse pas de marge de manœuvre et impose d'en assurer la stabilité.

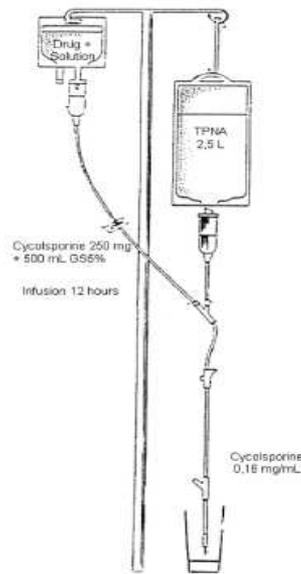
Au cours des années 1980, de nombreuses études ont prouvé la stabilité des éléments-trace dans les mélanges binaires, souvent basées sur des résultats de dosage par spectroscopie d'absorption atomique [157–160]. Cependant, une incompatibilité a été démontrée entre le cuivre et la cystéine, ces deux éléments réagissant pour mener à des particules de sulfure de cuivre insolubles qui sont bloquées par le filtre en ligne, provoquant ainsi son noircissement [161–166]. Cette incompatibilité dépend de la spécialité d'acides aminés utilisée pour préparer le MNP [167].

Le sélénite soluble est réduit en sélénium insoluble en présence d'une importante concentration d'acide ascorbique ( $\geq 5$  g/L) [168]. Un mélange de pH < 5 favorise fortement la précipitation de sélénium en présence d'acide ascorbique. Des concentrations de 100 mg/L suffisent pour permettre la réduction de l'élément-trace [169].

### C. Stabilité des mélanges de nutrition parentérale en présence de médicaments

Lorsqu'il est question d'administrer un médicament avec la NP, deux modalités existent :

- la **perfusion simultanée en Y** (Figure 10), employée essentiellement en milieu hospitalier [170]
  - au moyen d'une pompe électrique imposant un débit régulier pour l'administration du médicament. Dans ce cas, le médicament est généralement conditionné dans une seringue (de 20 à 60 mL) ou une poche souple (de 100 à 250 mL). Le temps de contact entre la NP et le médicament peut varier de quelques minutes à plusieurs heures.
  - sous la forme d'une « miniperfusion » : le médicament est dilué dans un volume de 50 à 250 mL, le débit est moins régulier, le temps de contact médicament/MNP est plus court, allant de quelques minutes à une heure.
  
- **l'ajout direct du médicament dans la poche** contenant le mélange nutritif (Figure 11) [90,171].



**Figure 10** : Perfusion concomitante d'un médicament et d'un MNP *via* un montage en Y [174]



**Figure 11** : Ajout direct de médicament dans une poche de MNP [174]

Le choix d'administration conjointe des médicaments avec le MNP est en relation avec le contexte clinique du patient à un instant donné. Dans le cas de l'administration *via* une connexion en Y, bien que le temps de contact entre le MNP et le médicament soit limité, il est parfois suffisant pour voir se produire l'incompatibilité.

Dans le cas de l'ajout direct dans la poche, le MNP sert de solvant ou de « véhicule » d'administration. Le temps de contact du médicament avec le MNP peut atteindre au maximum 24 heures. Pour des patients « stables » bénéficiant de NPAD, les mélanges de NP sont préparés à l'avance pour permettre de limiter la livraison des poches à son domicile une fois par semaine. Dans ce cas précis, le temps de contact est d'au moins une semaine.

Cette pratique est rarement recommandée par les fabricants dans les RCP concernés [172], au vu des risques présentés précédemment.

Cependant, cette méthode peut présenter certains avantages, notamment d'améliorer la précision dans la dose de médicament administrée, de limiter les volumes de solutés administrés (pouvant être nécessaire pour des patients ayant une restriction hydrique) ou encore de limiter le recours à plusieurs accès vasculaires distincts [48].

L'ajout des médicaments dans la poche de NP étant parfois inévitable, les sociétés savantes de nutrition entérale et parentérale ont émis des recommandations à destination des professionnels de santé [48,78,173], de sorte que l'ajout direct de médicament dans les MNP n'est possible que si :

- des données concernant la compatibilité physicochimique et la stabilité du médicament ajouté et de la préparation finale (NP + médicament) sont disponibles
- et
- des données cliniques confirment l'efficacité thérapeutique attendue du mélange nutritionnel ainsi que du médicament administré.

Une enquête menée en 2013 aux Etats-Unis a révélé que 75% des répondants avaient régulièrement recours à l'ajout de médicaments (hors nutriments) dans les MNP. Parmi les médicaments les plus cités, figuraient l'insuline, l'héparine, et les antagonistes des récepteurs H<sub>2</sub>.

Pour suivre les recommandations des sociétés savantes, il est par conséquent nécessaire pour les médecins et pharmaciens de savoir où trouver les informations fiables concernant la stabilité et la compatibilité des médicaments et de la NP.

Des bases de données ainsi que des ouvrages auxquels l'accès est payant (*i.e.* Micromedex®, King Guide to parenteral admixtures, Handbook on injectable drugs) [85] sont à la disposition des pharmaciens pour conclure à la compatibilité des médicaments et de la NP, mais les concentrations médicamenteuses proposées ne correspondent pas toujours à la concentration d'intérêt, ce qui oblige les pharmaciens à mener leurs propres études de stabilité.

Les difficultés majeures auxquelles les pharmaciens sont confrontés lors de la recherche de données mais également lors de la mise en œuvre d'études de stabilité de médicaments avec les mélanges nutritifs résident principalement dans la multiplicité des formulations de NP et la diversité des concentrations de médicaments administrés conjointement à la NP. D'ailleurs l'extrapolation de ces données à des conditions différentes (*i.e.* concentration, types de MNP) est déconseillée.

De nombreuses études ont déjà été publiées à propos de la compatibilité des médicaments et de la NP [85,91,174–178] mais nous expliquerons dans le paragraphe suivant, qu'elles ne sont pas toutes exploitables car parfois incomplètes.

Des phénomènes de fixation (absorption ou adsorption) du médicament sur le matériau constituant la poche de NP ou les dispositifs employés pour l'administration ont déjà été décrits [179]. Cela peut avoir pour conséquence de réduire la quantité de médicament ou de nutriments administrée, et/ou de favoriser la formation de substances toxiques ou de particules [180].

En résumé, pour être recevable, une étude de stabilité doit être élaborée à partir de la pratique clinique pour le choix des concentrations de médicaments, la nature du mélange nutritif et les modalités d'administration (montage de perfusion dont la géométrie et les matériaux des dispositifs médicaux, temps de contact) [181].

## **1. Etudes de stabilité des médicaments et nutrition parentérale : état des lieux et limites**

Il n'existe pas de méthodologie standardisée concernant l'étude de l'administration conjointe des médicaments et de la nutrition parentérale.

Néanmoins, les recommandations des sociétés savantes (ASPEN et ESPEN) comportent des exigences minimales devant être respectées pour mener des études de stabilité scientifiquement valables. Ces études doivent entre autres :

- fournir une description détaillée de la NP et du médicament,

- être basées sur des tests indicatifs de stabilité du médicament, comprenant plusieurs des essais répétés sur au moins 12 à 24 heures,
- détailler les propriétés physicochimiques de la NP et du médicament,
- simuler les conditions réelles d'administration,
- prouver le maintien de l'efficacité pharmacologique ou thérapeutique sans augmentation de la survenue d'effets indésirables,
- prouver l'efficacité d'une administration IV continue en vue de maintenir une concentration thérapeutique efficace, en comparaison avec des administrations intermittentes.

Quel que soit le mode d'administration du médicament (en Y ou dans le mélange de NP), les aspects suivants doivent être abordés [86] :

- changements dans les caractéristiques de l'émulsion,
- réaction du médicament avec le matériau composant le contenant,
- réactions impliquant des nutriments spécifiques, pouvant mener à leur inactivation,
- réactions avec certains composants pouvant mener à une toxicité (précipitation, formation de radicaux).

Ces recommandations rendent nécessaire la distinction entre la compatibilité et la stabilité mais rendent l'évaluation des deux notions indispensable. La stabilité est une notion faisant référence au médicament (dont la concentration doit se maintenir au dessus d'un seuil de 90% de la concentration initiale après ajout dans le MNP). La compatibilité est quant à elle une notion se rapportant plutôt à l'association du MNP et du médicament, se traduisant par la recherche de la stabilité physique de l'émulsion dans le cas d'un MNP ternaire et de l'absence d'apparition d'un précipité ou encore d'un changement de pH [182].

Ces exigences sont abordées dans les études de stabilité concernant les médicaments et les MNP, puisque des données *in vitro* de méthodologie variable existent, cependant tous les critères ne sont pas systématiquement étudiés.

Le [Tableau VI](#) regroupe certaines études portant sur la stabilité physique de médicaments avec des MNP. Par définition, ces études sont centrées sur la mesure des paramètres de stabilité des émulsions (comme décrits dans le paragraphe I de la partie expérimentale) ou la recherche de formation d'un précipité témoignant ainsi d'une incompatibilité.

**Tableau VI** : Etudes de compatibilité / stabilité physique entre médicaments et MNP

Référence	Médicament(s)	Mode d'étude (statique ou dynamique)	Type de MNP (binaire ou ternaire)	Paramètres de stabilité de l'émulsion et incompatibilité physique	Limites
Bouchoud (2013) [91]	Albumine, amoxicilline/acide clavulanique, CaCl <sub>2</sub> , céfépime, ésoméprazole, fentanyl, fluorouracile, furosémide, MgSO <sub>4</sub> , méropénème, métoclopramide, métronidazole, midazolam, morphine sulfate, noradrénaline, octréotide, ondansétron, pantoprazole, paracétamol, piperacilline/tazobactam, phosphate de potassium, tacrolimus, tropisétron, vancomycine	Statique (4h), en Y	Ternaire (stabilité émulsion) ou binaire (précipité, changement de coloration)	Observation visuelle, DLS, light obscuration, microscopie optique, changement de couleur, précipité visible, particules non visibles	Précipité et particules sur mélanges binaires
Staven (2017) [183]	Aciclovir, ampicilline, ondansétron, paracétamol	Statique (4h), en Y	Ternaire	Potentiel zêta, DLS, light obscuration, effet Tyndall, pH, turbidimétrie	Analyse non menée dans le mélange binaire (remplacement de l'émulsion par de l'eau ou centrifugation puis recueil de la phase hydrophile)

Référence	Médicament(s)	Mode d'étude (statique ou dynamique)	Type de MNP (binaire ou ternaire)	Paramètres de stabilité de l'émulsion et incompatibilité physique	Limites
Staven (2016) [92]	Ampicilline, cefazidime, clindamycine, dexaméthasone, fluconazole, fosphénytoïne, furosémide, métronidazole, ondansétron, paracétamol	Statique (4h), en Y	Ternaire pédiatrique	PFAT5, diamètre moyen des globules, pH, précipité, turbidimétrie, comptage particules non visibles, examen visuel macroscopique	Analyse particulière sur mélange ternaire avec de l'eau en remplacement de l'émulsion
Gostynska (2019) [184]	Ciprofloxacine	Statique (4h)	Ternaire	Inspection visuelle, pH, osmolalité, comptage particulaire et potentiel zêta.	
Watrobska (2019) [185]	Furosémide et torasémide	Statique et dynamique en Y	Ternaire	Inspection visuelle, microscopie optique, pH, potentiel zêta, distribution de la taille des globules	
Greenhill (2019) [186]	Alprostadil, gluconate de calcium, dexmédétomidine, adrénaline, noradrénaline, esmolol, furosémide, vasopressine, milrinone	Statique (4h)	Binaire	Turbidimétrie, pH, changement visuel, émission de gaz	
Fox (2013) [187]	Amiodarone, clindamycine, citrate de caféine, énalapril, adrénaline, fluconazole, fosphénytoïne, hydrocortisone, métoclopramide, midazolam, pentobarbital, phenobarbital et rifampicine	Statique (3h)	Binaire	Turbidimétrie, particules visibles	Pas de recherche des particules non visibles

Dans les études s'intéressant à l'administration en Y, deux types de méthodologies sont retrouvées. La première (mais aussi la plus courante dans les travaux plus anciens), consiste à mélanger selon un ratio de volumes défini (souvent 1:1 v/v) le mélange nutritif et la solution médicamenteuse. Ils sont alors laissés en contact pendant un temps défini puis le mélange est analysé selon différentes méthodes. Ce mode est qualifié de « statique ». La seconde correspond à une simulation de la perfusion, puisque le montage de perfusion est reproduit à l'identique et l'administration en Y est réalisée dans les conditions réelles. Cette dernière méthodologie (dite en mode « dynamique ») est préférable puisqu'elle permet d'inclure la notion de dynamique fluide, pouvant influencer la formation ou la disparition de précipités entre autres.

Lorsque l'administration se fait par ajout direct du médicament dans le mélange nutritif, la méthodologie peut suivre les deux mêmes principes : mélange isovolumétrique ou bien ajout dans la poche et simulation de la perfusion. Il est important de préciser que les données de compatibilité physique ne préservent en rien de la compatibilité chimique (les études de stabilité basées sur la quantification du médicament sont par conséquent indispensables).

La compatibilité visuelle est insuffisante, notamment parce que certaines particules sont invisibles à l'œil nu. Dès lors, les travaux qui traitent de la compatibilité entre les MNP et les médicaments doivent comporter la recherche de précipités. Cependant, dans ce type de travaux, la nature lipidique des MNP ternaires est une entrave majeure pour la recherche de précipités (en raison de l'opacité des émulsions). Dans certaines études de stabilité, il arrive parfois que pour contourner la problématique de l'émulsion, les auteurs remplacent la partie lipidique de la NP ternaire par de l'eau [183]. Dans ce cas, la recherche du précipité est effectuée à partir de la formule sans lipides. La stabilité de l'émulsion (mesure du potentiel zêta, du diamètre des globules, du PFAT5) et la recherche d'apparition de précipité (comptage particulaire, mesure de la turbidité, effet Tyndall) sont alors testées indépendamment. Une autre manière de procéder consiste à préparer un MNP ternaire, y ajouter le médicament puis centrifuger le mélange pour en isoler la partie hydrophile et rechercher l'apparition d'un précipité en s'affranchissant de l'opacité de l'émulsion lipidique [92]. Ce type de démarche ne constitue pas une méthodologie acceptable puisque chaque nutriment ou autre constituant du MNP est

susceptible d'influencer la compatibilité du mélange nutritif avec le médicament co-administré.

Enfin, la plupart des études de stabilité physique portent sur une durée de 4 heures et s'appliquent par conséquent à une administration en Y et non à un ajout direct du médicament dans le MNP.

Le [Tableau VII](#) regroupe les études de stabilité, incluant le dosage du médicament d'intérêt après ajout dans le MNP.

Ces études confirment que dans le cas de l'étude de stabilité d'un médicament dans des MNP ternaires, la quantification de principes actifs médicamenteux peut être compliquée selon les méthodes analytiques habituelles. En effet, des étapes d'extraction semblent indispensables avant l'injection dans un système de chromatographie liquide par exemple. Cependant, les techniques immunométriques, basées sur la reconnaissance antigène-anticorps semblent être un moyen de contourner cette difficulté.

Plusieurs revues systématiques ont été publiées notamment par les membres des sociétés savantes [48,173,175,176,188–190], malheureusement la plupart des publications qui sont référencées concernent des études menées uniquement sur la stabilité physique du MNP. Parmi celles qui ont décrit la stabilité chimique avec quantification du médicament, la plupart concernent des mélanges binaires.

Malgré une littérature de plus en plus riche sur la stabilité, plusieurs écueils sont souvent relevés : essais sur des mélanges en mode statique, absence de détail sur le matériel (composition exacte du mélange de NP, solvant de reconstitution ou dilution du médicament) et/ou les méthodes (méthodes analytiques de dosage du médicament, notion de validation de ces méthodes dans le milieu complexe qu'est la NP).

De plus, la compatibilité avec les dispositifs médicaux d'administration (poche, filtre en ligne, tubulure) doit être étudiée et ce n'est que rarement le cas. En effet, comme précédemment décrit, des phénomènes de sorption du principe actif ou de ses excipients peuvent être observés sur les matériaux plastiques mais également sur le réseau filtrant.

**Tableau VII : Etudes de stabilité de médicaments dans les MNP**

Publication (année)	Nature du MNP (binaire ou ternaire)	Mode d'étude (statique ou dynamique)	Médicament(s)	Traitement pré analytique de l'échantillon	Méthode de dosage du médicament
Tomczak (2019) [191]	Ternaire	Statique (7 j)	Linézolide	Extraction par du n-hexane	HPLC-UV
Costa (1990) [90]	Binaire	Statique (15 j à +4°C puis 24 h à T amb)	Vancomycine	Dilution au 1/6 <sup>ème</sup> dans NaCl 0,9%	Méthode immunométrique par polarisation de fluorescence
Aeberhard (2017) [192]	Ternaire	Statique (7j)	Lévétiracétam	Extraction par un tampon spécifique	HPLC-MS/MS
Garcia (2018) [193]	Ternaire	Statique (4 h)	Ibuprofène	Dilution au 1/50 <sup>ème</sup> dans un mélange MeOH + ACN	HPLC-UV
Baumgartner (1997) [194]	Binaire	Statique	Ranitidine et thiamine	x	HPLC-UV

Publication (année)	Nature du MNP (binaire ou ternaire)	Mode d'étude (statique ou dynamique)	Médicament(s)	Traitement pré analytique de l'échantillon	Méthode de dosage du médicament
Mediavilla (2018) [195]	Ternaire	Dynamique simulée	Amiodarone	Non précisé	HPLC-UV
Schilling (1989) [196]	Binaire	Statique	Vancomycine	Dilution au 1/10 <sup>ème</sup> et au 1/20 <sup>ème</sup> dans le solvant de dilution fourni avec le kit	Méthode immunométrique par polarisation de fluorescence
Stawny (2019) [197]	Binaire et ternaire	Statique	Thiamine	x	HPLC-UV
Stawny (2019) [198]	Ternaire	Statique + simulation dynamique	Ampicilline	Dilution 1/4 avec du chloroforme puis centrifugation	HPLC-UV
Campbell (2019) [199]	Binaire	Statique	Pentoxifylline	X	HPLC-UV

MeOH : methanol ; ACN : acétonitrile ; HPLC-UV : chromatographie liquide haute performance avec détection ultraviolet

## 2. Recommandations concernant l'administration conjointe de mélanges de nutrition parentérale et de médicaments

Le mélange du médicament et de la NP est à envisager avec précaution quand :

- la formulation du médicament comprend des agents solubilisants (*i.e.* éthanol, crémophor...),
- le médicament d'intérêt présente une susceptibilité chimique particulière (majoritairement les médicaments se présentant sous la forme de lyophilisats),
- le médicament est à marge thérapeutique étroite,
- le médicament a une courte demi-vie et son administration à un débit trop lent entraînerait une modification pharmacocinétique trop importante.

En cas d'absolue nécessité d'administration concomitante de médicament et d'un mélange de NP, les principales règles à respecter sont les suivantes [112] :

- la pose d'un cathéter multi-lumière sera préférée (permettant ainsi une administration physiquement séparée),
- l'administration intermittente IV associée à un rinçage suffisant sera favorisée,
- un avis pharmaceutique sera demandé en cas d'ajout du médicament dans le mélange nutritif,
- le médicament sera caractérisé au préalable sur un plan physico-chimique afin d'estimer sa compatibilité potentielle,
- les rapports de concentration médicament/NP seront pris en compte,
- l'ajout du médicament dans le mélange nutritif doit être fait extemporanément, juste avant l'administration de l'ensemble,
- l'effet thérapeutique du médicament après ajout dans le mélange sera évalué par un test de biodisponibilité indirecte,
- l'utilisation de formules standards de NP et de protocoles standards d'administration de médicament permettront d'alimenter les bases de données référentielles.

Le mélange du médicament et de la NP est possible si :

- des données de stabilité sont disponibles (données de la littérature ou expérimentales),
- la formulation du médicament est compatible avec le pH du mélange nutritif,
- il n'y a pas d'excipients incompatibles avec le mélange nutritif (*i.e.* cations divalents),
- le médicament d'intérêt est à marge thérapeutique large,
- l'ajout du médicament dans le mélange nutritif est fait dans le respect des conditions aseptiques et selon un protocole validé par le service pharmaceutique,
- des essais de stabilité simples à mettre en œuvre existent,
- un filtre en ligne est ajouté.

## IV. Complications de la nutrition parentérale

Les complications de la NP peuvent être classées selon 2 catégories : les complications liées au cathéter d'une part et les complications métaboliques d'autre part [200]. La première catégorie comprend les complications mécaniques [201], infectieuses (particulièrement redoutées chez les patients bénéficiant d'une NP) [202,203] et thrombotiques. Concernant les complications métaboliques, des complications hépatobiliaires [204,205], des phénomènes d'hypersensibilité [206], des déséquilibres acido-basiques, un syndrome de renutrition inappropriée [207,208].

Parmi les complications les plus à craindre, la dysglycémie (hypo- ou hyperglycémie) doit faire l'objet d'une attention particulière du praticien hospitalier.

### A. Hypoglycémie

Bien que moins fréquente que l'hyperglycémie, l'hypoglycémie est responsable d'une augmentation de la mortalité à partir d'un seuil de 70 mg/dL, notamment chez les patients de soins intensifs (SI) [209]. Cette augmentation de la mortalité est principalement liée à la survenue de risques cardiovasculaires [210], plus particulièrement d'arythmies cardiaques [211]. Comme pour l'hyperglycémie, la

définition du seuil d'alerte n'est pas identique selon les auteurs [212–216], cependant il est indispensable de la prévenir et de la traiter [217].

La plupart des hypoglycémies survenant dans le cadre d'une NP peuvent être asymptomatiques, ce qui rend l'évaluation de leur prévalence plus difficile [218,219].

Au contraire de l'hyperglycémie, il est difficile d'établir un lien entre NP et hypoglycémie, étant donné que le mélange nutritif constitue un apport massif de glucose. Dans les cas rapportés, l'hypoglycémie a été identifiée à partir de prélèvements biologiques ou de glycémies capillaires alors que les patients étaient cliniquement asymptomatiques. Dans les deux cas, le statut nutritionnel des patients était altéré avant l'instauration de la NP. Cette dénutrition préexistante a eu pour effet d'accroître la sensibilité des récepteurs à l'insuline et lorsque la NP a été initiée, la synthèse d'insuline endogène a eu une action hypoglycémiant démultipliée. De plus, comme vu précédemment dans le paragraphe sur l'hyperglycémie, sa prise en charge implique l'apport exogène d'insuline en parallèle du mélange de NP. Cette insuline exogène a également vu son action démultipliée en raison de l'hypersensibilité des récepteurs hormonaux.

Olveira et al. ont mené des travaux chez les patients traités par NP afin de déterminer la prévalence des hypoglycémies chez ces patients, ainsi que les risques associés [220]. La prévalence de survenue d'une hypoglycémie est beaucoup plus faible (< 3%) que celle des hyperglycémies précédemment décrites. Bien que le suivi par mesure de la glycémie capillaire ait révélé une hypoglycémie chez 6,8% des patients suivis, seuls 2,6% des patients au total ont vécu une hypoglycémie symptomatique. Cette étude a identifié un faible IMC, une importante variabilité glycémique et la durée de la NP totale comme étant des facteurs de risque d'hypoglycémie. L'utilisation d'insuline IV et la variabilité glycémique sont prédictives d'hypoglycémie symptomatique.

Comme pour l'hyperglycémie, l'hypoglycémie bénéficie de recommandations pour sa prise en charge [215].

## B. Hyperglycémie

L'hyperglycémie est une complication fréquente au cours d'une hospitalisation. Sa prévalence est de 46% chez des patients de SI et 32% en dehors de cette population [221].

Si l'on s'intéresse plus particulièrement aux patients bénéficiant d'une NP, l'hyperglycémie est la plus fréquente des complications métaboliques, devant les troubles hydroélectrolytiques [222]. Cette complication survient indépendamment du statut diabétique précédant l'instauration de la NP [201,223] chez près de 50% des patients ayant recours à cette technique de nutrition [224–226]. Cependant, les patients diabétiques ne sont bien évidemment pas épargnés par cette complication, qui est plus facilement détectable dans cette population : des patients traités par NP ont par exemple dû multiplier par deux le nombre quotidien d'unités d'insuline en comparaison à leur insulinothérapie habituelle [227].

Certains paramètres clinico-biologiques permettent de prédire la survenue d'hyperglycémie : les travaux de Martinez *et al.* ont montré qu'un IMC > 25 kg/m<sup>2</sup> multiplie par 10 ce risque, ainsi que l'existence d'une hyperglycémie avant l'instauration de NP qui augmente de 38% ce risque [228]. Bien que l'hyperglycémie touche indifféremment les patients diabétiques ou non, son délai de survenue est plus court chez les patients diabétiques. Dans cette population, l'hyperglycémie est constatée dès l'instauration de la NP contre 2,3 jours en moyenne chez les patients non diabétiques.

L'hyperglycémie est un événement métabolique pouvant survenir en dehors de toute administration de NP, il s'agit alors d'une hyperglycémie induite par le stress, causé par un sepsis sévère par exemple [229]. Celle-ci est majoritairement observée chez les patients de SI. Une blessure ou une pathologie aiguë, induit un stress dans l'organisme qui altère la métabolisation des nutriments : il existe dans ce cas une augmentation de la synthèse endogène de glucose (via une double voie de glycogénolyse et néoglucogénèse) en réponse au relargage d'hormones de contre-régulation (glucagon, cortisol, catécholamines, hormone de croissance)[230].

L'administration de NP conduit à la perfusion intraveineuse de glucose. Cette voie permet une biodisponibilité totale mais entraîne le shunt de l'effet de premier passage hépatique qui augmente le risque d'hyperglycémie. La quantité de glucose apportée par le mélange de NP est directement lié à la survenue d'une hyperglycémie et à l'intensité de cette dernière chez les patients non diabétiques hospitalisés en soins intensifs [223].

D'autre part, la tolérance au glucose dépend du débit d'administration de la NP (une perfusion à débit élevé sera plus à risque de causer une hyperglycémie) et des prédispositions du patient, notamment de la capacité à procéder à l'oxydation du glucose. Cette fonction métabolique est diminuée lorsque le patient subit un stress hypermétabolique (c'est le cas lors d'une défaillance d'organe, un sepsis ou en SI [231]), chez les patients ayant une pathologie altérant l'efficacité de l'insuline (diabète, pancréatite aiguë), chez les patients âgés [232], ou encore chez les patients traités par un médicament altérant le métabolisme du glucose (i.e corticoïdes, tacrolimus, catécholamines).

L'hyperglycémie peut avoir des conséquences délétères, qu'elle soit liée à la NP ou non. Dans les études s'intéressant à l'hyperglycémie non causée par l'administration de NP, il a été prouvé qu'il existait un lien entre la présence d'une hyperglycémie et une augmentation de la mortalité. Ces études étaient centrées sur différentes typologies de patients :

- La persistance d'une hyperglycémie sur une période de 30 jours chez les patients ayant subi un accident vasculaire cérébral ischémique aigu entraîne une multiplication du taux de mortalité par 24 [233].
- La mortalité est supérieure chez les patients ayant eu un infarctus du myocarde lorsqu'ils ont un statut hyperglycémique [234].
- L'hyperglycémie augmente de 73% le risque de mortalité et de 53% le risque de survenue de complications au cours de l'hospitalisation [235].
- Des taux glycémiques extrêmes (hypo- < 65 mg/dL ou hyper- 200 mg/dL) sont prédictifs de décès à la sortie des soins intensifs avec une haute spécificité [236].
- La mortalité à 6 mois est plus importante en cas d'hyperglycémie, quel que soit le statut diabétique ou non des patients [237].

L'un des risques associés avec l'hyperglycémie est le risque cardiaque. Dans une étude menée chez des patients souffrant d'affection myocardique aiguë, une augmentation de 48% du risque de tachycardie ventriculaire a été observée en cas d'hyperglycémie [238].

Le fonctionnement du système immunitaire est également diminué en cas d'hyperglycémie persistante [239,240]. En effet, cet état biologique peut affecter les composants de la réponse immunitaire et induire une glycosylation aberrante des protéines, enzymes et immunoglobulines intervenant dans l'immunité adaptative [241]. L'immunosuppression qui en résulte est d'ailleurs associée à de moins bons résultats cliniques chez les patients [242], notamment en favorisant la survenue d'infections [243].

Enfin, l'hyperglycémie est associée à une neurotoxicité ayant pour mécanisme identifié l'altération des astrocytes et des neurones de la microglie [244,245]. Les conséquences délétères de cet état biologique ont déjà été décrites dans des travaux incluant des patients victimes de traumatismes cérébraux [246,247].

De récentes études ont étendu l'analyse des complications en s'intéressant à l'impact de la variabilité glycémique. L'une d'entre elles, menée chez des patients déjà atteints d'une infection aiguë (de localisation respiratoire, urinaire, cutanée ou des tissus mous) a établi un lien entre l'importance de la variabilité glycémique et le taux de bactériémies, la mortalité à 30 jours et la diminution du taux de survie à 5 ans, chez des patients diabétiques ou non [248].

De nombreuses études se sont intéressées aux conséquences de l'hyperglycémie provoquée par l'administration de NP. Une importante proportion d'entre elles a été menée dans une population de patients de SI étant donné que ce type de patient nécessite souvent une NP afin de garantir un apport nutritionnel suffisant à des patients dont les besoins énergétiques sont très fortement augmentés et pour lesquels la NE est trop à risque de provoquer une pneumopathie d'inhalation.

Bien que la définition de l'hyperglycémie ne soit pas identique dans tous ces travaux et que les différents paramètres étudiés soient variables (durée de la NP, apport calorique,

population de SI ou non, préexistence d'un diabète ou non), de grandes tendances sont retrouvées et doivent être prises en considération. L'hyperglycémie est étroitement associée à une augmentation de la mortalité et de la morbidité chez les patients recevant de la NP [249] (tant chez les patients de SI que chez les patients de services de médecine-chirurgie-obstétrique) ou du glucose IV [250]. En effet, les taux de mortalité sont de 2 à 11 fois plus élevées en cas d'hyperglycémie associée à la NP qu'en l'absence d'hyperglycémie. Plusieurs travaux s'intéressant à cette association ont été publiés ces dernières années [124–126,141,142]. Le **Tableau VIII**, élaboré par Drincic *et al.* synthétise les résultats de ces publications [253].

**Tableau VIII : Hyperglycémie et mortalité chez les patients recevant de la NP**

	Cheung <i>et al.</i> [227]	Lin <i>et al.</i> [251]	Sarkisian <i>et al.</i> [225]	Pasquel <i>et al.</i> [254]	Llop <i>et al.</i> [255]	Olveira <i>et al.</i> [252]
Effectif (nombre de traitements par NP)	122	457	100	276	119	605
Seuils glycémiques étudiés (mg/dL)	< 125 vs > 164	< 114 vs > 180	> 180	< 120 vs >180	> 180	< 140 vs > 180
OR de la mortalité dans le groupe hyperglycémie <i>versus</i> autre groupe (95% IC)	10,9 (2,0 – 60,5)	5,0 (2,4 -10,6)	7,22 (1,08 – 48,3)	2,8 (1,2 – 6,8)	23,2 (2,55 – 209,98)	5,6 (1,47 – 21,4)

Dans les travaux d'Olveira *et al.* concernant des patients hospitalisés dans des unités hors SI, certains facteurs de risque de dépasser le seuil de glycémie de 180 mg/dL (responsable d'une mortalité multipliée par 5,6) ont d'ailleurs été identifiés : il s'agit d'un taux de CRP élevée, l'âge > 65 ans, l'existence d'un diabète, de complications infectieuses ou la perfusion de grandes quantités de glucose [252].

L'augmentation de la mortalité n'était pas retrouvée dans l'étude de Llop *et al.* qui était pourtant basée sur le même seuil d'hyperglycémie. Cependant une forte association a été rapportée entre glycémie > 180 mg/dL et allongement de la durée de séjour ou encore admission en SI (risque multiplié par 23) [255].

Tout comme pour l'hyperglycémie non iatrogène, une hyperglycémie > 142 mg/dL associée à l'administration de NP augmente globalement la survenue de complications [227]. Ensuite, plus le niveau d'hyperglycémie augmente, plus les complications observées sont spécifiques : survenue d'infection (en particulier de septicémie), ainsi que dysfonction d'organe.

Sur ce dernier point, une étude a mis en évidence que chaque palier d'augmentation de 10 mg/dL de la glycémie au-delà de 114 mg/L est responsable d'une augmentation de 10 % du risque de complications cardiaques (OR 1,1 IC95 1,03 - 1,17), de 8% de la détresse respiratoire (OR 1,08 IC95 1,02 - 1,14) ou encore de 7% pour l'insuffisance rénale aiguë (OR 1,07 IC95 1,03 - 1,11) [251]. Dans les travaux de Cheung *et al.*, l'association entre hyperglycémie et insuffisance rénale aiguë devient significative à partir de 165 mg/dL [227].

La dysfonction cardiaque, qui fait partie des complications décrites en lien avec l'hyperglycémie iatrogène a également fait l'objet d'études. La survenue de problèmes cardiaques dans les 45 jours chez des patients âgés ayant un état hyperglycémique sous NP est augmentée de 62% et la gravité de ces complications est significativement plus importante si la glycémie est > 200 mg/dL [256].

En dehors de ces complications organiques, les complications infectieuses sont une préoccupation chez les patients traités par NP. En effet, bien que, comme décrit dans le chapitre sur les conséquences de la dénutrition, un état nutritionnel adéquat soit essentiel pour maintenir un système immunitaire compétent, un apport excessif de glucose conduisant à un état d'hyperglycémie peut également être néfaste et se traduire par une immunosuppression. Un allongement de la durée des infections a d'ailleurs été mis en évidence chez des patients traités par NP, bénéficiant d'une greffe de cellules souches hématopoïétiques [257,258]. Cependant cette relation est aujourd'hui

controversée [259]. Une étude menée dans la population pédiatrique de soins intensifs a mis en évidence un mortalité 1,9 fois plus élevée chez les patients ayant une infection liée au cathéter concomitante à l'hyperglycémie [260]. L'hyperglycémie multiplie par 5 le nombre d'infections sur cathéter chez les patients diabétiques. Dans les travaux précédemment cités, Lin *et al.* ont conclu à une augmentation de 9% du risque d'infection par palier de 10 mg/dL à partir de 114 mg/dL [260] tandis que l'augmentation des risques infectieux devenait significative à partir de 165 mg/dL dans l'étude de Cheung *et al.* [227].

Les complications observées chez les patients ayant une hyperglycémie iatrogène liée à la NP sont comparables à celles des patients diabétiques. La probabilité de survenue de complications induites par l'hyperglycémie dépend des affections concomitantes, de la durée de la NP et de la durée de vie du patient.

En raison des nombreux effets indésirables de l'hyperglycémie iatrogène causée par l'administration de NP chez des patients diabétiques ou non, il est indispensable de prévenir et traiter cette hyperglycémie. Les objectifs glycémiques ainsi que les moyens mis en œuvre seront détaillés dans le paragraphe suivant.

## V. Nutrition parentérale et insuline : une relation complexe

### A. Prise en charge de l'hyperglycémie : pourquoi ?

Comme cela a déjà été détaillé dans le paragraphe précédent, l'hyperglycémie est responsable d'une augmentation de la morbi-mortalité, ainsi que de nombreuses complications, pour tous les patients, qu'ils soient hospitalisés en services de SI ou non et qu'ils soient diabétiques ou non. Le contrôle de l'hyperglycémie est associé à de meilleurs résultats cliniques. Dès lors, il apparaît indispensable en premier lieu de prévenir l'hyperglycémie et de la traiter en cas de survenue.

Il existe différentes approches pour prévenir l'hyperglycémie durant l'administration de NP [253] :

- diminution de l'apport de glucose dans le mélange nutritif (limitation à 4 mg/kg/min ou à 150-200 g/jour [261] ;
- diminution des calories contenues dans le mélange de NP : emploi de mélanges hypocaloriques de NP (soit  $\leq 20$  kcal/kg/jour et ne couvrant pas plus de 80% des besoins énergétiques) [229]. Cette démarche permet d'ajuster la quantité de glucose perfusé à la consommation du cerveau et aux besoins des fonctions cellulaires de base ;
- emploi d'hydrates de carbone non glucosés dans la NP ; cependant une étude employant un mélange glucose-fructose-xylitol en ratio 2:2:1 n'a pas démontré de plus-value par rapport au glucose en termes de moindre hyperglycémie et de recours à l'insuline [262] ;
- combinaison de la NE et de la NP : dans ce cas, si la NE apporte 30% des besoins nutritionnels, cela permet de d'obtenir des glycémies plus basses, de diminuer la résistance à l'insuline, d'augmenter la sécrétion d'incrétines et d'améliorer la perméabilité intestinale [263] ;
- apport concomitant d'insuline exogène, lorsque les précédentes stratégies n'ont pas suffi [264].

Le choix de la stratégie de prévention de l'hyperglycémie dépend de l'existence ou non d'une politique commune à l'établissement et des recommandations des équipes de soins nutritionnels.

## 1. Cibles glycémiques

Concernant les cibles glycémiques, la variabilité est moindre que pour les stratégies de prévention de l'hyperglycémie. Cependant, elles doivent être adaptées à la situation clinique du patient.

Pour toute prise en charge, il existe un double objectif : limiter la variabilité glycémique et se situer dans une cible thérapeutique de glycémie [265].

Des études menées dans une population de patients de SI ont mis en évidence que l'augmentation de la maîtrise de la glycémie par de l'insuline en post-opératoire réduit à la fois la mortalité mais également la morbidité [266,267].

Pour une catégorie de patients donnée, les cibles glycémiques sont les mêmes, quelle que soit l'origine de l'hyperglycémie (iatrogène au cours de l'administration de NP, due au stress physiopathologique, ou encore d'origine diabétique entre autres). Cependant ces cibles glycémiques peuvent varier selon la prise en charge thérapeutique du patient.

Choix des cibles glycémiques en fonction de la population d'intérêt :

Selon les différents essais cliniques publiés à propos du contrôle glycémique chez les patients hospitalisés, il est possible de distinguer deux catégories [268] :

- le contrôle glycémique conventionnel correspondant à une cible de glycémie < 180 mg/dL ou entre 140 et 180 mg/dL

ou

- le contrôle glycémique intensif dont la cible est comprise entre 81 et 108 mg/dL.

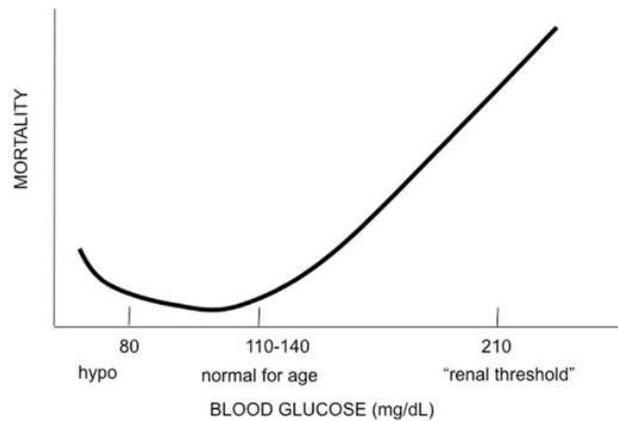
Dès lors, il apparaît important d'adapter la cible glycémique en fonction du type de patient concerné. La plupart des travaux publiés concerne les patients de SI. Une partie de ces travaux semble converger vers un contrôle glycémique intensif, une meilleure guérison étant liée à un contrôle rigoureux de la glycémie [201]. L'un de ces travaux a comparé l'efficacité d'un protocole intensif d'insulinothérapie à un protocole

conventionnel chez des patients hospitalisés en SI [242]. L'insulinothérapie intensive a permis selon cette étude, de réduire la mortalité de 43% en SI et de 34% la mortalité globale hospitalière. Cette efficacité s'est manifestée par une diminution de 46% du risque d'infection sévère ainsi que du recours à une antibiothérapie de 10 jours mais serait davantage liée au contrôle des niveaux glycémiques plutôt qu'à l'apport en insuline. Une étude similaire a été menée quelques années plus tard et a montré un effet encore plus prononcé et prolongé dans un échantillon de patients de SI chirurgicaux que de SI médicaux ; cet effet bénéfique pouvant perdurer jusqu'à 4 ans après la sortie d'hospitalisation [269]. Cependant les résultats de cette étude multicentrique en ouvert sont controversés en raison de la méthodologie mais également du taux élevé de mortalité dans les deux bras de l'étude.

A l'opposé de ces études, d'autres travaux concluent à la nécessité d'une prudence vis-à-vis de l'insulinothérapie intensive. En effet, non seulement ce protocole n'a pas de bénéfice sur la mortalité globale, mais son utilisation aurait même tendance à augmenter la mortalité des patients à 30 jours. Ceci s'expliquerait entre autre par l'augmentation de l'incidence des hypoglycémies [270–272]. Des travaux complémentaires ayant étudié une cible glycémique < 110 mg/dL ont renforcé cet argument, en soulignant que plus la cible glycémique est difficile à atteindre, plus le risque de survenue d'hypoglycémie sévère est important [273–276]. La revue de littérature de Devos *et al.*, recommande par conséquent un contrôle glycémique plus modéré (140 – 180 mg/dL) permettant un meilleur rapport bénéfice/risque [277].

En résumé, en raison de la relation qui existe entre la glycémie et la mortalité (Figure 12) il semble raisonnable d'envisager une approche moins stricte concernant les objectifs glycémiques, le protocole d'insulinothérapie devant être suffisant pour éviter une hyperglycémie, mais également adapté pour limiter la survenue d'une hypoglycémie tout aussi délétère.

Quelques études ont été menées chez des patients hospitalisés en dehors des services de SI [278]. L'objectif glycémique retenu pour ces patients est < 180 mg/dL.



**Figure 12** : Relation entre mortalité et glycémie chez les patients de soins intensifs [211]

Outre la population ciblée, il est important de connaître le mode d'administration de la nutrition artificielle afin de choisir une fourchette d'objectif glycémique adaptée au moment de mesure de la glycémie. En cas d'administration discontinue, il sera indispensable de distinguer une mesure glycémique avant administration de la nutrition (cette mesure permettant d'obtenir une glycémie à jeun, encore appelée préprandiale) d'une mesure glycémique pendant ou rapidement après administration (dite glycémie post-prandiale). Les objectifs de glycémie préprandiale doivent logiquement être inférieurs aux objectifs postprandiaux.

En se basant sur les données publiées, les sociétés savantes ont émis des recommandations à propos des cibles glycémiques. Celles-ci sont détaillées dans le [Tableau IX](#).

Pour les patients nécessitant une nutrition artificielle au long cours, il est également possible d'effectuer le suivi glycémique global en effectuant des dosages réguliers d'hémoglobine glyquée (HbA1c) (leur fréquence étant habituellement trimestrielle). Les résultats de ces dosages doivent selon les recommandations de l'ESPEN, se situer entre 6,5 et 7,5% [59].

**Tableau IX : Recommandations des sociétés savantes pour les cibles glycémiques**

<b>Société savante</b>	<b>Cible glycémique</b>	<b>Patients cibles</b>
ASPEN [215]	140 – 180 mg/dL hypoglycémie < 70 mg/dL	Hors SI
SCCM [279]	150 – 180 mg/dL	Patients de SI (hors chirurgie cardiaque et traumatisés crâniens)
Groupe GARIN [280]	<ul style="list-style-type: none"> <li>• si nutrition artificielle continue : 140 – 180 mg/dL</li> <li>• si nutrition artificielle discontinuée : glycémie à jeun entre 100 et 140 mg/dL, glycémie post prandiale entre 140 et 180 mg/dL</li> </ul>	Hors SI, ayant diabète ou hyperglycémie de stress et nutrition artificielle
SFNCM [281]	<ul style="list-style-type: none"> <li>• objectifs glycémiques stricts : 80 – 130 mg/dL à jeun ou &lt; 160 – 180 mg/dL en post-prandial</li> <li>• objectifs glycémiques larges : 100 – 150 mg/dL à jeun ou 150 – 250 mg/dL en post-prandial</li> </ul>	
<b>Société savante</b>	<b>Cible glycémique</b>	<b>Patients cibles</b>
AACE / ADA [268]	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) 140 – 180 mg/dL</li> <li>2) 110 – 140 mg/dL</li> <li>3) Glycémie préprandiale &lt; 140 mg/dL ; glycémie postprandiale &lt; 180 mg/dL</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) Patients de SI</li> <li>2) Patients de SI ayant subi chirurgie cardiaque ou ayant contrôle glycémique stable sans hypoglycémie</li> <li>3) Patients hors SI</li> </ol>
ESPEN [59]	Glycémie postprandiale < 180 mg/dL	Patients de NPAD

## 2. Quand débiter l'insuline ?

Comme cela a été détaillé dans le paragraphe précédent, les cibles glycémiques peuvent être variables. Cependant il est important de traiter l'hyperglycémie avant que celle-ci n'atteigne un niveau délétère pour le patient.

L'hyperglycémie, quelle que soit son origine, peut être prise en charge de plusieurs manières chez les patients recevant de la nutrition artificielle : soit en diminuant l'apport de glucose dans la nutrition, soit en instaurant un apport exogène d'insuline.

Partant du constat que l'hyperglycémie est délétère, il semble évident que limiter l'apport en glucose dans la nutrition artificielle devrait suffire à limiter la survenue d'hyperglycémies. Cependant deux paramètres sont à prendre en compte :

un état inflammatoire ou pathologique augmente l'apport calorique nécessaire pour un patient. Or, les nutriments ayant le plus important rendement calorique sont les lipides et ils ne peuvent pas être apportés en proportion trop importante dans les mélanges de NP. Le glucose est par conséquent le second nutriment fixant l'apport calorique et il n'est donc pas possible d'en diminuer la quantité de manière drastique.

Certains auteurs soulignent que ce n'est pas uniquement l'absence d'hyperglycémie, mais également l'apport d'insuline qui aurait des effets bénéfiques [268]. Ces derniers sont attribués à ses effets anti-inflammatoires, vasodilatateurs et antioxydants ainsi qu'à sa capacité à inhiber la lipolyse et l'agrégation plaquettaire. Une étude a rapporté que des taux élevés de cytokines et de marqueurs inflammatoires, associés à une hyperglycémie sévère, revenaient à la normale après un traitement par de l'insuline et la résolution de l'hyperglycémie [282]. L'insuline agit en supprimant les hormones de contre-régulation et les facteurs de transcription pro-inflammatoires, voire même en annulant la synthèse des espèces réactives de l'oxygène.

Dès lors, l'apport d'insuline semble l'option la plus appropriée parmi les deux propositions formulées ci-dessus. En effet, elle permet de ne pas modifier l'apport en glucides du patient, tout en facilitant leur assimilation par l'organisme.

Comme décrit précédemment, il existe des cibles glycémiques en fonction des populations de patients étudiées. Des facteurs prédictifs des besoins en insuline ont été identifiés parmi une cohorte de patients hospitalisés recevant de la NP [230]. Ceux-ci sont fortement corrélés au diabète, au statut pondéral (surpoids ou obésité), à l'hospitalisation en SI, à l'existence d'une glycémie > 120 mg/dL le jour de l'initiation de la NP, une glycémie moyenne > 180 mg/dL pendant l'administration de la NP ou une HbA1c > 5,7%. Cependant, seuls l'HbA1c > 5,7%, le séjour en SI, le diabète et la glycémie > 120 mg/dL le jour de l'instauration de la NP sont prédictifs du recours à l'insuline.

Par la suite, des protocoles d'insulinothérapie, associés à une surveillance glycémique accrue ont été développés pour permettre d'atteindre les cibles décrites [283].

En revanche, le calcul de la dose et le protocole mis en œuvre varient en fonction des établissements. L'obtention d'un contrôle glycémique optimal peut prendre plusieurs jours chez les patients sous NP, étant donné que le glucose est titré pour fournir les besoins en énergie optimum, et que les doses d'insuline sont ajustées [268,280,284].

## **B. Types d'insuline employés et modalités d'administration**

La SFNCM a émis des principes de prise en charge de l'hyperglycémie au cours de la nutrition artificielle [136]. Les objectifs énoncés dans ces recommandations sont d'éviter le risque d'hypoglycémie et d'être plus efficace tout en facilitant l'adaptation des doses d'insuline.

Cependant, dans le cas de l'administration sous-cutanée (SC) d'insuline, il ne faut pas exclure le risque d'erreur d'administration dont le patient lui-même serait à l'origine (en sélectionnant par exemple un nombre d'unités incorrect).

Une autre situation pouvant conduire à une hypoglycémie chez le patient serait l'interruption non initialement prévue de la NP. Dans ce dernier cas de figure, si le recours à la voie orale n'était pas envisageable, il serait alors difficile de compenser l'action de l'insuline déjà administrée par voie SC.

Dès lors, les règles dictées par la SFNCM sont :

- de choisir convenablement l'insuline administrée parmi les spécialités pharmaceutiques disponibles, afin de permettre l'adéquation entre la durée d'action de l'insuline et la durée d'administration du mélange de la NP,
- de fractionner la dose quotidienne d'insuline et de procéder à une injection avant chaque branchement de la poche de nutrition.

Dans les paragraphes suivants, nous allons détailler les données cliniques et *in vitro* disponibles à propos de la co-administration de MNP et d'insuline.

## 1. Modalités d'administration de l'insuline

Selon la situation physiopathologique du patient ou encore la typologie du service de soins, la prévention ainsi que le traitement de l'hyperglycémie ne sont pas menés dans les mêmes conditions. Une recherche bibliographique a permis d'appréhender la diversité des protocoles employant l'insuline conjointement à la NP. A chaque situation décrite, des effets indésirables ont été observés.

### *a. Essais cliniques concernant l'efficacité de l'insuline dans la prise en charge de l'hyperglycémie chez les patients traités par nutrition parentérale*

Comme nous l'avons décrit précédemment, les cibles glycémiques peuvent varier selon les recommandations des sociétés savantes. Cette variabilité est retrouvée dans les études cliniques concernant la prise en charge de l'hyperglycémie chez les patients traités par NP, tant dans les cibles glycémiques visées que dans les protocoles d'administration de l'insuline. Le [Tableau X](#) reprend les types d'insuline, leur voie/mode d'administration ainsi que les effets indésirables observés au cours des études cliniques.

Les différentes voies d'administration de l'insuline testées dans ces études étaient la voie IV (perfusion isolée, en Y du MNP ou encore ajout direct dans le MNP) et la voie sous-cutanée, parfois en combinaison.

Il semble difficile d'harmoniser les conditions et les paramètres étudiés et ce pour plusieurs raisons.

Concernant les insulines administrées, il s'agissait majoritairement d'insuline à action rapide (insuline humaine biosynthétique, ou encore ses analogues rapides tels l'insuline asparte). Cependant, les recommandations ADI-AMD sur le traitement par insuline chez les patients recevant de la nutrition artificielle [286] soulignent que les analogues d'action longue peuvent être utilisés chez des patients stables si la nutrition est administrée à l'aide d'une pompe péristaltique. Parmi les travaux cités dans le tableau X, quelques-uns ont d'ailleurs porté sur l'administration d'analogues de durée d'action intermédiaire, voire longue [280,287-291]. En revanche, ces types d'insulines étaient rarement administrés dans le MNP, mais plutôt en SC.

**Tableau X :** Etudes cliniques portant sur l'utilisation d'insuline dans la prise en charge de l'hyperglycémie induite par la nutrition parentérale

Référence	Population	Mode d'administration	Type d'insuline	Dose d'insuline	Effets indésirables	Conclusions
Kinnare (2013) [292]	Patients diabétiques ou non ayant reçu insuline pour traiter une hyperglycémie sous NP (n = 1657 patients dont 382 diabétiques)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Perfusion continue d'insuline</li> <li>- Insuline LDA SC</li> <li>- Insuline dans la poche de NP</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Perfusion : insuline humaine</li> <li>- Dans la NP : Insuline humaine ou LDA</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Dose basée sur les précédents besoins</li> <li>- Dose/kg</li> <li>- Dose/g de glc dans la poche de NP (0,05-1 UI/g de glc)</li> </ul>	Hypoglycémie : augmentation du risque avec la durée de la NP, le nombre de jours avec de l'insuline, si calcul de la dose/kg ou en fonction des précédents besoins et si perfusion continue	Préférer le calcul de dose selon l'apport de glc dans la NP et l'ajout dans la poche de NP afin d'éviter les hypoglycémies
Olveira (2013) [293]	Patients hors SI ayant diabète ou hyperglycémie de stress et NP (n NC)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Insuline dans la poche de NP ± compléments SC /4-8 h</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Insuline humaine dans la poche</li> <li>- Analogue rapide ou NPH en SC</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Patients diabétiques : 0,7-0,8 UI/kg/j ou 0,3 UI/g de glucose dans la NP</li> <li>- Si HG de stress : 0,1 à 0,15 UI /g de glucose</li> <li>- 2/3 de la dose d'insuline calculée (1UI/5 à 20g de glucose) sont ajoutés dans la poche (insuline humaine). Le 1/3 restant est administré en SC sous la forme d'insuline NPH / 6-8h.</li> </ul>		<p>Recommandation d'ajout d'insuline humaine dans la poche et compléments par insuline humaine en SC/6-8 heures, avec ajustement de la dose totale si HG &gt; 140 mg/dL. Si objectifs non atteints, ajout dans la poche des 2/3 de l'insuline ajoutée en rattrapage.</p> <p>Risque d'hypoglycémie faible car arrêt de la perfusion d'insuline quand suspension de la NP.</p> <p>Insuline IV nécessaire si HG non maîtrisée.</p>

Référence	Population	Mode d'administration	Type d'insuline	Dose d'insuline	Effets indésirables	Conclusions
Gosmanov (2014) [261]	Patients ayant hyperglycémie sous nutrition artificielle (n NC)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- SC</li> <li>- IV</li> <li>- Insuline dans la poche</li> </ul>	Insuline humaine	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Insuline 1 UI/11g de glucose pour les patients diabétiques ayant NPT</li> <li>- Insuline 1 UI/ 15 à 20 g de glucose ou dose totale quotidienne de 0,1 à 0,5 UI/kg/j pour les patients non diabétiques</li> </ul>		Perfusion IV préférable pour patients SI ou hémodynamiquement instables
McMahon (2004) [294]	Patients diabétiques recevant NP en service de médecine aiguë ou en SI (n NC)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Insuline dans la poche de NP (unité de médecine aiguë)</li> <li>- Perfusion d'insuline en SI</li> </ul>	Insuline humaine	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 0,1 UI d'insuline / g de glc dans la poche de NP ± insuline SC en rattrapage si besoin</li> </ul> protocole d'insulinothérapie		L'ajustement de la dose d'insuline dans la poche de NP doit suivre la teneur en glucose du mélange de NP
McCowen (2004) [295]	Patients de SI (n NC)			Insuline humaine 1 UI/mL dans SSI		Perfusion d'insuline séparée de la NP préférable chez patients de SI
Roehl (2013) [230]	Patients hospitalisés sous NP (n = 1388)	Insuline dans la poche de NP	Insuline humaine	<ul style="list-style-type: none"> <li>- si diabète connu : 1 UI/10g de glucose</li> <li>- si patient non diabétique : 5 UI/g de glucose</li> </ul>	Survenue de quelques hypoglycémies ou hyperglycémies	Insuline dans la poche possible mais ajustements nécessaires en fonction de la glycémie

Référence	Population	Mode d'administration	Type d'insuline	Dose d'insuline	Effets indésirables	Conclusions
Madsen (2006) [296]	Patients recevant NP	- Insuline dans la poche de NP - Insuline IV	Insuline humaine	- si diabète connu : 1 UI/10g de glucose, voire 1,5-2 UI/10g de glucose si la glycémie est > 200 mg/dL		Administration IV ou dans la poche possible. Si passage de l'IV à l'ajout dans la NP, la dose dans la NP doit représenter les 2/3 de la dose administrée par perfusion.
Neff (2014)	Patients (hors SI) ayant HG sous NP (n = 53)	Insuline IV <i>versus</i> SC	- Insuline IV - SC : analogue rapide d'insuline en bolus + insuline basale		Pas de différence significative dans la survenue d'hypoglycémies	L'administration IV permet l'obtention d'une glycémie moyenne plus basse ainsi qu'une durée dans la cible glycémique plus longue
Sajbel (1986) [297]	Patients (diabétiques ou non) sous NP ayant HG > 200 mg/dL (n=16)	Perfusion IV d'insuline en Y de la NP puis ajout de l'insuline dans la NP lorsque la glycémie était équilibrée	- Patients diabétiques : mélange d'insulines de bœuf et de porc - Patients non diabétiques : insuline humaine ou de porc  Insuline à 0,5 ou 1 UI/mL dans SSI	Si HG > 200 mg/dL quand 75% de la NP administrée, perfusion en Y. De 1 à 5 UI/h selon le niveau glycémique	Rares évènements hypoglycémiques dus à la perfusion d'insuline sans administration de NP.	Avec la perfusion en Y, 73% des 636 mesures de glycémie étaient dans la cible 100-250 mg/dL. Aucune mesure n'était < 50 mg/dL. Ce mode de perfusion permet d'atteindre plus rapidement les cibles glycémiques car il n'est pas nécessaire d'attendre le changement de poche de NP pour ajuster l'apport en insuline. Cette méthode est également plus économique que l'ajout direct dans la NP. Cependant des précautions sont nécessaires pour ne pas laisser l'insuline perfusée sans NP.

Référence	Population	Mode d'administration	Type d'insuline	Dose d'insuline	Effets indésirables	Conclusions
Fatati (2014) [287]	Patients (diabétiques ou non) recevant de la NP et ayant 2 glycémies > 120 mg/dL (n=18)	- SC, 2injections/j	Insuline lispro protamine	2 injections par jour de 0,1 U/g de glucose perfusé si la glycémie est < 150 mg/dL ; 0,15 U/g de glucose si glycémie > 150 mg/dL		L'emploi d'insuline lispro permet de diminuer la glycémie moyenne des patients entre J0 et J5. La variabilité glycémique est également diminuée.
Ramos (2018) [278]	Patients de services de chirurgie, diabétiques ou non (n= 80)	SC	Insuline glargine (basale) et lispro (rattrapages/6h si glycémie > 180 mg/dL).	Schéma basal bolus. Dose totale quotidienne d'insuline de 0,4 U/kg/j.	22,5% des patients ont présenté une hypoglycémie modérée (< 70 mg/dL), et 7,5% un épisode d'hypoglycémie sévère (< 40 mg/dL), essentiellement lorsque la NP était interrompue.	Cette étude confirme que ce schéma basal bolus est efficace pour atteindre les cibles glycémiques chez les patients hospitalisés. Cependant seuls 50% des patients ont atteint la cible < 180 mg/dL.
Olveira (2019) [290]	Patients diabétiques type 2, hors SI (n = 149)	- Insuline dans la poche de NP - SC + dans NP	100% d'insuline humaine dans la poche de NP vs 50 % insuline glargine SC (basale) + 50% humaine dans NP	Détermination d'une dose-poids d'insuline (de 0,2 à 0,5 U/kg selon l'expérience du médecin). Correction si G > 140 mg/dL ou < 100 mg/dL.		Pas de différence significative dans l'atteinte du contrôle glycémique entre les 2 méthodes. Cependant la proportion d'hypoglycémies et le nombre d'évènements hypoglycémiques/100 jours était statistiquement plus important dans le groupe glargine. La glycémie était d'ailleurs plus basse à l'issue de l'étude dans le groupe glargine.

Référence	Mode d'administration	Type d'insuline	Dose d'insuline	Effets indésirables	Conclusions
Hakeam (2017) [289]	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Dans la poche de NP</li> <li>- SC</li> </ul>	<p>Schéma basal (faisant suite à 4 jours de schéma en escalade)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Insuline humaine dans NP</li> <li>- Glargine 1/j en SC</li> </ul>	Doses moyennes (non précisées)	Proportion d'hyperglycémies non contrôlées plus fréquentes dans le groupe glargine.	Pas de différence significative entre les 2 protocoles pour le contrôle glycémique (52,24% vs 47,76%). En revanche, la différence glycémique entre J4 et J9 était significativement plus importante dans le groupe glargine.
Truong (2019) [291]	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Dans la poche de NP</li> <li>- SC</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Insuline aspartate dans NP</li> <li>- Insuline glargine en SC</li> </ul>	Dose définie à partir d'une échelle d'escalade basée sur l'IMC ou les besoins quotidiens en insuline (échelle légère pour IMC < 25 kg/m <sup>2</sup> et/ou besoin < 50 U d'insuline/j; échelle moyenne si IMC 25-30 kg/m <sup>2</sup> et/ou 50-90 U d'insuline/j; échelle renforcée si IMC > 30 kg/m <sup>2</sup> et/ou > 90 U d'insuline/j)	Proportion significativement plus importante de survenue d'une hypoglycémie dans le groupe glargine (45,5% vs 20%)	Proportion de normoglycémie plus importante dans le groupe insuline dans NP (71,8%) que dans le groupe glargine SC (48,6%). Pas de différence dans le temps moyen nécessaire à atteindre la normoglycémie. La dose moyenne d'insuline nécessaire était supérieure dans le groupe insuline dans la NP.
Oghazian (2015) [298]	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) Insuline dans la poche de NP pendant 3 à 5 jours puis</li> <li>2) - Insuline dans NP</li> <li>- Insuline SC</li> </ol>	<p>Pour la seconde étape :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- insuline humaine dans la poche de NP: 100% de la dose présente dans le poche avant</li> </ul>	Dose en fonction de la glycémie (de 5 à 15 UI/g de glucose dans la NP au départ) puis adaptation en fonction des valeurs glycémiques obtenues		Variabilité glycémique moindre avec l'insuline dans la NP. Valeurs glycémiques moyennes comparables entre les 2 groupes.  Les patients du groupe SC ont nécessité davantage de doses de rattrapage que ceux du groupe insuline dans la NP. La glargine en SC est équivalente en terme

Référence	Population	Mode d'administration	Type d'insuline	Dose d'insuline	Effets indésirables	Conclusions
McCulloch (2019) [299]	Patients de NPAD avec diabète de type 1 ou diabète post pancréatectomie Durée > 3 ans (n = 4)	Insuline dans la poche de NP (avec rattrapages en SC)	Insuline humaine + insuline NPH en SC	2/3 de la dose administrée en IV la veille sont ajoutés dans la poche de NP 1 UI d'insuline/ 9 à 20 g de glucose dans la NP		Efficacité de l'ajout d'insuline dans la poche. Les patients ont tous préféré cette méthode leur permettant un meilleur équilibrage de leur glycémie avec moins de contrôles glycémiques, d'injections SC et un moindre impact sur leur qualité de vie.
Jakoby (2012) [216]	Patients sous NP ayant glycémie > 140 mg/dL (n = 55)	- Insuline dans NP (+ SC de rattrapage) - Protocoles institutionnels pré existants (insuline SC, insuline dans la NP, échelle d'escalade	2/3 de la dose d'insuline = insuline humaine dans la NP et 1/3 en insuline NPH répartie en 4 administrations SC	Ratio 1 UI d'insuline/20 g de glucose pour les patients non diabétiques. Si plus de la moitié des glycémies est > 140 mg/dL, ratio de 1U/15 g de glucose à partir du J2. Pour les patients diabétiques, ratio 1 U insuline/ 10 g de glucose.	Hypoglycémie plus fréquente dans le groupe insuline (3%) que dans le groupe contrôle (1%), sans aucun épisode d'hypoglycémie sévère.	Meilleur contrôle glycémique dans le groupe insuline que dans le groupe contrôle pour un nombre quotidien d'U d'insuline semblable. Cependant dans le groupe insuline 93% des doses administrées étaient prévues contre 66% de recours à des injections supplémentaires dans le groupe contrôle.

d'efficacité et de sécurité d'emploi que l'insuline rapide dans la NP.

Référence	Population	Mode d'administration	Type d'insuline	Dose d'insuline	Effets indésirables	Conclusions
Olveira (2015) [300]	Patients diabétiques ou non, hors SI, sous NP (n = 605)	- SC - IV (hors ou dans la NP) ± SC	Non détaillé	Non détaillé		Patients non diabétiques : insuline IV dans 17% des cas seulement et efficacité dans 99% des cas. Patients ayant stress hyperglycémique et intolérance au glucose, insuline IV dans 25% des cas. Patients diabétiques : malgré des doses d'insuline plus importantes administrées dans la poche de NP, l'efficacité n'était retrouvée que dans 1 cas sur 3.
Andersen (2018) [301]	Patients ayant subi une pancréatectomie totale, traités par NP ou par perfusion de glucose (n = 97)	- Insuline dans NP - Insuline dans G5%	Insuline aspartate dans poche de NP ou dans G5% + insuline detemir SC ± bolus d'insuline aspartate SC	Patients groupe NP : 1U d'insuline rapide / 10g de glucose dans NP. Patients groupe glucose : perfusion de G5% et 2 U d'insuline rapide/10 g de glucose.  Dans les 2 groupes, insuline detemir SC 2 fois par jour (0,2 U/kg/j) ± bolus d'insuline aspartate SC si glycémie > 10 mmol/L		Les glycémies cibles étaient atteintes en proportion plus importante chez les patients du groupe NP.

G = glycémie, G5% = glucose 5%, glc = glucose, HG = hyperglycémie, IV = intraveineuse, LDA = longue durée d'action, n NC = effectif non communiqué, NP = nutrition parentérale, NPAD = nutrition parentérale à domicile, insuline NPH = insuline Neutral Protamine Hagedorn, SC = sous-cutanée, SI = soins intensifs, SSI = sérum salé isotonique, U = unités, UI = unités internationale

D'autre part, deux types de populations (patients diabétiques et non diabétiques) étaient étudiées et les résultats cliniques obtenus différaient selon le type d'insuline et le mode d'administration. Les travaux d'Hakeam *et al* ont retrouvé une action plus rapide de l'insuline glargine SC chez les patients diabétiques, tandis que chez les non diabétiques, la normoglycémie était atteinte plus rapidement avec de l'insuline asparte dans la poche de NP [289]. Ces travaux ont également mis en évidence la nécessité d'une dose initiale plus importante dans le groupe insuline dans la NP, mais également une dose de plus en plus importante jusqu'à l'atteinte du contrôle glycémique, ce qui laisserait à penser qu'il existe une interaction entre l'insuline et la NP.

De plus, selon les études, différents paramètres ont été utilisés dans l'interprétation des résultats : survenue d'hyperglycémie, survenue d'au moins une hyperglycémie, survenue d'hypoglycémie modérée ou sévère, temps passé en normoglycémie ou le temps nécessaire à atteindre la normoglycémie, variabilité glycémique, différence glycémique, proportion d'atteinte de la normoglycémie, dosage d'hémoglobine glyquée dans les cas des patients de NPAD.

Par ailleurs, la plupart des protocoles testés a montré une efficacité dans l'obtention du contrôle métabolique, mais les résultats concernant la survenue d'hypoglycémies ne sont pas toujours similaires [289,290]. Dans la plupart des études, le suivi glycémique est assuré par une mesure de glycémie capillaire à intervalles réguliers (toutes les 4 à 6 heures). Cette méthode n'est malheureusement pas suffisante pour détecter l'ensemble des événements hypoglycémiques, ce qui peut sous-estimer la fréquence de survenue de cet effet indésirable lié à l'insuline. Cette limite dans la détection des hypoglycémies a été soulevée dans un cas rapporté [302].

Enfin les publications ne contiennent pas toujours les informations détaillées, notamment la dose d'insuline administrée ou encore le montage exact de perfusion lorsqu'il s'agit d'insuline administrée par voie IV.

Tous ces arguments illustrent la difficulté des sociétés savantes à émettre des recommandations protocolaires sur la prise en charge de l'hyperglycémie dans le cadre

de la NP. Ces dernières ont néanmoins rédigé des éléments principaux afin d'aider les médecins devant faire face à ce type de situation.

En 2018, l'ADA (American Diabetes Association) a recommandé d'ajouter de l'insuline humaine dans la solution de NP en commençant par 1 unité d'insuline pour 10 g de glucose afin de prévenir l'hyperglycémie puis traiter l'hyperglycémie si elle survient à l'aide d'injections SC d'insuline (insuline humaine/ 6 heures ou analogue rapide de l'insuline / 4 heures) [303]. Dans le cadre d'une NP continue, la SFNCM recommande une insulinothérapie IV isolée pour une prise en charge aiguë et souligne la possibilité d'employer une insuline de longue durée d'action lors de l'administration de NP au long cours [285]. Ces recommandations comportent d'ailleurs un paragraphe consacré à l'ajout d'insuline dans la poche de NP, encourageant à choisir une insuline rapide et soulignant que la stabilité de la disponibilité de l'insuline n'est pas garantie.

#### ***b. Essais in vitro sur la stabilité de l'insuline dans la nutrition parentérale : revue de la littérature***

A l'issue de la revue de la littérature sur les études cliniques, il est apparu nécessaire en raison de l'importante variabilité des paramètres étudiés et des résultats présentés, de mener une revue de la littérature sur les études *in vitro* concernant la stabilité de l'insuline dans les mélanges de NP.

Le résultat de cette revue de la littérature (**Tableau XI**) aboutit aux mêmes réserves que celles qui ont été émises à propos des études cliniques. En effet, on retrouve une importante variabilité tant dans le milieu étudié (SSI, NP binaire avec des origines d'apport azoté variables, ternaire pouvant présenter une teneur en lipides variable, avec ou sans électrolytes, vitamines ou éléments-trace, solutions glucosées de différentes concentrations), que dans les contenants (en verre ou différents matériaux plastiques pouvant être reliés à des tubulures de perfusion), la concentration en insuline ou les conditions de stockage et de prélèvements.

**Tableau XI : Etudes in vitro concernant la stabilité de l'insuline dans les mélanges de nutrition parentérale**

Auteur	Modalité (en Y ou dans NP)	Nature du mélange de NP	Paramètres étudiés	Nature et concentration en insuline	Contenants	Conditions	Méthode de quantification de l'insuline	Conclusions
Christianson (2006) [304]	Dans NP	NP binaire ± vitamines et ET	Dosage de l'insuline immunoréactive - prlvt dans le flacon à t0 - prlvt en sortie de tubulure à t1h et t11,5h	Insuline humaine 10 UI/L	Flacon en verre (1L) + set de perfusion	Stockage pendant 4 à 16 heures à 7°C après préparation de la NP.	RIA N = 6	A t0 : récupération de 100% de l'insuline en présence de vitamines dans la NP vs 38% sans A t1h et 11,5h : récupération de 95% d'insuline si vitamines vs 5% sans  Pas d'effet des vitamines sur le pH de la NP
Rusavy (2004) [305]	Dans NP	SSI vs ternaire		Insuline humaine 8 UI/20 mL (soit 400 UI/L)	Perfuseur en PVC	Durée : 3,5 heures	RIA N = 15	Disponibilité de l'insuline plus importante dans la NP (28,8%) que dans le SSI (5,2%) dès t0. Adsorption sur les parois du set de perfusion, limitée par la présence d'AA (effet stabilisant de la NP)
Marcuard (1990) [306]	Dans NP	NP binaire NP ternaire (avec différentes sources azotées) SSI Avec vit et ET	Comptage radioactivité : - de la solution en sortie de tubulure - d'un morceau de poche, de tubulure et du port d'injection à la fin de la perfusion	Insuline humaine 10, 25 ou 50 U/L + insuline radiomarquée I125 (< 0,01 U/mL)	Poche EVA (1L) + tubulure PVC	Stockage des poches 8 à 12 heures à 4°C puis 1-2 h à Tamb Perfusion pendant 7 h N = 3	Comptage radioactivité	Biodisponibilité médiocre dans SSI (65%) mais très élevée dans NP binaire et ternaire (90% minimum). Nature de la source d'apport azoté influe sur la biodisponibilité de l'insuline. Maximum 5% de liaison de l'insuline dans le port d'injection pour les 2 types de NP et < 1% de liaison sur la poche ou la tubulure. Dans le SSI, liaison à 13,5% sur la poche, 10,9% sur la tubulure et 2,6% sur le port d'injection.

Auteur	Modalité (en Y ou dans NP)	Nature du mélange de NP	Paramètres étudiés	Nature et concentration en insuline	Contenants	Conditions	Méthode de quantification de l'insuline	Conclusions
Ichikawa (2006) [307]	Dans NP	NP binaire avec KCl (3g de KCl + 6mg de riboflavine)	Mesure de la surface du pic d'insuline	Insuline humaine 0,01 U/mL (soit 10 U/L)	Poche (Hicaliq Terumo) (960 mL)	Durée 24 h N = 3 dosages	HPLC-UV (210 et 280 nm)	Augmentation de l'aire du pic d'insuline en présence de glucose, riboflavine et tryptophane. La présence d'acide ascorbique annule l'effet du Trp. Complexation riboflavine-Trp qui se fixe sur la chaîne A de l'insuline
Yu (2016) [308]	NA	NA	Ratio d'aire du pic d'insuline à $t/t_0$	Actrapid® 1UI/mL	Poche EVA (500mL) Tube en verre	-Lumière : UV/fluorescence/obscurité - Température : 2-8°C vs 25°C - Durée : 72 h N = 3 dosages	HPLC-UV (214 nm)	- Pas d'absorption sur le verre vs adsorption sur l'EVA (à 25°C obscurité, absorption de 62,71% de l'insuline au bout de 24 heures dans l'EVA versus 6,34% sur le verre). - Le taux d'absorption est corrélé au temps de contact (maxi à 36 heures). - L'absorption est plus importante à 25°C qu'à température réfrigérée. - Influence significative des UV.
Forchielli (2018) [309]	Dans NP	NP binaire et ternaire (avec concentration variable de lipides)	Concentration en insuline (conversion en ratio Ct/C0)	Insuline humaine	Poches EVA	Durée 24 h N = 4	IECL	Dans NP binaire : insuline négligeable dès $t_0$ et inexistante à $t_{24}$ , quelle que soit la concentration en insuline. Dans la NP ternaire : à $t_0$ , récupération de 3 à 81% de récupération de l'insuline à $t_0$ selon les concentrations croissantes en insuline puis stabilité puisque récupération de 2,5 à 72,5% de l'insuline à $t_{24}$

Auteur	Modalité (en Y ou dans NP)	Nature du mélange de NP	Paramètres étudiés	Nature et concentration en insuline	Contenants	Conditions	Méthode de quantification de l'insuline	Conclusions
Bassons (1985) [310]	Dans NP	G5% /Binaire /ternaire ± vitamines	Pourcentage d'insuline récupérée en fonction du temps (absorption sur les plastiques)	- Pour la RIA : Insuline humaine 288 pmol/L  - Pour le comptage radioactif insuline marquée à l'I125	Flacons PVC ou EVA	Durée 24 h N = 6 pour la RIA et 2 pour le comptage	RIA et comptage radioactif de l'insuline radiomarquée	Récupération d'insuline EVA > PVC (différence non significative) mais libération de l'insuline plus régulière à partir du PVC. Parfois résultats discordants RIA/comptage. Meilleure libération (pourcentage plus élevé et meilleure régularité) dans les mélanges ternaires. Ceci serait dû à la présence de l'émulsifiant qui diminuerait l'adhérence de l'insuline au plastique. La présence de vitamines et électrolytes permettrait de limiter l'absorption.
Weber (1977) [311]	Dans NP	- Binaire avec différentes sources azotées (Aminosol®, CPH®, FreAminell®, Amigen®)	- Comptage de la radioactivité à partir de prélèvements issus de : - Simulation de la perfusion à 165 mL/h, mesure en sortie de tubulure - Impact d'un traitement de 30	Insuline marquée à l'I125 De 10 à 100 UI/L	Contenants de 1L : - flacons en verre - flacons PVC Connectés à un set de perfusion (conditionné	Durée de perfusion : 6 h mais stockage à +4°C pendant 12 h avant la perfusion) N = 6	Comptage de l'insuline radiomarquée	- Perte d'insuline t0 > T2, 4 et 6 heures de perfusion (78% à t0 vs 43%) - Pourcentage de perte en insuline un peu plus importante pour la plus faible concentration (10 UI/L) mais du même ordre de grandeur (45%) que pour les concentrations plus élevées. - Pas d'effet selon la source azotée (perte légèrement plus faible avec l'hydrolysate de caséine mais valeurs similaires soit 45% environ) - Perte significativement plus faible en présence

		- Binaire ± vitamines et électrolytes - Binaire ± 0,375% de sérum albumine humaine	minutes avec une solution de sérum albumine bovine à 1% sur l'adsorption de l'insuline sur le verre		pendant 6 à 12 heures à +4°C) ± filtres de 0,22 ou 0,45µm			de vitamines et d'électrolytes (34% environ) - Perte plus importante en présence de filtres en ligne (57% environ) Perte plus importante sur les poches PVC (52%) vs verre (47%) - Moindre perte en présence d'albumine (38 à 41%)
<b>Auteur</b>	<b>Modalité (en Y ou dans NP)</b>	<b>Nature du mélange de NP</b>	<b>Paramètres étudiés</b>	<b>Nature et concentration en insuline</b>	<b>Contenants</b>	<b>Conditions</b>	<b>Méthode de quantification de l'insuline</b>	<b>Conclusions</b>
Trissel (1999) [174]	Dans NP (solution d'insuline dans G5% 1 :1 v/v avec NP)	9 MNP ternaires avec vitamines et ET	Observation visuelle : recherche de - rupture d'émulsion - changement de couleur - dégagement gazeux - particules visibles (après centrifugation et dilution), sous lumière fluorescente (œil nu) puis devant fond noir et blanc	Insuline 1 UI/mL	Mélange directement dans tubes de centrifugation	Durée 0, 1 et 4 h 23°C n = 2	Observation visuelle d'incompatibilité	Pas d'incompatibilité visible pour l'insuline

Auteur	Modalité (en Y ou dans NP)	Nature du mélange de NP	Paramètres étudiés	Nature et concentration en insuline	Contenants	Conditions	Méthode de quantification de l'insuline	Conclusions
Miranda (2016) [190]	Micromedex	NP binaire NP ternaire						Compatibilité : - 2 UI/mL dans NP binaire - 1 UI/mL dans NP ternaire
Canivet (1983) [312]	Dans solution glucosée	Dans G5 à G30%	- Comptage radioactivité dans la tubulure et dans prélvts à la sortie de la tubulure - Analyse qualitative de l'insuline par chromatographie sur gel	Insuline porcine + insuline marquée I125	Flacons en verre + tubulure PVC avec DEHP, filtre polyamide et chambre PE	n non renseigné	Comptage radioactivité	- Pas d'influence de la teneur en glucose - Pas de dégradation de l'insuline - 75% d'adsorption quand faible concentration en insuline - phénomène d'adsorption rapide car concentration en insuline constante dans l'effluent
Doglietto (1989) [179]	Dans NP	NP binaire (1L SSI + 1L G 20% + 1L AA 7,5%)	Ratio C(t)/C <sub>0</sub>	Insuline humaine 10 UI/3L	Poches EVA 3L (3 références différentes) + tubulure et épicroânienne 19G	Durée : 24 h N = 8	RIA	Importante absorption sur l'EVA dès le t <sub>0</sub> (seulement 20% d'insuline récupérée en sortie d'aiguille) et jusque t <sub>24</sub> . Une dispensation constante d'insuline est assurée sur 24 heures.

Auteur	Modalité (en Y ou dans NP)	Nature du mélange de NP	Paramètres étudiés	Nature et concentration en insuline	Contenants	Conditions	Méthode de quantification de l'insuline	Conclusions
Hewson (2000) [313]	Dans solvant	Solution d'insuline dans - SSI - G5% - albumine 2,4% dans SSI	Ratio $AUC_{0-6h} / AUC_{théorique\ 0-6h}$	Insuline humaine 50 ou 200 mU/mL  Débit de perfusion 0,5 ou 1,0 mL/h	Seringue PP 60 mL + tubulure PVC ( $\pm$ pré conditionnement, et/ou flush) + cathéter (central ou périphérique)	Durée = 22 h N = 2	RIA	Albumine améliore la disponibilité de l'insuline de 61%. Disponibilité est débit et concentration dépendante. Préconditionnement améliore de 20% la disponibilité dans les 2 premières heures. Le flush améliore de 32% la disponibilité dans les 6 premières heures. Flush + preconditionnement améliorent la disponibilité et diminuent la variabilité

NA : non applicable, RIA : Radioimmunoassay, EVA : Ethylène vinyle acétate, SSI : Sérum salé isotonique, PP polypropylène

La plupart des méthodes analytiques employées présentent des limites dans l'interprétation des résultats :

- le comptage de radioactivité repose sur l'emploi d'insuline radiomarquée (souvent à l'I<sup>125</sup>). Or il est impossible de savoir si ce marquage radioactif ne modifie pas les propriétés physicochimiques de l'insuline.
- Les RadioImmuno Assays (RIA) (reposant sur la reconnaissance de l'insuline par des anticorps dont l'un est radiomarqué) et l'Immunoélectrochimiluminescence (IECL) (basée sur la reconnaissance de la protéine par un couple d'anticorps) sont des méthodes validées pour la quantification de l'insuline dans le sérum humain. Or les matrices testées dans les études *in vitro* ont une composition très éloignée de celle du sérum humain, cela pouvant engendrer des erreurs dans la quantification de l'insuline. D'autre part, les gammes d'étalonnage des kits de dosage sont valables pour des concentrations très faibles (de l'ordre de la  $\mu\text{UI/mL}$  pour l'insulinémie physiologique) ce qui impose normalement des étapes de préparation des échantillons (non détaillées dans les différents travaux publiés).
- L'HPLC-UV, tout en étant une méthode séparative, n'est pas idéale pour l'étude de l'insuline. En effet, selon la longueur d'onde sélectionnée, la quantification concerne l'insuline mais aussi certains excipients présents dans la spécialité pharmaceutique. Le métacrésol par exemple, conservateur présent dans la solution commerciale de Novorapid® (insuline asparte, analogue rapide de l'insuline humaine), absorbe aux longueurs d'onde 210 et 214 nm [314] employées dans les études basées sur la méthode HPLC [307,308]. Cela peut remettre en question les résultats présentés dans ces travaux, la méthode n'étant pas sélective de l'insuline à cette longueur d'onde.

A l'issue de cette revue de la littérature portant sur les études *in vitro* dans différents milieux dont la NP, il apparaît que de nombreux paramètres peuvent influencer sur la biodisponibilité de l'insuline : la composition en acide aminés, la présence ou non de lipides, de vitamines, d'albumine ou encore la nature du contenant.

Dès lors, l'objectif du présent travail était d'étudier la disponibilité de l'insuline humaine à partir d'un MNP ternaire.

## Objectifs

---

Comme nous l'avons précédemment présenté dans le contexte, les mélanges de nutrition parentérale sont des mélanges complexes, puisqu'ils peuvent contenir plusieurs dizaines de nutriments, de nature physico-chimique très variée. Dans certaines situations cliniques, les accès veineux des patients sont limités, ce qui amène à employer le mélange de NP comme « véhicule d'administration » pour les médicaments injectables. L'hyperglycémie causée par l'apport important de glucose contenu dans le mélange est fréquente, y compris chez des patients non diabétiques. Cet effet indésirable nécessite alors la prise en charge par un apport exogène d'insuline. Dès lors, il apparaît avantageux d'ajouter l'insuline dans le mélange de NP afin d'assurer une co-administration strictement conjointe d'insuline à l'assimilation intracellulaire du glucose. Cependant, il est obligatoire de démontrer au préalable la stabilité de l'insuline et du mélange de NP, selon les recommandations des sociétés savantes de nutrition entérale et parentérale.

L'objectif de ces travaux de recherche est par conséquent de déterminer la stabilité de l'insuline et du mélange de NP lorsqu'ils sont mis en présence l'un de l'autre.

Afin d'atteindre cet objectif, il est nécessaire d'envisager plusieurs étapes :

- 1) Vérifier la stabilité physique du mélange de NP ternaire après ajout d'insuline humaine.
- 2) Mettre au point et valider une méthode de quantification de l'insuline dans le milieu complexe que représente ce mélange de NP ternaire.
- 3) Mener une étude de stabilité de l'insuline humaine en mélange dans une émulsion lipidique injectable.
- 4) Identifier les facteurs influençant la stabilité de l'insuline dans le MNP ternaire.
- 5) Vérifier l'activité biologique de l'insuline après ajout dans le MNP ternaire.

## Partie expérimentale

---

### I. Etude de stabilité physique de l'émulsion de nutrition parentérale après ajout d'insuline

#### A. Introduction

Les MNP ternaire sont des émulsions dont la stabilité peut être remise en cause notamment lorsque des éléments extérieurs sont injectés dans la poche. C'est le cas des médicaments. Les recommandations des sociétés savantes (ASPEN et ESPEN) soulignent l'importance de s'assurer de la stabilité physique de l'émulsion de NP ternaire après reconstitution et ajout du médicament, sur une durée couvrant la période de stockage et l'administration.

Seule une évaluation limitée (résumé de communication affichée) a traité à la fois la stabilité physique de l'émulsion et le maintien d'une concentration stable en insuline [315]. Une autre étude a testé la stabilité physique d'un MNP ternaire en présence d'insuline, mais la concentration en insuline était très élevée (1 UI/mL soit 1000 UI/L) [174]. Dans ces travaux, la stabilité de l'émulsion était étudiée sur une durée de 4 heures seulement (puisqu'il s'agissait d'étudier la compatibilité pour une administration *via* un montage en Y) et reposait sur les paramètres suivants : détection des particules visibles (après une étape de centrifugation), détection d'une rupture d'émulsion ou d'un crémage et détection d'un dégagement gazeux.

**Dans cette partie, notre objectif est d'étudier l'impact de l'ajout d'insuline sur la stabilité d'un MNP ternaire industriel, en évaluant la stabilité de l'émulsion.**

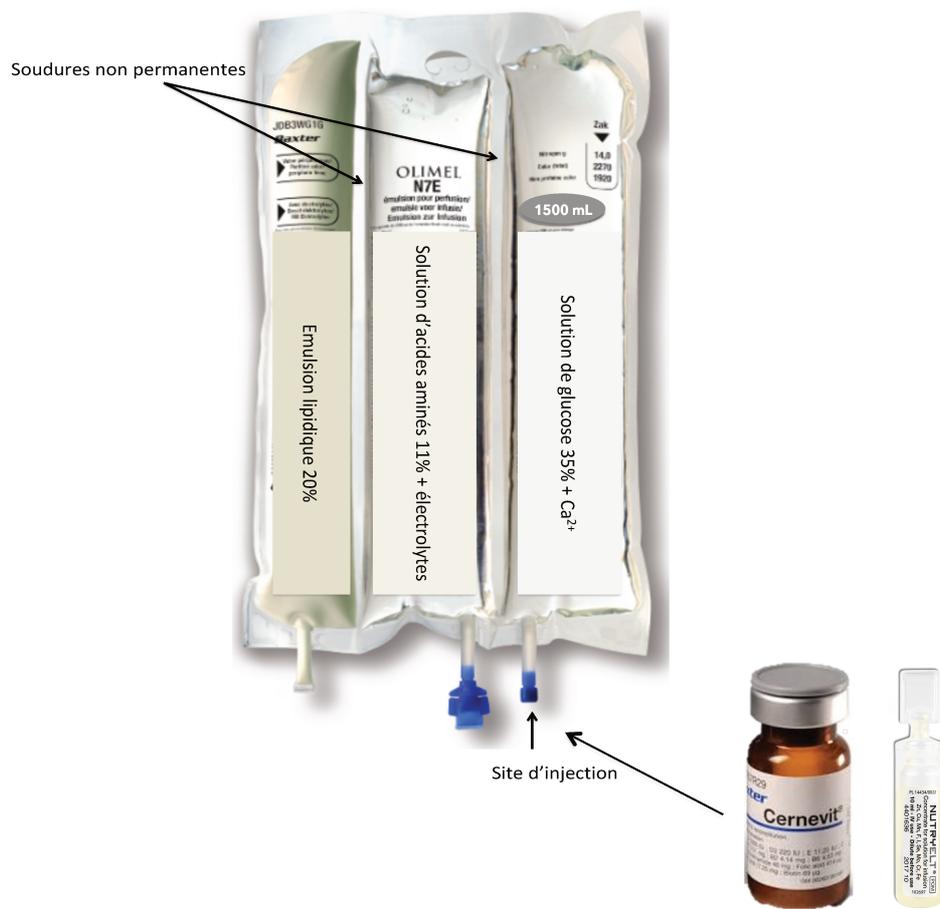
#### B. Matériels et méthodes

##### 1. Nature et préparation du milieu nutritif

Les compositions détaillées des spécialités pharmaceutiques figurent en [Annexe A](#).

Le **milieu nutritif de référence** employé dans ces travaux se compose d'un mélange de NP ternaire industriel supplémenté en vitamines et éléments-trace. Ce milieu est préparé à partir des spécialités pharmaceutiques suivantes :

- Mélange de nutrition parentérale ternaire Olimel N7E® émulsion pour perfusion, poche de 1500 mL (Baxter, Meyzieux, France). Ce mélange est initialement présenté sous la forme de poche tricompartimentée, chaque compartiment contenant un macronutriment (Figure 13) soit
  - Une solution de glucose à 35% avec du calcium
  - Une solution d'acides aminés à 11,1% avec d'autres électrolytes
  - Une émulsion lipidique à 20% (mélange de 80% d'huile d'olive raffinée et de 20% d'huile de soja raffinée)



**Figure 13 :** Mélange nutritif de référence supplémenté en vitamines et éléments-trace

Le mélange ternaire est reconstitué avant emploi. Un minimum de 6 retournements de la poche est ensuite effectué pour garantir l'obtention d'une émulsion d'aspect blanc laiteux homogène.

➤ Supplémentation de la NPT avec

- Des vitamines : un flacon de Cernevit® poudre pour solution injectable ou perfusion (Baxter, Meyzieux, France) est reconstitué avec 5 mL de NaCl 0,9% puis injecté via le port d'injection de la poche de NP dans la solution de glucose avant reconstitution du mélange ternaire.
- Des éléments-trace : une ampoule de 10 mL de Nutryelt® solution injectable pour perfusion (Aguettant, Lyon, France) est injectée via le port d'injection dans la poche après reconstitution du mélange ternaire.

Ce milieu nutritif a été additionné d'**insuline humaine** à la concentration finale de 20 UI/L. Il s'agit d'une insuline humaine biosynthétique recombinante commercialisée sous le nom de spécialité pharmaceutique Umuline® rapide (100 UI/mL, solution injectable en flacon de 10 mL, Lilly France). La concentration finale de 20 UI/L a été choisie après recueil des quantités d'insuline ajoutées quotidiennement dans les poches de NP des patients bénéficiant d'une NPAD.

## 2. Instruments d'analyse

Les instruments suivants sont employés dans l'évaluation de la stabilité du MNP ternaire :

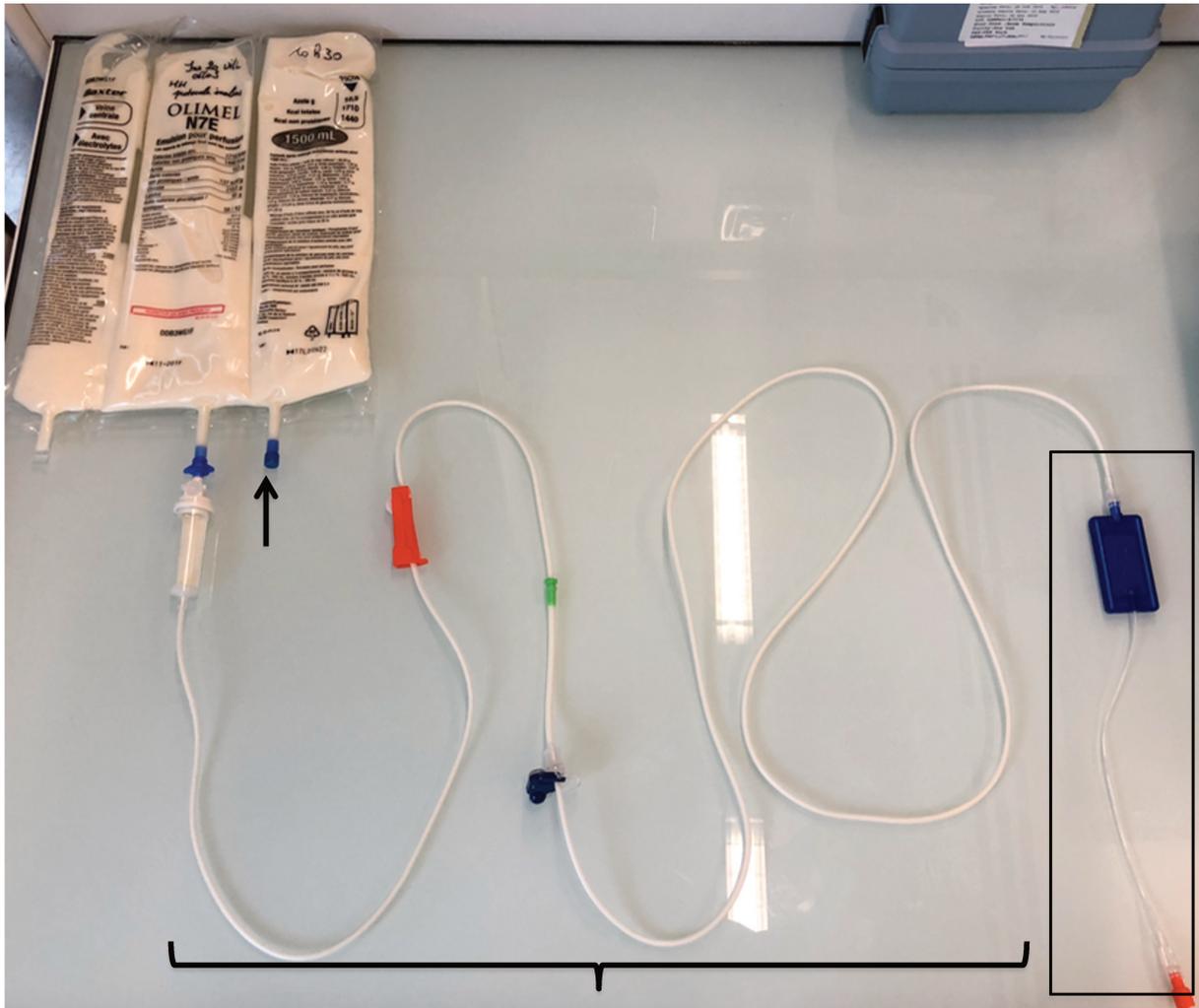
- un AccuSizer 780 APS (PSSNicom, Port Richey, United States) basé sur la technologie « single particle optical sizing » (SPOS) et disposant d'un détecteur dont la gamme de mesure va de 1,8 à 50 µm pour mesurer le PFAT5,
- un pH mètre (Mettler Toledo, Columbus, United States) muni d'une électrode avec diaphragme à manchon (permettant de faciliter la mesure du pH dans l'émulsion),
- un osmomètre modèle 210 (Fiske, Norwood, United States) permettant de mesurer l'osmolalité sur des échantillons de 20 µL.

### 3. Méthode

#### *a. Préparation des milieux testés et prélèvements*

##### i. Mesure du PFAT5 et du pH

- Deux poches de NP sans insuline (servant de témoins) et 2 poches de NP contenant 20 UI/L d'insuline ont été préparées selon les modalités définies précédemment. Toutes les poches sont conservées à température ambiante et exposition à la lumière du jour pendant 7 jours. Elles sont suspendues à un pied à perfusion.
  
- Un montage de perfusion est mimé comprenant ([Figure 14](#)):
  - une tubulure VL ST00 Agilia Volumat (Fresenius kabi, Sèvres, France) constituée majoritairement de PVC et dans une moindre proportion, de silicone ([Annexe B](#)),
  - un filtre Lipipor TNA (PALL corporation, New-York, United States) en nylon, de porosité 1,2 $\mu$ m ([Annexe B](#)).



**Figure 14 :** Montage de perfusion utilisé lors de l'étude de stabilité de l'émulsion. La flèche pointe le site d'injection de la poche de NP, l'accolade souligne la tubulure de perfusion et le cadre indique le filtre.

Des prélèvements sont effectués aux temps 0, 4, 24 et 168 heures selon 2 modalités (Figure 14) :

- directement dans la poche de NP au niveau du site d'injection avec une seringue Plastipak® de 10 mL (Becton dickinson, Le Pont de Claix, France) munie d'une aiguille,
- en sortie de filtre (à l'extrémité distale du montage) en débloquant la roulette d'ajustement du débit.

Avant chaque prélèvement, la poche de NP est inspectée visuellement à l'œil nu afin de mettre en évidence tout phénomène de séparation de phase, puis retournée à 3 reprises dans le but d'homogénéiser le mélange de NP. La tubulure ayant un volume mort

de 25 mL ([Annexe B](#)) les 30 premiers mL sont systématiquement récupérés dans une éprouvette puis éliminés avant de procéder aux prélèvements.

Les échantillons sont analysés sans attendre. Pour la mesure du PFAT5, une étape de dilution automatique d'un facteur 900 est effectuée en deux étapes par l'instrument dans de l'eau ultrapure. Ce niveau de dilution a été déterminé lors de pré-tests.

#### ii. Mesure de l'osmolalité

- Trois poches de NP sans insuline (servant de témoins) et 3 poches de NP contenant 20 UI/L d'insuline sont préparées selon les modalités définies précédemment. Toutes les poches sont conservées à température ambiante et exposition à la lumière du jour pendant 7 jours.
- Des prélèvements sont effectués aux temps 0, 1, 2 4, 24 et 168 heures. L'analyse des échantillons est faite sans attendre.

#### iii. Inspection visuelle

Une évaluation visuelle directe à l'œil nu est effectuée avant de procéder à l'agitation de la poche, afin de rechercher un crémage voire une rupture d'émulsion. Au moment de la purge, l'absence d'occlusion du filtre est vérifiée.

#### ***b. Interprétation / analyse des résultats***

Les résultats sont évalués de manière descriptive car ils ne sont pas suffisamment nombreux pour procéder à une analyse statistique.

### **C. Résultats**

Les valeurs obtenues pour le PFAT5 et le pH sont détaillées dans le [Tableau XII](#).

**Tableau XII :** Valeurs de PFAT5 (n=2), pH (n = 3) et osmolalité (n = 3) obtenus au cours de l'étude de stabilité de l'émulsion de NP avec ou sans insuline (n=2). Pour le PFAT5, les valeurs sont données pour les prélèvements dans la poche et en sortie de filtre 1,2µm

	Temps (h)	Osmolalité (mOsm/kg)		pH		PFAT5 (%)	
		Moyenne	Ecart type	Moyenne	Ecart type	Moyenne poche seule	Moyenne poche + filtre
MNP	0	1700,3	14,0	6,36	0,01	0,018	0,004
	1	1697,3	14,5	x	x	x	x
	2	1680,3	13,7	x	x	x	x
	4	1683,3	13,1	6,36	0,01	0,009	0,000
	24	1709,7	15,5	6,32	0,02	0,005	0,001
	168	1694,0	10,6	6,29	0,01	0,001	0,001
MNP + umuline 20 UI/L	0	1718,7	15,9	6,36	0,01	0,018	0,011
	1	1714,7	13,4	x	x	x	x
	2	1722,0	9,0	x	x	x	x
	4	1721,3	11,9	6,365	0,01	0,009	0,001
	24	1710,0	6,1	6,315	0,01	0,004	0,001
	168	1719,0	5,2	6,285	0,01	0,001	0,001

Les valeurs de PFAT5, pH et osmolalité sont stables dans le temps. Toutes les valeurs de PFAT5 sont restées bien inférieures au seuil de 0,05% fixé par la Pharmacopée Américaine. Aucune modification macroscopique de l'émulsion n'a été observée au cours de l'évaluation. Aucune occlusion de filtre n'est survenue.

Bien qu'en présence d'insuline la valeur moyenne d'osmolalité mesurée est un peu plus élevée que sans, les valeurs obtenues pour les 3 paramètres d'intérêt sont comparables selon que le MNP contienne de l'insuline ou non.

#### D. Discussion

L'objet de ces travaux de recherche porte sur une pratique clinique, par conséquent la priorité était de procéder selon les protocoles de soins, en employant notamment l'un des milieux nutritionnels couramment utilisé. C'est la raison pour laquelle nous avons choisi un milieu de NP ternaire. Afin de nous affranchir de trop nombreuses variations de formulation, c'est un mélange industriel qui a été retenu. Ce milieu a volontairement été supplémenté en vitamines et éléments-trace puisqu'il a déjà été démontré dans certains travaux que leur présence ou absence pouvait influencer sur les réactions physico-

chimiques mises en jeu [164], y compris dans le cas de MNP ternaires [52,164]. Le choix d'un milieu ternaire a donc rendu obligatoire l'évaluation de la stabilité de l'émulsion.

Comme cela a été expliqué dans le paragraphe concernant la stabilité physique des mélanges nutritifs, il existe plusieurs paramètres pouvant être étudiés pour conclure quant à la stabilité ou l'instabilité d'un MNP ternaire. Dans ces travaux, nous avons décidé de privilégier le PFAT5 puisqu'il fait partie des paramètres décrits dans la monographie de l'USP s'intéressant à la caractérisation de la taille des globules huileux des émulsions lipidiques injectables [109] et qu'il a par conséquent été très employé dans les différentes études ayant pour objet la stabilité des émulsions [51,91,92,96,98,100,102,106,107,316,317].

La mesure du PFAT5 est importante car elle permet d'évaluer le potentiel impact clinique néfaste que pourrait avoir une émulsion de NP instable. En effet, les globules huileux de diamètre  $> 5 \mu\text{m}$  sont de taille supérieure au diamètre des capillaires. Ainsi lorsqu'ils sont introduits dans la circulation sanguine en grande quantité, ils peuvent causer des embolisations ainsi que des nécroses des tissus environnants ou encore influencer sur le fonctionnement des organes [104]. Etant donné l'existence de lipases susceptibles de dégrader les esters d'acides gras dans l'endothélium vasculaire, quelques globules de taille supérieure à  $5 \mu\text{m}$  sont tolérés, c'est la raison pour laquelle le seuil d'acceptabilité du PFAT5 est fixé à 0,05% pour les émulsions injectables (telles que définies à la Pharmacopée Américaine [113], quelle que soit leur concentration initiale (10, 20 ou 30%)). En revanche, si le pourcentage de globules lipidiques de taille  $> 5 \mu\text{m}$  dépasse 0,4% pour des mélanges complexes, il a été prouvé que cela remet en cause la stabilité des MNP [48,96,111]. Des précédents travaux ont mis en évidence une évolution différente du PFAT5 en fonction de la nature de l'émulsion testée [318]. Il apparaissait donc important d'évaluer la stabilité du PFAT5 pour notre MNP additionné d'insuline.

Dans notre étude, la valeur du PFAT5 est restée inférieure au seuil de 0,05% fixé par l'USP, sur une durée de 7 jours à partir de l'ajout d'insuline humaine dans le MNP ternaire. Ceci fournit un premier élément en faveur de la stabilité de l'émulsion. Comme nous l'avons précédemment introduit, il faut souligner que le seuil de 0,05%,

initialement prévu pour des émulsions pures peut être réévalué pour les mélanges complexes que représentent les MNP ternaires. La valeur limite de 0,4% proposée par Driscoll *et al.* [111] correspond à une séparation de phases visible lorsque la méthode analytique employée est l'extinction de lumière. Cette méthode, à la différence de la mesure isolée du diamètre des gloules [319], semble par conséquent être un très bon choix analytique. Dans les présents travaux, la technologie SPOS employée pour mesurer le PFAT5 est basée sur le principe d'extinction de lumière, ce qui permet d'interpréter de manière positive le maintien du PFAT5 sous le seuil de 0,4%.

Ceci a été confirmé par l'absence de modification visible lors de l'observation visuelle.

L'une des précautions à respecter lors de la mesure du PFAT5 est de procéder au préalable à une dilution de l'échantillon avant de procéder à l'analyse [111,320]. L'avantage de l'instrument de mesure du PFAT5 utilisé au cours de ces travaux est qu'il a permis une dilution automatique de l'échantillon avant analyse (plus précisément au 1/900<sup>ème</sup>).

Si l'on observe plus en détail l'évolution du PFAT5 dans le temps, les valeurs ont tendance à diminuer. Les travaux employant ce paramètre pour le suivi de la stabilité de l'émulsion rapportent une tendance à la diminution de cette valeur, expliquant ce phénomène par la fusion des globules huileux avec de l'oxygène présent dans le milieu.

Lors de l'administration de MNP, il est recommandé d'utiliser un filtre [321]. Cette recommandation fait suite à des incidents survenus lors de l'administration de MNP non stables [322]. Selon le type de filtre employé, l'objectif peut être de réduire la charge particulaire, les microprécipités, les microorganismes ou les bulles d'air. Lors de l'administration d'émulsions, les filtres de porosité 1,2 µm sont adaptés [48,323]. C'est la raison pour laquelle ce type de filtre a été employé dans le montage de perfusion. L'objectif était de tester la stabilité de l'émulsion avec le montage en conditions quasi réelles (puisque l'emploi de pompes à nutrition n'a pas été possible lors de ces essais) en procédant au prélèvement en sortie de filtre, mais également la stabilité intrinsèque du mélange présent dans la poche.

Après analyse des résultats, il semble que les valeurs de PFAT5 sont plus faibles après le filtre que dans la poche ; cependant les valeurs retrouvées de PFAT5 dans les échantillons prélevés après le filtre ne sont pas nulles . En effet, ce dernier ayant une porosité de 1,2 $\mu$ m, il devrait permettre la rétention des globules dont le diamètre est supérieur à cette porosité (dont les globules de diamètre > 5 $\mu$ m). Ce phénomène peut être expliqué par la déformabilité des globules [320], et pas la sensibilité de l'appareil.

Dans nos travaux, le dénombrement des globules de grand diamètre a été réalisé selon une pondération par le volume, ce qui est recommandé par la Pharmacopée Américaine mais il aurait également pu être envisageable de faire la pondération par le nombre de globules.

Pour conclure sur la dimension des globules lipidiques, en se référant à la monographie de la Pharmacopée Américaine, notre étude devra comporter afin d'être exhaustive la détermination du diamètre moyen des globules lipidiques [91,92,102,106,107,109,316], ainsi que la distribution de la taille des globules de l'émulsion (d'allure gaussienne si l'émulsion est stable) [52,106,324].

Le pH et l'osmolalité sont régulièrement évalués dans les études de stabilité des émulsions parentérales [50,92,111,316,325,326], c'est la raison pour laquelle ils ont également été mesurés et suivis sur la durée de l'étude de stabilité, soit 7 jours. Le pH en restant stable, permet de maintenir l'état d'ionisation des lécithines, agents émulsifiants intégrés dans la formulation du MNP [52,110,327,328]. Dans notre étude, le pH et l'osmolalité sont restés stables, renforçant ainsi l'hypothèse de stabilité du MNP en présence d'insuline humaine. Ces résultats doivent être ultérieurement renforcés par la mesure du potentiel zêta, paramètre complémentaire du pH puisqu'il reflète la répulsion électrostatique de la surface des globules lipidiques [50,51,91,92,96,100,103,324].

**L'ensemble des résultats présentés est compatible avec une stabilité physique de l'émulsion après ajout de l'insuline humaine à la concentration de 20 UI/L.**

Notre évaluation de la stabilité du MNP ternaire s'est limitée à la stabilité physique de l'émulsion, bien que pour répondre aux exigences des recommandations des sociétés savantes, la stabilité de chaque nutriment présent dans le mélange (vitamines, éléments-trace, acides aminés, électrolytes) devrait être testée. Néanmoins la majorité des études concernant la stabilité des mélanges ternaires de NP porte sur l'étude de la stabilité de l'émulsion. Cela est facilement compréhensible puisque le caractère lipidique de ce mélange rend indispensable une étape de rupture de l'émulsion afin de pouvoir envisager une analyse quantitative et qualitative de la composition du mélange. Le dosage des acides aminés serait alors réalisable par HPLC couplée à une détection UV. Une étape préalable de dérivation à l'orthophtaldialdéhyde serait néanmoins nécessaire, afin de former à partir des acides aminés natifs, des dérivés fluorescents et absorbant dans l'UV [329].

Sur le plan de la stabilité de l'émulsion, le versant chimique devrait également être étudié. La peroxydation lipidique est un phénomène bien décrit, souvent augmentée par la présence d'agents pro-oxydants (tels que le zinc ou d'autres ions métalliques), d'oxygène, de lumière (par exposition aux rayons ultraviolets) ou au contraire ralentie par l'ajout de substances ayant des propriétés anti-oxydantes (telles que les vitamines C ou E). L'un des marqueurs de la peroxydation lipidique est le malondialdéhyde (MDA), produit secondaire des étapes d'initiation, propagation et terminaison de la peroxydation. Il devra par conséquent être quantifié afin de compléter l'étude de stabilité de l'émulsion parentérale [330].

## **II. Validation d'une méthode immunométrique de quantification de l'insuline humaine dans un mélange de nutrition parentérale ternaire**

### **A. Introduction**

Comme nous l'avons vu précédemment, la complexité du MNP ternaire peut représenter un frein à la quantification de l'insuline après ajout dans ce type de milieu. C'est la raison pour laquelle comme décrit dans la première partie, plusieurs études se sont intéressées à la stabilité de l'insuline dans différents MNP. A l'heure actuelle, l'insuline humaine ainsi que ses analogues peuvent être quantifiées selon de multiples techniques analytiques. Ces techniques peuvent être réparties en deux catégories : immunométriques ou non. La revue de la littérature du dosage de l'insuline dans les MNP (synthétisée dans le tableau XI) a relevé que la première catégorie semble être la plus couramment employée. Elle comprend : l'ELISA (Enzyme-linked Immuno Sorbent Analysis) [331], la radio-immunoanalyse (RIA) [332], la spectro-immunométrie couplée à une détection par spectrométrie de masse haute résolution [333], l'immunofluorescence en temps résolu [334], et plus récemment, l'impédancemétrie électrochimique [335]. Quant aux méthodes non immunométriques telles que la chromatographie liquide couplée à une détection par spectrophotométrie UV-visible [336] ou la spectrométrie de masse [337], elles sont plus coûteuses. De plus, elles nécessitent une étape préalable d'extraction de l'insuline à partir du MNP, afin de ne pas endommager le système de chromatographie ou le détecteur.

**Dans cette partie expérimentale, nous avons optimisé et validé une méthode analytique immunométrique en vue de procéder à la quantification de l'insuline humaine après ajout dans le MNP ternaire.**

## B. Matériels et méthodes

### 1. Matériels

Le milieu nutritif de référence (MNP ternaire supplémenté en vitamines et ET, cf paragraphe 1.2.1) additionné d'Umuline rapide® à la concentration finale de 20 UI/L a été employé dans ces travaux.

#### Tampons et adjuvants

- Tampon phosphate 0,04 M
- Sérum albumine bovine (SAB) Fraction V, lyophilisat (95% de pureté) (Euromedex, Souffelweyersheim, France).
- Acide chlorhydrique 37% (VWR, val de Fontenay, France)

#### Automate

Les analyses immunométriques sont effectuées sur un automate COBAS 8000 (Roche, Meylan, France), localisé au Centre de Biologie Pathologie Pierre Degand du CHU de Lille.

#### Kits de dosage

Les kits (Roche diagnostics, Meylan, France) nécessaires à la quantification de l'insuline avec l'automate COBAS sont :

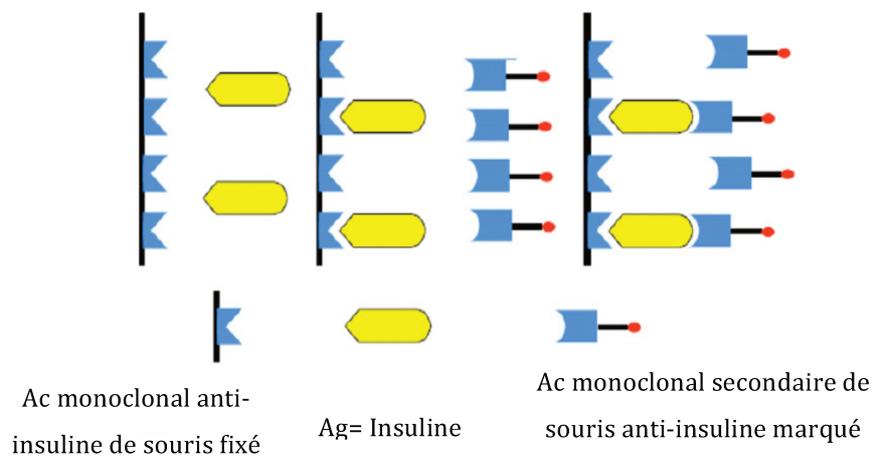
- le PreciControl Multimarker composé de 2 solutions de contrôles (deux niveaux de concentration en insuline respectivement haut et bas),
- l'Elecsys Insulin contenant les réactifs de dosage.

### 2. Méthodes

#### a. Méthodes immunométriques

- Principe général des méthodes immunométriques de dosage de l'insuline

La technique employée dans le présent travail est basée sur une méthode qualifiée de « sandwich », méthode immunométrique à deux sites ou méthode non compétitive (**Figure 15**). Pendant la période d'incubation, l'insuline présente dans l'échantillon se fixe *via* ses antigènes (Ag) (aussi appelés épitopes) sur les sites spécifiques d'anticorps (Ac) anti-insuline. Ces anticorps monoclonaux produits chez la souris sont présents en excès dans la cuve réactionnelle. Ils sont qualifiés d'Ac liants. Dans un second temps, des Ac monoclonaux secondaires anti-insuline, produits chez la souris puis marqués (Ac\*) sont ajoutés en excès et peuvent à leur tour se fixer sur le complexe Ac liant-insuline.



**Figure 15** : Principe général du dosage immunométrique de l'insuline

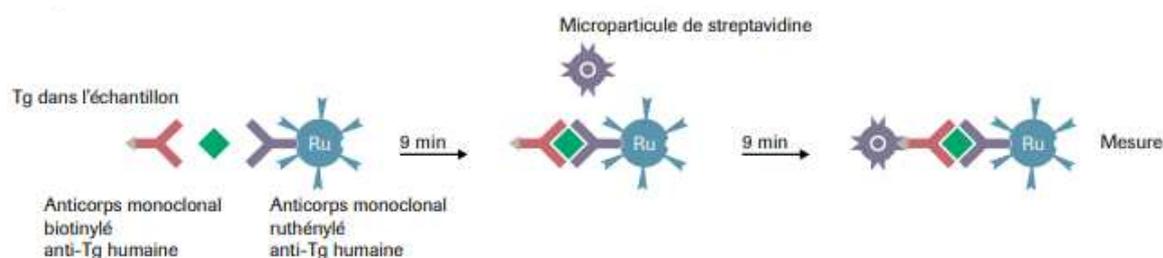
Des séries de lavages permettent d'éliminer les Ac secondaires non fixés. Par conséquent, les courbes représentant l'intensité du signal (correspondant aux complexes marqués [Ac-insuline-Ac\*]) en fonction de la concentration en antigène ont une allure croissante.

Le marquage de l'Ac secondaire peut être réalisé avec un traceur radioactif, une enzyme ou un autre élément chimique. C'est le cas du kit retenu dans notre étude. La méthode de dosage est qualifiée de chimiluminescente.

## ii. Méthode chimiluminescente de quantification de l'insuline

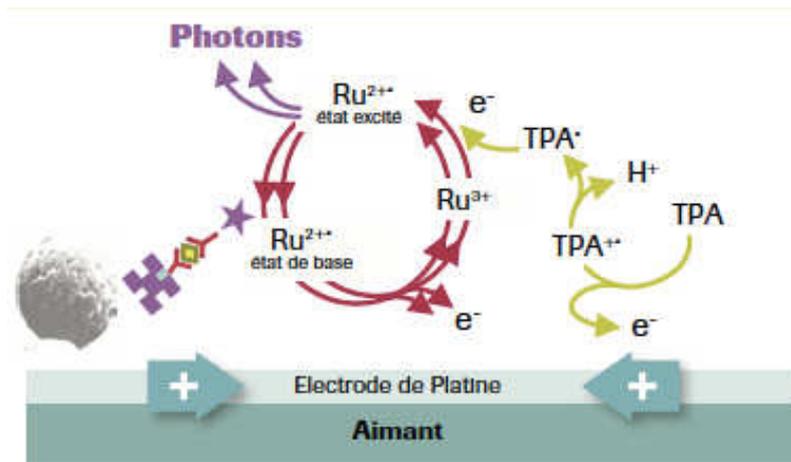
Le kit Elecsys® Insulin utilisé dans le cadre de la présente validation de méthode correspond à une méthode d'immunoélectrochimiluminescence (IECL) permettant une analyse entièrement automatisée.

Cette méthode repose sur le principe de reconnaissance spécifique de 2 épitopes de l'insuline par un couple d'Ac monoclonaux anti-insuline, d'origine murine (Figure 16). Les Ac liants sont associés à de la biotine tandis que les Ac secondaires anti-insuline ont un marquage au ruthénium (Ac\*). Une première phase d'incubation de l'échantillon en présence des 2 types d'Ac permet la formation des complexes [Ac-Ag-insuline-Ac\*] en solution. L'ajout de microparticules recouvertes de streptavidine dans le milieu réactionnel permet à ces complexes de se fixer sur les microparticules selon une liaison streptavidine-biotine.



**Figure 16 :** Reconnaissance de l'insuline par le couple d'Ac du kit « Elecsys Insulin »

Le mélange est ensuite maintenu par un aimant au niveau de l'électrode de mesure. Une différence de potentiel est appliquée à cette dernière permettant la production de chimiluminescence qui est mesurée par un photomultiplicateur (Figure 17). Les résultats sont fournis uniquement en  $\mu\text{UI/mL}$  à partir d'une courbe de calibration en 2 points et d'une courbe de référence mémorisée dans le code barre du réactif.



**Figure 17** : Principe du dosage par IECL de l'insuline

Les Ac (représentés en rouge), sont qualifiés de liants s'ils sont liés à la biotine (carré bleu) ou de secondaires s'ils sont liés au ruthénium (★). Les microparticules tapissées de streptavidine (✚) se lient à la biotine et fixent par attirance avec l'aimant, les complexes Ac-Ag au niveau de l'électrode. Une cascade d'oxydo-réduction entretenue entre le ruthénium et la tripropylamine (TPA) permet l'émission de luminescence sous la forme d'un photon de longueur d'onde 620 nm.

### ***b. Préparation des échantillons avant analyse***

L'objectif étant de se rapprocher le plus possible des pratiques rencontrées en services cliniques, nous avons choisi de fixer la concentration en insuline des mélanges testés lors des essais de stabilité à 20 UI/L. Considérant la limite supérieure de la gamme d'étalonnage du kit Elecsys insulín employé pour le dosage de l'insuline (1000  $\mu$ UI/mL) des dilutions d'un facteur global 200 sont nécessaires (ramenant ainsi la concentration d'intérêt de 20 UI/L à 100  $\mu$ UI/mL après dilution).

Afin de choisir le meilleur diluant, une étude de recherche d'effet matrice est menée lors de l'étape de validation de la méthode IECL. Celle-ci est décrite dans la démarche de validation de méthode publiée en 2017 [338].

Le tampon phosphate 0,04M est ajusté à pH=7,53.

### ***c. Essais de validation de méthode : profil d'exactitude***

Le kit Elecsys insulín étant destiné à analyser des échantillons de sérum ou plasma humain, il est nécessaire de précéder l'étude de stabilité d'une étape de validation des méthodes analytiques dans le MNP ternaire avec ajouts de vitamines et éléments-trace. Dans cet objectif, nous avons opté pour la méthode du profil d'exactitude. Une normalisation de cette méthodologie a été réalisée par la Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques (SFSTP) [339].

Le but de cette méthode est de fournir des garanties afin que chaque résultat obtenu soit suffisamment proche de la valeur réelle de l'échantillon traité.

Pour y parvenir, le principe général de ce type de validation est d'effectuer une prédiction statistique de l'incertitude de mesure en considérant l'erreur totale (somme des erreurs systématique et aléatoire).

Dans le cadre de notre étude, les limites d'acceptabilité haute et basse ont été fixées à  $\pm 10\%$  (sachant que la limite communément admise pour les dosages immunométriques est de  $\pm 20\%$  [340]).

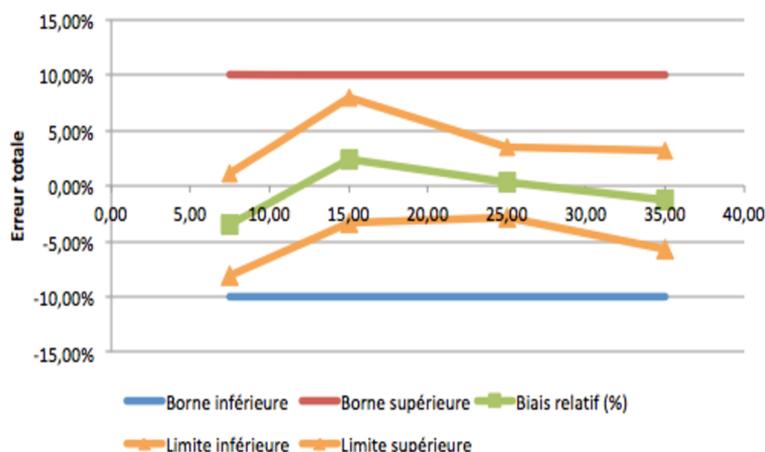
## **C. Résultats**

### **1. Effet matrice**

Le diluant retenu pour les dosages effectués avec le kit Elecsys est la SAB 40 g/L en solution dans du tampon phosphate 0,04 M (nommée ci-après SAB<sub>P</sub>).

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

Le profil d'exactitude obtenu avec la méthode Elecsys de quantification de l'insuline humaine dans le MNP ternaire de référence est présenté dans la [Figure 18](#).



**Figure 18 :** Profil d'exactitude obtenu avec la méthode Elecsys de quantification d'Umuline rapide® (diluant SAB<sub>p</sub> 40 g/L)

La méthode IECL est validée pour la quantification *in vitro* de l'Umuline rapide® après ajout dans le MNP ternaire de référence au risque de  $\pm 10\%$ .

#### D. Discussion

De nombreuses méthodes de quantification de l'insuline sont décrites, mais la plupart nécessite de travailler à partir d'échantillons sériques ou plasmatiques humains (c'est le cas de tous les kits de dosages utilisés en routine dans les laboratoires de biologie médicale) ou d'appliquer aux échantillons un pré traitement à type d'extraction lorsque le milieu choisi est un milieu complexe (ce qui est le cas dans le présent travail).

Dans plusieurs des travaux répertoriés dans la revue sur la stabilité *in vitro* de l'insuline, cette dernière est quantifiée grâce à un marquage radioactif à l'I<sup>125</sup> qui permet d'effectuer un comptage direct des échantillons prélevés [306,310,311]. Cependant, cette méthode a fourni des résultats assez différents et il est possible que ce marquage entraîne des modifications de comportement de la protéine, notamment dans les interactions qu'elle peut présenter avec l'environnement (tant avec la solution dans laquelle elle est ajoutée, qu'avec les dispositifs d'administration).

Les techniques immunométriques sont depuis longtemps des techniques de choix. Les premiers dosages par radio-immuno-essais ont été publiés dès les années 1970 [341].

Ces techniques immunométriques garantissent une spécificité très élevée puisqu'elles reposent sur la reconnaissance Ag-Ac. De plus, le résultat peut être obtenu relativement rapidement (par exemple, avec le kit Elecsys insulín, le dosage dure 18 minutes). Cependant, l'effet matrice représente une difficulté majeure qu'il faut surmonter lors de l'emploi de ces méthodes [332,342], notamment lorsque le dosage ne s'effectue pas en milieu sérique ou plasmatique (*i.e.* le MNP ternaire employé dans les présents travaux). C'est la raison pour laquelle la validation préalable de la méthode IECL est indispensable à l'exploitation de tout résultat issu de cette technique de dosage. Ce point constitue d'ailleurs une lacune majeure dans l'étude de stabilité de l'insuline menée dans des MNP préparés dans une unité de préparation aseptique [309]. L'effet matrice est d'autant plus à redouter que dans la notice du kit IECL Elecsys insulín, le paragraphe intitulé « limites d'utilisation – interférences » mentionne une absence d'influence de la lipémie si cette dernière est inférieure à 1800 mg/dL, soit 18 g/L. Or il se trouve que le MNP ternaire employé contient 60 g de lipides dans un volume nominal d'environ 1500 mL, soit 40 g/L. Cette importante concentration en lipides (entraînant un risque d'interférences par effet matrice) ainsi qu'une concentration initiale en insuline humaine (20 UI/L) largement supérieure au domaine de mesure validé pour le kit (0,2 – 1000  $\mu$ U/mL) ont rendu indispensable une étape de dilution. L'ajout de sérum albumine dans le diluant a été inspiré par les travaux menés sur l'effet matrice [332,343]. Dans le présent travail, nous avons réussi à valider la quantification de l'insuline humaine biosynthétique avec une méthode d'IECL. Celle-ci va par conséquent pouvoir être employée pour mener une étude de stabilité de l'insuline humaine après ajout dans le MNP ternaire choisi.

Cette validation de méthode a fait l'objet d'une publication en 2017 : Immunoassay quantification of human insulin added to ternary parenteral nutrition containers: comparison of two methods. *Anal Bioanal Chem.* mai 2017;409(14):3677-84.

Henry H, Lannoy D, Simon N, Seguy D, D'Herbomez M, Barthélémy C, Décaudin B, Dine T, Odou P.

### **III. Etude de stabilité *in vitro* de l'insuline humaine dans un mélange de nutrition parentérale ternaire**

#### **A. Introduction**

**L'objectif de cette étude est de caractériser l'évolution de la concentration en insuline dans le MNP ternaire.**

#### **B. Matériels et méthodes**

##### **1. Matériels**

###### **- Mélange de NP et insuline humaine**

Le milieu nutritif de référence décrit dans la partie traitant de la stabilité physique de l'émulsion (Olimel N7E® supplémenté en vitamines et ET) est utilisé dans cette étude.

Quelle que soit la condition étudiée, l'insuline humaine (Umuline rapide®) est toujours ajoutée à la concentration préalablement fixée de 20 UI/L.

Dès lors que le milieu testé est supplémenté en vitamines et éléments-trace, un flacon de Cernevit® et une ampoule de Nutryelt® sont ajoutés pour un équivalent de 1,5 L de milieu nutritif.

###### **- Contenant**

Pour chaque condition expérimentale, deux types de contenants sont étudiés en parallèle : des fioles en verre de 500 mL et des poches en EVA de 250 mL provenant du laboratoire Bexen medical (Hernani, Espagne).

###### **- Produit adjuvant**

- SAB Fraction V, lyophilisat (95% de pureté) (Euromedex, Souffelweyersheim, France)
- Tampon phosphate 0,04 M

**- Automate et kits de dosage** : identiques à ceux employés lors de la validation de méthode (voir paragraphe précédent).

## 2. Méthodes

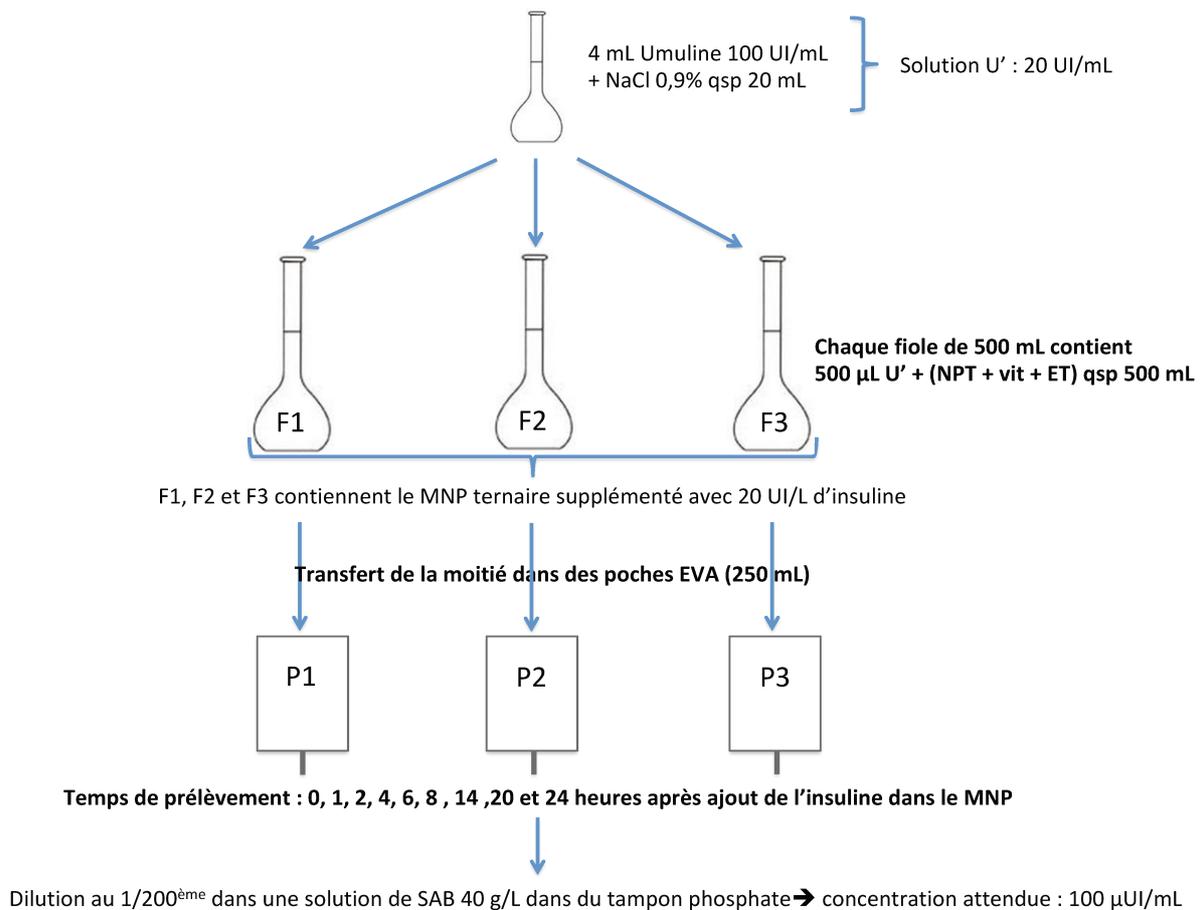
### *a. Préparation des mélanges étudiés*

La [Figure 19](#) représente la préparation des mélanges conditionnés soit dans des fioles en verre, soit dans des poches en EVA pour l'étude de stabilité. Chaque milieu est préparé en triplicat.

Sachant que la solution commerciale d'Umuline rapide® a une concentration initiale de 100 UI/mL et que le volume initial de MNP reconstitué est de 500 mL, l'ajout de 10 UI d'Umuline rapide® est nécessaire pour atteindre la concentration souhaitée de 20 UI/L. Afin de garantir une précision optimale lors de la mesure du volume d'insuline, une solution d'insuline diluée (de concentration finale 20 UI/mL) est préparée dans du NaCl 0,9%. Cette dilution est effectuée dans une fiole jaugée en verre de 20 mL.

Le MNP est préparé suivant le même protocole que pour la validation de méthode IECL. Il est ensuite partiellement transféré dans des fioles jaugées en verre de 500 mL, puis on y ajoute 500 µL la solution d'insuline diluée (de concentration 20 UI/mL) préparée juste avant. L'ajustement au trait de jauge est réalisé avec le MNP avant de procéder à une homogénéisation finale.

La moitié du contenu des 3 fioles est ensuite transféré dans 3 poches en EVA à l'aide d'une seringue (BD plastipak) de 50 mL. Pour finir, l'air résiduel est évacué des poches (par pression) avant leur fermeture définitive. Ce moment marque le  $t_0$  de l'essai.



**Figure 19** : Protocole de préparation des fioles en verre et poches EVA pour l'étude de stabilité  
NPT = nutrition parentérale ternaire

### ***b. Protocole de prélèvement et de traitement des échantillons***

La stabilité de l'émulsion est évaluée par un examen visuel à l'œil nu avant chaque prélèvement (recherche d'un changement de coloration, la présence d'un précipité, ou encore d'un phénomène de séparation de phases). Une agitation manuelle précède chaque prélèvement. Les échantillons sont recueillis dans des tubes en verre borosilicaté (directement par transfert à partir de la fiole ou à l'aide d'une seringue munie d'une aiguille pour les poches EVA).

Ils sont ensuite dilués au 1/200<sup>ème</sup> dans une solution de SAB<sub>p</sub> puis analysés sans délai selon la méthode IECL précédemment validée.

Entre deux prélèvements, les fioles et poches sont conservées à température ambiante (soit 25°C) avec exposition à la lumière du jour. Les fioles en verre sont parafilmées afin d'éviter tout phénomène d'évaporation et de limiter l'apport d'oxygène dans le MNP.

L'étude de stabilité est menée sur une durée de 24 heures. Afin de garantir la fiabilité des dosages, 4 solutions de contrôles qualité de concentrations respectives 7,5 / 15 / 25 et 35 UI/L sont préparées et quantifiées chaque jour. Les prélèvements sont effectués à H0, H1, H2, H4, H6, H8, H14, H20 et H24. Une gamme d'étalonnage allant de 5 à 40 UI/L a été préparée à H0 puis un point de contrôle a été préparé extemporanément pour être dosé lors de chaque prélèvement.

Le résultat obtenu à partir de l'automate correspond à la concentration en insuline en  $\mu\text{UI/mL}$ . Le ratio  $C_t/C_0$  est ensuite calculé. Il correspond au rapport de la concentration en insuline à un instant  $t$  divisé par la concentration initiale à  $t_0$  et est exprimé en %.

### *c. Analyses statistiques : étude de stabilité dans le mélange ternaire*

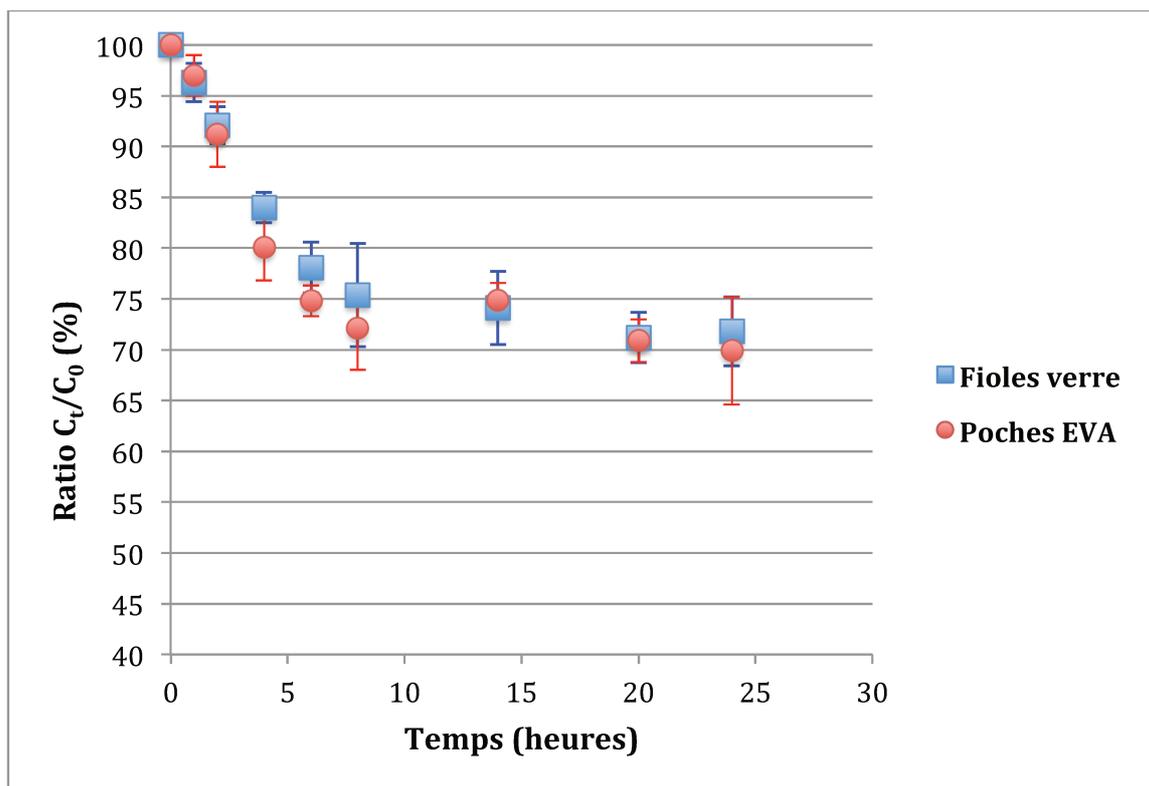
Les résultats présentés pour cette étude de stabilité sont analysés d'un point de vue statistique avec un risque  $\alpha = 5\%$ .

La comparaison des résultats obtenus entre les fioles en verre et les poches en EVA est effectuée à chaque temps de prélèvement au moyen d'un test non paramétrique de Wilcoxon sur échantillons appariés (fiole vs poche). Le seuil de significativité est fixé à 5%.

Le seuil retenu pour définir la stabilité de l'insuline en solution est une variation de 10% maximum.

## **C. Résultats**

La cinétique d'évolution de la concentration en insuline dans le milieu peut être décomposée en 2 parties. Une diminution rapide et importante est observée dans les 6 premières heures (environ 30%) avant d'atteindre une phase de plateau (Figure 20).



**Figure 20 :** Evolution sur 24 heures de la teneur en Umuline rapide® par rapport à la concentration initiale dans des fioles en verre et dans des poches en EVA

Le seuil de 90% définissant la limite de stabilité a été franchi entre la 2<sup>ème</sup> et la 4<sup>ème</sup> heure. L'aspect macroscopique des mélanges nutritifs n'a pas subi de modification.

Le test de Wilcoxon de comparaison fioles *versus* poches du taux résiduel d'Umuline rapide® n'a révélé aucune différence significative à chaque temps de prélèvement (Annexe C). Les résultats obtenus étaient donc comparables entre les 2 types de contenant.

#### D. Discussion

Cette première étude de stabilité de l'insuline dans un MNP industriel ternaire a retrouvé une décroissance de la concentration résiduelle en insuline de l'ordre de 30% en 24 heures.

La durée d'étude a été choisie afin d'être représentative de la durée maximale de perfusion d'un MNP en service de soins ou à domicile. Le choix de la conservation à température ambiante est justifié par le même argument. En effet, il est impossible d'administrer au patient un MNP réfrigéré sous peine de provoquer une hypothermie.

La comparaison des deux types de contenants repose sur l'hypothèse d'un comportement différent de l'insuline selon la nature du matériau. Comme nous l'avons décrit dans la partie de contextualisation du sujet, l'instabilité physique d'un MNP (qu'il contienne un médicament ajouté ou non) peut être liée à des phénomènes d'interaction avec le contenant (absorption ou adsorption notamment). Les phénomènes de sorption des peptides ou protéines ont très largement été décrits dans la littérature que ce soit sur le verre [344–346] ou sur des matériaux plastiques. En ce qui concerne l'EVA, une étude rapporte la perte d'insuline en sortie de dispositif [179], mais cette étude associe une poche en EVA avec une poche en PVC sans distinguer la sorption de l'insuline sur chaque matériau pris indépendamment de l'autre.

La diminution rapide du taux résiduel d'insuline suivie d'une phase en plateau peut évoquer une cinétique d'adsorption non spécifique de l'insuline sur les parois des contenants en verre et en EVA. La phase plateau correspondrait à la saturation des sites d'adsorption présentés à la surface des contenants. Les auteurs ayant traité le sujet concluent que l'insuline a tendance à s'adsorber sur les surfaces ayant des caractéristiques hydrophobes, subissant ainsi des modifications dans sa conformation secondaire conduisant à un phénomène d'agrégation qui suit une cinétique en deux temps [347–350].

**La première hypothèse permettant d'expliquer cette diminution de la concentration en insuline dans le milieu d'intérêt est donc la survenue d'une adsorption ou d'une agrégation à la surface interne du contenant.**

**La seconde hypothèse réside dans la possibilité d'un réarrangement conformationnel de la protéine. Sachant que la quantification de l'insuline par IECL repose sur la reconnaissance de 2 épitopes différents à la surface de la protéine par deux anticorps anti-insuline, si l'un des deux épitopes n'est plus accessible pour les anticorps, la quantification n'est plus possible. Chaque nutriment entrant dans la composition du MNP est susceptible de modifier le comportement de l'insuline. C'est la raison pour laquelle cette étude de stabilité a été réitérée en faisant varier les conditions expérimentales.**

## **IV. Etude des facteurs influençant la stabilité de l'insuline dans un mélange de nutrition parentérale ternaire**

### **A. Introduction**

Après avoir formulé deux hypothèses pouvant expliquer la diminution de la concentration résiduelle en insuline dans le MNP, **l'objectif de cette partie est d'identifier les facteurs intrinsèques ou extrinsèques au MNP pouvant influencer la stabilité de l'insuline.**

### **B. Matériels et méthodes**

#### **1. Matériels**

##### **- Milieu nutritif et insuline**

- Le milieu nutritif employé varie selon les conditions mais il est toujours préparé à partir d'une poche d'Olimel N7E®
- Dans certaines conditions, des émulsions injectables autres que celle contenue dans le compartiment d'une poche d'Olimel N7E® sont employées : Médialipide®, Intralipide®, Smoflipid® et Omegaven®. La composition des ces émulsions sera détaillée plus bas.
- L'insuline employée est l'Umuline rapide® à la concentration finale de 20 UI/L.

##### **- Autres médicaments**

- Lorsque ce milieu nutritif est supplémenté en vitamines et éléments-trace, cette supplémentation est faite à partir de Cernevit® et Nutryelt® dans des proportions équivalentes à 1 flacon de Cernevit® et 1 ampoule de Nutryelt® pour 1500 mL de milieu nutritif.
- Dans l'une des conditions, un flacon de Gluconate de zinc (Aguettant, Lyon, France) est ajouté en remplacement de l'ampoule de Nutryelt®.

### - Produits adjuvants

- Hydroxyde de sodium (NaOH 30%, VWR chemicals, Fontenay-sous-Bois, France) ou de l'acide chlorhydrique (HCl 25%, Merck millipore, Molsheim, France) pour les ajustements de pH
- Glucose anhydre (Inresa, Bartenheim, France)
- SAB Fraction V, lyophilisat (95% de pureté) (Euromedex, Souffelweyersheim, France)
- Tween 20 (ou polysorbate 20) (Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France)

- **Automate et kits de dosage** : identiques à ceux employés lors de la validation de méthode (voir paragraphe précédent).

## 2. Méthodes

### - Etude de stabilité dans les compartiments séparés et dans le mélange binaire

La composition des mélanges de NP étant variable d'un patient à l'autre, nous avons décidé de nous intéresser à l'influence de chacun des macronutriments sur la stabilité de l'insuline.



**Figure 21** : Combinaisons employées pour la préparation du milieu nutritif

a = solution de glucose 35% + Ca

b = solution d'acides aminés + électrolytes

c = émulsion lipidique

d = a + b = mélange binaire

e = mélange ternaire

#### ○ Influence du glucose

La stabilité de l'insuline est étudiée en comparant des solutions de glucose 35% obtenues de 2 manières différentes :

- En récupérant la solution de glucose 35% provenant d'une poche d'Olimel N7E® non reconstituée (le compartiment contenant le glucose et du calcium était découpé en suivant la soudure non permanente) (Figure 21).
- En préparant une solution extemporanée de glucose 35% par dissolution de 35 g de glucose anhydre dans de l'eau ultra pure.

Chaque solution de glucose est supplémentée en vitamines et éléments-trace.

#### ○ Influence des acides aminés

Le compartiment de la poche d'Olimel N7E® contenant les acides aminés (ainsi que certains électrolytes) était isolé par découpage de la poche puis supplémenté en vitamines et éléments-trace (Figure 21).

#### ○ Influence des lipides

Plusieurs natures et concentrations d'émulsions lipidiques ont été étudiées. Celles-ci sont détaillées dans le Tableau XIII.

**Tableau XIII:** Natures et concentrations des émulsions testées dans l'étude de stabilité

Spécialité pharmaceutique	Nature de l'huile	Emulsifiant	Concentrations testées
Olimel® (compartiment contenant l'émulsion)	Olive 80% + soja 20%	Lécithine d'œuf	5 / 10 / 20%
Médialipide®	Soja 50 % + TCM 50%	Lécithine d'œuf	20%
Intralipide®	Soja 100% (TCL)	Lécithine d'œuf	20%
Smoflipid®	Soja 30% + TCM 30% + olive 25% + poisson 15%	Lécithine d'œuf	20%
Omegaven®	Poisson 100%	Lécithine d'œuf	10%

TCM = Triglycérides à chaîne moyenne ; TCL : triglycérides à chaîne longue

Chaque émulsion a été supplémentée et utilisée à sa concentration initiale. Cependant l'émulsion provenant du compartiment de la poche d'Olimel® a également été testée après dilution avec de l'eau pour préparation injectable et supplémentation.

- **Influence du mélange binaire**

Certains MNP étant de nature binaire (mélange de glucose et d'acides aminés), l'étude de stabilité a été menée dans le mélange binaire reconstitué à partir des 2 compartiments de la poche d'Olimel® contenant respectivement la solution glucosée et la solution d'acides aminés. Cette solution binaire a été supplémentée en vitamines et éléments-trace.

- **Influence d'une étape de pré-conditionnement des contenants**

Dans cette partie, les contenants ( fioles et poches) subissent un prétraitement de surface. Des solutions de SAB ou de Tween 20 à la concentration de 3,3 g/L sont préparées dans du tampon phosphate 0,4 M. Les fioles et poches sont ensuite remplies à l'aide de l'une ou l'autre de ces solutions et une période de contact de 72 heures est respectée. A l'issue de cette durée, les contenants sont vidés et laissés à température ambiante afin que les parois sèchent. Après séchage, le MNP ternaire ainsi que l'insuline sont ajoutés dans les contenants. Cette étape marque le début de l'étude de stabilité.

- **Influence d'une étape de conditionnement des contenants**

A la suite des essais de pré-conditionnement, la SAB et le Tween 20 sont employés de manière différente. Ils sont ajoutés à deux niveaux de concentration finale (3,3g/L ou 40g/L) directement dans le MNP ternaire contenant l'insuline.

- **Influence du zinc**

Dans cette partie, l'objectif était d'étudier l'influence potentielle que les ions zinc contenus dans le Nutryelt® pouvaient avoir sur la stabilité de l'insuline. Dès lors, le mélange de nutrition parentérale ternaire n'était pas supplémenté avec du Nutryelt® mais par ajout d'un flacon de gluconate de zinc (contenant 10 mg de zinc élément), soit la même quantité que celle présente dans une ampoule de Nutryelt®.

### - Influence du pH

Dans un premier temps, l'étude de stabilité a été menée dans chaque milieu nutritionnel à son pH natif/d'origine (figurant dans le [Tableau XIV](#)). Ayant constaté deux niveaux de pH selon les milieux étudiés (un niveau bas autour de 3,6 et un niveau haut autour de 6,3), le pH de chacun des milieux a été ajusté dans un second temps à ces deux niveaux de pH à l'aide de NaOH ou d'HCl.

Les mesures de pH ont été effectuées à l'aide d'un pH-mètre symphony (VWR international, Fontenay-sous-Bois, France).

### - Influence de la nature du contenant

Comme décrit en début de cette partie, deux types de contenants ont été testés afin de mettre en évidence une éventuelle différence de comportement de l'insuline dans le milieu en fonction des interactions contenant-contenu.

L'ensemble des conditions testées est synthétisé dans le [Tableau XIV](#).

**Tableau XIV** : Synthèse des différentes conditions expérimentales et paramètres d'influence étudiés pour la stabilité de l'insuline

Milieu testé	pH initial	pH bas	pH haut	Contenant (F/P)	Zn
Ternaire	6,3	x	x	F/P	x
Glucose olimel	3,6	x	x	F/P	
Glucose extemp	5,6	x	x	F/P	
AA	6,3	x	x	F/P	
Lipides	7,5	x	x	F/P	
Binaire	6,3	x	x	F/P	

F = fiole en verre / P = poche en EVA

Glucose olimel = solution de glucose 35% provenant du compartiment de la poche d'Olimel N7E®

Glucose extemp = solution de glucose préparée extemporanément par dissolution de 35 g de glucose anhydre dans 100 mL d'eau ultrapure

### - **Influence du temps**

L'administration d'un mélange de NP pouvant être effectuée sur une durée maximale de 24 heures, les études de stabilité ont été menées sur cette durée. Au cours de l'étude initiale dans le mélange ternaire, les prélèvements ont été effectués à 0, 1, 2, 4, 6, 14 et 20 heures après ajout de l'insuline dans le mélange de NP. Par la suite, afin de limiter le nombre d'échantillons à analyser, les temps de prélèvement ont été espacés à 0, 4 et 24 heures après ajout de l'insuline.

### **Protocole de traitement des échantillons**

Les prélèvements réalisés à H0, H4 et H24 sont dilués au 1/200<sup>ème</sup> dans la solution de SAB<sub>P</sub> puis immédiatement analysés.

Les résultats des dosages de l'insuline ont été rapportés en ratio de la concentration à un instant  $t$  ( $C_t$ ) divisée par la concentration initiale ( $C_0$ ), exprimé en pourcent. Les calculs de ratio sont exploités sous la forme de représentation graphique.

## **3. Etude statistique**

L'ensemble des résultats exprimés est soumis à une analyse de covariance (ANCOVA) afin de déterminer dans un premier temps l'ordre de la cinétique à laquelle correspond l'évolution de la concentration en insuline selon les différentes conditions testées. Les analyses sont réalisées à partir des valeurs de concentration en insuline (exprimés en mUI/mL) dans les diverses conditions expérimentales détaillées plus haut. Dans un second temps, les facteurs ayant une significativité lors de cette première analyse sont testés en tant que covariables à partir du modèle choisi, afin de déterminer le sens et l'intensité de leur impact sur l'évolution de la concentration en insuline.

### ***a. Détermination du modèle cinétique d'évolution de la concentration***

Sachant qu'une réaction de nature chimique est possible, les 5 modèles d'ordres cinétiques les plus fréquemment rencontrés dans ce type de réaction (soient les modèles d'ordre 0, 0.5, 1, 1.5 et 2) sont testés afin de choisir le modèle cinétique le plus adapté.

Dans un premier temps, les valeurs correspondant à  $\sqrt{C_t}$ ,  $\ln(C_t)$ ,  $1/\sqrt{C_t}$  et  $1/C_t$  sont calculées.

**b. Analyse de la covariance pour mesurer l'impact des facteurs**

Une fois l'ordre de la cinétique établi, l'effet de différents paramètres (Tableau XV) sur cette cinétique est testé en employant ces paramètres en tant que covariables dans une analyse ANCOVA.

**Tableau XV :** Détail des données quantitatives et qualitatives utilisées dans l'ANCOVA

Données quantitatives	Données qualitatives
1/C <sub>t</sub>	Eléments-trace
Temps	Zn
Niveau de pH (3,5 ou 6,5)	Pré conditionnement
Teneur en glucose (%)	Ajout conditionnement
Teneur en AA (%)	Nature émulsion lipidique
Teneur en lipides (%)	Contenant

Puis, seuls les paramètres ayant une significativité sont utilisés en tant que covariables, afin d'évaluer l'impact des ces facteurs.

**C. Résultats**

Aucune modification visuelle n'a été observée, quel que soit le milieu dans lequel l'étude a été menée.

Un total de 1656 résultats a été analysé pour la détermination du modèle cinétique puis l'analyse ANCOVA.

## 1. Détermination du modèle cinétique d'évolution de la concentration

Le modèle de cinétique le plus approprié était celui d'une cinétique d'ordre 2, celui-ci fournissant le coefficient de corrélation le plus élevé avec les paramètres détaillées dans le **Tableau XV**, c'est ce modèle, d'équation  $\frac{1}{c} - \frac{1}{c_0} = k \cdot t$  qui a été choisi pour faire les analyses de covariance.

## 2. Analyse de la covariance pour mesurer l'impact des facteurs

Seuls les paramètres présentés dans le **Tableau XVI** ont été retenus pour l'analyse finale par ANCOVA car ils ont une significativité statistique.

**Tableau XVI** : Variables retenues pour l'analyse finale par ANCOVA

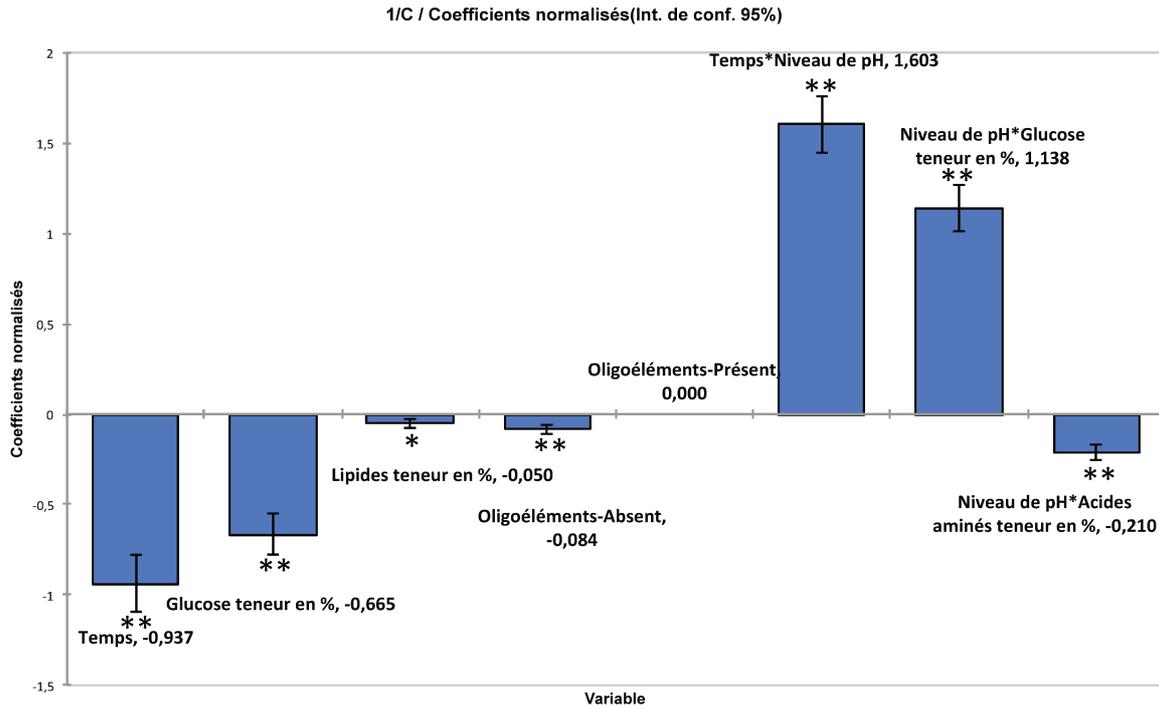
Variables testées <b>indépendamment</b>	Variables testées <b>en interaction</b>
Temps (heures)	Temps * niveau de pH
Teneur en glucose (%)	Niveau de pH * teneur en glucose
Teneur en lipides (%)	Niveau de pH * teneur en AA
Absence d'éléments-trace	

Cette analyse de covariance a fourni le coefficient de corrélation le plus élevé ( $r^2 = 0,68$  ( $p = 0,01$ )).

L'équation du modèle retenu après analyse est la suivante :

$$1/C = 11,1 - 0,311 * \text{Temps} - 0,126 * \text{Glucose teneur en \%} - 2,518E-02 * \text{Lipides teneur en \%} - 1,247 * \text{Oligoéléments-Absent} + 8,679E-02 * \text{Temps} * \text{Niveau de pH} + 4,021E-02 * \text{Niveau de pH} * \text{Glucose teneur en \%} - 2,695E-02 * \text{Niveau de pH} * \text{Acides aminés teneur en \%}$$

La **Figure 22** représente l'impact des différentes variables considérées seules ou en interaction, exprimés avec l'intervalle de confiance à 95%.



**Figure 22 :** Coefficients des variables prises en considération dans l'ANCOVA selon le modèle cinétique d'ordre 2

\* p = 0 ; \*\* p < 0,0001

### 3. Etude de l'influence du pH dans les compartiments séparés et le mélange binaire

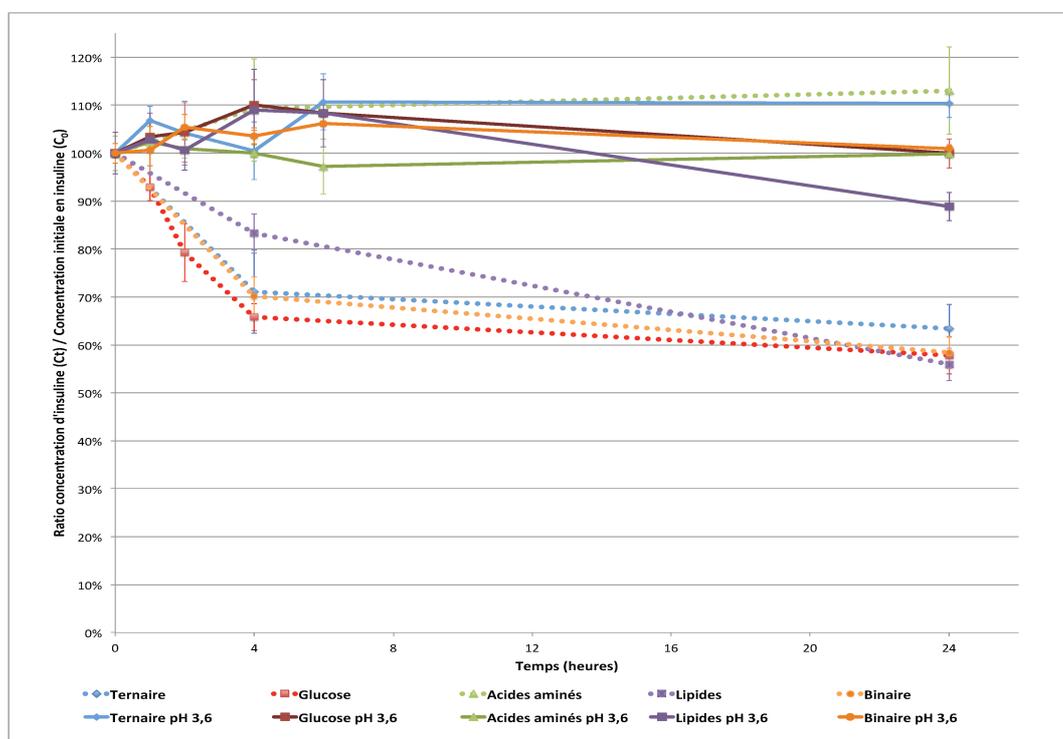
Au vu de l'évolution de la concentration en insuline observée dans l'étude de stabilité du précédent paragraphe, il a semblé intéressant d'étudier la stabilité de cette protéine dans chaque compartiment de la poche, pris indépendamment les uns des autres mais également en combinaison binaire. Les résultats de cette étude n'ont pu être interprétés qu'en considérant le niveau de pH du milieu étudié.

Les valeurs initiales de pH de chaque compartiment indépendant et du mélange binaire (mélange v/v des solutions de glucose et d'acides aminés) supplémenté en vitamines et ET sont décrits dans le [Tableau XVII](#)).

**Tableau XVII:** Valeurs nominales de pH de chaque compartiment de la poche de NP et du mélange binaire, après supplémentation en vitamines et éléments-trace

Type de milieu	pH nominal
Solution de glucose 35% + Ca <sup>2+</sup>	3,6
Solution d'acides aminés 11% + électrolytes	6,54
Emulsion lipidique 20%	7,5
Mélange binaire	6,3
Mélange ternaire	6,34

Quel que soit le milieu étudié, deux situations se distinguent (Figure 23) : à pH de niveau bas (pH = 3,6), la concentration en insuline est constante tandis qu'à pH élevé (pH = 6,3), la diminution de teneur résiduelle en insuline est comparable à celle observée dans le MNP ternaire lors de l'étude de stabilité initiale. En revanche, l'un des milieux nutritifs, la solution d'acides aminés, échappe à cette règle de stabilité en fonction du pH : à pH élevé, l'insuline reste à une concentration constante dans ce milieu.



**Figure 23 :** Evolution de la concentration résiduelle en insuline sur 24 heures en fonction du milieu nutritif étudié et du niveau de pH. Les courbes en trait plein correspondent au niveau de pH bas (3,6) tandis que le niveau de pH élevé (6,3) est représenté en traits pointillés.

#### 4. Etude de l'influence d'une étape de pré-conditionnement des contenants

La Figure 24 montre que, quel que soit le type de contenant étudié, aucune différence d'évolution de la concentration en insuline dans le milieu n'a été observée suite au pré-traitement des contenants par Tween ou SAB.

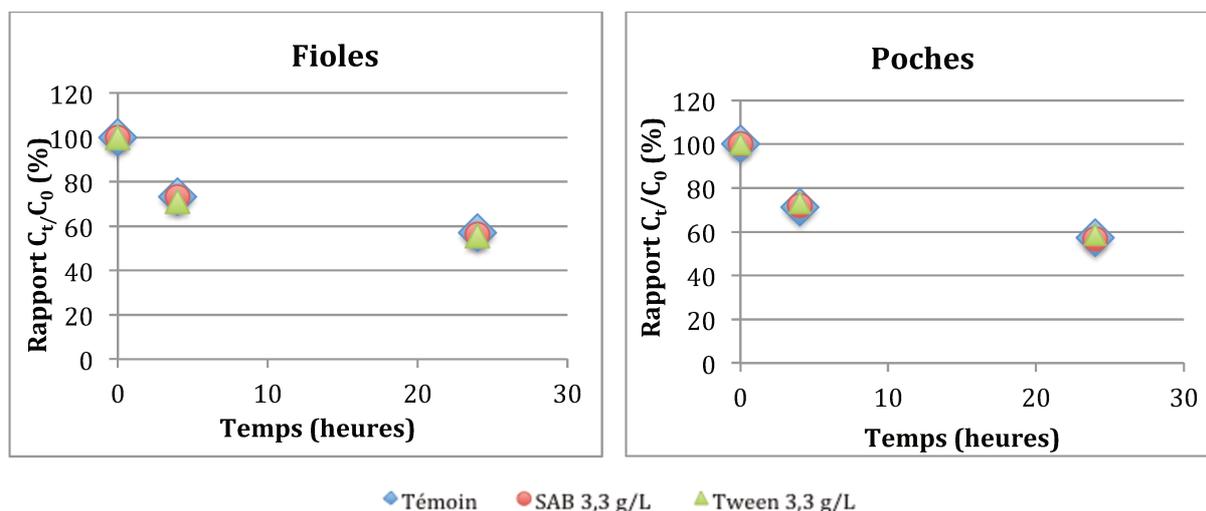


Figure 24 : Stabilité de l'insuline dans le MNP ternaire : contenant ayant subi 72 heures de pré-conditionnement

#### 5. Etude de l'influence d'une étape de conditionnement des contenants

La Figure 25 détaille l'évolution de la concentration en insuline lorsque l'étude de stabilité est menée avec un conditionnement par SAB ou Tween à deux concentrations distinctes.

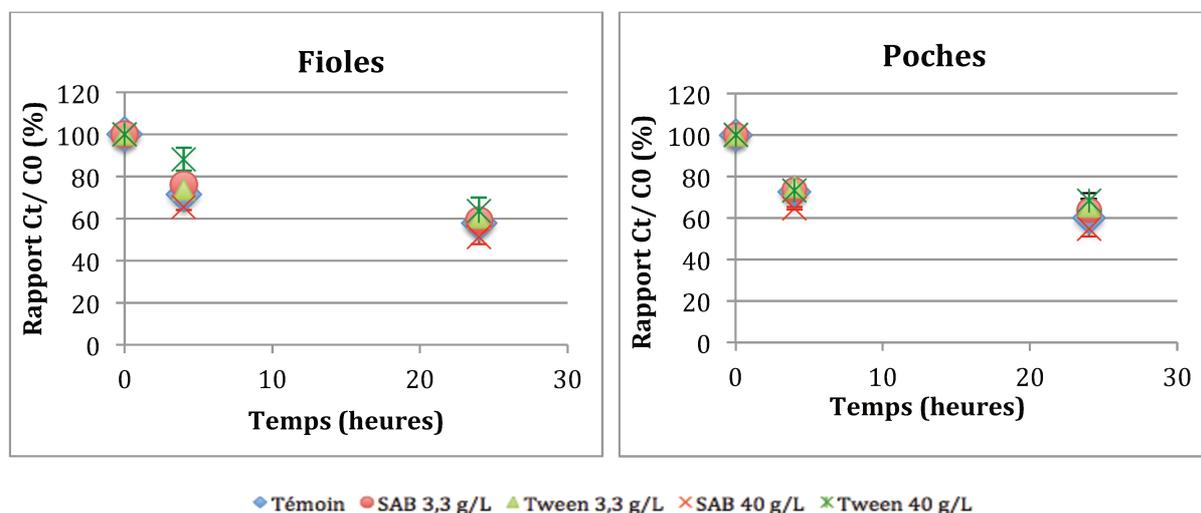
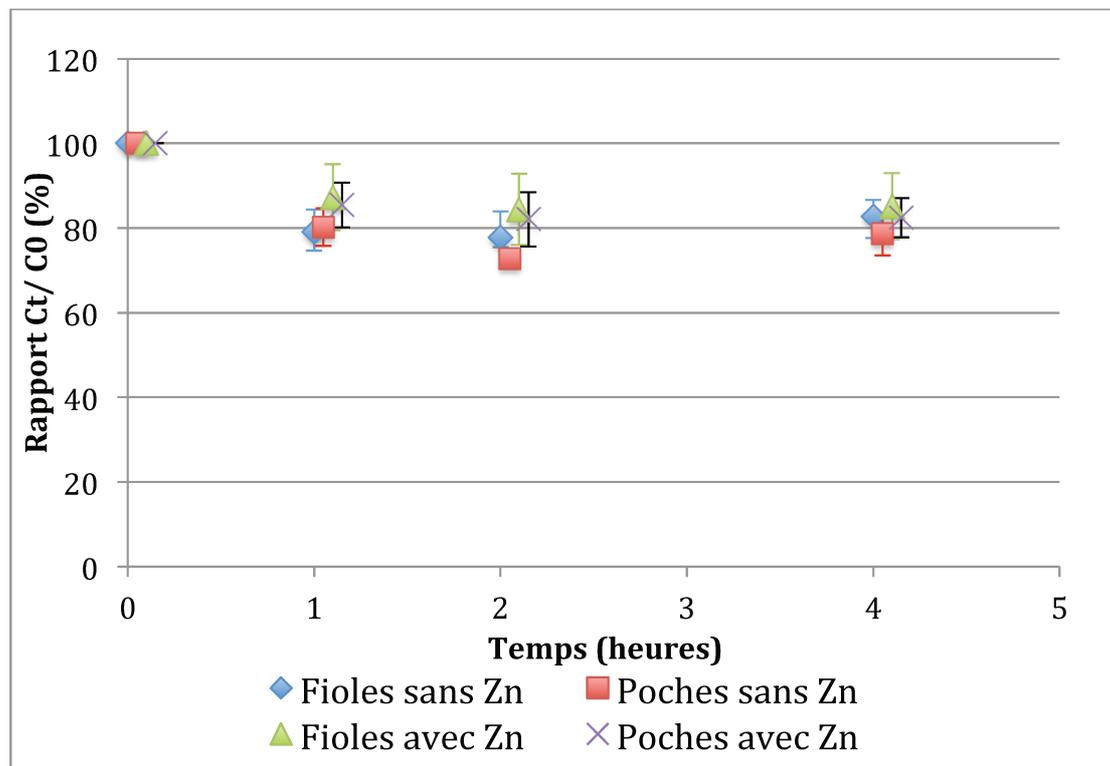


Figure 25 : Stabilité de l'insuline dans le MNP ternaire avec conditionnement

Quel que soit l'adjuvant ou la concentration à laquelle il est ajouté dans le MNP, une diminution de la concentration résiduelle en insuline est observée. Cette diminution est semblable à celle observée sans conditionnement.

## 6. Influence du zinc

La Figure 26 présente les résultats des dosages de l'insuline dans le MNP ternaire avec ou sans supplémentation en zinc dans les deux types de contenants.

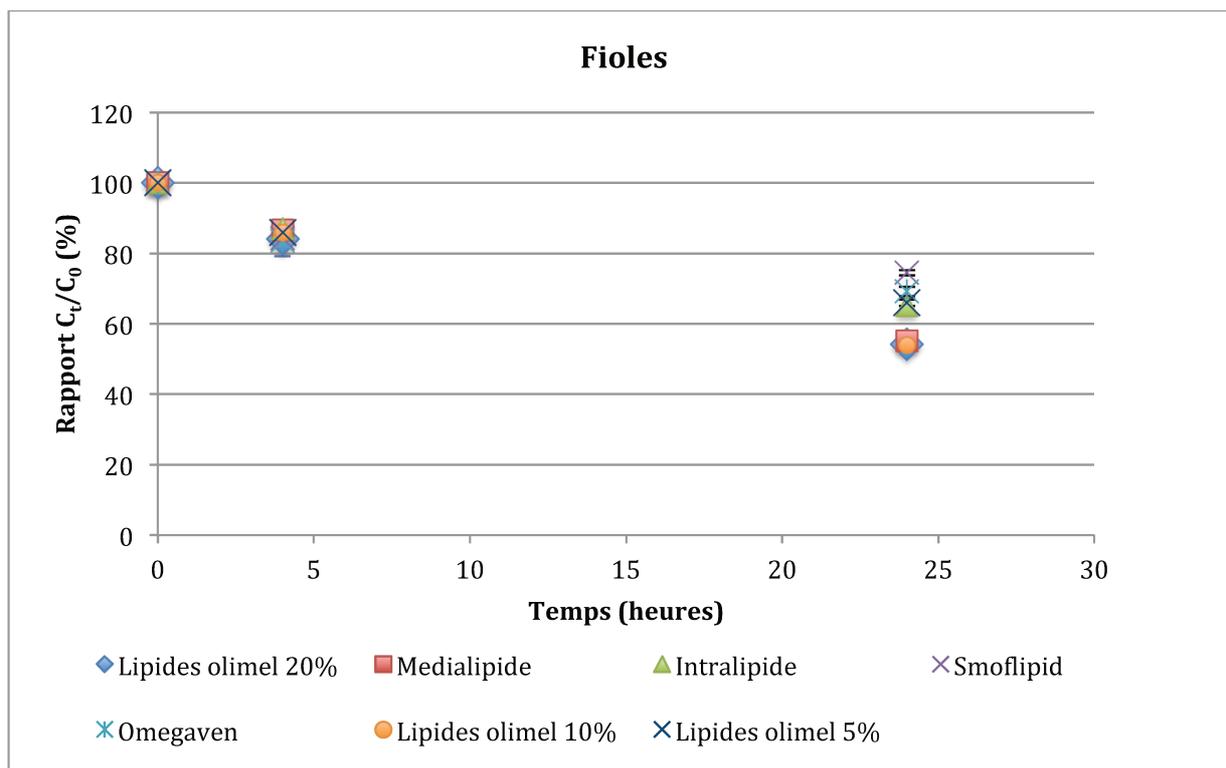


**Figure 26** : Evolution de la concentration résiduelle en insuline en présence ou absence de supplémentation en zinc dans le mélange nutritif

Quel que soit le type de contenant étudié, aucune différence d'évolution de la concentration en insuline dans le milieu n'a été observée. Cependant, la teneur résiduelle retrouvée après 4 heures d'étude semble se stabiliser autour de 80%.

## 7. Influence de la nature et la concentration des lipides

Les résultats de l'étude de stabilité menée dans les émulsions lipidiques décrites dans le matériel et méthode sont présentés dans la Figure 27.



**Figure 27** : Evolution de la concentration en insuline selon la nature et la concentration de l'émulsion lipidique

Dans toutes les conditions testées, quel que soit le type d'émulsion employé, une diminution de la teneur en insuline du même ordre est observée.

#### D. Discussion

La cinétique d'évolution de la concentration en insuline dans le MNP ternaire ayant une allure pouvant témoigner d'un phénomène de saturation après la 6<sup>ème</sup> heure de contact entre le médicament et le MNP, la première hypothèse explorée était celle d'une adsorption possible de l'insuline sur les sites des parois des contenants (soit les fioles en verre et les poches en EVA).

Ce phénomène d'adsorption a déjà été mis en évidence dans la littérature et étudié pour diverses protéines, notamment pour l'insuline sur divers matériaux : verres borosilicaté et blanc [344,345,351,352], polychlorure de vinyle (PVC) [313,344,353,354], polyéthylène (PE) et polyuréthane (PUR) [355], polypropylène (PP) [313,345,356,357], polystyrène [345,357].

En ce qui concerne l'EVA, une seule étude menée par Doglietto *et al.*[179] révèle une perte d'insuline mais pour la poche EVA associée à la tubulure PVC.

Cette problématique d'adsorption de l'insuline sur différents matériaux a déjà été abordée, que ce soit dans le cadre des essais *in vitro* [345,352,357,358] ou *in vivo* [313,354,355] et il semblerait que ce phénomène prédomine dans les premières heures de la perfusion et soit plus important lorsque le débit de perfusion est plus faible car le temps de contact avec le matériau plastique est alors plus long [353].

De nombreux facteurs influent sur l'adsorption de l'insuline et sont à prendre en compte dans notre étude : le matériau du contenant, la concentration en glucose, la présence d'électrolytes, la présence d'acides aminés (notamment le tryptophane, identifié comme favorisant la disponibilité de l'insuline à partir d'un MNP [307]), la concentration en insuline [359] ou encore la présence de vitamines [304,311]. Ces dernières, en formant un complexe avec l'insuline, limiteraient ainsi l'adsorption de la protéine sur le matériau. La dilution de l'insuline dans un mélange complexe de type MNP permettrait d'obtenir une meilleure récupération de l'insuline en sortie de tubulure en PVC, permettant de diminuer de 30% la dose d'insuline lorsqu'elle est administrée dans un MNP en comparaison à de l'insuline dans du NaCl 0,9% [305].

Il apparaît que l'une des solutions envisageables pour limiter l'adsorption non spécifique de l'insuline est de saturer au préalable les sites de liaison [360] ou d'ajouter directement dans la solution une protéine qui entre en compétition avec l'insuline pour la fixation sur les sites. Cecil *et al.* [352] et Livesey *et al.* [357] ont étudié l'impact de différents éléments ajoutés (SAB, SAH, ovalbumine, gélatine, tween 20, lysozyme et insuline) dans la préparation contenant de l'insuline radiomarquée pour modifier la fixation de l'insuline. Cecil *et al.* [352] ont conclu que l'ajout de d'insuline fournissait le meilleur résultat (réduction de la perte d'insuline de 45% à 12%), suivi de l'ajout de 5 mg/mL de SAB (réduction de 44% à 33%).

Les résultats obtenus lors des essais de pré conditionnement et conditionnement, permettent d'exclure l'hypothèse de la diminution de la teneur en insuline au cours de l'étude de stabilité. Cependant il sera nécessaire de prendre en compte cette problématique d'interaction, notamment lors de l'étude *in vivo* puisque dans cette

partie, un montage comprenant une tubulure majoritairement composée de PVC sera employée. Dans des conditions d'étude *in vivo*, les auteurs [313,361,362] ont testé différentes méthodes d'administration d'insuline par voie IV, notamment la possibilité de pré-conditionner les tubulures [363,364] ou de les rincer avec la solution d'insuline en amont de l'administration [313]. L'adsorption de l'insuline sur les différents matériaux plastiques étudiés serait favorisée par la concentration en insuline perfusée (plus la concentration est faible, plus l'adsorption est importante sur du PP [363]) mais les travaux menés à ce sujet sont parfois contradictoires (Simmons *et al.* concluent à des pertes négligeables par adsorption sur le PP [365]).

Il existe un mécanisme différent impliquant une interaction entre l'insuline et les surfaces hydrophobes, qui pourrait expliquer la diminution de la concentration en insuline dans le temps : l'agrégation de l'insuline sous la forme d'amyloïdes [349,350]. Cependant nous ne disposons pas des techniques analytiques dédiées (spectroscopie avec transformation de Fourier) pour explorer cette hypothèse.

Les spécialités pharmaceutiques d'éléments-trace (dont le Nutryelt®) contiennent dans leur formulation des ions zinc (Zn). Ces ions zinc, ajoutés en tant qu'excipients sont destinés à stabiliser la solution d'insuline sans affecter la stabilité chimique de la protéine [366]. Des travaux antérieurs [367] rapportent que ces ions peuvent être responsables de l'hexamérisation de l'insuline, notamment en présence de phénol ou de métracrésol (comme c'est le cas dans la solution commerciale d'Umuline rapide®). En cas d'hexamérisation, nous avons envisagé la possibilité que les épitopes de l'insuline reconnus par les Ac du kit se retrouvent « piégés » au cœur de l'hexamère et ne soient par conséquent plus accessibles. Lors de cet essai, nous avons comparé la stabilité de l'insuline après ajout direct dans le MNP ternaire supplémenté en vitamines mais pas en éléments-trace ± zinc.

D'après les résultats obtenus lors de cet essai, la diminution d'insuline est la même, que les conditions expérimentales soient en présence ou en l'absence de zinc. Cela pourrait s'expliquer par le fait que l'hexamérisation de l'insuline en présence de 2 ions Zn ne soit pas la forme prépondérante lorsque la concentration en insuline est < 0,07 mg/mL (soit 2 000 UI/L), si l'on considère que dans la présente étude la concentration en insuline est

de 1000 UI/L. D'autre part, dans cet essai, la quantité de zinc présente dans le mélange (10 mg), est peut être trop faible pour induire ce phénomène d'hexamérisation par un phénomène de dilution dans le grand volume du MNP.

Suite à ces considérations, il apparaît évident que chaque paramètre peut avoir un impact sur la stabilité de l'insuline après ajout dans le MNP ternaire. C'est la raison pour laquelle la suite des travaux s'est réalisée sur un paramètre à la fois.

La première étape a consisté à étudier la stabilité dans chaque compartiment indépendamment considéré puis dans le mélange binaire.

La concentration en insuline diminue dans l'émulsion lipidique. Comme nous l'avons présenté préalablement, l'émulsion lipidique peut être sujette à une instabilité impliquant une réaction de peroxydation, y compris dans les MNP. Cette réaction de peroxydation, due à la présence de certaines espèces réactives de l'oxygène ou de radicaux libres qui réagissent avec les lipides [368], mène à la synthèse d'un produit de dégradation qui peut être dosé dans le sang des patients recevant de la NP : le malondialdéhyde (MDA) [143]. Dès lors, une étude de stabilité (dont les résultats n'ont pas été présentés dans ce manuscrit), a été réalisée en introduisant de manière artificielle du MDA dans l'émulsion lipidique contenant l'insuline. Cet ajout était réalisé à hauteur d'une concentration en MDA 100 fois plus importante que celle habituellement retrouvée dans les émulsions de NP [369], afin de garantir un impact visible lors de l'étude de stabilité. Aucune différence n'a été retrouvée en présence ou en l'absence de MDA dans le MNP. De plus, la plupart des études ayant impliqué les lipides et l'insuline n'ont pas retrouvé un impact des lipides sur la disponibilité de l'insuline [306], si ce n'est que leur présence augmenterait sa disponibilité par interaction avec le matériau plastique des poches ou des tubulures [305,309].

Pour ce qui est des autres compartiments de la poche de NP, les résultats ne retrouvent une concentration stable en insuline que dans la solution de glucose ou dans celle d'acides aminés mais pas dans le mélange des deux solutions (mélange binaire). Une réaction chimique se produisant en présence de glucose et d'acides aminés a donc été envisagée.

Etant donné le manque de stabilité de l'insuline dans le mélange binaire et considérant les données existantes sur l'influence du pH sur le degré de polymérisation de l'insuline humaine [370], le pH a été mesuré. Les valeurs de pH de la solution de glucose seule ou du mélange binaire sont respectivement de 3,6 et 6,3 environ. Ces deux valeurs très différentes sont expliquées par la présence dans le mélange binaire des acides aminés qui ont tendance à tamponner le milieu nutritif à un pH proche de la neutralité.

Plusieurs hypothèses ont été envisagées pour expliquer le rôle du pH élevé (6,3) dans la diminution de la concentration en insuline, dont l'agrégation survenant à pH physiologique [371]. Des données contradictoires sont publiées à propos de l'apparition de produits de dégradation de haut poids moléculaire de l'insuline : ceux-ci se forment à pH acide [372] ou plutôt neutre [373]. La recherche de ces produits de dégradation semble inutile puisque dans la solution d'acides aminés de pH 6,3, la concentration en insuline reste stable et que l'insuline est stockée à un pH compris entre 6 et 7 dans les cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans.

Le pH est donc à prendre en considération non pas seul, mais en association avec la nature du milieu nutritif testé. C'est la raison pour laquelle tous les milieux nutritifs ont été employés en modifiant artificiellement leur pH à un niveau bas (pH = 3,6) ou haut (pH = 6,3) avec de l'acide ou de la soude. Ces deux niveaux de pH correspondent respectivement aux valeurs de la solution de glucose seule et du mélange binaire.

L'analyse ANCOVA de tous les résultats des essais menés dans cette partie a permis d'identifier les variables ayant un impact significatif parmi toutes les variables testées. Les 7 variables choisies (variables indépendantes et en interactions), expliquent 68% de la variabilité de la concentration en insuline dans le milieu testé. Il y a donc d'autres paramètres non identifiés en l'état actuel des connaissances.

Cette analyse a permis de confirmer la non-significativité au risque de 5% des essais de pré conditionnement, conditionnement ainsi que du rôle du zinc et de la nature des lipides.

Par ailleurs, cette ANCOVA confirme l'implication de la concentration en glucose et du temps, qu'ils soient considérés seuls ou en interaction avec le niveau de pH. Ce sont également les variables ayant le plus fort impact sur la concentration en insuline. L'absence d'éléments-trace n'est pas clairement considérée car seuls 9 essais ont été faits dans cette condition. En revanche, la présence de ces micronutriments joue un rôle significatif dans la stabilité de l'insuline.

Si l'on interprète les signes des facteurs fournis par l'équation de l'ANCOVA, il est possible de conclure que la concentration en insuline est inversement proportionnelle à la concentration en glucose, mais également que quand le pH augmente, la concentration en insuline diminue. Le pH influence la concentration lorsqu'il est considéré avec la teneur en glucose, le temps (l'effet pH est important dans le temps) et la teneur en acides aminés.

Il existe cependant des limites de cette modélisation : en effet, le modèle obtenu peut être discuté car chaque condition n'y est pas représentée dans des proportions équivalentes. Par conséquent, il n'y a pas la même pondération des paramètres testés. Étant donné qu'il s'agissait d'une étude impliquant de très nombreuses variables, il n'était pas possible de mener des essais dans toutes les conditions. C'est la raison pour laquelle nous avons choisi de tester les mélanges les plus caractéristiques.

**Ces conclusions amènent à envisager une réaction impliquant l'insuline, conditionnée à la présence de glucose à pH non acide, dont la survenue dépend du temps et de la concentration en glucose. Cette description peut correspondre à une réaction de glycation.**

## V. Glycation de l'insuline dans un mélange de nutrition parentérale binaire

### A. Introduction

Suite aux résultats des travaux précédents, deux hypothèses sont envisagées :

- une modification conformationnelle de l'insuline empêchant la reconnaissance d'au moins l'un des deux épitopes par les couples d'anticorps
- une modification chimique résultant d'une altération de l'insuline dans le milieu NPT. Sur la base de données de la littérature, la mise en jeu d'une réaction de glycation a été proposée. En effet, la glycation des acides aminés (et par conséquent des protéines), qui correspond à une réaction de Maillard, est un phénomène déjà décrit *in vitro et in vivo*, notamment pour l'insuline [374,375].

La glycation d'une protéine selon la réaction de Maillard peut être schématisée comme dans la Figure 28.

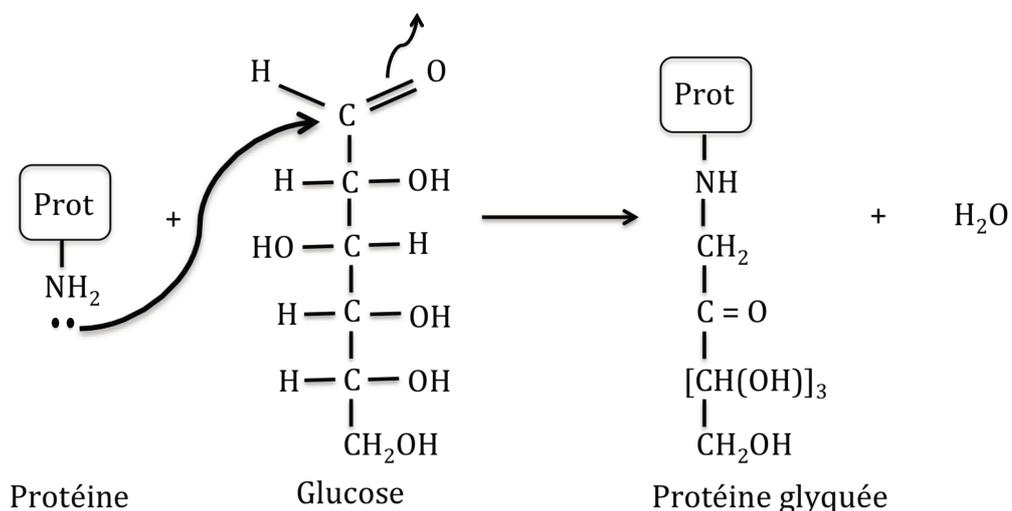


Figure 28 : Représentation schématique de la réaction de glycation d'une protéine

Cette réaction consiste en la fixation d'une molécule de glucose (MM =180 Da), associée à une perte d'une molécule d'eau (18 Da). La différence de masse qui en résulte est par conséquent de 162 Da.

Dans cette partie, nous allons nous attacher à explorer cette seconde hypothèse qui pourrait être à l'origine de la diminution de la teneur en insuline observée en IECL.

**L'objectif étant d'évaluer la pertinence de l'hypothèse d'une glycation de l'insuline dans le mélange de nutrition parentérale, il est nécessaire de développer une méthode de dosage de l'insuline, orthogonale à l'IECL, à savoir une méthode utilisant l'HPLC-MS/MS.**

## **B. Optimisation et validation d'une méthode HPLC-MS/MS pour la quantification de l'insuline et l'identification d'insuline glyquée**

### **1. Matériels et méthodes**

#### **a. Réactifs et solvants**

##### **i. Produits commerciaux**

Lors du développement de la méthode analytique, de l'insuline de différentes origines et différents étalons internes ont été évalués. Ces analytes seront décrits ci-dessous. Nous préciserons, en vert, ceux qui ont été retenus pour la validation de la méthode.

- Analytes
  - **Insuline humaine** (Figure 29-(a)) lyophilisat, **standard de référence** de qualité USP; Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). *Par la suite, cet analyte sera nommé **insuline humaine-std**.*
  - **Umuline rapide®** 100 UI/mL (**Insuline humaine**, 3,5 mg/mL [336,344]), solution injectable en flacon de 10 mL; *Excipients : acide chlorhydrique, hydroxyde de sodium, glycérol, métacrésol, eau pour préparations injectables (eau ppi) ; Lilly (Fegersheim, France).*

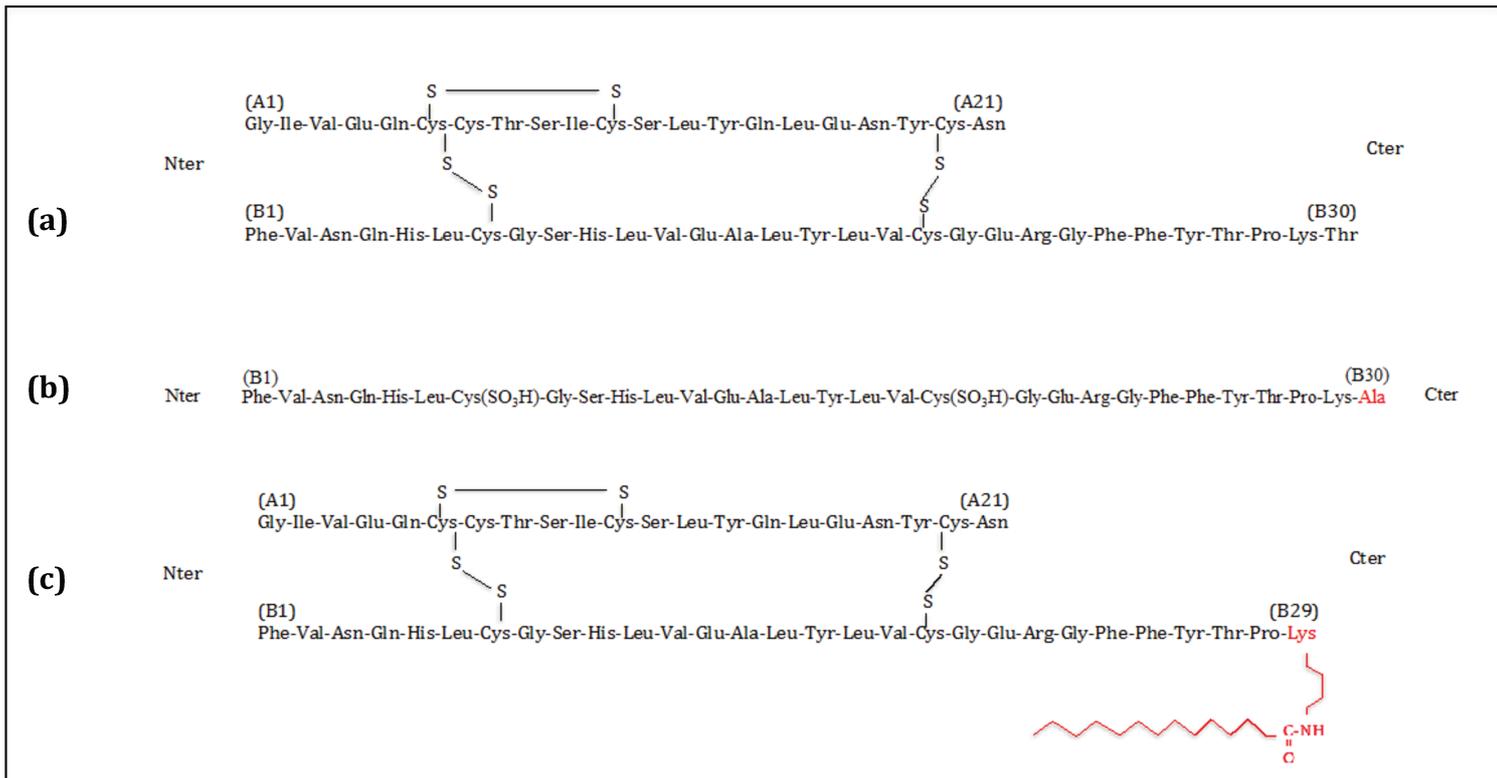
*Par la suite, cet analyte sera nommé **Umuline®**.*

- Etalons internes (EI)
  - **Chaîne B de l'insuline bovine** (Figure 29-(b)) de qualité analytique (>80%), dont les résidus cystéine sont oxydés (SO<sub>3</sub>H). Elle comporte une alanine substituant la thréonine en position 30 de la chaîne B, en comparaison à l'insuline humaine ; Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France)

*Par la suite, cet analyte sera nommé **chaîne B**.*

- **Levemir® 100 UI/mL (Insuline détémir** (Figure 29-(c)), 14,2 mg/mL [376], solution injectable en cartouche de 3 mL. *Excipients : glycérol, phénol, métacrésol, acétate de zinc, phosphate disodique dihydraté, chlorure de sodium, acide chlorhydrique et hydroxyde de sodium (pour ajustement du pH), eau ppi.* Il s'agit d'une insuline humaine à action retardée et prolongée par modification de sa structure peptidique : la thréonine en position 30 de la chaîne B est déléetée et un acide myristique substitue la fonction amino de la lysine C-terminale en position 29 de cette même chaîne. L'ajout de cet acide gras comportant 14 atomes de carbone facilite l'interaction de cette insuline avec l'albumine du compartiment sanguin, responsable de son action prolongée; Novonordisk (Chartres, France).

*Par la suite, cet analyte sera nommé **Levemir**.*



**Figure 29** : Séquences peptidiques de l'insuline humaine (a), de la chaîne B de l'insuline bovine (b) et de l'insuline détémir (c)

*Les parties indiquées en rouge correspondent aux différences de structure en comparaison à la séquence de l'insuline humaine.*

- Adjuvants

- **Sérum Albumine Bovine** (SAB) fraction V, lyophilisat (95% de pureté); Euromedex (Souffelweyersheim, France)

- Solvants

L'acétonitrile (ACN ; VWR, Val de Fontenay, France) est de qualité HPLC/MS. L'acide formique (HCOOH, 98% ; Fluka, France), l'acide trifluoroacétique (TFA, 99% ; Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) et l'acide chlorhydrique (HCl, 38% ; VWR, val de Fontenay, France) sont de qualité analytique. L'eau ultrapure a été produite à l'aide d'un système de purification d'eau Milli-Q Waters 18 MΩ, de la société Millipore (Saint-Quentin en Yvelines, France).

- Glucose anhydre (Inresa, Bartenheim, France)

- Nutrition parentérale

Les mélanges de nutrition parentérale sont préparés à partir des mêmes spécialités que celles précédemment décrites soit à partir

- d'une poche de nutrition parentérale industrielle tricompartimentée Olimel® N7E (Baxter, Meyzieux, France). Seuls les compartiments contenant le glucose et les acides aminés ont été utilisés dans cette partie. En effet, en l'absence d'un protocole d'extraction de l'insuline à partir du mélange ternaire, il n'était pas envisageable de mener les premiers travaux sur une émulsion.
- d'un mélange de vitamines : Cernevit® lyophilisat (solution à reconstituer avec 5 mL d'eau ppi) (Baxter, Meyzieux, France),
- d'une solution d'éléments-trace : Nutryelt® (solution à diluer pour perfusion ; 1 ampoule de 10 mL) (Aguettant, Lyon, France),

Les compositions détaillées de ces médicaments figurent en [Annexe A](#).

- ii. Glycation de l'insuline : préparation

Des solutions aqueuses de glucose à 5% et 35 % ont été préparées extemporanément par dissolution du glucose anhydre dans de l'eau. Les solutions obtenues ont été additionnées d'Umuline® afin d'obtenir une concentration finale en insuline de 7 mg/L ou 35 mg/L aux deux niveaux de concentration de glucose. Ces solutions ont été placées dans une étuve à 40°C, pendant 2 heures.

- b. Méthodes***

- i. Préparation des solutions d'insuline et d'étalon interne utilisées au cours de l'optimisation de la méthode

Des solutions mères d'insuline humaine-std et de chaîne B à 2000 mg/L ont été préparées dans une solution d'HCl à 2 mM afin de faciliter la dissolution de ces protéines.

Ces solutions mères ont ensuite été diluées dans un mélange ACN/H<sub>2</sub>O-20/80 (v/v) à 0,1% en HCOOH afin d'obtenir des solutions à 7 mg/L.

Des solutions de Levemir® et d'Umuline® à 7 mg/L ont également été préparées à partir des spécialités pharmaceutiques correspondantes, respectivement à 14 200 mg/L et 3500 mg/L, par dilution dans un mélange ACN/H<sub>2</sub>O-20/80 (v/v) à 0,1% en HCOOH.

## ii. Instrumentation et conditions opératoires

Afin de quantifier l'insuline, une méthode de dosage par chromatographie liquide haute performance (HPLC) en polarité de phase inversée, couplée à une détection par spectrométrie de masse (MS) en mode tandem (MS/MS) a été développée. L'optimisation de la méthode d'analyse est réalisée en deux temps :

- la détection par MS est réalisée par introduction directe de solutions des composés d'intérêt (paramètres relatifs à la source d'ionisation, sélection des ions précurseurs, choix des transitions étudiées),
- le couplage HPLC-MS/MS et la séparation des analytes (composition de la phase mobile et gradient d'élution, choix de l'étalon interne),

Les modalités de dilution des échantillons à doser sont ensuite recherchées afin d'obtenir des signaux optimaux.

Toutes ces étapes sont détaillées dans la partie « résultats et discussion ». Les conditions opératoires retenues à l'issue de l'optimisation sont présentées ci-dessous.

- Appareillage

Il est constitué :

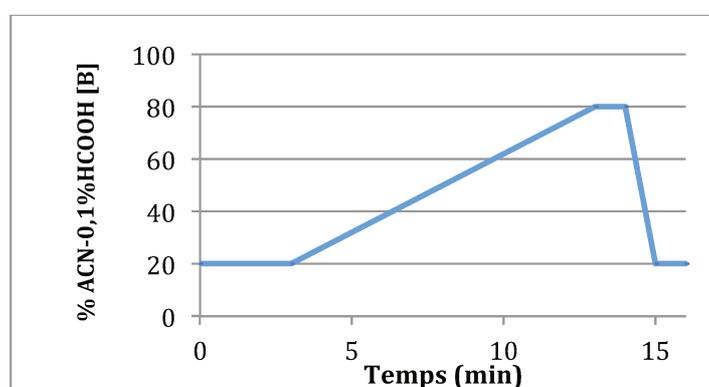
- d'une chaîne d'ultra fast liquid chromatography (UFLC) Shimadzu (Kyoto, Japon) UFLC-XR, dotée d'un autosampler et d'un dégazeur en ligne,

- d'un spectromètre de masse API QTrap 5500 de la société AB Sciex (Framingham, MA, USA), équipé d'une source d'ionisation de type électrospray (ESI) et d'un analyseur hybride de type triple quadripôle (Q1 : sélection de l'ion précurseur, q2 : cellule de collision et Q3 : sélection du ou des ion(s) produit(s)) à l'aide d'un piège à ion linéaire. Cet appareil possède une gamme de masse allant de 0 à 1200 Daltons (Da). Il est piloté par un ordinateur muni du logiciel Analyst Software (version 1.5.2) permettant le contrôle de la chaîne chromatographique et du spectromètre de masse et l'exploitation des résultats.

La séparation chromatographique a été réalisée sur colonne Kinetex Core-shell C18 (5  $\mu\text{m}$ , 100  $\text{\AA}$ , 100 x 2,1 mm) (Phenomenex, Torrance, CA, USA) munie d'une pré-colonne.

Les conditions chromatographiques retenues après optimisation sont les suivantes :

- Débit : 0,4 mL/min
- Phase mobile : mélange de [A] eau ultrapure à 0,1% en acide formique et de [B] acétonitrile à 0,1% en acide formique, selon le gradient d'élution suivant (Figure 30) :



**Figure 30:** Gradient d'élution pour le dosage de l'insuline

L'acquisition en spectrométrie de masse se fait à partir de 2 minutes d'analyse.

- Volume d'injection : 10  $\mu\text{L}$
- Température du passeur d'échantillon : +5°C

Les conditions opératoires optimisées concernant la source ESI sont détaillées dans le [Tableau XVIII](#).

**Tableau XVIII : Paramètres de la source d'ionisation**

Paramètre	Valeur choisie
Flux du gaz rideau	25
Température de la source	450°C
Gaz 1 de la source d'ions	50
Gaz 2 de la source d'ions	50
Gaz de collision	medium
Position de l'aiguille	Horizontale 7 ; verticale 5
Potentiel de défragmentation	100

L'air est utilisé comme gaz nébuliseur et comme gaz chauffant, tandis que l'azote est employé en tant que gaz rideau et gaz de collision.

La détection en spectrométrie de masse utilise le mode « Multiple Reaction Monitoring » (MRM). Cette expérience consiste à suivre la transition entre un ion précurseur sélectionné en  $Q_1$  (ion parent) et un ion fragment (ion fils) produit par fragmentation, sélectionné en  $Q_3$ . La fragmentation de l'ion précurseur se fait par application d'une énergie de collision en  $q_2$ .

On distingue deux types de fragments. Le premier, le plus abondant, permet la quantification. Le second permet d'assurer une meilleure spécificité de l'analyse.

Le **Tableau XIX** présente les transitions sélectionnées.

**Tableau XIX : Transitions suivies en mode MRM – ESI+**

Molécule	Energie de collision (V)	Ion fragment	Transitions (m/z)
Insuline	5	Qualifiant	1162,5 → 1162,5
	39	<b>Quantifiant</b>	<b>968,8 → 136,0</b>
Chaîne B	50	<b>Quantifiant</b>	<b>1166,0 → 315,2</b>
	35	Qualifiant	874,8 → 315,2
Insuline glyquée	5	Qualifiant	1194,6 → 1194,6
	5	<b>Quantifiant</b>	<b>995,8 → 995,8</b>

On peut noter que la transition 1162,5 → 1162,5 de l'insuline est qualifiée de pseudo-MRM dans la mesure où aucun ion fils n'est observé quel que soit l'énergie de collision sélectionnée. Il en est de même pour les transitions de l'insuline glyquée.

### iii. Validation de la méthode HPLC-MS/MS

#### (a) *Quantification de l'insuline*

La méthode analytique permettant le dosage de l'insuline a été validée selon les recommandations de la Société Française des Sciences Techniques et Pharmaceutiques (SFSTP) [339,377]. La validation a été réalisée sur trois jours consécutifs afin d'estimer l'erreur de prédiction. Chaque jour, sept solutions standards de calibration et quatre solutions standards de validation (chacune préparée trois fois), un blanc matriciel additionné ou non de l'étalon interne et d'insuline, ont été préparés et analysés. Chaque solution standard se compose de la matrice nutritive (milieu binaire additionné de vitamine et éléments-trace) diluée au 1/10<sup>ème</sup> dans le mélange ACN/H<sub>2</sub>O-20/80 (v/v) à 0,1% en HCOOH, de l'insuline humaine (Umuline®) et de l'étalon interne (chaîne B de l'insuline bovine).

#### (i) *Préparation des solutions standards de calibration et de validation*

#### Préparation du milieu de nutrition parentérale binaire

Un milieu nutritionnel binaire a été préparé par mélange, volume à volume, des deux compartiments d'une poche d'Olimel® N7E, contenant la solution de glucose 35% contenant des ions Ca<sup>2+</sup>, et la solution d'acides aminés 11%, contenant des électrolytes. Ce mélange binaire a été additionné des solutions de Cernevit® et de Nutryelt® en quantité respectant les proportions habituellement recommandées en pratique clinique, à savoir 1500 mL de mélange de NP binaire additionné de 5 mL de Cernevit® et 10 mL de Nutryelt®.

### Préparation des solutions standards

Les solutions standards ont été préparés à partir de la solution commerciale d'Umuline® de concentration initiale 3500 mg/L et d'une solution mère de chaîne B (EI) à 2000 mg/L préparée dans un mélange ACN/H<sub>2</sub>O-20/80 (v/v) à 0,1% en HCOOH.

Des solutions intermédiaires à 1 mg/L en insuline et en EI ont été préparées par dilution dans un mélange ACN/H<sub>2</sub>O-20/80 (v/v) à 0,1% en HCOOH additionné de 0,3% de SAB.

Ces solutions intermédiaires ont été utilisées pour préparer chaque **solution standard de calibration** contenant l'insuline à 0,010 ; 0,015 ; 0,025 ; 0,040 ; 0,060 ; 0,080 ; 0,10 mg/L, l'EI à 0,060 mg/L et la matrice nutritive diluée au 1/10<sup>ème</sup> dans un mélange ACN/H<sub>2</sub>O-20/80 (v/v) à 0,1% en HCOOH et 0,3% en SAB.

Par ailleurs, des **solutions standards de validation** contenant l'étalon interne à la même concentration (0,060 mg/L) et l'insuline à 0,010 ; 0,020 ; 0,070 et 0,10 mg/L ont été préparées dans la matrice nutritive diluée au 1/10<sup>ème</sup> dans un mélange ACN/H<sub>2</sub>O-20/80 (v/v) à 0,1% en HCOOH et 0,3% en SAB.

On également été préparés :

- un blanc matriciel composé de la matrice nutritive diluée au 1/10<sup>ème</sup> dans un mélange ACN/H<sub>2</sub>O-20/80 (v/v) à 0,1% en HCOOH et 0,3% en SAB.
- un blanc matriciel additionné de l'étalon interne à 0,060 mg/L

### (ii) *Méthode de validation*

La spécificité, la fonction de réponse, la linéarité, la justesse, la fidélité et la limite de quantification ont été étudiées et le profil d'exactitude a été construit à l'aide du logiciel Neolicy® software (version :1.8.2.2) avec des limites d'acceptation fixées à ± 15% au risque statistique de 5%.

## *(b) Identification d'une forme glyquée de l'insuline*

La méthode analytique développée a également pour objet de mettre en évidence la formation d'insuline glyquée et de suivre sa cinétique de formation lors de l'étude de la stabilité de l'insuline. En l'absence d'étalon, la quantification de l'insuline glyquée n'est pas envisageable sauf à considérer un même facteur de réponse pour l'insuline native et la forme glyquée. Pour cela, il a été nécessaire d'évaluer la spécificité de la méthode développée pour l'identification et le suivi de l'insuline glyquée.

Un blanc matriciel additionné de la solution d'insuline partiellement glyquée obtenue à l'issue de l'incubation de l'insuline à 35 mg/L dans le glucose 5% (environ 2/3 d'insuline et 1/3 d'insuline glyquée) a été préparé et analysé.

Chaque jour, lors des essais réalisés afin de valider la méthode de quantification de l'insuline, le blanc matriciel additionné ou non d'étalon interne et d'insuline a été préparé et analysé.

## **2. Résultats et discussion**

### *a. Optimisation des conditions opératoires pour le dosage de l'insuline native*

Le développement d'une méthode HPLC-MS/MS pour le dosage de l'insuline dans le mélange de NP nécessite en premier lieu d'optimiser les paramètres de détection du spectromètre de masse. Afin d'obtenir des seuils de quantification les plus faibles possibles, le mode d'acquisition MRM est employé.

Dans un premier temps la démarche d'optimisation a été menée à partir d'une solution d'insuline humaine-std, afin de s'affranchir des excipients présents dans la solution commerciale d'Umuline rapide®.

Les paramètres de détection de l'insuline et des EI envisagés, à savoir la chaîne B et la Levemir®, ont été optimisés par introduction directe, dans le spectromètre de masse, de

solutions à 7,0 mg/L préparées dans un mélange ACN/H<sub>2</sub>O-20/80 (v/v) à 0,1% en HCOOH (mélange de composition proche de celle des phases mobiles évaluées par la suite).

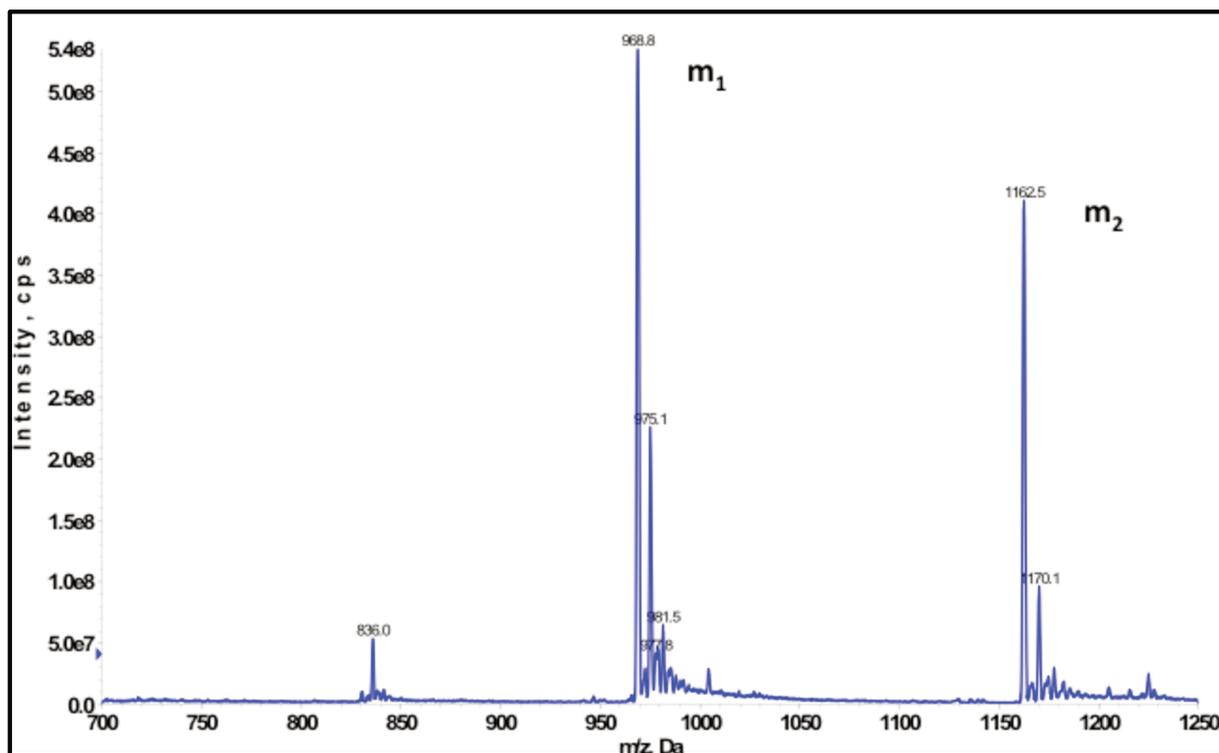
i. Paramètres du spectromètre de masse pour la détection de l'insuline et des étalons internes potentiels en introduction directe

(a) *Sélection des ions précurseurs*

Dans un premier temps, afin de visualiser l'ensemble des ions de rapport m/z distincts, produits dans la source d'ionisation, l'enregistrement du spectre de masse en mode « full scan » a été réalisé sur l'intégralité de la gamme de masse de l'appareil. L'objectif de cette étape est d'identifier, sur les spectres obtenus, les signaux caractéristiques de ces analytes, à savoir ceux correspondant aux différents ions précurseurs potentiels. En effet, les ions précurseurs attendus issus de protéines sont généralement multichargés.

### **Insuline humaine**

L'introduction directe de l'insuline humaine-std en solution dans un mélange ACN/H<sub>2</sub>O-20/80 (v/v) à 0,1% en HCOOH dans le spectromètre de masse en mode « full scan » positif (ce mode ayant donné la meilleure réponse et le meilleur rapport signal/bruit), a permis de distinguer deux signaux de rapports m/z respectifs 1162,5 et 968,8 Da/unité de charge (UC) (Figure 31).



**Figure 31** : Spectre de masse en mode «full scan» ESI positif de l'insuline humaine-std ( $m_1$  et  $m_2$  sont les rapports masse/charge respectifs des ions de charges  $n_1$  et  $n_2$ ).

*Solution d'insuline humaine-std dans un mélange ACN/H<sub>2</sub>O-20/80 (v/v) à 0,1% en acide formique.*

Ces signaux correspondent à deux états de charge différents de l'insuline. En mode positif, l'ionisation dans la source du spectromètre résulte principalement de l'addition d'un proton sur un résidu azoté. Ainsi, la nature protéique de l'insuline permet une ionisation multiple de par la présence d'acides aminés basiques et d'une fonction amine N-terminale. On observe donc plusieurs signaux sur le spectre enregistré en mode « full scan », chacun d'eux correspondant à un ion moléculaire dont la charge est à déterminer. L'état de charge des ions détectés peut être déterminé à partir de l'expression du rapport  $m/z$  en fonction de  $M$  et de  $n$  :

$$m_1 = \frac{M + n_1}{n_1} \quad \text{et} \quad m_2 = \frac{M + n_2}{n_2}$$

avec  $n$  = nombre de charges de l'ion

$M$  = masse moléculaire de la protéine non chargée

$m_1$  = masse de l'ion chargé  $n_1$

$m_2$  = masse de l'ion chargé  $n_2$

et  $n_2 = n_1 - 1$

On en déduit l'expression suivante :  $n_1 = \frac{m_2 - 1}{m_2 - m_1}$

Dans le cas de l'insuline  $m_1 = 968,8$  Da/UC et  $m_2 = 1162,5$  Da/UC soit :

$$n_1 = (1162,5 - 1) / (1162,5 - 968,8) = 6 \text{ charges}$$

$$n_2 = n_1 - 1 = 5 \text{ charges}$$

Le signal de rapport  $m/z = 1162,5$  Da/UC correspond donc à l'insuline protonnée 5 fois  $(M+5H)^{5+}$ . Ainsi la masse de cette espèce serait de 5812,5 Da, ce qui correspondrait à une masse pour la molécule non protonnée de 5807,5 Da. Ce résultat est en accord avec les données de la littérature [336] et du fournisseur (Sigma-Aldrich) de l'insuline humaine-std. Une valeur similaire est obtenue à partir du signal 968,8 Da, ion de charge +6 (5812,8 Da) soit une espèce non protonnée de masse moléculaire de 5806,8 Da.

### Chaîne B

Une approche identique a été appliquée à l'analyse du spectre de masse obtenu pour la **chaîne B** qui présentait 3 signaux de rapports  $m/z$  respectifs de 1166,1 ; 874,8 et 700,1 Da/UC.

Ainsi, il a pu être établi que ces signaux correspondaient respectivement à :

- 1166,1 Da/UC : ion portant 3 charges positives
- 874,8 Da/UC : ion portant 4 charges positives
- 700,1 Da/UC : ion portant 5 charges positives

et que la masse de la **chaîne B de l'insuline bovine non protonnée est de 3495,5 Da**.

### Levemir®

Dans le cas de la **Levemir®**, 2 signaux ont été observés pour des valeurs  $m/z$  égales à 1183,9 et 987,0 Da/UC. Ils correspondent respectivement à des ions de charge +5 et +6, formés à partir d'une espèce non protonnée de masse moléculaire égale à 5916 Da.

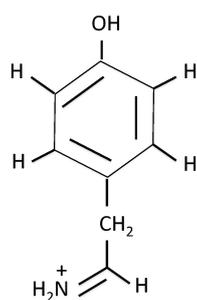
A l'issue de cette étude, **les ions précurseurs sélectionnés** sont :

- 1162,5 et 968,8 Da/UC pour l'insuline humaine,
- 1166,1 et 874,8 Da/UC pour la chaîne B de l'insuline bovine,
- 1183,9 Da/UC pour la Levemir®.

(b) *Choix des transitions ion précurseur / ion fils*

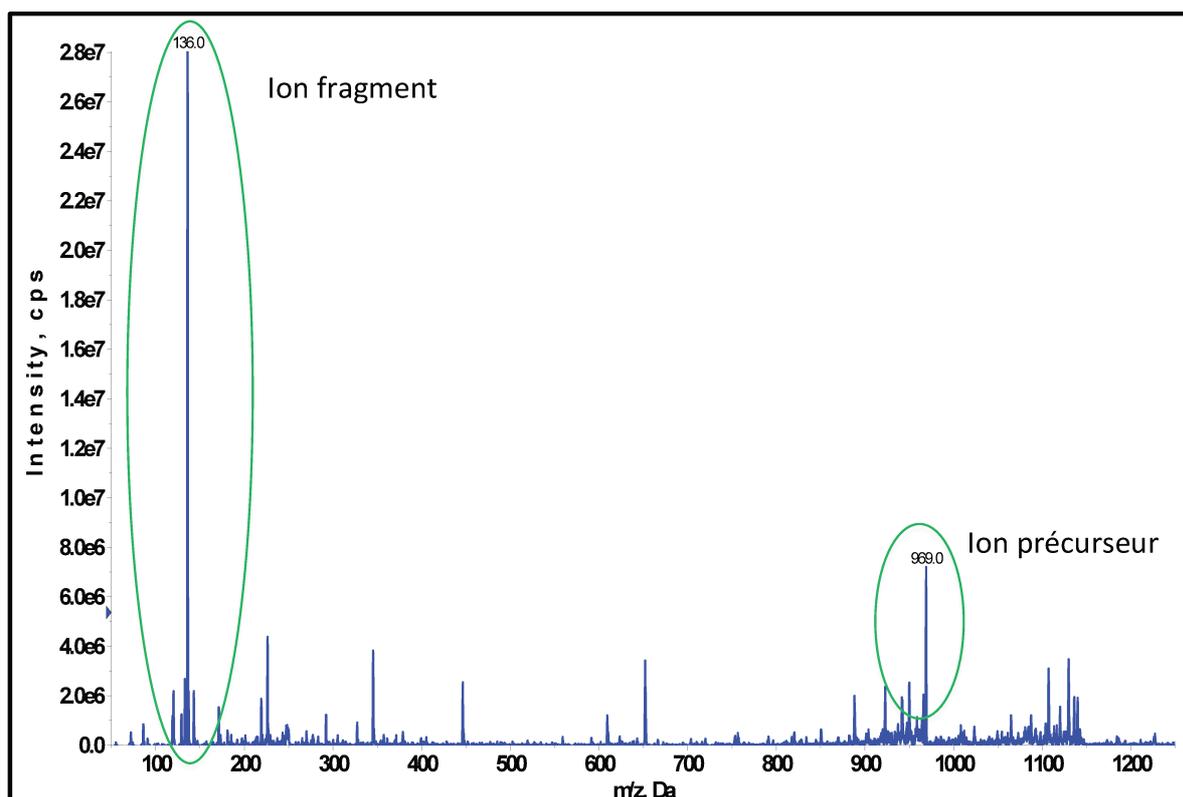
L'objectif était de sélectionner les transitions d'intérêt pour l'analyse de l'insuline et des EI en réalisant une analyse par couplage HPLC-MS en mode tandem (HPLC-MS/MS). En l'absence de colonne chromatographique dans les conditions d'élution décrites dans la partie « matériels et méthodes », la fragmentation des ions précurseurs sélectionnés a été étudiée. Une première analyse a été effectuée en mode « Product Ion Scan » : l'ion précurseur est sélectionné par le premier quadripôle ( $Q_1$ ), puis fragmenté en chambre de collision ( $q_2$ ) et tous les fragments générés (ions fils) sont analysés par le dernier quadripôle ( $Q_3$ ). Afin de déterminer l'énergie de collision (EC) optimale, à savoir celle permettant l'obtention d'un ion fils majoritaire, différentes EC ont été évaluées (de 5 à 50 V).

Ainsi, dans le **cas de l'insuline-std**, l'ion précurseur sélectionné par le quadripôle  $Q_1$  ayant le rapport  $m/z$  : 968,8 Da/UC  $[M + 6H]^{6+}$  est fragmenté dans la cellule de collision  $q_2$  avec une EC optimisée à 39 V. Enfin, les fragments obtenus ont été analysés en mode « Product Ion Scan » afin d'identifier un fragment majoritaire. Il s'agit ici du fragment de  $m/z$  136,0 Da/UC (Figure 33) qui pourrait correspondre à un ion immonium du résidu tyrosine en position 26 de la chaîne B (Figure 32).



**Figure 32** : Ion immonium de la TyrB26

Par ailleurs, dans le cas de l'ion de valeur  $m/z$  égale à 1162,5 Da/UC  $[M + 5H]^{5+}$ , on peut noter qu'aucune fragmentation n'a été observée, quelle que soit l'énergie de collision. Ainsi, le dosage de l'insuline en mode MRM pourra être effectué en suivant la transition MRM 968,8  $\rightarrow$  136 Da/UC et la transition pseudo-MRM 1162,5  $\rightarrow$  1162,5 Da/UC.



**Figure 33** : Spectre de masse de l'ion précurseur  $m/z = 968,8$  Da/UC de l'insuline en mode « Product Ion Scan ».

*Solution d'insuline humaine-std dans un mélange ACN/H<sub>2</sub>O-20/80 (v/v) à 0,1% en acide formique.*

La fragmentation des ions précurseurs de la **chaîne B** a permis de définir les 2 transitions suivantes :  $1166,0 [M + 3H]^{3+} \rightarrow 315,2$  Da/UC (EC = 50 V) et  $874,8 [M + 4H]^{4+} \rightarrow 315,2$  Da/UC (EC = 35 V). Ce fragment monochargé  $[M + H]^+$ , de  $m/z$  315,2 Da/UC correspond aux 3 derniers acides aminés de l'extrémité C terminale de la chaîne B.

L'analyse de la **Levemir®** a révélé une transition  $1183,9 [M + 5H]^{5+} \rightarrow 454$  Da/UC (EC = 44V). Ce fragment correspond à un ion monochargé formé des deux derniers acides aminés de l'extrémité C-terminale de la chaîne B, incluant l'acide myristique.

Le **Tableau XX** regroupe les transitions sélectionnées à l'issue de cette étude, ainsi que l'EC permettant de former les ions fils.

**Tableau XX** : Transitions obtenues en mode MRM pour l'insuline et les EI potentiels

Molécule	Energie de collision (V)	Transition suivie (Da/UC)
Insuline	5	1162,5 → 1162,5
	39	968,8 → 136,0
Chaîne B	50	1166,0 → 315,2
	35	874,8 → 315,2
Levemir®	44	1183,9 → 454,0

ii. Paramètres de séparation

Après avoir optimisé les paramètres relatifs à la détection des ions en spectrométrie de masse, nous avons procédé au couplage du système HPLC au détecteur. L'objectif était de trouver des conditions d'analyse permettant un dosage de l'insuline à l'aide d'un étalon interne et l'identification de sa forme glyquée par la spectrométrie de masse avec un temps d'analyse raisonnable. La détection se faisant par spectrométrie de masse en mode MRM, la séparation des trois composés n'est pas obligatoire, mais souhaitable afin d'éviter le phénomène de suppression ionique. D'abord, nous avons fait le choix de trouver des conditions chromatographiques permettant la séparation de l'insuline native et d'un étalon interne.

L'optimisation de la méthode séparative a porté sur l'étude de la composition de la phase mobile et du mode d'élution (isocratique / gradient).

Le choix de la colonne chromatographique et des conditions d'analyse s'est fait en se basant sur les données de la littérature concernant la quantification de l'insuline humaine [378] et de l'insuline glyquée (bovine ou humaine) par HPLC-MS/MS [374,375,379-384]. La séparation a donc été optimisée sur une **colonne Kinetex Core-shell C18** (5µm, 100 Å, 100 x 2,1mm, Phenomenex, Torrance, CA, USA) munie d'une pré-colonne, à l'aide d'une phase mobile acide, constituée d'un mélange ACN/H<sub>2</sub>O.

Toutes les expériences d'optimisation ont été réalisées en utilisant l'analyseur Q-trap en mode MRM avec les transitions déterminées précédemment pour chaque composé d'intérêt.

(a) Conditions d'élution

Optimisation de la phase mobile et conditions de couplage HPLC-MS/MS

Dans un premier temps, des essais ont été réalisés en mode isocratique d'une phase mobile constituée de 20% d'acétonitrile et 80% d'eau, additionnée de 0,1% d'HCOOH, par injection d'un mélange équimolaire d'insuline, de chaîne B et de Levemir® à 0,40 mg/L préparé dans une solution ACN/H<sub>2</sub>O-20/80 (v/v) à 0,1% en HCOOH ou 0,05% en TFA. Aucune séparation de l'insuline et des EI n'a pu être obtenue selon ce mode de séparation dans un délai d'analyse raisonnable (< 30 minutes). Les réponses obtenues avec l'acide formique étaient environ 10 fois plus élevées qu'avec le TFA. Ce dernier a donc été retenu pour la suite de l'étude.

Dans un second temps, une optimisation en mode gradient d'élution a été menée. Le pourcentage d'ACN initial (10, 20 ou 30%), final (80, 90 ou 100%) et la pente du gradient ont été testés en évaluant la résolution des pics.

Les conditions opératoires chromatographiques retenues après optimisation sont présentées dans la partie « matériel et méthodes ».

Le [Tableau XXI](#) regroupe les temps de rétention obtenus pour les différents composés d'intérêt.

**Tableau XXI : Temps de rétention des composés d'intérêt**

Composé	t <sub>r</sub> (min)	Rs/insuline
Insuline	5,59	/
Chaîne B	5,85	2,25
Levemir®	7,33	24,3

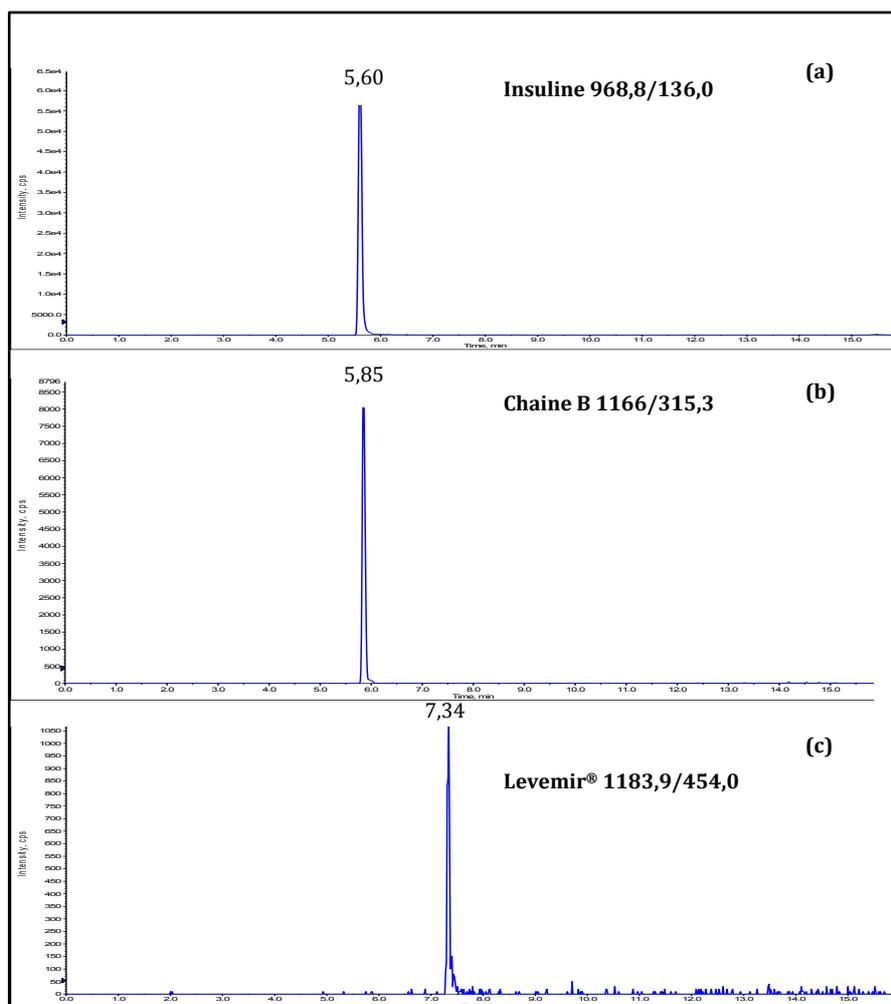
Comme l'attestent les résolutions obtenues ( $R_s > 1,5$ ), les conditions chromatographiques retenues permettent une séparation satisfaisante entre l'insuline et les deux étalons internes potentiels sélectionnés.

Ces conditions chromatographiques ont été appliquées à l'analyse en mode « full scan » sur l'ensemble de la gamme de masse, de la matrice nutritive constituant les échantillons qui seront à analyser. Ainsi, de nombreux ions ont été observés au cours des 2 premières minutes. Compte tenu de ce résultat, lors de l'analyse de l'insuline dans les échantillons de nutrition, la phase mobile éluée lors des 2 premières minutes ne sera pas introduite dans le spectromètre de masse afin d'éviter l'encrassement de la source d'ionisation. L'acquisition en spectrométrie de masse se fera donc à partir de 2 minutes d'analyse.

Notons que l'analyse d'une solution d'Umuline® à 0,40 mg/L conduit à un pic chromatographique dont le temps de rétention est équivalent à celui observé lors de l'analyse de l'insuline humaine-std, dont la surface est équivalente, ce qui atteste de la non perturbation de l'analyse en présence des excipients contenus dans l'Umuline®.

#### *(b) Etalon interne*

Tout dosage par HPLC/MS-MS nécessite l'utilisation d'un étalon interne qui permet de corriger les variations d'ionisation au niveau de la source. Deux étalons internes ont été envisagés : la chaîne B de l'insuline bovine et la Levemir®. La [Figure 34](#) présente les chromatogrammes obtenus pour l'insuline, la chaîne B de l'insuline bovine et la Levemir® en solution à 0,40 mg/L dans un mélange ACN/H<sub>2</sub>O-20/80 (v/v) à 0,1% en HCOOH. Bien que la Levemir® présente une meilleure séparation par rapport à l'insuline que la chaîne B de l'insuline bovine, le pic chromatographique obtenu est asymétrique ( $As = 1,76$  versus 1,17) et de plus faible intensité que celui de la chaîne B (1060 cps versus 8766 cps). Par conséquent la chaîne B a été retenue comme étalon interne pour la suite de l'étude.



**Figure 34** : Chromatogrammes de (a) l'insuline humaine-std, (b) la chaîne B de l'insuline bovine et (c) de la Levemir® à 0,40 mg/L dans les conditions optimisées

Conditions : colonne Kinetex Core-shell C18 (5  $\mu$ m, 100A, 100 x 2,1mm), phase mobile : ACN/H<sub>2</sub>O à 0,1% d'acide formique en mode gradient d'éluion (Figure 30); 0,4 mL.min<sup>-1</sup>; acquisition après 2 min d'éluion ; 25°C ; volume d'injection : 10  $\mu$ L ; détection en mode MRM.

### ***b. Détection de l'insuline glyquée***

#### ***i. Paramètres du spectromètre de masse pour la détection de l'insuline glyquée***

L'optimisation des paramètres de détection de l'insuline glyquée a été menée à l'aide de des solutions issues des mélanges d'insuline et de glucose, en conditions de couplage HPLC-MS/MS.

(a) *Sélection des ions précurseurs*

Concernant l'**insuline glyquée**, quelles que soient les mélanges d'insuline et de glucose réalisés, l'introduction directe n'a pas permis de mettre en évidence des signaux correspondant au rapport m/z attendu. Cela peut s'expliquer par le fait qu'*a minima* la concentration en glucose est 5000 fois plus élevée que celle de l'insuline (cas de la solution de G5% contenant de l'insuline à 35 mg/L). Dès lors, son ionisation contribue au phénomène de suppression ionique de l'insuline glyquée. Afin de lever ce phénomène, une séparation préalable de l'insuline et du glucose s'avère indispensable.

Seule une analyse des solutions issues des essais de glycation, réalisée en HPLC-MS en mode « full scan », a permis de mettre en évidence deux signaux de rapports m/z 1194,6 et 995,8 Da/UC.

Si l'on suppose que les états d'ionisation sont similaires à ceux de l'insuline native, en appliquant la même approche que précédemment, on considérera que potentiellement :

- le signal de rapport m/z = 1194,6 Da/UC correspond donc à l'insuline monoglyquée protonnée 5 fois  $(M+5H)^{5+}$ . La vérification de la masse de la protéine non protonnée conduit à une valeur de  $((1194,6 \times 5) - 5)$  soit 5968 Da.
- le signal de rapport m/z = 995,8 Da/UC correspond donc à l'insuline monoglyquée protonnée 6 fois  $(M+6H)^{6+}$ . Selon le même calcul que précédemment, la masse de la protéine non protonnée a une valeur de  $((995,8 \times 6) - 6)$ , soit 5968,8 Da.

L'insuline native ayant une masse de 5806,8 Da, cette masse de 5968 Da ( $\Delta m = 161,2$  Da) correspond bien à la masse de l'insuline monoglyquée (c'est à dire ayant fixé une seule molécule de glucose).

A l'issue de cette étude, les ions précurseurs sélectionnés sont 1194,6 et 995,8 Da/UC pour l'insuline glyquée.

(b) *Choix des transitions ion précurseur / ion fils*

Selon la même démarche méthodologique que pour l'insuline native, nous avons procédé à l'identification des transitions à suivre pour l'insuline glyquée.

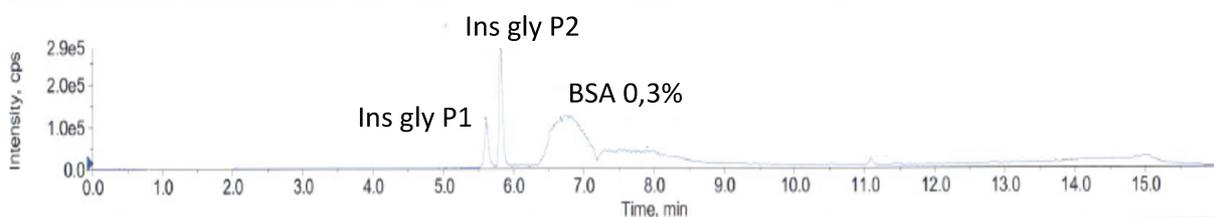
La fragmentation de l'**insuline glyquée** n'a pas été possible, même à des énergies de collision élevées. Dès lors, seules les transitions pseudo-MRM 1194,6 [M + 5H]<sup>5+</sup>, → 1194,6 et 995,8 [M + 6H]<sup>6+</sup>, → 995,8 seront suivies par la suite.

ii. Paramètres de séparation

Après optimisation des conditions chromatographiques, nous avons injecté le mélange issu de l'incubation d'insuline avec du glucose afin d'éviter le phénomène de suppression ionique

(a) *Conditions d'élution*

La solution d'insuline à 5% de glucose obtenue à l'issue de la glycation forcée a été analysée dans ces conditions opératoires en mode MRM. Deux pics chromatographiques distincts ont été observés respectivement à 5,67 min et 5,86 min (Figure 35). La résolution obtenue est de 1,74. Par la suite, nous les nommerons respectivement Ins-gly P1 et Ins-gly P2.



**Figure 35** : Chromatogrammes d'une solution d'insuline glyquée

*Détection par HPLC-MS/MS des deux signaux d'insuline glyquée. Analyse d'une solution d'Umuline 35 mg/L dans le milieu binaire Olimel®, après incubation 24 heures ; dilution des échantillons au 1/10<sup>ème</sup> dans ACN/H<sub>2</sub>O-20/80 (v/v) à 0,1% d'acide formique + SAB 0,3 %*

### *(b) Contrôle de la suppression ionique*

Le dosage de l'insuline native nécessite de vérifier qu'aucun phénomène de suppression ionique dû à la présence d'insuline glyquée n'avait lieu dans le cas de l'insuline et de l'étalon interne. Des ajouts dosés de la solution d'insuline glyquée ont été réalisés dans une solution d'insuline native à 7 mg/L et d'EI. Notons qu'à l'issue de la glycation d'une solution d'insuline initialement à 35 mg/L dans le glucose 5% (incubation de 2 h à 40°C), la solution obtenue contenait environ 13 mg/L en insuline glyquée et 22 mg/L d'insuline native (concentration en insuline native évaluée par dosage et concentration d'insuline glyquée calculée par un bilan de matière). Une variation linéaire du rapport de l'aire du signal de l'insuline sur celle de l'EI en fonction des ajouts d'insuline et d'insuline glyquée a été observée. Ceci traduit l'absence de suppression ionique induite par l'insuline glyquée et valide donc les conditions de séparation retenues.

### *c. Optimisation de la composition du diluant pour la préparation des solutions standards et des échantillons à analyser*

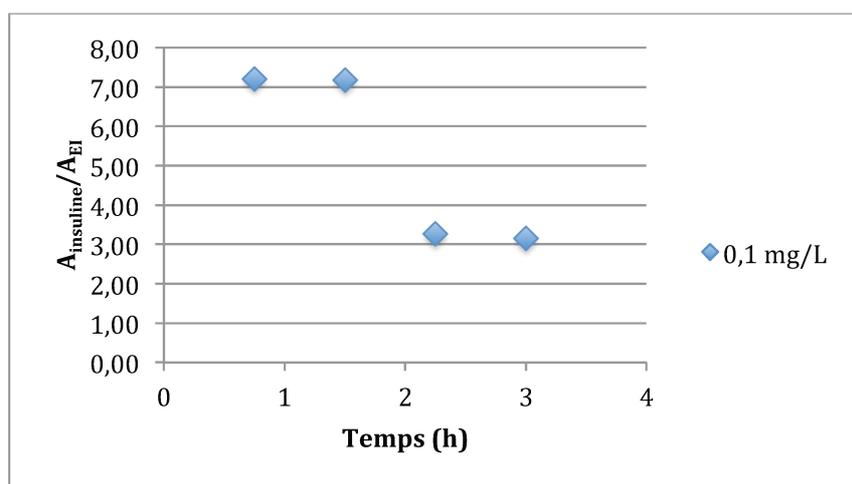
En raison de la présence d'une forte concentration en glucose (17,5%) dans le mélange binaire, il était indispensable de procéder à une étape de dilution des échantillons à analyser afin d'éviter un phénomène de caramélisation dans la source d'ionisation à l'intérieur de laquelle une température de 450°C est appliquée. Une dilution au 1/10<sup>ème</sup> a été choisie.

Notre objectif dans cette partie expérimentale a été de déterminer la composition optimale du diluant à utiliser pour réaliser la dilution des échantillons à analyser ainsi que pour la préparation des solutions standards de calibration et de validation.

#### *i. Etude de la stabilité de l'insuline dans différents diluants*

En se basant sur la concentration cible en insuline dans les poches de nutrition parentérale (20 UI/L, soit 0,70 mg/L) et du choix d'effectuer une dilution au 1/10<sup>ème</sup>,

nous avons choisi d'évaluer, dans un premier temps, la stabilité de l'insuline à 0,10 mg/L dans le mélange ACN/H<sub>2</sub>O-20/80 (v/v) à 0,1% d'acide formique (phase mobile utilisée en début de gradient). L'analyse de cette solution a été réalisée 4 fois (une analyse toutes les 45 minutes). La Figure 36 présente le rapport de l'aire du signal de l'insuline sur celui de l'EI (chaîne B) en fonction du temps.

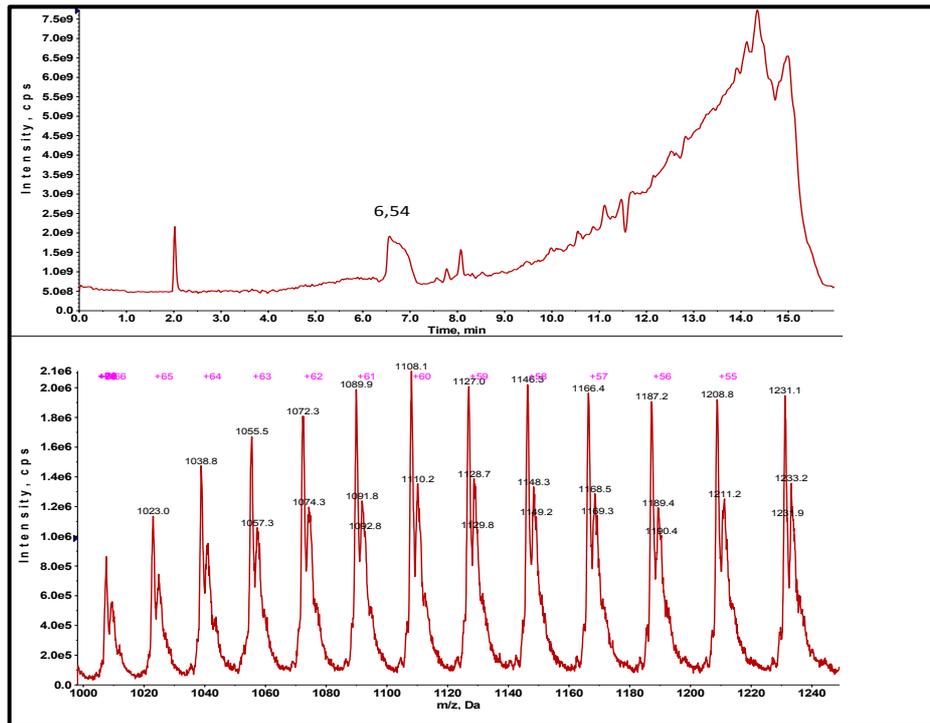


**Figure 36** : Evolution du rapport  $A_{\text{insuline}}/A_{\text{EI}}$  en fonction du temps (4 analyses successives du même échantillon).

Au fur et à mesure des analyses, on observe clairement une modification du ratio de l'aire du signal de l'insuline sur celui de l'étalon interne ( $A_{\text{insuline}}/A_{\text{EI}}$ ) d'un facteur 2. Ceci reflète la réduction dans le temps, de la réponse de l'insuline. On peut noter qu'une altération de l'allure des pics chromatographiques est également observée.

Afin d'expliquer ce phénomène, différentes hypothèses ont été avancées : (1) l'adsorption des protéines sur les flacons en verre, (2) la formation d'agrégats et (3) la dégradation de l'insuline. Dès lors, il a été envisagé d'ajouter un additif à savoir de la sérum albumine bovine (SAB) dans le solvant contenant l'échantillon pour améliorer la stabilité de l'insuline, comme c'est le cas en IECL.

Dans un premier temps, une solution de SAB à 0,3% a été préparée dans un mélange ACN/H<sub>2</sub>O-20/80 (v/v) à 0,1% en acide formique, puis analysée en mode « full scan » dans les conditions chromatographiques optimisées précédemment (Figure 37).

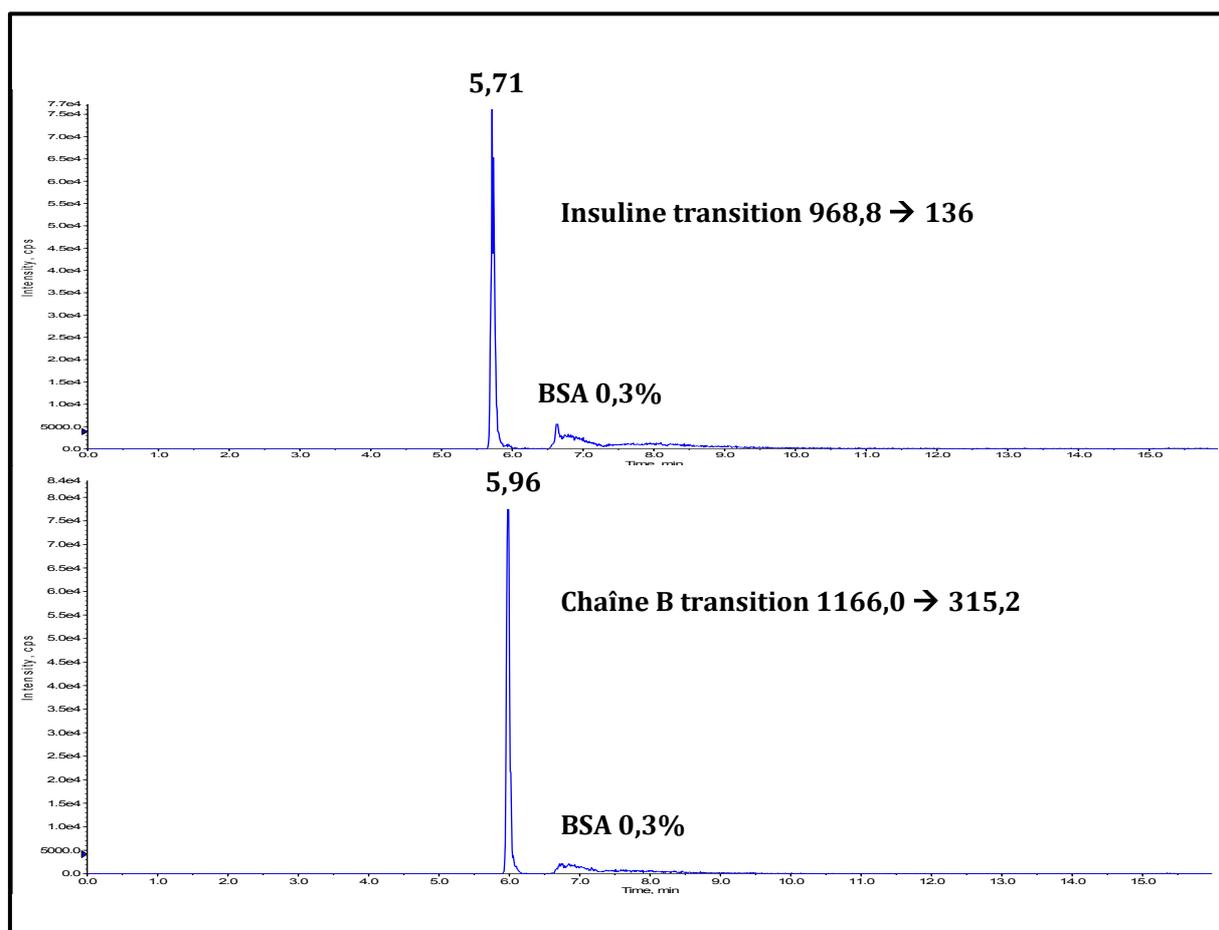


**Figure 37** : Chromatogramme en mode « full scan » (700-1250 Da) d'une solution de SAB à 0,3% dans ACN/H<sub>2</sub>O-20/80 (v/v) à 0,1% en acide formique

Conditions : colonne Kinetex Core-shell C18 (5  $\mu$ m, 100A, 100 x 2,1mm), phase mobile : ACN/H<sub>2</sub>O à 0,1% d'acide formique en mode gradient d'élution (Figure 30); 0,4 mL.min<sup>-1</sup>; acquisition après 2 min d'élution ; 25°C, volume d'injection : 10  $\mu$ L ; détection en mode full scan.

A l'aide de la méthode de calcul précédemment employée et en utilisant le nombre de charges, il apparaît que la masse moléculaire de la protéine non chargée à l'origine du signal est de 66 428 kDa, ce qui permet d'attribuer le signal observé au temps de rétention  $t_r = 6,54$  min à la SAB.

Dans un second temps 0,3% de SAB ont été ajoutés à une solution contenant l'insuline humaine-std et la chaîne B de l'insuline bovine (EI) à 0,40 mg/L. La solution préparée a été analysée en mode MRM (Figure 38). Sur les chromatogrammes on observe les signaux respectifs de l'insuline, de la chaîne B de l'insuline bovine et de la SAB. Aucune altération des signaux correspondants à l'insuline et à l'EI n'est observée.



**Figure 38** : Chromatogrammes en mode MRM de l'insuline humaine-std et de la chaîne B de l'insuline bovine à 0,40 mg/L en solution dans le mélange ACN/H<sub>2</sub>O-20/80 (v/v) à 0,1% en acide formique enrichi en SAB 0,3%

Conditions : colonne Kinetex Core-shell C18 (5 µm, 100A, 100 x 2,1mm), phase mobile : ACN/H<sub>2</sub>O à 0,1% d'acide formique en mode gradient d'éluion (Figure 30); 0,4 mL.min<sup>-1</sup>; acquisition après 2 min d'éluion; 25°C; volume d'injection : 10 µL; détection en mode MRM.

L'analyse identique en présence de SAB montre une stabilité de signal de l'insuline.

Sachant que la poursuite de l'étude emploie l'Umuline®, il apparaît important de prendre en compte les excipients qu'elle contient. Des essais ont donc été menés en utilisant cette spécialité pharmaceutique pour préparer les solutions standards de calibration. Ces essais ayant fourni des résultats équivalents, cette spécialité d'insuline peut donc être utilisée pour la validation de la méthode.

#### ***d. Validation de la méthode HPLC-MS/MS – dosage de l'insuline native***

##### ***i. Dosage de l'insuline***

L'objectif de la validation d'une méthode de dosage est de garantir que la concentration qui sera déterminée ultérieurement en routine, sera suffisamment représentative de la « vraie concentration » de l'échantillon inconnu avec une erreur maîtrisée.

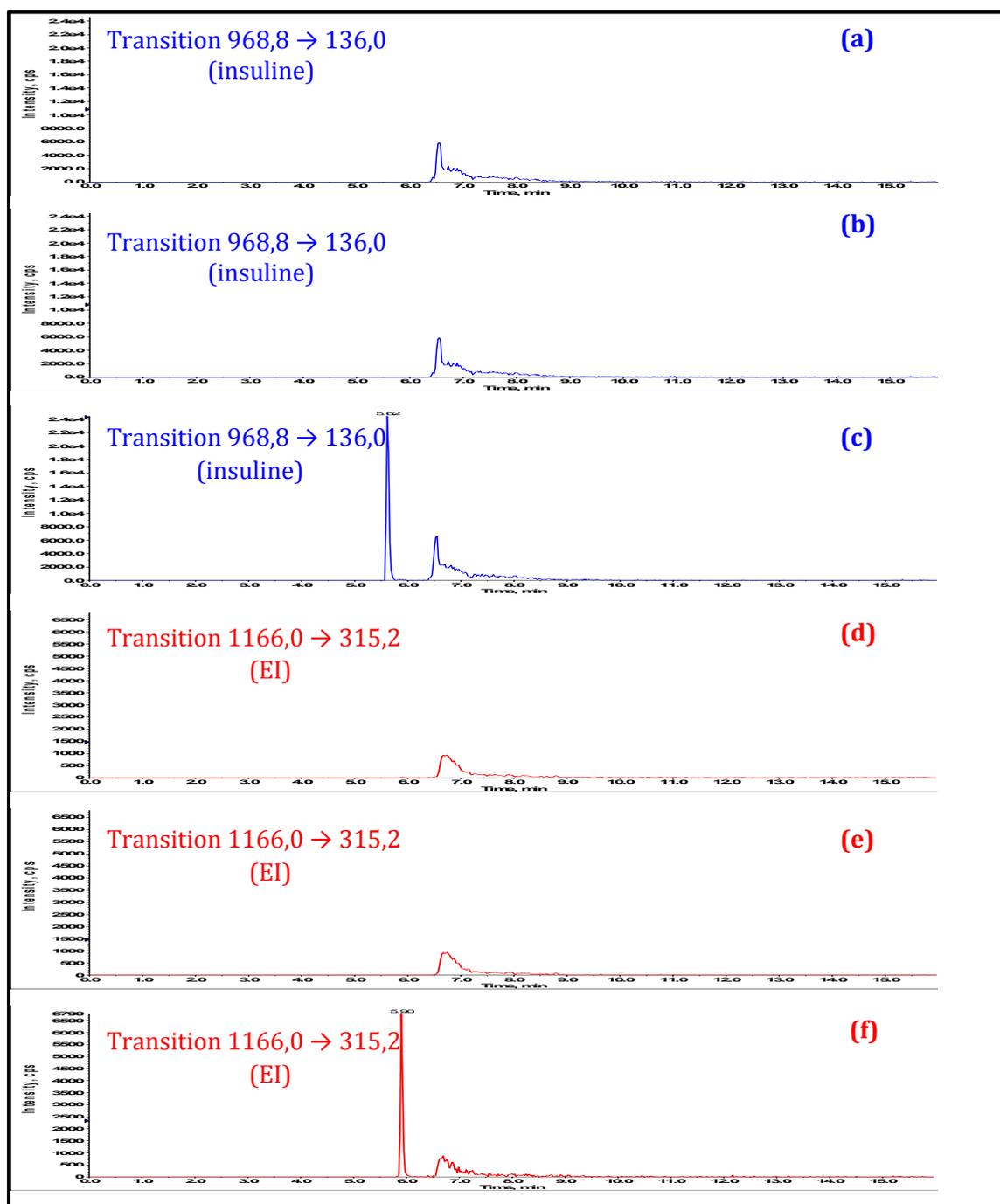
La méthode a été validée selon les recommandations de la Société Française des Sciences Techniques et Pharmaceutiques. Ces recommandations sont basées sur l'étude de l'exactitude, aussi appelée « erreur totale », qui représente la somme des erreurs systématiques (justesse) et aléatoire (fidélité) obtenues à partir de l'analyse des standards de validation. L'erreur totale décrit la différence entre la valeur vraie et la valeur calculée pour chaque standard de validation. Elle est représentée par l'intervalle de tolérance sur le profil d'exactitude qui est un outil graphique décisionnel permettant d'assurer la qualité de la méthode analytique. Notre méthode a été validée avec des limites d'acceptabilité fixées à  $\pm 15\%$  pour un risque d'erreur ( $\alpha$ ) fixé à 5%.

##### ***(a) Spécificité***

La méthode d'analyse développée devant permettre le dosage de l'insuline dans le milieu nutritif complexe, il est indispensable d'évaluer le comportement des composants de la matrice lors de l'analyse (notamment la possibilité d'interférence avec l'insuline) d'une part, mais également des produits de glycation potentiellement formés dans le milieu nutritif binaire, d'autre part.

La spécificité de la méthode de dosage de l'insuline a été évaluée afin de s'assurer que les composés présents dans la matrice, issue du mélange de nutrition, ne perturbent pas le signal de l'insuline à quantifier ou l'étalon interne et qu'ils ne provoquent pas de variation de l'intensité des pics de ces mêmes entités dans les conditions chromatographiques retenues.

Pour cela, la comparaison des chromatogrammes obtenus en mode MRM aux transitions respectives de l'insuline et de l'EI, lors de l'injection d'un blanc matriciel (matrice diluée au 1/10<sup>ème</sup> dans le mélange ACN/H<sub>2</sub>O-20/80 (v/v) à 0,1% en HCOOH et 0,3% en SAB) et de cette même solution additionnée d'étalon interne, d'insuline et/ou d'insuline glyquée a été réalisée. La [Figure 39](#) présente les chromatogrammes obtenus.



**Figure 39** : Spécificité de la méthode d'analyse en mode MRM

Chromatogrammes du :

- (a) **blanc matriciel**, analyse à la transition de l'insuline
- (b) **blanc matriciel additionné d'EI**, analyse à la transition de l'insuline
- (c) **blanc matriciel additionné d'insuline et d'EI**, analyse à la transition de l'insuline
- (d) **blanc matriciel**, analyse à la transition de l'EI
- (e) **blanc matriciel additionné d'insuline**, analyse à la transition de l'EI
- (f) **blanc matriciel additionné d'insuline et d'EI**, analyse à la transition de l'EI

Pour chacune des transitions suivies en mode MRM, la matrice ne perturbe pas les signaux temps de rétention caractéristiques de l'insuline et de l'étalon interne.

Aucune co-élution entre les constituants de la matrice et l'insuline ou encore l'étalon interne n'est observée aux temps de rétention choisis.

Ces résultats attestent de la spécificité de la méthode pour le dosage de l'insuline.

#### *(b) Erreur de prédiction de la méthode*

Chaque jour, et ce pendant trois jours consécutifs, une série de sept standards de calibration (0,010 – 0,10 mg/L) et quatre standards de validation (0,010 ; 0,020 ; 0,070 et 0,10 mg/L ; en triplicat), contenant l'EI à 0,060 mg/L, a été préparée et analysée. Les résultats obtenus après exploitation des données expérimentales exprimant la fonction de réponse, la linéarité, la justesse, la fidélité et l'exactitude sont détaillés dans le [Tableau XXII](#) et seront commentés dans les paragraphes suivants.

#### **Fonction de réponse**

La fonction de réponse traduit, à l'intérieur de l'intervalle de dosage, la relation existante entre la réponse (rapport de l'aire du signal de l'insuline sur celle de son EI ( $A_{\text{insuline}}/A_{\text{EI}}$ )) et la concentration en analyte (insuline) dans l'échantillon. Chaque jour, elle a été établie à partir de sept solutions standards de calibration préparées dans la matrice nutritive diluée au 1/10<sup>ème</sup> dans un mélange ACN/H<sub>2</sub>O-20/80 (v/v) à 0,1% en HCOOH et 0,3% en SAB. Le niveau supérieur de la gamme d'étalonnage (0,10 mg/L) a été sélectionné en considérant la concentration de l'insuline utilisée dans les poches de nutrition parentérale (0,70 mg/L) et du protocole de préparation des échantillons retenu pour l'étude de la stabilité de l'insuline (dilution au 1/10<sup>ème</sup>). Quant à la concentration basse de la gamme d'étalonnage (0,010 mg/L), elle a été choisie pour correspondre à une réduction de la concentration en insuline de 85 %. Chaque solution a été analysée à deux reprises. Les résultats obtenus ont été modélisés par la méthode des moindres carrés à l'aide d'un modèle linéaire pondéré en 1/X. Les coefficients de détermination R<sup>2</sup> obtenus sont supérieurs à 0,991.

**Tableau XXII : Paramètres de validation de la méthode HPLC-MS/MS**

<b>Paramètres de validation</b>		
<b>Fonction de réponse</b>		
f(X)	Y = 19,72 X + 0,0340	
R <sup>2</sup>	0,991	
<b>Linéarité</b>		
Pente	1,011	
Ordonnée à l'origine	-7,87.10 <sup>-6</sup>	
R <sup>2</sup>	0,9894	
<b>Justesse</b>		
	C <sub>recalculée</sub> (mg.L <sup>-1</sup> )	Biais relatif (%)
SV1 : 0,010 mg.L <sup>-1</sup>	0,0099	-0,68
SV2 : 0,020mg.L <sup>-1</sup>	0,019	-6,01
SV3 : 0,070 mg.L <sup>-1</sup>	0,070	-0,21
SV4 : 0,10 mg.L <sup>-1</sup>	0,10	0,48
<b>Fidélité</b>		
	Répétabilité (CV%)	Fidélité intermédiaire (CV%)
SV1 : 0,010 mg.L <sup>-1</sup>	10,9	10,9
SV2 : 0,020 mg.L <sup>-1</sup>	5,70	6,25
SV3 : 0,070 mg.L <sup>-1</sup>	6,05	8,58
SV4 : 0,10 mg.L <sup>-1</sup>	5,08	5,79
<b>Exactitude</b>		
Intervalle de tolérance de l'erreur totale	Limite basse (%)	Limite haute (%)
SV1 : 0,010 mg.L <sup>-1</sup>	-8,2	6,8
SV2 : 0,020 mg.L <sup>-1</sup>	-10,4	-1,8
SV3 : 0,070 mg.L <sup>-1</sup>	-6,4	5,9
SV4 : 0,10 mg.L <sup>-1</sup>	-3,9	4,8

(c) *Linéarité*

La linéarité est la capacité, à l'intérieur de l'intervalle de dosage défini, d'obtenir des résultats de quantification directement proportionnels à la concentration réelle en

analyte dans l'échantillon. Elle a été évaluée à partir des standards de validation dont les concentrations ont été calculées à partir de la fonction de réponse. La droite obtenue présente une valeur de  $R^2$  égale à 0,989. Un test de Student au risque  $\alpha$  de 5% a permis d'établir que la pente peut être considérée égale à 1 et l'ordonnée à l'origine à zéro, ce qui confirme la linéarité de la méthode.

(d) *Exactitude : justesse et fidélité*

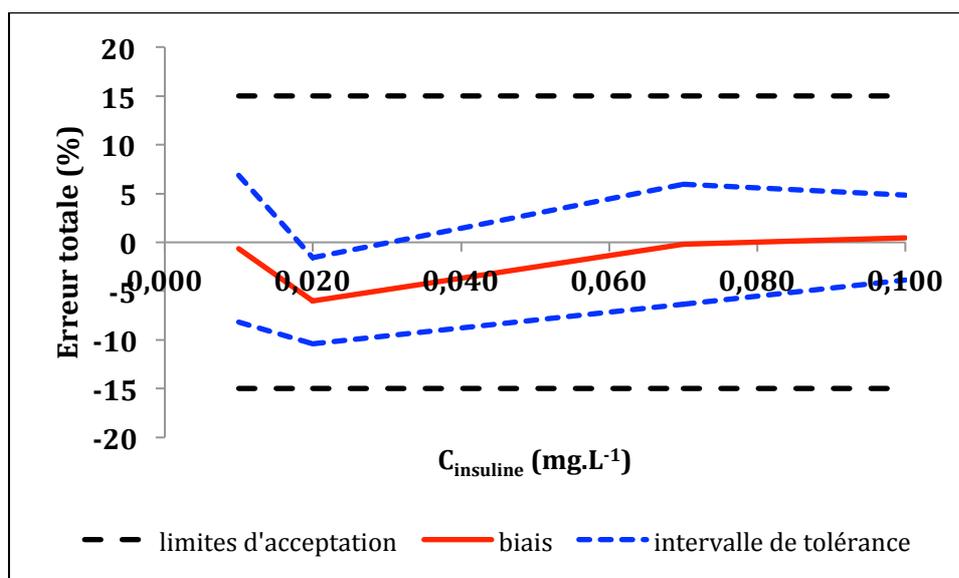
L'exactitude de la méthode a été évaluée à partir de l'erreur totale (erreur systématique + erreur aléatoire) lors de la construction du profil d'exactitude. Dans le cas présent, la justesse exprime l'étroitesse de l'accord entre une concentration moyenne obtenue à partir d'une série de dosages d'un standard de validation (SV) et la concentration réelle. Elle est évaluée par le calcul du biais relatif. La fidélité exprime l'étroitesse de l'accord (degré de dispersion) entre une série de mesures provenant de multiples prises issues d'un échantillon homogène. Le coefficient de variation caractérise la fidélité.

Cette évaluation a été menée sur trois jours, à l'aide de quatre standards de validation préparés en triplicat. Chaque jour, les concentrations des standards de validation ont été recalculées à partir des fonctions de réponses du jour, afin d'apprécier la justesse et la fidélité intermédiaire de la méthode.

Ainsi, les biais relatifs sont compris entre - 6,01% et 0,48% (Tableau XXII), soit inférieures à  $\pm 15\%$  en accord avec les recommandations de l'EMA. La fidélité de la méthode (répétabilité et fidélité intermédiaire) représentée par des coefficients de variation (CV) inférieurs à 10,9% répond également aux critères de l'EMA ( $CV \leq 15\%$ ).

A partir de ces résultats, les limites de tolérance hautes et basses des standards de validation ont été déterminées et les profils d'exactitude ont pu être établis. Comme l'illustre la Figure 40, quel que soit le niveau de concentration, l'intervalle de tolérance ( $\beta = 5\%$ ) est inclus dans la limite d'acceptabilité fixée à  $\pm 15\%$  pour l'insuline. Il y a donc 5% de risque que l'erreur totale sur la valeur vraie analysée soit supérieure à 15%.

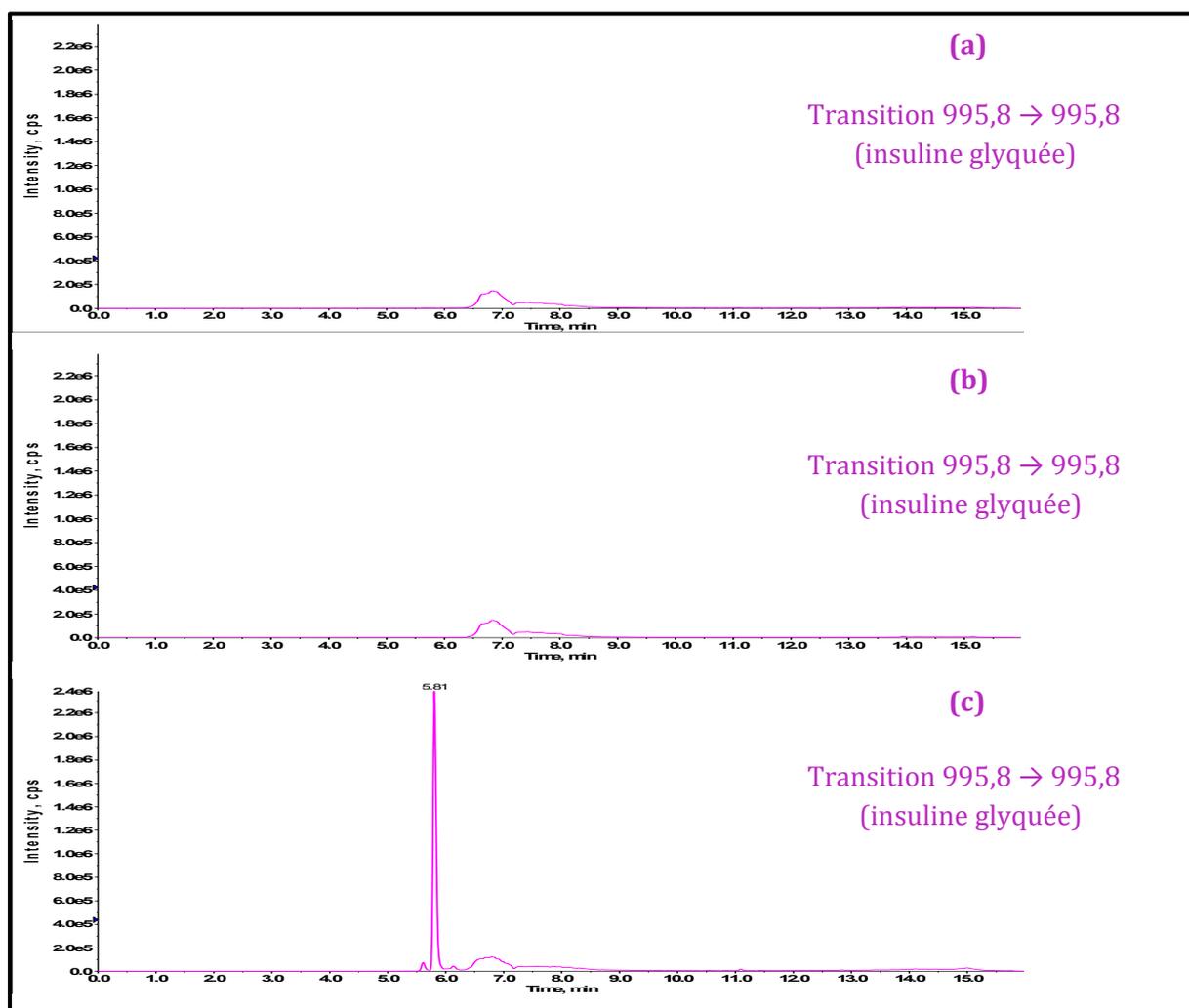
La méthode est donc validée sur la gamme de concentration allant de 0,010 à 0,10 mg/L. La concentration de 0,010 mg/L représente donc la plus petite quantité d'insuline pouvant être dosée avec exactitude et correspond de ce fait à la limite de quantification de la méthode développée.



**Figure 40** : Profil d'exactitude de l'insuline en HPLC-MS/MS

*e. Mise en évidence de l'insuline glyquée*

La spécificité de la méthode permettant de suivre la formation de l'insuline glyquée a été évaluée afin de s'assurer que les composés présents dans la matrice issue du mélange de nutrition ainsi que l'insuline et l'EI ne sont pas détectés aux  $t_R$  de l'insuline monoglyquée lorsque sa transition caractéristique est suivie. Pour cela, les chromatogrammes obtenus en mode MRM à la transition de l'insuline monoglyquée pour l'analyse du blanc matriciel additionné ou non d'insuline et d'EI ou encore d'insuline glyquée ont été comparés. (Figure 41)



**Figure 41** : Spécificité de la méthode d'analyse en mode MRM pour la détection de l'insuline monoglyquée : chromatogramme du :

- (a) **blanc matriciel, analysé** à la transition de l'insuline glyquée
- (b) **blanc matriciel additionné d'insuline et d'EI, analysé** à la transition de l'insuline glyquée
- (c) **blanc matriciel additionné d'insuline, d'EI et d'insuline monoglyquée, analysé** à la transition de l'insuline glyquée

Le blanc matriciel seul ou additionné d'insuline et d'EI ne présente aucun signal aux  $t_R$  de l'insuline monoglyquée, ce qui atteste de la spécificité de la méthode de détection de celle-ci.

Afin de s'assurer qu'aucun phénomène de suppression ionique dû à la présence d'insuline n'avait lieu dans le cas de l'insuline glyquée, des ajouts dosés d'une solution d'insuline à 7,0 mg/L ont été réalisés dans une solution d'insuline glyquée à environ 13 mg/L (calculé à partir de la quantification de l'insuline native et d'un bilan matière) (solution initialement à 35 mg/L, incubée 7 jours à 40°C en présence de 5% de glucose). Pour une augmentation d'environ 2 fois de la quantité d'insuline présente initialement en solution, aucune variation de la réponse de l'insuline glyquée (Ins-gly P1 et Ins-gly P2) n'a été observée. Ceci traduit l'absence de suppression ionique induite par l'insuline sur le signal de l'insuline glyquée dans la gamme de concentration en insuline présente. Ainsi le suivi des signaux de l'insuline glyquée permettra d'apprécier l'évolution des quantités présentes en solution sans toutefois pouvoir déterminer la concentration exacte.

## **C. Etude de stabilité de l'Umuline® en présence de glucose**

### **1. Introduction**

L'objectif de cette étude est de mener une étude de stabilité de l'insuline identique à celle menée précédemment par IECL, mais en utilisant la méthode l'HPLC-MS/MS précédemment validée. Il s'agit ici d'établir si la diminution de la teneur en insuline native observée en IECL repose sur un problème de reconnaissance par les anticorps ou sur une modification de l'insuline causée par une réaction de glycation de la protéine.

### **2. Matériels et méthodes**

#### ***a. Réactifs et solvants***

L'étude de la stabilité a été menée en utilisant les mêmes réactifs que lors de la validation de la méthode, à savoir de l'Umuline®, la chaîne B, la SAB, les solvants, le glucose anhydre et le milieu nutritif décrits dans la partie expérimentale concernant le développement de la méthode HPLC-MS/MS (paragraphe V. B).

### ***b. Instrumentation et conditions d'analyse***

L'analyse des solutions issues des essais de stabilité a été menée à l'aide du système HPLC-MS/MS décrit au paragraphe V.B, dans les conditions optimales établies, afin de quantifier l'insuline et de détecter l'insuline glyquée pouvant se former.

Lors de chaque campagne d'essais, une série de solutions standards de calibration et de validation ont été préparées puis analysées selon le mode opératoire décrit dans le paragraphe relatif à la validation de la méthode. En effet, l'appareil utilisé étant intégré dans un service commun, il s'est avéré indispensable de contrôler sa capacité de réponse dans la mesure où elle est liée aux analyses ayant pu avoir lieu entre deux campagnes d'essais (encrassement de l'appareil).

### ***c. Protocole expérimental d'étude de la stabilité de l'insuline***

#### ***i. Préparation des milieux nutritifs nécessaires à l'étude***

La stabilité de l'insuline a été étudiée dans les différents mélanges qui sont listés dans le [Tableau XXIII](#).

Ceux-ci ont été élaborés à partir d'une solution de glucose 35% contenant des ions  $\text{Ca}^{2+}$  provenant d'une poche d'Olimel® N7E, mélangée volume à volume avec de l'eau ou avec la solution d'acides aminés Olimel® contenant les électrolytes. A ce mélange, des solutions de Cernevit® et de Nutryelt® ont été additionnées à hauteur respective de 0,27% et 0,54%. Dans ces conditions la concentration finale en glucose est de 17,5%.

Afin d'étudier l'influence du pH des essais complémentaires ont été menés à partir de mélanges préparés comme décrit précédemment, à la différence près que leur pH était ajusté à 3,6 par addition d'HCl 1 M ou à 6,3 par ajout de NaOH concentrée lorsque cela était nécessaire.

**Tableau XXIII : Milieux nutritifs utilisés pour l'étude de stabilité de l'insuline en présence de glucose**

	Glucose		Acides aminés Olimel®	Ajustement du pH	pH final
	Origine	Teneur	Teneur		
<b>Milieu 1 :</b> « binaire Olimel® »	Olimel®	17,5%	5,5 %	Non	6,3
<b>Milieu 2 :</b> « binaire Olimel® acide	Olimel	17,5%	5,5%	HCl	3,6
<b>Milieu 3 :</b> « glucose Olimel® 1/2 »	Olimel®	17,5%	0	NaOH	6,3
<b>Milieu 4 :</b> « glucose Olimel® 1/2 acide »	Olimel®	17,5%	0	HCl	3,6

ii. Protocole d'étude de la stabilité de l'insuline

Chaque milieu préparé précédemment a été additionné d'Umuline® afin d'obtenir une solution de concentration initiale égale à 0,70 mg/L. Un premier prélèvement extemporané a été réalisé, puis analysé afin de déterminer la concentration initiale d'insuline dans la solution à t = 0 h. Les solutions ainsi obtenues ont été placées dans une enceinte climatique à 25°C. Des prélèvements ont alors été effectués et analysés aux temps 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 18 h et 24 h après ajout de l'insuline. Chaque essai a été répété trois fois.

Un essai de stabilité a par ailleurs été réalisé à 40°C, dans le cas d'une solution d'insuline à 35 mg/L préparée dans une solution de glucose 5%. Des prélèvements à 2 h puis 7 jours ont été réalisés. L'objectif de cet essai supplémentaire était d'accentuer la glycation afin de voir l'évolution des signaux Ins-gly P1 et Ins-gly P2.

iii. Protocole d'analyse des échantillons issus de l'étude de stabilité

Deux méthodes de dilution des prélèvements effectués lors de l'étude de stabilité ont été appliquées. Les modalités de dilution sont les suivantes :

Méthode n°1 : dilution dans un mélange ACN/H<sub>2</sub>O-20/80 (v/v) à 0,3% de SAB avec 0,1% d'acide formique (pH = 2,70)

Les échantillons prélevés ont été dilués extemporanément, au 1/10<sup>ème</sup>, dans un mélange ACN/H<sub>2</sub>O-20/80 (v/v) à 0,1% d'acide formique + SAB 0,3 %, et additionnés d'une solution mère d'EI afin d'obtenir des échantillons à analyser à 0,06 mg/L en EI. Ce protocole de dilution permet d'obtenir des solutions équivalentes à celles utilisées lors de la validation de la méthode de dosage de l'insuline. Rappelons également que cette composition a été choisie en accord avec les données de la bibliographie, à savoir un milieu acide, afin de garantir la stabilité des échantillons.

Méthode n°2 : dilution dans un mélange ACN/H<sub>2</sub>O-20/80 (v/v) à 0,3% de SAB sans acide formique (pH = 7,35)

Les échantillons prélevés ont été dilués extemporanément, au 1/10<sup>ème</sup>, dans un mélange ACN/H<sub>2</sub>O-20/80 (v/v) + SAB 0,3 %, et additionnés d'une solution mère d'EI afin d'obtenir des échantillons à analyser à 0,060 mg/L en EI.

iv. Exploitation des résultats

La concentration de l'insuline a été déterminée aux différents temps de contact avec le milieu étudié, à partir du ratio de l'aire du signal de l'insuline celui de l'EI ( $A_{\text{insuline}}/A_{\text{EI}}$ ) à l'aide de la droite d'étalonnage établie au préalable.

Comme dans l'étude de stabilité menée à l'aide de la méthode IECL, la stabilité de l'insuline a été évaluée en se basant sur l'évolution du rapport  $C_t/C_0$  où  $C_t$  correspond à la concentration déterminée à chaque temps et  $C_0$  la concentration initiale en insuline.

Par ailleurs, le cas échéant, les aires des signaux correspondant à de l'insuline monoglyquée ont été relevées, puis les ratios  $A_{\text{ins-gly}}/A_{\text{EI}}$  ont été calculés afin de suivre l'évolution de la formation d'insuline monoglyquée, bien que sa quantification n'ait pu être réalisée.

### 3. Résultats et discussion

#### *a. Etude de la stabilité de l'Umuline® dans un mélange binaire Olimel® (pH 6,3) : impact des conditions de dilution des échantillons*

Une première étude de la stabilité de l'Umuline® a été menée dans un mélange binaire Olimel® de pH 6,3. Les prélèvements réalisés lors de cette étude ont été dilués au 1/10<sup>ème</sup> dans les conditions établies au cours de la mise au point de la méthode de dosage par HPLC-MS/MS, soit par une solution ACN/H<sub>2</sub>O-20/80 (v/v) à 0,1% d'acide formique et 0,3% de SAB. Dans un second temps, l'étude a été réitérée en modifiant le protocole de dilution des prélèvements : les dilutions ont été réalisées dans une solution ACN/H<sub>2</sub>O-20/80 (v/v) à 0,3% de SAB (pH apparent 7,35).

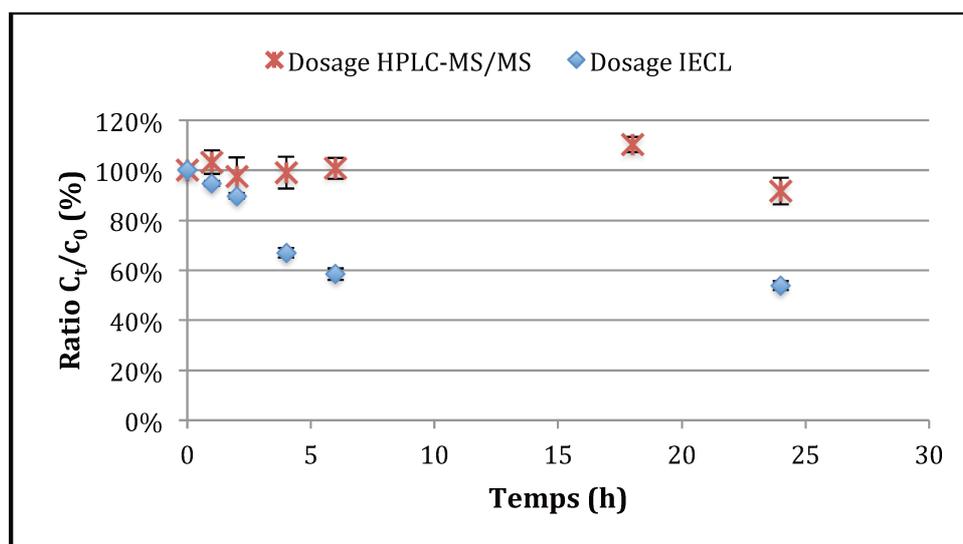
##### i. Profil de stabilité après dilution par une solution avec acide formique (pH = 2,70)

La première étude de la stabilité de l'Umuline® a été menée dans un mélange binaire Olimel® de pH 6,3 (glucose contenant des ions Ca<sup>2+</sup> + solution d'acides aminés et d'électrolytes), additionné de vitamines et d'éléments-trace (**milieu 1** du [Tableau XXIII](#)).

Après préparation de fioles contenant 50 mL du **milieu 1** (n=3), l'addition extemporanée d'Umuline® (C = 0,70 mg/L) a permis d'initier l'étude de stabilité basée sur un prélèvement à différents temps (0 ; 1 ; 2 ; 4 ; 6 ; 18 et 24 h). A chaque temps, 100 µL d'échantillon ont été prélevés dans les différentes fioles, puis dilués au 1/10<sup>ème</sup> et analysés par HPLC-MS/MS.

##### *(a) Suivi de l'Umuline®*

L'analyse des échantillons prélevés a permis de suivre l'évolution de la concentration en insuline mesurée à chaque temps, rapportée à la concentration initiale ( $C_t/C_0$ ) ( $C_0$  insuline dans le glucose Olimel® = 0,540 mg/L). Elle est présentée sur la [Figure 42](#). Les résultats obtenus précédemment en IECL (paragraphe III) sont également reportés sur cette figure.



**Figure 42** : Evolution du ratio  $C_t/C_0$  en insuline dans le mélange binaire Olimel® à pH 6,3 (milieu 1; n = 3) : dosage par HPLC-MS/MS ou IECL

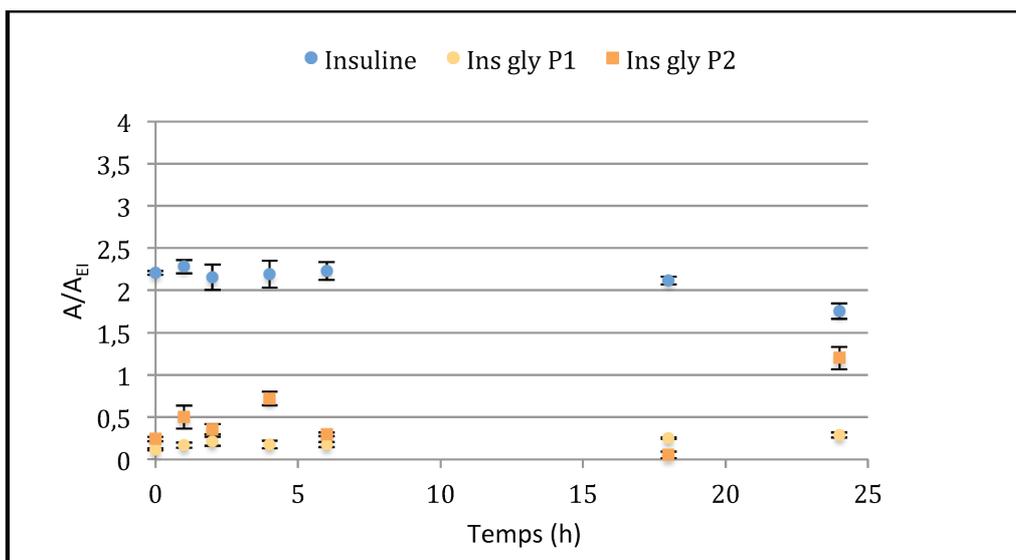
Quantification par HPLC-MS/MS : dilution des échantillons au 1/10<sup>ème</sup> dans ACN/H<sub>2</sub>O-20/80 (v/v) à 0,1% d'acide formique + SAB 0,3 %

Quantification par IECL : dilution des échantillons au 200<sup>ème</sup> dans tampon phosphate 0,4 M + SAB 4%

Contrairement à la diminution importante de la teneur apparente en insuline observée en IECL, le ratio  $C_t/C_0$  déterminé par HPLC-MS/MS semble plus stable dans le temps. L'analyse statistique du rapport  $C_t/C_0$  par un test de Conover-Iman n'a pas permis de mettre en évidence une différence significative entre la teneur en insuline mesurée à  $t = 0$  et celle mesurée au bout de 18 heures ( $p = 0,086$ ). Cependant, une diminution de 10% environ est observée à 24h.

#### (b) Suivi de l'insuline glyquée par HPLC-MS/MS

En HPLC-MS/MS, après 1 h d'incubation, les chromatogrammes obtenus présentent deux pics caractéristiques de la formation d'insuline glyquée (transition MRM 995,8 → 995,8 ; Ins-gly P1 et P2) de faibles intensités mais cependant supérieures à 3 fois le bruit de fond. La Figure 43 reporte les ratios  $A_{\text{soluté d'intérêt}}/A_{\text{EI}}$ , en fonction du temps pour l'insuline et l'insuline glyquée, lors des essais menés dans le mélange binaire Olimel®. On observe une augmentation du pic P1 d'insuline glyquée (Ins-gly P1) et une augmentation plus marquée du pic P2 de l'insuline glyquée (Ins-gly P2). Dans ce cas, le ratio  $A_{\text{Ins-gly P2}}/A_{\text{EI}}$  est multiplié par 3 après 24 heures par rapport à la valeur moyenne obtenue pour des temps inférieurs à 6 h.



**Figure 43** : Evolution du rapport  $A_{\text{soluté d'intérêt}}/A_{\text{EI}}$  pour les pics caractéristiques de l'insuline et de l'insuline glyquée dans le milieu binaire à base de glucose provenant d'une poche d'Olimel®, pH 6,3 (milieu 1 ; n = 3) : analyse par HPLC-MS/MS aux transitions des analytes considérés.

*Dilution des échantillons au 1/10<sup>ème</sup> dans ACN/H<sub>2</sub>O-20/80 (v/v) à 0,1% d'acide formique + SAB 0,3 %*

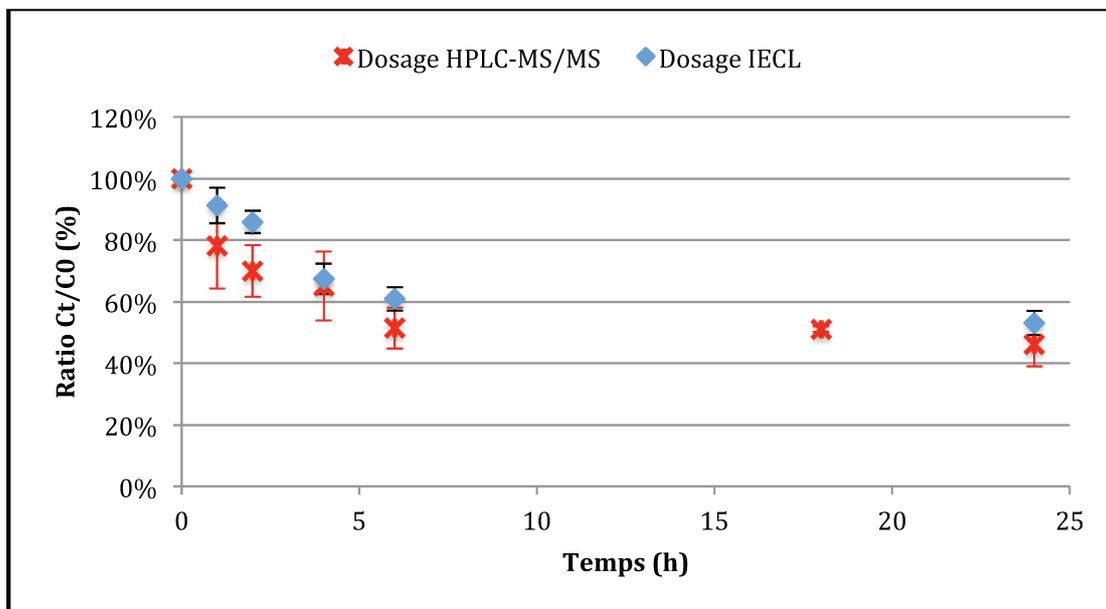
L'amorce d'une formation d'insuline glyquée après 18 h d'incubation, nous a incité à poursuivre l'investigation de la réaction de glycation de l'insuline, en mimant le protocole de préparation des échantillons en IECL. En effet, la différence expérimentale majeure entre les deux essais concerne le pH du solvant de dilution. Pour rappel, lors de l'analyse par IECL, les échantillons sont dilués dans un tampon phosphate 0,40 M de pH 7,5 additionné de 4 % de SAB.

Ainsi, l'analyse a été renouvelée en procédant à une dilution des échantillons dans un mélange ACN/H<sub>2</sub>O-20/80 (v/v) + SAB 0,3 %, soit un mélange ne contenant pas d'acide formique (pH apparent 7,35).

ii. Profil de stabilité après dilution par une solution de pH neutre (pH = 7,35)

Cette seconde étude de stabilité de l'insuline dans le mélange binaire Olimel® additionné de vitamines et d'éléments-trace, a donc été menée de manière équivalente à celle qui vient d'être présentée. Chaque prélèvement effectué a cette fois subi une dilution au 1/10<sup>ème</sup> dans un mélange ACN/H<sub>2</sub>O-20/80 (v/v) + SAB 0,3 %, associé à l'addition d'EI à une concentration de 0,060 mg/L.

Dans le cas de l'insuline, l'évolution du ratio de la concentration en insuline à chaque temps sur sa concentration initiale ( $C_t/C_0$ ) ( $C_0$  insuline dans glucose Olimel® = 0,607 mg/L) est présentée sur la Figure 44, ainsi que ceux précédemment obtenus en IECL.



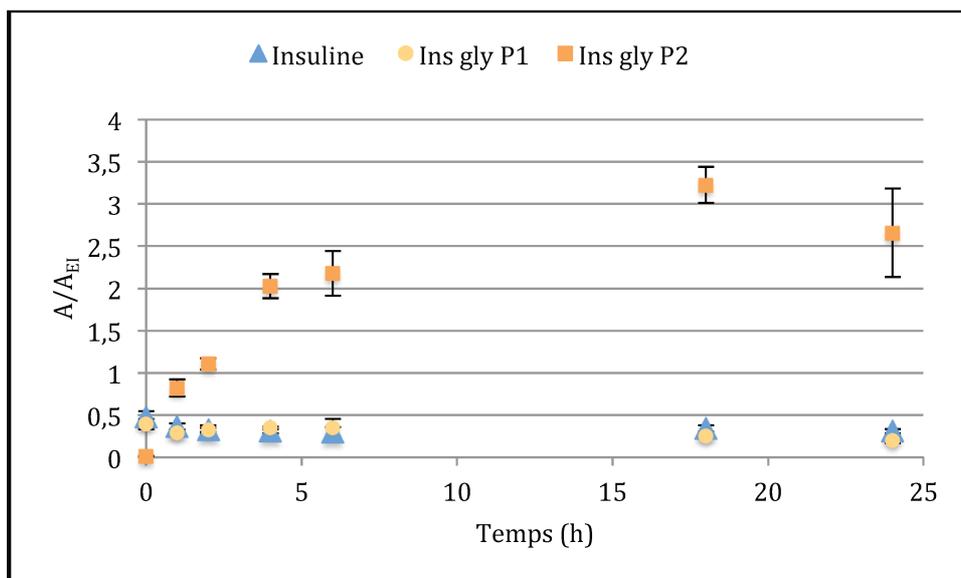
**Figure 44** : Evolution du ratio  $C_t/C_0$  en insuline dans le mélange binaire Olimel® à pH 6,3 (milieu 1 ; n = 3) : dosage par HPLC-MS/MS ou par IECL.

*Quantification par HPLC-MS/MS : dilution des échantillons au 1/10<sup>ème</sup> dans ACN/H<sub>2</sub>O-20/80 (v/v) + SAB 0,3 %*

*Quantification par IECL : dilution au 200<sup>ème</sup> dans tampon phosphate 0,4 M + SAB 4 %*

La Figure 44 montre que dans ces conditions de dilution de l'échantillon en milieu l'évolution de la teneur en insuline déterminée par HPLC-MS/MS est similaire à celle observée en IECL : une diminution de l'ordre de 50% de la concentration en insuline est observée lors des 6 premières heures. Elle semble ensuite se stabiliser entre 6 h et 24 h, reflétant un état de pseudo équilibre.

En ce qui concerne la formation d'insuline glyquée, dans le milieu binaire Olimel® de pH 6,3 après dilution en milieu de pH neutre, l'évolution des rapports  $A_{\text{insuline glyquée}}/A_{\text{EI}}$  relatifs aux deux pics Ins-gly P1 et Ins-gly P2 observés, sont présentés sur la Figure 45. A titre de comparaison le ratio  $A_{\text{insuline}}/A_{\text{EI}}$  a également été reporté.



**Figure 45** : Evolution du rapport  $A_{\text{soluté d'intérêt}}/A_{EI}$  pour l'insuline et les deux pics Ins-gly P1 et Ins-gly P2, caractéristiques de l'insuline glyquée dans le milieu binaire Olimel® à pH 6,3 (milieu 1 ; n = 3) : analyse par HPLC-MS/MS.

*Dilution des échantillons au 1/10<sup>ème</sup> dans ACN/H<sub>2</sub>O-20/80 (v/v) + SAB 0,3 %*

Comme précédemment, dans le milieu binaire Olimel® (**milieu 1**) le signal Ins-gly P1 observé pour l'insuline glyquée est faible et ne semble pas évoluer dans la fenêtre de temps étudiée. Au contraire, le signal Ins-gly P2 augmente de manière inversement proportionnelle à la disparition de l'insuline native, pour atteindre une valeur stabilisée entre 18 et 24 heures.

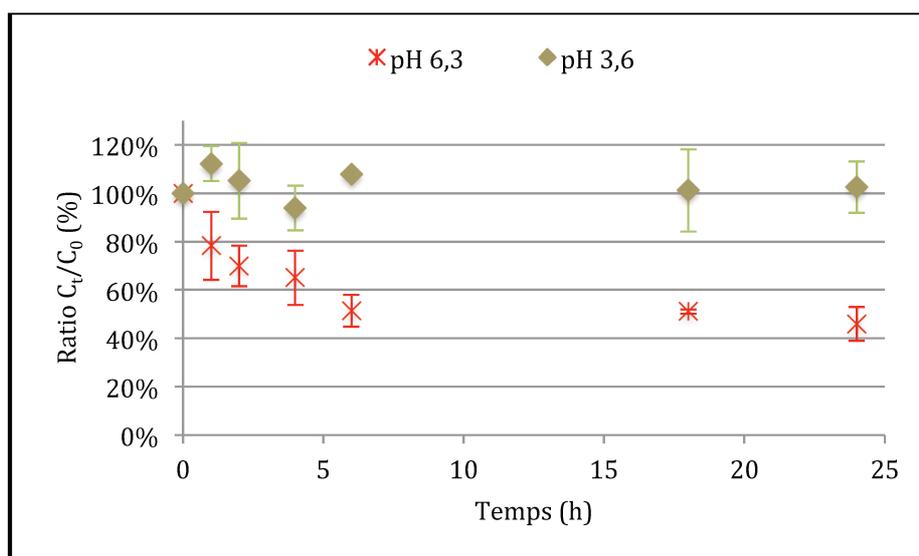
Ces résultats établissent clairement le lien entre la glycation de l'insuline et la diminution de la teneur en insuline déterminée par quantification en IECL et en HPLC-MS/MS.

Par ailleurs, un essai de stabilité à 40°C dans le cas d'une solution d'insuline à 35 mg/L dans une solution de glucose 5% a été réalisé. Après 7 jours d'incubation, l'analyse de la solution diluée en milieu neutre montre un signal relatif à l'insuline glyquée P1 (Ins-gly P1) trois fois plus intense qu'après 2 h d'incubation, alors que celui relatif à l'insuline glyquée P2 (Ins-gly P2) reste globalement équivalent. La concentration d'insuline à 2 h et 7 jours d'incubation est respectivement de 21,5 et 9,5 mg/L. Si l'on suppose que la totalité de l'insuline disparue s'est transformée en insuline monoglyquée, le taux de glycation est donc de 38% à 2 h et de 73% à 7 jours. En conclusion, il semblerait donc

que la réaction de glycation se poursuit au-delà de 24 h, bien qu'aucune diminution de la concentration en insuline n'ait été mise en évidence entre 6h et 24 h d'incubation à 25°C. A l'avenir, il s'agira de vérifier la stabilité de l'insuline à 40°C, dans un milieu équivalent ne contenant pas de glucose.

### *b. Etude de l'influence du pH du milieu nutritif sur la stabilité de l'insuline*

Afin d'évaluer l'impact du pH sur la stabilité de l'insuline en milieu glucosé, une étude équivalente a été réalisée dans le mélange binaire Olimel® additionné de vitamines et d'éléments-trace en ajustant le pH à 3,6 par addition d'acide chlorhydrique 1 M (**milieu 2** du Tableau XXIII). La Figure 46 présente les résultats obtenus à ce niveau bas de pH en comparaison au pH de 6,3 (**milieu 1**). Les échantillons sont dilués dans un milieu de pH neutre (pH = 7,35).



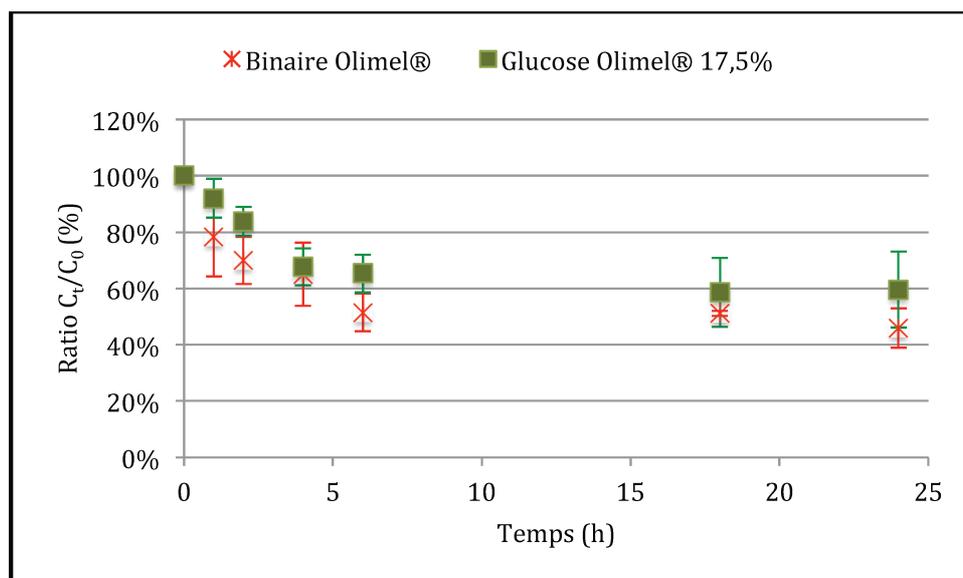
**Figure 46** : Evolution du ratio  $C_t/C_0$  en insuline dans le mélange binaire Olimel® à pH 3,6 (milieu 2) et 6,3 (milieu 1) : analyse par HPLC-MS/MS.

*Dilution des échantillons au 1/10<sup>ème</sup> dans ACN/H<sub>2</sub>O-20/80 (v/v) + SAB 0,3 %*

Lorsque l'incubation est réalisée à pH 3,6, la teneur en insuline native reste constante. Par ailleurs aucune forme glyquée d'insuline n'est détectée. Ces résultats concordent avec ceux obtenus lors des études de stabilité avec quantification par IECL et confirment le rapport existant entre la réaction de glycation et le niveau de pH du milieu nutritif. La réaction de glycation de l'insuline n'a pas lieu à pH bas (3,6) mais se produit à pH proche de la neutralité (6,3).

### c. Influence de la présence d'acides aminés dans le milieu nutritif

Afin d'objectiver un éventuel impact des acides aminés sur la stabilité, celle-ci a également été évaluée dans la solution de glucose Olimel® diluée au ½ avec de l'eau (solution à 17,5% de glucose) à pH 6,3 (**milieu 3** du **Tableau XXIII**). Les échantillons sont dilués dans un milieu à pH neutre.

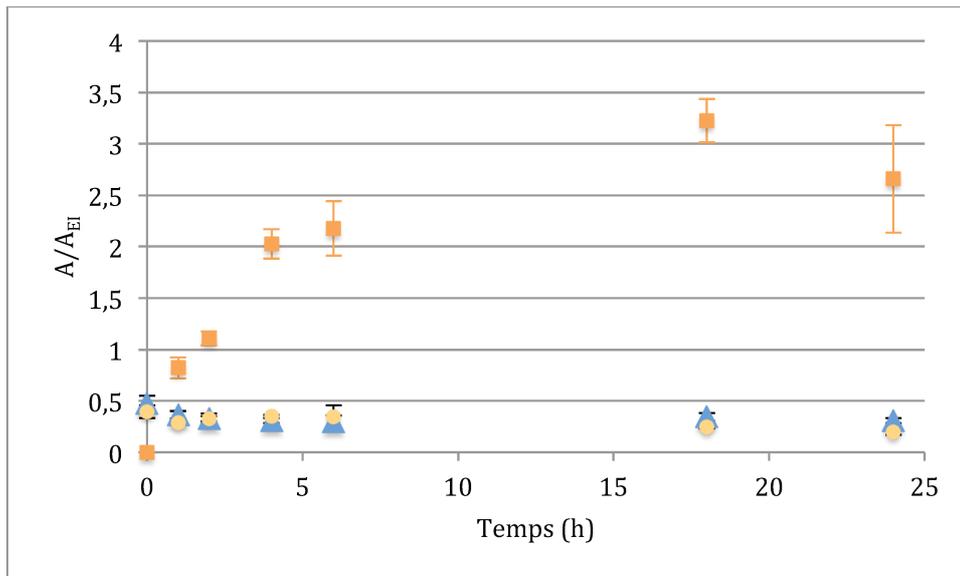


**Figure 47** : Evolution du ratio  $C_t/C_0$  en insuline dans le mélange binaire Olimel® (milieu 1) et dans la solution de glucose Olimel® à 17,5% (milieu 3) à pH 6,3 : analyse par HPLC-MS/MS.

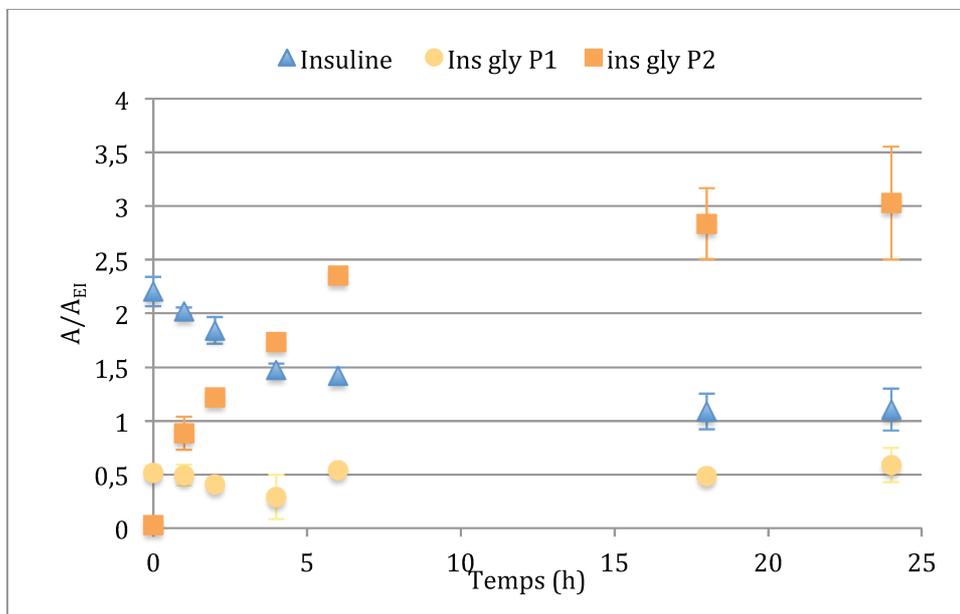
*Dilution des échantillons au 1/10<sup>ème</sup> dans ACN/H<sub>2</sub>O-20/80 (v/v) + SAB 0,3 %*

La **Figure 47** montre une diminution de la teneur en insuline comparable, en présence ou non d'acides aminés.

En ce qui concerne la formation d'insuline glyquée au cours du temps, l'évolution des rapports  $A_{\text{insuline glyquée}}/A_{\text{EI}}$  relatifs aux deux signaux Ins-gly P1 et Ins-gly P2 observés, est présentée sur la **Figure 48**-(a) pour le milieu binaire Olimel® (milieu 1) et **Figure 48**-(b) pour la solution de glucose Olimel® à 17,5% (milieu 3). A titre de comparaison le ratio  $A_{\text{insuline}}/A_{\text{EI}}$  a également été reporté.



(a)



(b)

**Figure 48** : Evolution du rapport  $A_{\text{soluté d'intérêt}}/A_{EI}$  pour l'insuline et les deux pics Ins-gly P1 et Ins-gly P2, caractéristiques de l'insuline glyquée dans (a) le milieu binaire Olimel® (milieu 1) et (b) la solution de glucose Olimel® à 17,5% (milieu 3) à pH 6,3 : analyse par HPLC-MS/MS.

*Dilution des échantillons au 1/10<sup>ème</sup> dans ACN/H<sub>2</sub>O-20/80 (v/v) + SAB 0,3 %*

Dans les deux milieux, des profils équivalents sont observés pour les pics Ins-gly P1 et Ins-gly P2. L'absence d'acides aminés ne modifie pas la réaction de glycation.

Les résultats ainsi obtenus confirment que deux paramètres jouent un rôle prépondérant dans la stabilité de l'insuline dans les milieux nutritifs : la présence de glucose, ainsi que le niveau de pH. Ces paramètres avaient déjà été identifiés au cours

des études de stabilités employant l'IECL comme méthode de quantification de l'insuline.

L'emploi de l'HPLC-MS/MS, une méthode orthogonale à l'IECL, a permis d'expliquer la diminution de la teneur en insuline dans les milieux nutritifs et la mise en évidence d'une réaction de glycation.

## D. Etude de la stabilité de l'insuline glyquée selon le pH - Réversibilité

### 1. Introduction

Suite à l'obtention de profils de stabilité de l'insuline différents selon le mode de dilution des échantillons (dilution par un milieu acide (pH 3,6) ou proche de la neutralité (pH 6,3)), nous avons examiné de manière approfondie le mécanisme de glycation mis en jeu.

Rappelons que lors des premiers essais relatifs à l'étude de la stabilité en milieu binaire à pH 6,3, une réduction de la teneur en insuline n'a pu être observée qu'après 24 h d'incubation si la dilution des échantillons est réalisée à pH acide. En revanche, le profil de la concentration en insuline est fortement modifié si la dilution des échantillons se fait par un milieu neutre.

Par ailleurs, comme nous l'avons montré avec l'étude de stabilité, l'insuline est stable à pH 3,6 en milieu glucosé (**milieu 2**), ce qui justifie les choix faits par différents auteurs qui stoppaient la réaction de glycation par ajout d'acide acétique concentré [384,385] : ces travaux rapportent en effet une cinétique de glycation de l'insuline lente (après 30 jours à 37°C : glycation d'environ 30% de l'insuline bovine).

Une réflexion approfondie du protocole expérimental utilisé pour la mise en place du dosage a été menée. Compte tenu de la durée d'une analyse (16 minutes) et du nombre important d'échantillons à analyser, seul le prélèvement effectué à  $t = 24$  h a été dosé extemporanément après dilution dans la solution de pH 2,70. Les prélèvements effectués à des temps inférieurs avaient été dosés après plus de 2 h d'attente dans le passeur d'échantillons à 4°C. La question d'une réversibilité de la réaction de glycation observée après dilution en milieu acide a donc été posée.

## 2. Matériels et méthodes

### a. Milieu nutritif et concentration en insuline

Un mélange binaire 50/50-v/v des compartiments de glucose et d'acides aminés d'une poche d'Olimel N7E® a été employé. Après mélange, ce milieu binaire a été supplémenté en vitamines et éléments-trace dans les conditions habituelles. Le pH du mélange était donc de 6,3 (milieu 1 du [Tableau XXIII](#)).

L'Umuline® a été ajoutée dans ce milieu binaire Olimel® à deux niveaux de concentration : 35 mg/L ou 0,70 mg/L.

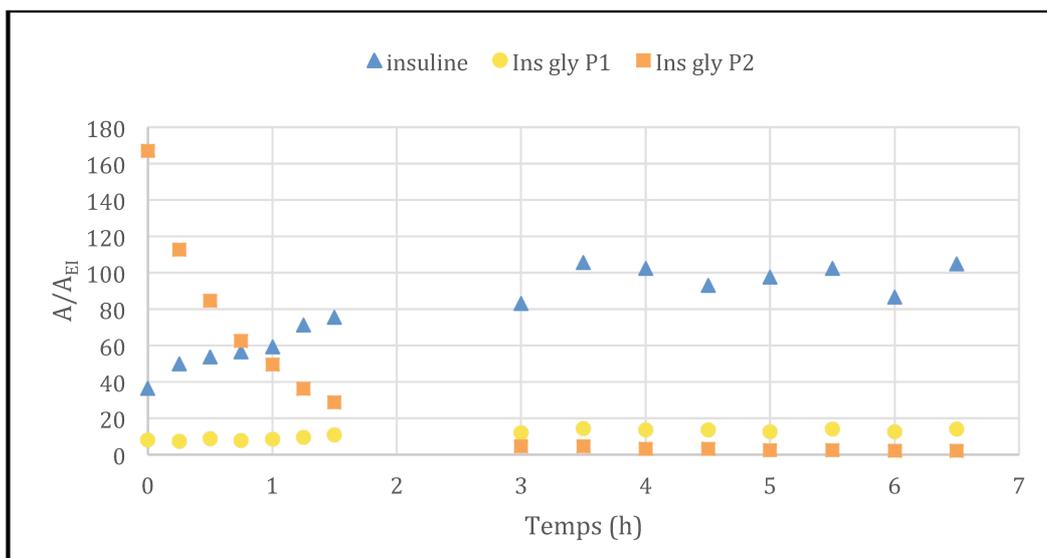
### b. Mode opératoire

Afin de garantir la présence d'une quantité importante d'insuline glyquée dans le milieu binaire, un temps d'incubation de l'insuline dans le milieu binaire Olimel® d'au moins 30 heures a été imposé.

A l'issue de ce temps, deux prélèvements distincts ont été effectués pour chacun des essais réalisés ( $C_{\text{insuline}} = 35 \text{ mg/L}$  et  $0,70 \text{ mg/L}$ ), puis respectivement dilués à l'aide d'un diluant acide (pH 2,70) ou neutre (pH 7,35) en présence d'étalon interne. Chaque solution obtenue a été placée dans le passeur de la chaîne HPLC, thermostaté à 20°C, afin d'en réaliser l'analyse en mode MRM, toutes les 16 minutes pendant 1h30 puis toutes les 30 min et ce jusqu'à 6 heures au moins après la dilution initiale.

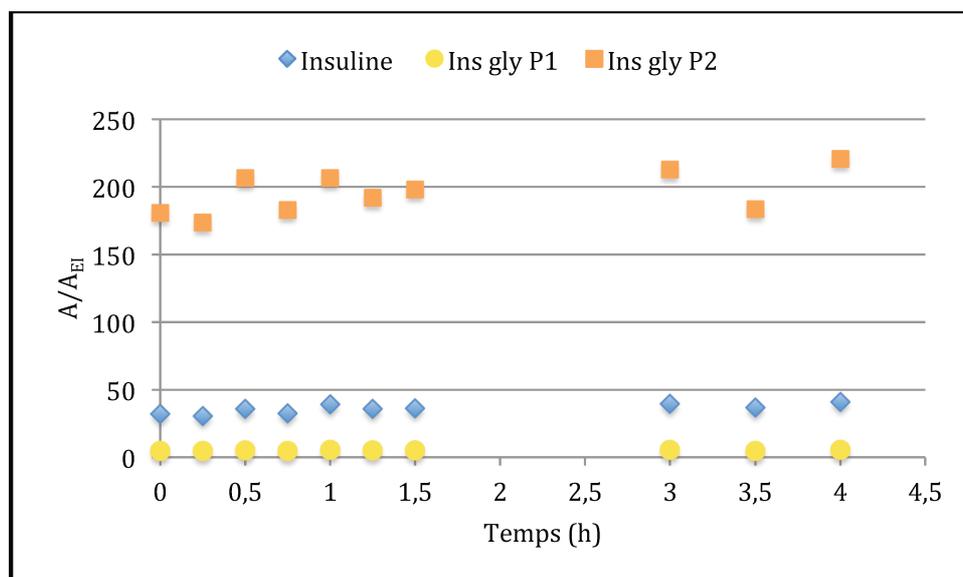
## 3. Résultats

La [Figure 49](#) présente les résultats obtenus après dilution de l'échantillon en milieu acide (pH 2,70) pour une concentration d'Umuline® de 35 mg/L, tandis que ceux obtenus après dilution en milieu neutre (pH 7,35) sont représentés dans la [Figure 50](#).



**Figure 49** : Evolution du rapport  $A_{\text{soluté d'intérêt}}/A_{EI}$  pour l'insuline et les deux pics Ins-gly P1 et Ins-gly P2 (caractéristiques de l'insuline glyquée) à une concentration d'Umuline® de 35 mg/L; pH du milieu de glycation = 6,3 (n=1).

*Dilution des échantillons au 1/10<sup>ème</sup> dans ACN/H<sub>2</sub>O-20/80 (v/v) à 0,1% d'acide formique + SAB 0,3 % ; pH apparent = 2,70.*



**Figure 50** : Evolution du rapport  $A_{\text{soluté d'intérêt}}/A_{EI}$  pour l'insuline et les deux pics Ins-gly P1 et Ins-gly P2 (caractéristiques de l'insuline glyquée) à une concentration d'Umuline® de 35 mg/L ; pH du milieu de glycation = 6,3 (n=1).

*Dilution des échantillons au 1/10<sup>ème</sup> dans ACN/H<sub>2</sub>O-20/80 (v/v) + SAB 0,3 %. pH apparent = 7,35.*

Quelles que soient les conditions de pH étudiées pour le diluant, le rapport  $A/A_{EI}$  du pic Ins-gly P2 possède l'intensité la plus importante à  $t = 0$ . Dans des conditions de dilution acide (pH 2,70), ce rapport diminue progressivement tandis que le rapport relatif de l'insuline native (non glyquée) augmente de manière inverse. En revanche, le rapport relatif du pic Ins-gly P1 d'insuline glyquée reste stable.

Dans les conditions non acides de dilution (pH 7,35), tous les signaux ont un niveau constant dans le temps.

Les essais ont permis d'évaluer la stabilité des produits formés par glycation de l'insuline dans des milieux de pH différents (acide *versus* neutre).

Grâce à une dilution de la solution d'insuline glyquée par des solutions de pH différent, nous avons pu mettre en évidence que les molécules d'insuline monoglyquées caractérisées par les pics Ins-gly P1 et Ins-gly P2 ont deux comportements distincts. En milieu acide, l'évolution en sens inverse des signaux de l'insuline et du pic P2 reflète une relation d'équilibre entre la molécule d'insuline et celle de l'insuline monoglyquée éluee en second (P2). La réaction de glycation mise en jeu pour former cette molécule est un phénomène réversible en milieu acide, mais ne l'est pas en milieu neutre.

En revanche, la molécule d'insuline monoglyquée éluee en premier (P1) ne voit pas son signal évoluer en milieu acide. La stabilité de cette molécule d'insuline monoglyquée semble montrer que la réaction conduisant à sa formation est irréversible quel que soit l'acidité du milieu.

#### 4. Discussion

L'étude de stabilité de l'insuline menée en HPLC-MS/MS a permis de confirmer les résultats obtenus en IECL : à température ambiante et pH 6,3, l'insuline disparaît à hauteur de 40% en moins de 6 h en présence de glucose à 17,5%. Dans une fenêtre de temps allant de 6 h à 24 h, sa concentration semble se stabiliser. Cependant après 7 jours à 40°C dans une solution de glucose à 35%, la concentration d'insuline diminue d'avantage, pour atteindre un taux d'environ 30% par rapport à la quantité initiale. Ainsi, l'invariance de la concentration en insuline entre 6 h et 24 h à l'ambiante ne peut être interprétée comme l'obtention d'un état d'équilibre. Il a par ailleurs été montré que l'insuline était stable en milieu acide.

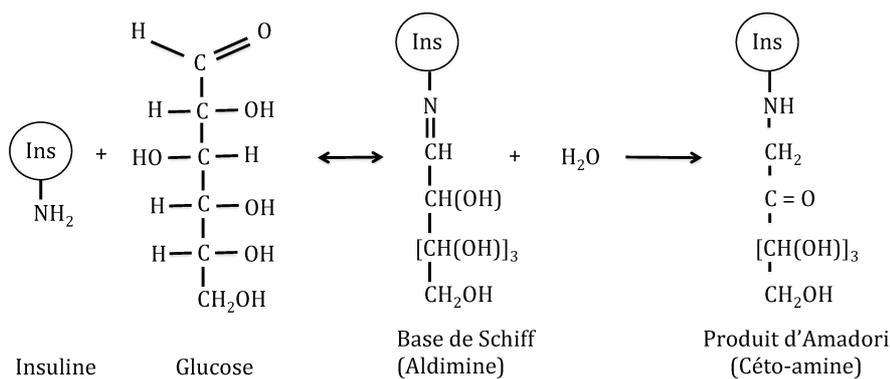
Lors de l'étude réalisée en HPLC-MS/MS, deux signaux de rapport m/z caractéristiques de l'insuline monoglyquée ont pu être mis en évidence. L'un d'eux correspond à un composé co-élué avec l'insuline (Ins-gly P1 : tr = 5,67 min), alors que le second à un composé co-élué avec l'étalon interne (Ins-gly P2 : tr = 5,86 min). Notons que le signal Ins-gly P2 observé est plus intense que celui de Ins-gly P1 (facteur 4,5 à t<sub>0</sub>).

Par ailleurs, il a pu être démontré que la réaction conduisant à la modification de l'insuline pouvait être réversible par addition d'acide. Dans ce cas, ce phénomène est associé à une disparition du signal Ins-gly P2 alors que le signal Ins-gly P1 reste stable.

Rappelons que l'étude menée en HPLC-MS/MS avait pour objectif d'identifier l'origine de la diminution de la concentration en insuline détectée en IECL, en répondant notamment aux questions suivantes :

- l'insuline subit-elle une modification conformationnelle empêchant la reconnaissance d'au moins l'un des deux épitopes par les couples d'anticorps ?
- l'insuline subit-elle une modification chimique potentiellement réversible dans le milieu NPT et notamment une réaction de glycation ?

Au regard de nos résultats, il apparaît clairement que la diminution apparente de la concentration en insuline native observée en IECL et en HPLC-MS/MS résulte d'une modification chimique de type glycation caractérisée en HPLC-MS/MS. La formation d'insuline monoglyquée provient de la réaction d'une molécule d'insuline avec une molécule de glucose. De manière générale, cette réaction qui implique d'une part le groupement aldéhyde d'un sucre réducteur à savoir le glucose et un groupement amine  $\alpha$  ou  $\epsilon$  d'une protéine d'autre part [383] est appelée glycation, dans la mesure où elle ne fait pas intervenir d'enzyme. Il s'agit d'une réaction de Maillard qui se déroule en plusieurs étapes, détaillées dans la [Figure 51](#) [386,387].



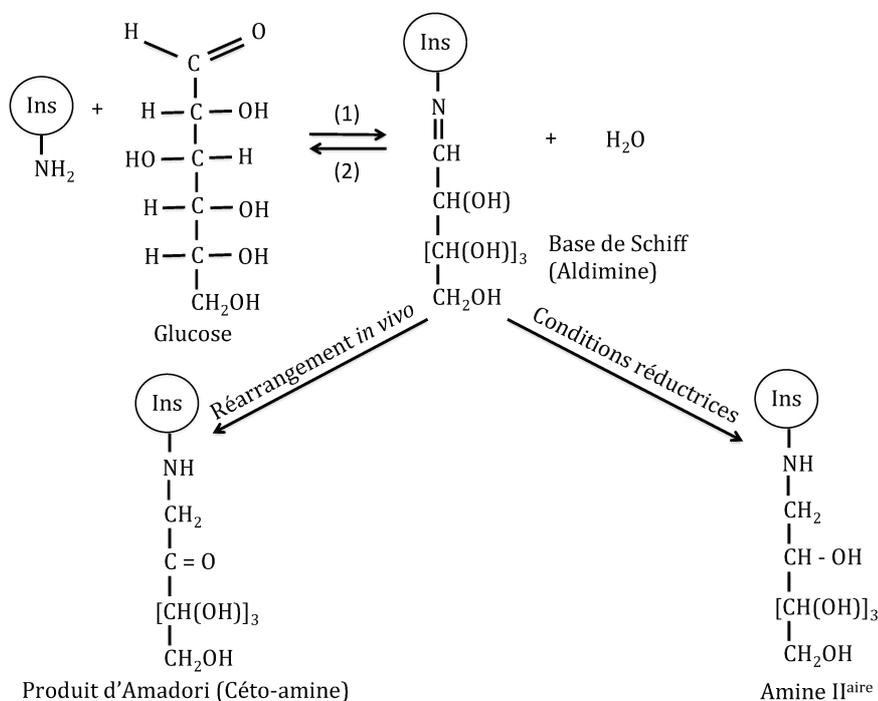
**Figure 51** : Etapes de la réaction de glycation de l'insuline

La première étape correspond à une attaque nucléophile de la fonction amine de la protéine sur le sucre réducteur. Il en résulte une molécule de structure aldimine également appelée base de Schiff. Cette première étape est rapide et réversible car la base de Schiff est une entité chimique très réactive. S'ensuit une réaction lente de réarrangement structurel aboutissant à la formation d'une céto-amine (appelée produit d'Amadori). Cette seconde étape de la réaction de Maillard est irréversible.

Dans le cas de l'insuline cette réaction a déjà été décrite *in vitro* et *in vivo*, initialement sur l'insuline bovine [374,380,385,388,389] puis sur l'insuline porcine [382] et l'insuline humaine [379,390]. Il a été montré que le taux de glycation de l'insuline augmentait avec la concentration en glucose [375,383,385,391], avec la température [375] (la glycation est multipliée par 4 lorsque la température d'incubation passe de 4 à 37°C) et en présence d'un agent réducteur dans le milieu glucosé. Il est par ailleurs dépendant du temps de contact. Par exemple, d'après Abdel-Wahab *et al.* [375] à 37°C, dans une solution de glucose à 4% de pH 7,4 (tampon phosphate), l'insuline bovine subit une réaction de glycation à hauteur de 28% en 48 heures. Ce résultat est cohérent avec nos propres résultats (température plus faible (25°C) et temps de contact plus court (24 h), mais concentration en glucose environ 4 fois plus importante).

Différents auteurs se sont attachés à la caractérisation des espèces formées dans différentes conditions opératoires (milieu simple ou en présence d'un large excès d'un agent réducteur tel que le cyanoborohydrure de sodium (NaBH<sub>3</sub>CN)) et ce en fonction du temps. L'ajout d'un agent réducteur dans le milieu réactionnel lors de la glycation *in vitro* favorise la formation de la base de Schiff par un déplacement de la réaction de

glycation dans le sens (1) (Figure 52) et la formation de l'amine secondaire correspondante. Les principaux résultats obtenus sont présentés dans le Tableau XXIV.



**Figure 52 :** Réaction de glycation de l'insuline en conditions réductrices (NaBH<sub>3</sub>CN) et non réductrices

En conditions non réductrices, l'insuline peut être monoglyquée (fixation d'une seule unité glucose) ou diglyquée (fixation de deux unités glucoses par molécule d'insuline). Soulignons que seuls les travaux de Guedes *et al* [384] ont mis en évidence la formation d'insuline doublement glyquée en conditions non réductrices, pour un temps de contact très long (30 jours à 37°C), ce qui corrobore le fait qu'à 25°C nous ne détectons que de l'insuline monoglyquée pour des temps de contact de 24 h.

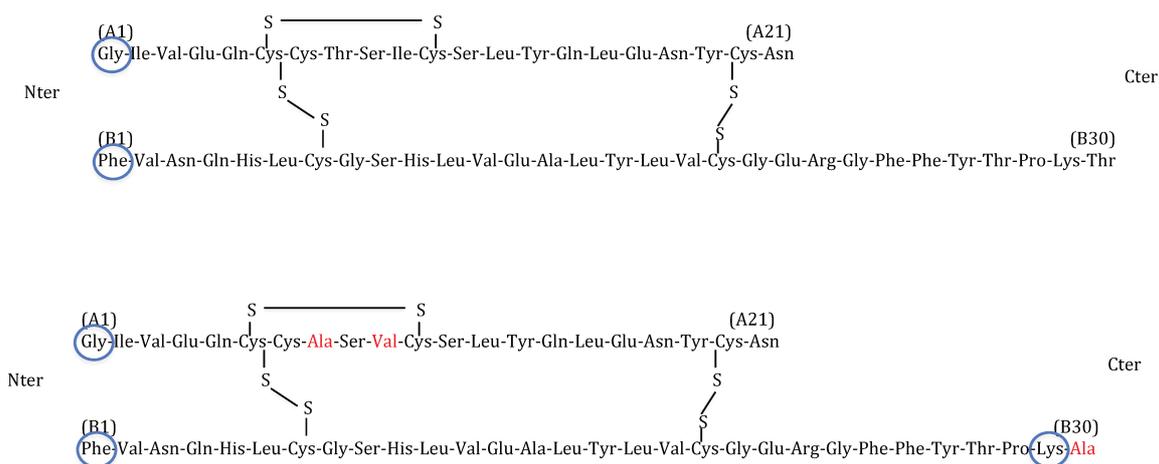
En conditions réductrices, il est possible de détecter de l'insuline mono- di- ou tri-glyquée.

Par ailleurs, quelles que soient les conditions expérimentales (milieu réducteur ou non), l'insuline monoglyquée est la forme préférentiellement observée et en proportion plus importante, vient ensuite la forme diglyquée puis la forme triglyquée [384,388].

**Tableau XXIV** : Sites de glycation décrits pour l'insuline en fonction des conditions opératoires

Conditions	Référence	Type d'insuline	Insuline glyquée	Site de glycation
Non réductrices	[384]	Bovine, <i>In vitro</i>	Monoglyquée Diglyquée	Lys29B ou Phe1B Phe1B et Lys29B Ou Lys29B et Gly1A
	[388]	Bovine, <i>in vitro</i>	Monoglyquée	Lys29B ou Phe1B
Réductrices	[391]	Bovine, <i>in vitro</i>	Monoglyquée Diglyquée	B1-13 ou B22-30
	[384]	Bovine, <i>in vitro</i>	Monoglyquée Diglyquée Triglyquée	Phe 1B Phe1B et Lys29B Ou Gly1A et Lys29B
	[388]	Bovine, <i>in vitro</i>	Monoglyquée Diglyquée Triglyquée	Phe 1B ou LysB29 Phe1B et Lys29B Ou Gly1A et Lys29B
	[390]	Humaine, <i>in vitro</i>	Monoglyquée Diglyquée	Phe1B Phe1B et Gly1A
	[379]	Humaine, <i>in vitro</i>	Monoglyquée	NA
	[392]	Humaine, <i>in vitro</i>	Monoglyquée	NA

La majorité des données collectées quant aux sites de glycation concernent l'insuline bovine. Le(s) site(s) de glycation sont variables (Tableau XXIV et Figure 53). La phenylalanine en position 1 de la chaîne B représente le site préférentiel de glycation [383], mais les fonctions amino de la glycine en position 1 de la chaîne A et la lysine en position 29 de la chaîne B peuvent également participer à l'attaque nucléophile de la fonction aldéhyde. Dans le cas de l'insuline humaine, on peut noter que les sites de glycation sont identiques à ceux de l'insuline bovine à l'exception de la lysine en position 29 de la chaîne B qui ne semble pas impliquée [390].



**Figure 53** : Séquences peptidiques de l'insuline humaine (a) et de l'insuline bovine (b)

Les parties indiquées en rouge correspondent aux différences de structure en comparaison à la séquence de l'insuline humaine. Les acides aminés entourés en bleu sont les sites de glycation décrits pour chacune des insulines.

Dans les études ayant été menées en l'absence de conditions réductrices, la différence de masse est de 162 Da, correspondant à la masse d'un adduit glucose (soit la masse d'un glucose (180 Da) ayant perdu une molécule d'eau (18 Da)). Ceci est parfaitement en accord avec nos résultats. En revanche, dans des conditions réductrices, la différence de masse retrouvée entre l'insuline native et l'insuline monoglyquée est de 164 Da, correspondant à un adduit glucitol, issu de la réduction du glucose en sorbitol (182Da) accompagnée de la perte d'une molécule d'eau (18 Da).

A ce stade de l'étude, plusieurs hypothèses peuvent être établies quant à la nature des espèces formées lors de la réaction de l'insuline sur le glucose et qui conduisent à l'obtention des signaux Ins-gly P1 et Ins-gly P2 :

- **hypothèse 1** : monoglycation de l'insuline conduisant à l'obtention d'une molécule caractérisée par le signal Ins-gly P2 suivi d'une modification conformationnelle de l'insuline monoglyquée formée pour former l'espèce Ins-gly P1 en faible quantité. Ce changement de conformation pourrait entraîner une modification de la polarité apparente de la protéine et une rétention différente des deux formes. Cette hypothèse semble cependant peu probable au regard des différences de stabilité observées pour les molécules d'insuline monoglyquée caractérisées par les signaux Ins-gly P1 et Ins-gly P2 en milieu acide (disparition

du signal Ins-gly P2 alors que le signal Ins-gly P1 reste stable et réapparition d'insuline).

- **hypothèse 2** : monoglycation de l'insuline sur deux sites distincts de la protéine.

Il est possible ici de distinguer deux cas de figure :

- ✓ le premier implique la N-glycation de l'insuline selon la réaction de Maillard via deux fonctions amines portées par deux acides aminés distincts, en accord avec les données de la littérature (Tableau XXIV) : la phenylalanine en position 1 de la chaîne B et par analogie à ce qui est observé dans le cas de l'insuline bovine, la lysine 29 de la chaîne B. En effet, les structures peptidiques des insulines humaine et bovine ne diffèrent que de quelques acides aminés (Figure 53). Etant donné que ces derniers ne correspondent pas aux sites de glycation décrits, il est possible d'envisager une transposition des notions de glycation de l'insuline bovine, très étudiée, à l'insuline humaine. Si tel est le cas, comment justifier, d'une part, la différence importante de l'intensité des signaux Ins-gly P1 et Ins-gly P2 qui traduirait une réactivité des fonctions amines très différente et, d'autre part, les deux comportements distincts observés lors de l'étude de réversibilité de la glycation en milieu acide pour une liaison covalente du même type ?
- ✓ le second implique la N-glycation de l'insuline d'une part (en PheB1) ainsi que sa O-glycation d'autre part, impliquant ainsi la formation de liaisons insuline-glucose distinctes, dont la stabilité pourrait différer. Aucune des études publiées ne fait cependant référence à une O-glycation. On peut noter que dans ces études, à l'issue de la glycation, le milieu obtenu est toujours acidifié à pH 4 par ajout d'acide acétique 0,5 M et seule l'insuline N-monoglyquée est mise en évidence. Compte tenu des résultats relatifs à la réversibilité de la réaction de glycation en milieu acide obtenus lors de nos travaux, on pourrait supposer que le signal Ins-gly P1 qui reste stable, correspondrait à la formation d'un adduit par N-glycation ; le signal Ins-gly P2 pourrait dans ce cas correspondre à un adduit formé par O-glycation. Cette hypothèse semble cependant peu probable dans le cas présent puisque les O-glycations ne sont décrites qu'*in vivo* dans l'appareil de Golgi et font dans ce cas intervenir des enzymes (O-glycosyltransférases).

- **hypothèse 3** : elle repose sur un examen approfondi des différentes étapes de la réaction de glycation décrite par Maillard. Comme explicité dans le paragraphe précédent, la glycation se décompose en deux étapes majeures, aboutissant respectivement à la formation d'une base de Schiff, qui correspondrait au signal Ins-gly P2 (réaction réversible, rapide) puis à un produit d'Amadori, qui correspondrait au signal Ins-gly P1 (réaction irréversible, lente).

Lors de l'essai de stabilité mené sur 24 h à 25°C, la réaction de glycation est initiée immédiatement après mise en présence de l'insuline et du glucose et augmente de manière exponentielle pendant les 6 premières heures d'incubation. Cette première phase correspondrait essentiellement à la formation de la base de Schiff. Elle atteint ensuite une phase de plateau, soit un pseudo état d'équilibre comparable à celui décrit par O'Harte *et al.* dans leurs travaux sur l'influence du temps d'incubation de l'insuline dans la solution de glucose [383]. Ce résultat pourrait s'expliquer par la différence importante des constantes cinétiques des réactions de formation de la base de Schiff et du produit d'Amadori. La glycation de l'hémoglobine a été étudiée et a permis de définir les niveaux de ces constantes. La formation des bases de Schiff obéit à une constante  $k_1 \approx 0,7 \cdot 10^{-3} \text{ mM}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  tandis que la constante de réarrangement en produits d'Amadori est  $k_2 \approx 0,0055 \text{ h}^{-1}$  [393]. Ces hypothèses sont confirmées par les résultats des essais menés à 40°C pour un temps long : si le temps de contact de 2 h est amené à 7 jours, le signal Ins-gly P2 identifié comme caractéristique de la base de Schiff reste constant alors que le signal Ins-gly P1 correspondant au produit d'Amadori augmente fortement (facteur 3). D'un point de vue chromatographique la séparation des deux composés formés (base de Schiff et produit d'Amadori) pourrait s'expliquer par une différence de conformation des deux formes des insulines glyquées due à la présence d'une double liaison N=C dans la base de Schiff.

Par ailleurs, dans nos travaux, l'application de conditions acides via le diluant pourrait avoir pour conséquence de déstabiliser la base de Schiff très réactive présente dans le milieu nutritif et de favoriser la réversibilité de la réaction de glycation, tandis qu'elle n'aurait aucun effet sur les produits d'Amadori déjà formés et stables en milieu acide [385]. Ceci expliquerait qu'en milieu acide on observe (1) une diminution du signal Ins-gly P2, qui correspondrait donc à la

base de Schiff, (2) une stabilité du signal Ins-gly P1, qui correspondrait quant à lui au produit d'Amadori et (3) l'augmentation du signal de l'insuline native jusqu'à atteindre une concentration proche de la concentration initiale en insuline.

Néanmoins, comment expliquer que dans la bibliographie, une seule espèce monoglyquée soit mise en évidence? Quelques études ont été menées en conditions non réductrices sur des périodes d'incubation longues (30 jours) [384,385,388,389]. Après incubation en milieu neutre, l'addition systématique d'acide a probablement conduit à la transformation de la base de Schiff formée en insuline native. Seule l'amine secondaire formée a dans ce cas été isolée. La majorité des travaux publiés, utilisent des conditions réductrices: l'ajout de cyanoborohydrate de sodium dans le milieu réactionnel permet de réduire rapidement la base de Schiff (une aldimine), en amine secondaire (Figure 52) [393,394], déplaçant ainsi la réaction de glycation de l'insuline vers la formation de la base de Schiff puis de l'amine secondaire ce qui explique des temps d'incubation de 24 à 48 h dans ces travaux. L'ajout d'acide en fin de réaction permet alors de décomplexer les complexes borés et d'éliminer la base de Schiff résiduelle et ainsi d'isoler l'amine secondaire formée.

Il s'agit ici de l'hypothèse qui nous semble la plus probable.

Afin de vérifier ou réfuter ces différentes hypothèses, il est envisagé d'isoler les composés Ins-gly P1 et Ins-gly P2 par chromatographie semi préparative en milieu non acide. Ensuite, ces insulines monoglyquées seront soumises à une dégradation enzymatique (par trypsine ou endoprotéinase Glu C), puis l'analyse par HPLC-MS/MS permettra de caractériser les sites de glycation [383,395].

## E. Discussion et perspectives

**Nous avons désormais la preuve que le phénomène responsable de la diminution de la teneur en insuline dans le milieu nutritif est une réaction de glycation de cette protéine.**

L'activité de l'insuline glyquée a déjà été étudiée *in vivo* chez des animaux diabétiques ou non, ainsi que chez l'homme. Ces études portant sur des insulines porcine, bovine ou encore humaine ont démontré que l'insuline glyquée conservait une activité hypoglycémiante mais environ 20 à 30% plus faible que celle de l'insuline native [379,382,390,392]. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cette diminution d'activité biologique : un défaut de reconnaissance de l'insuline glyquée par le récepteur dans le cas où la glycine en position 1 de la chaîne A (impliquée dans la reconnaissance du récepteur à l'insuline) serait glyquée [396]. En effet, la glycation pourrait affecter la densité de charge ou la structure tertiaire de l'insuline, modifiant ainsi la liaison à son récepteur. D'autre part, la glycation pourrait compromettre l'autophosphorylation du récepteur et la transduction du signal [382]. La structure quaternaire pourrait également être affectée puisque la lysine en position 29 de la chaîne B est impliquée dans la dimérisation des monomères d'insuline, tandis que la phénylalanine intervient dans l'assemblage de 3 dimères pour former un hexamère [397,398].

En considérant qu'il existe un état d'équilibre entre l'insuline glyquée et l'insuline native dans le milieu nutritif, il serait envisageable qu'après administration dans la circulation sanguine, l'insuline glyquée à l'état de base de Schiff reforme de l'insuline native ce qui restaurerait son activité hypoglycémiante. Dès lors, des essais *in vivo* chez l'animal sont nécessaires afin de conclure quant à la possibilité d'ajouter l'insuline dans les poches de NP ternaire.

## VI. Etude *in vivo* de l'activité hypoglycémiante de l'insuline après ajout dans un mélange de nutrition parentérale ternaire

### A. Introduction

Suite aux résultats des études *in vitro* et à l'identification du phénomène de glycation de l'insuline, une étude destinée à mettre en évidence le maintien ou la perte de l'activité hypoglycémiante de l'insuline semblait nécessaire. Par conséquent une étude *in vivo* a été menée chez l'animal.

Cela a nécessité dans un premier temps d'effectuer une recherche bibliographique afin de déterminer le modèle animal le plus adapté ainsi que les paramètres suivis et les modalités de la procédure d'expérimentation. Dans un second temps, la procédure expérimentale a été mise en œuvre selon cinq modalités qui seront détaillées dans le paragraphe matériels et méthodes.

Dès lors, **les objectifs étaient de vérifier si l'insuline conservait son activité hypoglycémiante et si cet effet variait en fonction du temps de contact avec le MNP au travers d'une procédure *in vivo* d'expérimentation animale.** L'hypothèse évaluée est que la glycémie et l'insulinémie diffèrent, si l'insuline est ajoutée extemporanément (potentiellement pas de dégradation) comparativement à l'insuline laissée en contact durant 12h avec le mélange nutritionnel ou encore en l'absence insuline humaine.

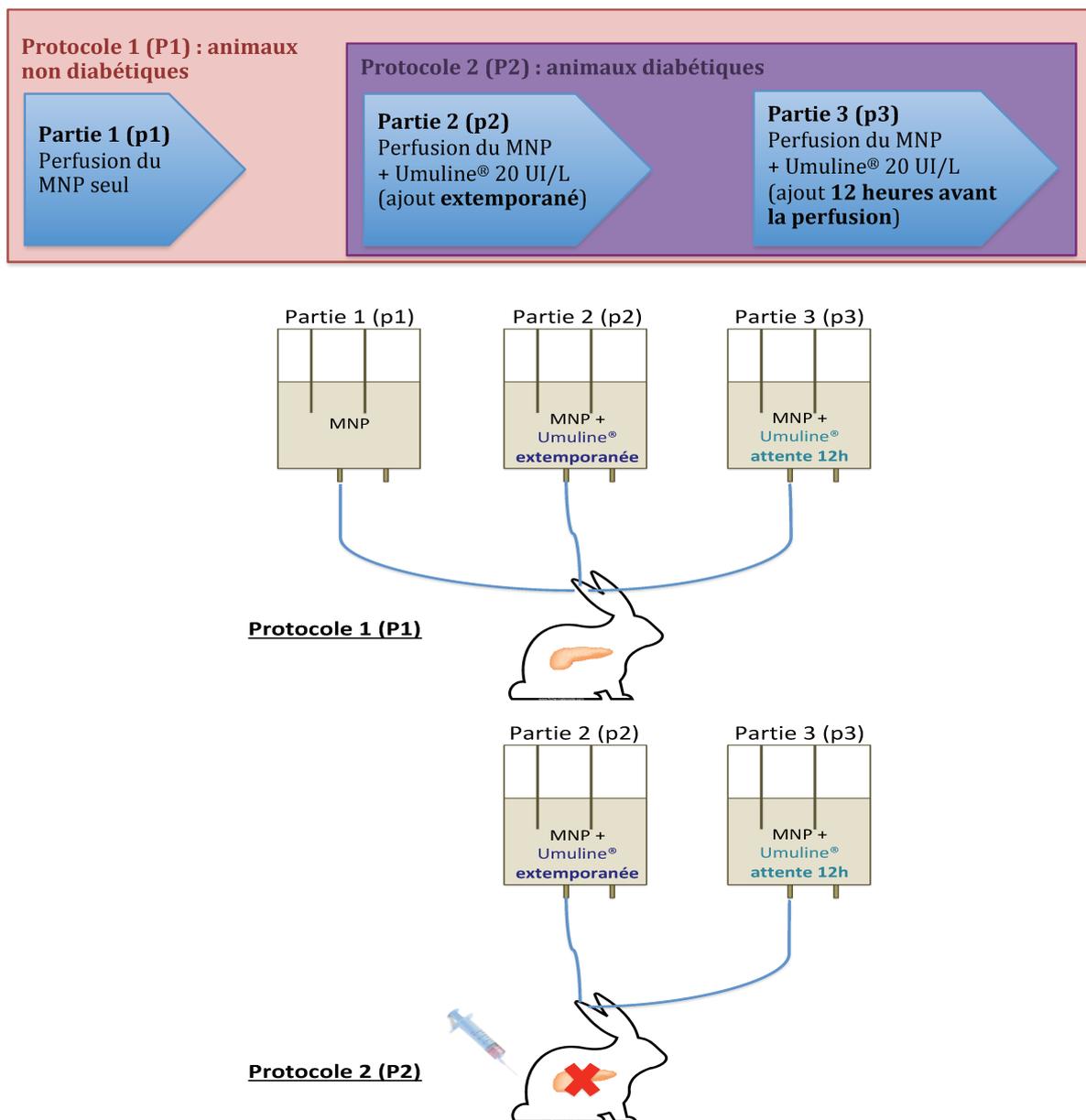
**Ces objectifs sont envisagés en s'appuyant sur un modèle animal original non décrit dans la littérature.**

## B. Matériels et méthodes

### 1. Procédure expérimentale

La procédure d'expérimentation animale ([Annexe D](#)) a reçu un avis favorable du comité d'éthique en expérimentation animale et a été approuvée par le Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche.

Elle se compose de 2 protocoles (nommés « P1 et P2 ») eux-mêmes découpés en parties (nommées « p ») ([Figure 54](#)).



**Figure 54 :** Description de la procédure d'expérimentation animale

Les facteurs variables sont :

- pour les protocoles P1 et P2, le caractère non diabétique (P1) ou diabétique (P2) de l'animal
- pour les parties p1 à p3, la nature du MNP administré
  - p1 : perfusion du MNP seul
  - p2 : perfusion du MNP + Umuline rapide® 20 UI/L **ajoutée extemporanément** (soit juste avant de débiter la perfusion) dans le MNP
  - p3 : perfusion du MNP + Umuline rapide® 20 UI/L **ajoutée 12 heures avant le début de la perfusion** dans le MNP

Les animaux sont utilisés dans un premier temps pour les 3 parties du protocole 1 (respectivement P1p1, P1p2 et P1p3). Ensuite le lapin est rendu diabétique par injection intraveineuse directe d'alloxan à 100 mg/kg. Le statut diabétique des animaux est défini par une glycémie à jeun > 200 mg/dL au moins 3 jours après l'injection d'alloxan.

En raison du diabète induit chez les animaux, le protocole P2 n'a comporté que les deux dernières parties (p2 et p3). En effet, l'apport de glucose sans apport d'insuline a provoqué des crises d'épilepsie chez deux animaux.

Les animaux sont soumis à l'ensemble des protocoles (en l'absence d'atteinte des points limites définis dans la procédure d'expérimentation animale).

Quel que soit le protocole, une solution d'héparine sodique à une concentration de 20 U/mL est régulièrement administrée sous la forme de bolus de faible volume (0,1 mL) entre les prélèvements afin d'éviter la thrombose du cathéter. Cette solution est administrée à l'aide d'une seringue de 10 mL et d'un prolongateur Lectrocath (Vygon, Ecouen, France) en polyéthylène, mesurant 50 cm de long.

La perfusion du MNP est faite à l'aide d'une pompe. L'administration peut être décrite en 3 phases successives :

- phase 1 croissante (de 0 à 15 minutes après l'initiation de la perfusion) : augmentation progressive du débit de perfusion de 0 à 40 mL/h,
- phase 2 en plateau (de 15 à 105 minutes) : perfusion à débit constant de 40 mL/h,

- phase 3 décroissante (de 105 à 120 minutes) : diminution progressive du débit de perfusion de 40 à 0 mL/h.

## 2. Mélange de nutrition parentérale et insuline

Quel que soit le protocole ou la partie, le MNP (correspondant au mélange nutritif de référence) est toujours préparé la veille (J-1) de l'administration (soit 12 heures avant). Pour le protocole 1 partie 1, ce MNP est administré sans ajout le lendemain matin. Pour les parties 2 (des protocoles 1 et 2), l'Umuline rapide® est ajoutée dans la poche à la concentration finale de 20 UI/L à J0, juste avant de débiter la perfusion (ajout « extemporané »). Pour les parties 3 (des protocoles 1 et 2), l'Umuline rapide® est ajoutée dans la poche à J-1 après reconstitution du MNP (soit 12 heures avant l'administration à l'animal : « perte » de 30% de l'activité hypoglycémiante).

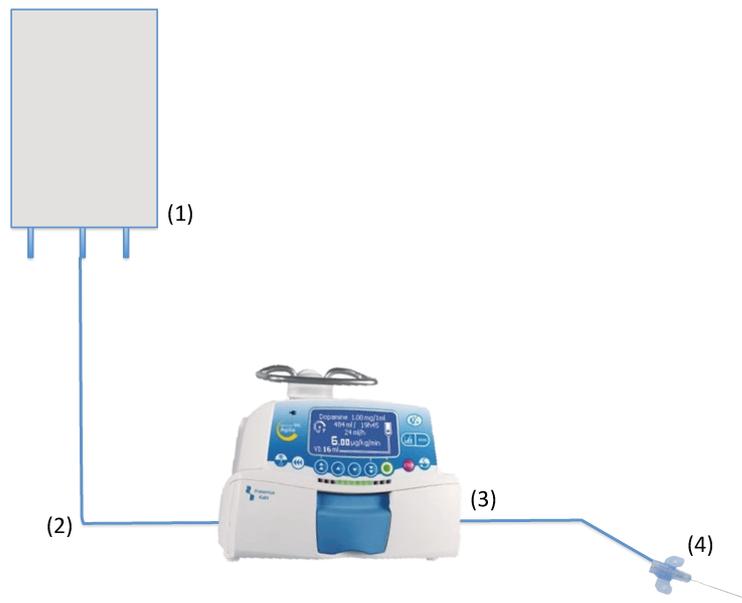
## 3. Animaux

Des lapins mâles albinos néozélandais d'environ 4 kg sont choisis comme modèle animal. Ces lapins sont mis à jeun 12 heures avant le début de la perfusion.

## 4. Montage de perfusion

Le recours à l'application d'une crème anesthésique locale 1 heure avant la pose du cathéter permet de limiter la douleur chez l'animal. Un cathéter en téflon (polytetrafluoroéthylène, PTFE) de 24G (Intraflon 2, Vygon) est positionné dans la veine marginale de chaque oreille (1 oreille pour procéder à l'administration du mélange de NP, l'autre oreille pour effectuer les prélèvements).

L'administration du MNP est faite selon un schéma continu sur une durée de 2 heures. Le débit est régulé à l'aide d'une pompe nutrition Agilia (Fresenius), à 40 mL/h à la phase de plateau. La poche de NP est percutée avec une tubulure volumat Agilia VLST00 pour nutrition parentérale (Fresenius) ([Annexe B](#)), connectée à l'un des deux cathéters ([Figure 55](#)).



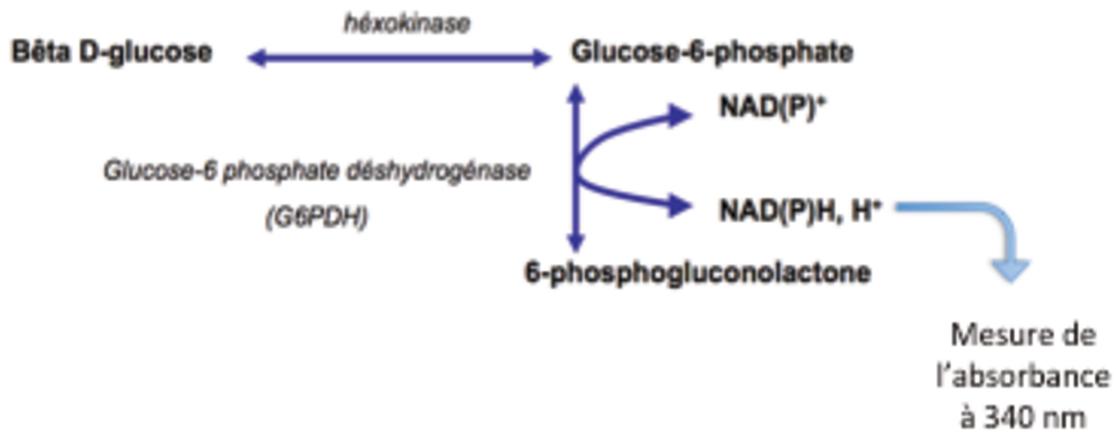
**Figure 55** : Montage de perfusion pour l'administration du MNP dans les essais chez l'animal  
 (1) Poche contenant le MNP (2) Tubulure PVC/silicone (3) Pompe d'administration (4) Cathéter

## 5. Paramètres évalués au cours de la procédure

Ayant pour objectif d'évaluer l'activité hypoglycémisante de l'insuline humaine, les paramètres suivis au cours de la procédure sont la glycémie et l'insulinémie. Les mesures sont réalisées à partir du plasma sanguin.

### *a. Dosage de la glycémie*

Afin de veiller au bon déroulement de chaque protocole, la glycémie est directement mesurée à l'aide d'un lecteur de glycémie (Contour next, Ascensia Bayer). Une goutte de sang prélevée en sortie du cathéter est déposée sur une bandelette positionnée dans le lecteur. La glycémie est dans ce cas mesurée par la technique utilisant comme enzyme la glucose déshydrogénase. Afin de permettre une mesure plus fidèle de la glycémie, les échantillons sanguins prélevés ont été dosés par une méthode à l'hexokinase (Figure 56) au centre de biologie du CHU.



**Figure 56** : Principe du dosage de la glycémie selon la technique à l'hexokinase

### ***b. Dosage de l'insulinémie***

Deux kits de dosages immunométriques sont employés dans ces essais. Le kit d'IECL précédemment utilisé dans les études de stabilité *in vitro*, ainsi qu'un kit d'ImmunoRadioMetric Assay (IRMA). Ce kit Bi-Ins-IRMA (CisBio, Saclay, France), dans lequel l'anticorps secondaire anti-insuline est marqué à l'iode 125. La radioactivité (exprimée en coups par minute) est mesurée à l'aide d'un scintillateur gamma qui convertit à l'aide du logiciel FiaCalc®, le signal détecté en concentration (en  $\mu\text{UI/mL}$ ) à l'aide d'une courbe d'étalonnage dont l'équation suit une fonction *spline*.

#### **i. Essais préliminaires**

Dans le protocole 1, les lapins n'étant pas diabétiques, ils sécrètent leur propre insuline endogène lors de l'administration du MNP. Dès lors il a été nécessaire de mener dans un premier temps des essais préliminaires afin de définir la meilleure méthode (IRMA ou IECL) pour doser l'insulinémie humaine d'une part et lagomorphe d'autre part. Ces essais ont été menés chez deux lapins selon :

- ❖ 2 types d'administrations : bolus (injection 5 mL en 5 minutes) et pompe (débit d'administration 45 mL/h avec montée et descente progressives sur 15 minutes, durée totale de perfusion 3 heures et 30 minutes soit 145 mL administrés au total).
- ❖ 2 conditions de produit : injection de NP seule ou NP + Umuline rapide® (ajout extemporané ou attente de 1h à 6h).

Les différentes combinaisons type d'administration/produit sont décrites dans le Tableau XXV.

**Tableau XXV** : Descriptif des conditions testées lors des essais préliminaires d'expérimentation animale

Modalités d'administration	Mélange administré	
	NP seule	NP + Umuline 20 UI/L
Bolus	x	x
Pompe	x	

ii. Dosage de l'insulinémie pour la procédure

Suite aux résultats des essais préliminaires et considérant que les 2 kits immunométriques sont validés dans le milieu plasmatique pour la quantification de l'insuline humaine, il semble possible de considérer que l'insulinémie de lapin peut être calculée par la différence de valeur d'insulinémie IRMA – insulinémie IECL.

- Dans le protocole 1, l'insulinémie est dosée avec les 2 méthodes (IRMA et IECL). L'insulinémie de lapin est par conséquent calculée tel que décrit juste avant.
- Dans le protocole 2, étant donné que les lapins sont diabétiques, la sécrétion endogène d'insuline est négligeable. Par conséquent, il est suffisant de doser la concentration en insuline humaine dans le sang de lapin avec le kit IECL.

## 6. Prélèvements et traitement pré-analytique

Les prélèvements sont récupérés dans des tubes héparinés pédiatriques (5 mL) à l'aide d'un système vacutainer (corps de pompe + adaptateur stérile). Ils sont réalisés aux temps suivants : t0 (à jeun, avant le début de la perfusion), 5 minutes, 10 minutes, 15

minutes puis toutes les 10 minutes jusqu'à la phase de décroissance du débit où les prélèvements sont faits toutes les 5 minutes. Après prélèvement, les échantillons sont maintenus à température ambiante pendant maximum 30 minutes. Ils sont ensuite centrifugés à 1500 rpm pendant 15 minutes à +4°C. Le plasma est ensuite prélevé à l'aide d'une micropipette puis réparti en 3 aliquots distincts. Deux aliquots de 150µL et 300µL destinés à la quantification de l'insulinémie par IRMA et IECL respectivement. Le dernier aliquot de 120µL utilisé pour la mesure de la glycémie par hexokinase. La glycémie et l'insulinémie par IECL sont mesurées dans les 4 heures suivant l'aliquotage. En raison d'un temps d'incubation de 2 heures, le dosage par IRMA nécessite un temps de réalisation plus important. Les aliquots destinés à ce dosage sont congelés à -20°C pour une lecture en série dans le mois suivant.

## 7. Exploitation des résultats

Dans un premier temps, les graphiques de l'évolution de la glycémie et des insulinémies lagomorphe et humaine en fonction du temps sont analysés.

Dans un second temps, à l'aide de la fonction « Solver » du logiciel Excel®, on procède à une estimation de l'insulinémie en minimisant les résidus afin de déterminer les facteurs de l'équation relative à l'évolution de l'insulinémie en fonction de la glycémie :

- la concentration maximale de sécrétion de l'insuline de lapin (nommée  $C_m$ )
- la glycémie permettant d'obtenir 50% de la concentration maximale de sécrétion d'insuline de lapin (nommée  $Gly_{50}$ )

Etant donné le faible nombre de lapins ayant été inclus dans les essais, les tests statistiques appliqués sont non paramétriques. Les tests de Mann et Whitney permettent d'analyser au risque  $\alpha = 10\%$ , la différence  $D$  entre les  $C_m$  ou  $Gly_{50}$  des différentes parties 1, 2 et 3 au sein du protocole 1.

Pour ce qui est du protocole 2, les comparaisons portent sur la hausse de glycémie.

## C. Résultats

### 1. Résultats des essais préliminaires

Ces essais préliminaires dont les résultats sont présentés dans le [Tableau XXVI](#), ont permis d'établir les données suivantes sur la réactivité croisée des Ac contenus dans les kits immunométriques, avec l'insuline de lapin :

- IRMA : réactivité croisée de 100% avec l'insuline lagomorphe
- IECL : réactivité très faible (de l'ordre de 10%) avec l'insuline de lapin

Bien que la réactivité croisée des deux kits avec l'insuline de lapin ne puisse pas être quantifiée en valeur absolue (en raison de l'absence d'insuline de lapin commercialisée), il est néanmoins possible d'émettre une réactivité croisée relative entre les 2 kits testés. Lors des deux types d'administration (bolus (a) ou par pompe (b)), le kit d'IECL a montré une réactivité croisée plus faible d'un facteur 10 environ, en comparaison avec le kit d'IRMA.

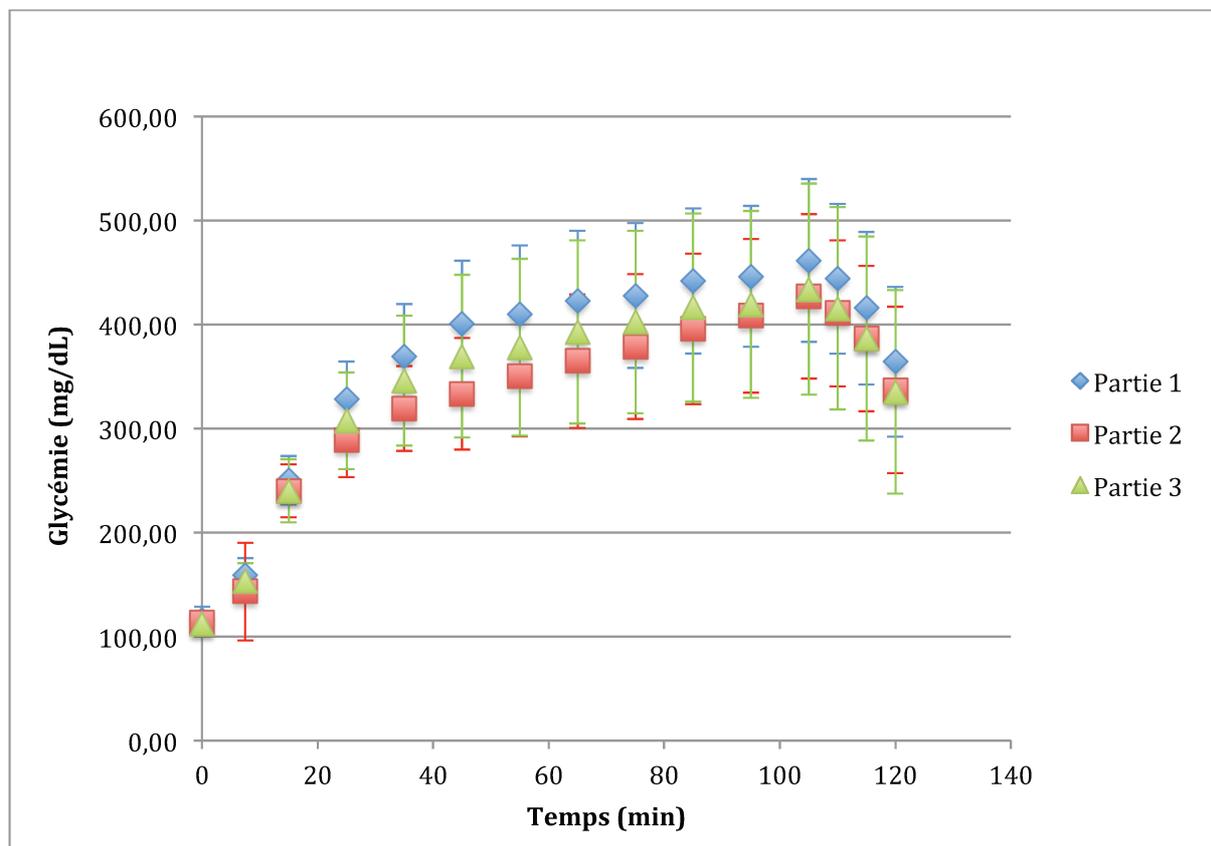
**Tableau XXVI** : Valeurs d'insulinémie de lapin obtenues dans 2 conditions d'administration du MNP, selon le kit de dosage employé (IRMA ou IECL) et calcul de la réactivité croisée de l'insuline de lapin

	Temps (minutes)	IRMA	IECL	Ratio IRMA/IECL (%)
Perfusion	0	20,69	1,75	11,82
	15	201,66	15,02	13,43
	22	302,90	22,99	13,18
	38	46,84	5,22	8,97
	60	354,09	30,41	11,64
	90	308,39	25,90	11,91
	120	351,98	28,76	12,24
	180	308,85	27,63	11,18
	240	345,71	31,70	10,91
	260	167,22	14,98	11,16
	270	67,65	6,17	10,96
Bolus 1	0	3,20	0,32	10,01
	15	19,07	1,78	10,69
	45	5,72	0,45	12,71
	75	6,07	0,80	7,59
Bolus 2	0	2,04	0,20	10,19
	5	74,03	7,14	10,37
	10	32,10	2,89	11,11
	15	17,65	1,22	14,47
	20	13,05	0,96	13,59
<b>Moyenne (%)</b>				<b>11,41</b>
<b>Ecart-type (%)</b>				<b>1,63</b>

## 2. Protocole 1

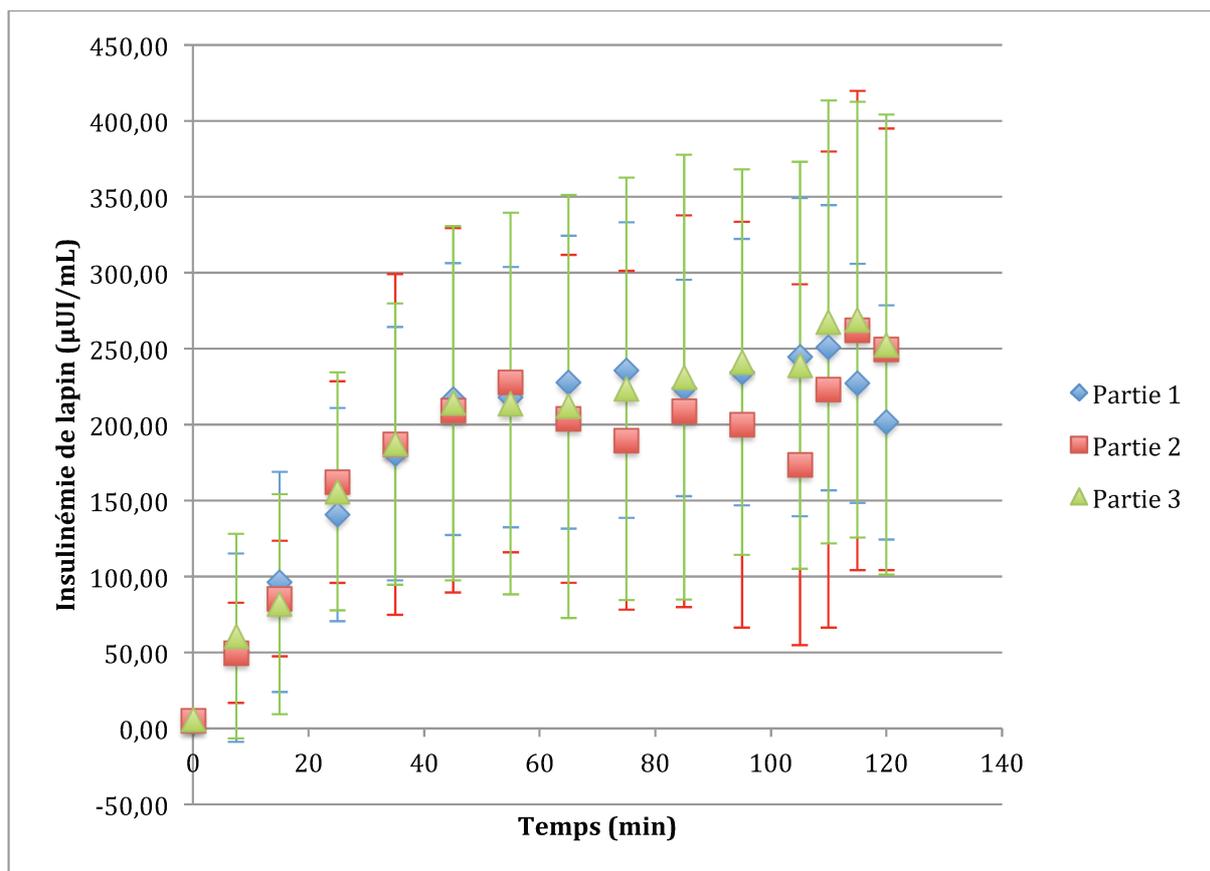
### a. Représentation graphique

La Figure 57 illustre la relation glycémie = f (temps) observée au cours du protocole 1.



**Figure 57** : Cinétique d'évolution de la glycémie (dosage par la méthode à l'hexokinase) au cours de la perfusion dans le protocole 1

Cette évolution présente une allure sigmoïde. Il en est de même pour la représentation de l'insulinémie de lapin en fonction du temps (Figure 58).



**Figure 58 :** Cinétique d'évolution de l'insulinémie de lapin calculée selon la formule (insulinémie IRMA – insulinémie IECL) au cours de la perfusion dans le protocole 1

### ***b. Simulation de la relation entre insulinémie et glycémie***

Les nombres de lapins pris en compte étaient respectivement de 12, 11 et 12 pour les parties 1, 2 et 3 du protocole 1.

Dès lors, l'application du solveur a permis de simuler l'évolution de l'insulinémie en fonction de la glycémie en minimisant les résidus selon la formule d'une courbe sigmoïde soit l'équation suivante :

$$\text{Insulinémie} = \frac{Cm \times G^\gamma}{Gly_{50}^\gamma + G^\gamma}$$

Où G représente la glycémie, Cm la concentration maximale de lapin et Gly<sub>50</sub> la glycémie nécessaire à l'obtention de 50% de Cm.

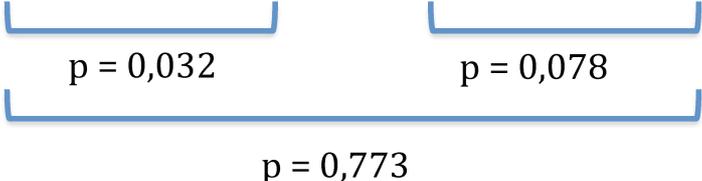
i. Comparaison des Cm

Le test statistique de Mann et Whitney a été appliqué en unilatéral au risque alpha de 10%. Les hypothèses testées sont donc  $H_0 : D = 0$  et  $H_1 : D < 0$  avec D représentant la différence entre les valeurs de Cm.

Les résultats de ces tests sont détaillés dans le [Tableau XXVII](#).

**Tableau XXVII** : Résultats des tests statistiques de comparaison des concentrations maximales en insuline de lapin par un test de Mann et Whitney au risque  $\alpha = 10\%$

Cm1	Cm2	Cm3
7036,3 ± 4890,7	10223,5 ± 3187,6	7537,5 ± 3414,2

  
p = 0,032      p = 0,078  
p = 0,773

La concentration maximale de la partie 2 est plus faible que celle obtenue dans les parties 1 et 3. Les concentrations maximales obtenues en partie 1 et 3 ne sont pas statistiquement différentes.

ii. Comparaison des Gly<sub>50</sub>

Le test statistique de Mann et Whitney a été appliqué dans le but de comparer les Gly<sub>50</sub> entre les 3 parties du protocole 1. Les niveaux de significativité obtenus sont décrits dans le [Tableau XXVIII](#).

La comparaison entre Gly<sub>50</sub>1 et Gly<sub>50</sub>2 est la seule pour laquelle une différence significative est retrouvée au risque alpha de 10%.

**Tableau XXVIII** : Comparaison des Gly<sub>50</sub> selon le test de Mann et Whitney au risque  $\alpha = 10\%$

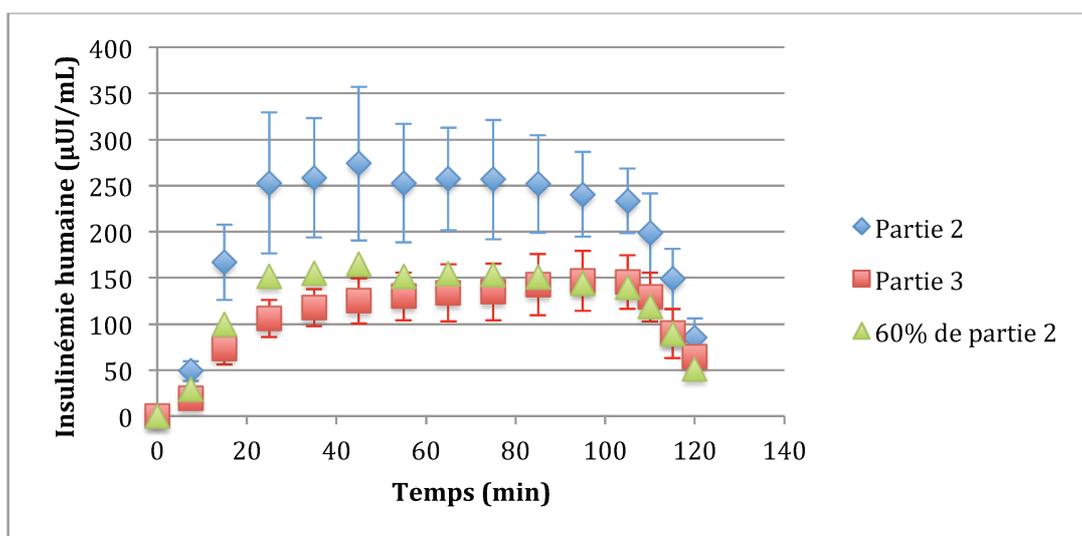
Gly <sub>50</sub> 1	Gly <sub>50</sub> 2	Gly <sub>50</sub> 3
185229,3 ± 383079,4	49599,7 ± 98776,3	238551,9 ± 407401,2

$p = 0,032$        $p = 0,146$   
 $p = 0,308$

### 3. Protocole 2

Plusieurs lapins sont décédés lors de l'induction du diabète suite à des comas hypoglycémiques causés par la libération brutale de l'insuline stockée dans les cellules pancréatiques lors de leur destruction par l'alloxan. Par ailleurs, deux lapins n'ont pas été déclarés diabétiques car leur glycémie à jeun n'était pas supérieure à 200 mg/dL.

La Figure 59 représente l'évolution de la concentration en insuline humaine dosée par IECL ainsi que la concentration calculée correspondant à 60% de l'insulinémie de la partie 2 dans le temps.



**Figure 59** : Quantification de l'insuline humaine par IECL pour les parties 2 et 3 du protocole 2. Représentation de la concentration calculée correspondant à 60% de l'insulinémie humaine de la partie 2.

La médiane de la hausse de glycémie des 4 lapins diabétiques ayant subi les parties 2 et 3 du protocole 2 est 27% plus faible pour la partie 2 que pour la partie 3. Au vu du faible nombre de lapins, aucun test statistique n'a été effectué sur ces résultats.

## D. Discussion

Historiquement évaluée par l'essai de convulsion chez la souris ou par l'effet hypoglycémiant chez le rat [399], la mesure de la bioactivité de l'insuline est aujourd'hui décrite dans la monographie 121 « insulin assays » de la Pharmacopée Américaine [400] ou dans la monographie « analyse statistique des résultats des dosages et essais biologiques » de la Pharmacopée Européenne [401], par injection d'insuline sous-cutanée à des lapins. La difficulté du modèle est de reproduire la situation clinique rencontrée dans les services hospitaliers. Nous avons donc adapté le modèle à ces contraintes en mettant en évidence des avantages et des inconvénients, tout en utilisant les données obtenues dans les études précédentes. L'une des conditions indispensables dans le choix du modèle animal résidait dans le fait que l'animal devait être en capacité de recevoir une perfusion de MNP. Par conséquent, les modèles de petits rongeurs étaient écartés d'office.

Lorsqu'il s'agit de nutrition parentérale, les macro- et micronutriments administrés sont identiques chez le lapin et chez l'homme [402], ce qui a permis d'envisager ce modèle. De plus, le lapin possède une veine marginale facilement accessible tant pour l'administration que pour les prélèvements. L'une des limites qu'il fallait envisager était la tolérance de cette voie veineuse périphérique. En effet, le MNP employé dans notre étude présente une osmolarité élevée (environ 1360 mOsm/L), rendant indispensable une administration par voie veineuse centrale. Cependant il était difficile d'envisager cette option car cela aurait nécessité de recourir à un acte chirurgical de pose de cathéter veineux central. Or le principal risque lié à l'administration d'une émulsion hyperosmolaire (osmolalité > 820 mOsm/kg) dans la veine marginale de l'oreille de lapin était l'apparition d'une phlébite [403]. Cela était à prendre en considération d'autant que notre procédure d'expérimentation animale prévoit des administrations répétées. La valeur seuil d'osmolalité recommandée est aussi liée au temps de perfusion, ce qui nous a encouragés à choisir le débit d'administration maximal cliniquement

tolérable de 40 mL/h. L'avantage du MNP ternaire réside dans le fait que la présence de lipides semblerait être un paramètre protecteur vis à vis des dommages causés au niveau des cellules endothéliales [404].

Sachant que les lapins ont un volume sanguin moyen estimé de 57 mL/kg, (soit des valeurs comprises entre 180 et 250 mL pour nos lapins), il a été nécessaire de limiter la durée de perfusion à 2 heures, soit environ 80 mL de MNP perfusé, afin d'éviter toute surcharge volumique susceptible de provoquer un œdème pulmonaire ou une défaillance cardio-circulatoire.

Le gold standard lorsqu'il s'agit d'évaluer la sensibilité à l'insuline consiste en la réalisation d'un clamp euglycémique hyperinsulinique [405–407]. De nombreuses études basées sur cette technique ont été menées chez le lapin albinos néozélandais [334,408,409]. Cette technique repose sur la perfusion d'insuline exogène à débit constant, entraînant ainsi une hyperinsulinémie. La glycémie est clampée à sa valeur mesurée à jeun grâce à la perfusion de glucose exogène. Lorsque l'équilibre est atteint, la production de glucose endogène est inhibée et tout le glucose perfusé est assimilé. Le débit de perfusion de glucose correspond par conséquent à la sensibilité tissulaire à l'insuline. L'étude que nous avons menée aurait pu être désignée selon une procédure inspirée de cette technique du clamp euglycémique. Le principe aurait été de suivre le débit de la solution de MNP nécessaire à maintenir une euglycémie. Cependant dans notre cas, cela était complexe car la variation du débit d'insuline aurait inévitablement provoqué une variation de l'apport de glucose puisque ce dernier est contenu dans le MNP. De plus, il aurait été nécessaire d'envisager une administration annexe d'une solution de glucose. Sachant que les 2 veines marginales des oreilles étaient déjà mobilisées, une perfusion par voie intrapéritonéale aurait du être envisagée, ce qui aurait été quelque peu inconfortable pour les lapins, déjà immobilisés dans une boîte de contention. Le stress inhérent à cette situation aurait été susceptible de biaiser les résultats de cette étude.

Dans les études portant sur la bioactivité, la glycémie et l'insulinémie sont mesurées à de nombreuses reprises après l'administration d'un bolus ou d'une perfusion d'insuline [399,410,411] afin de calculer l'aire sous la courbe de ces deux paramètres. Une étude *in vivo* de l'activité de l'insuline glyquée a été menée en calculant l'aire sous la courbe de la

glycémie après administration d'insuline glycosylée *versus* insuline native. C'est en ce sens que la procédure a été rédigée.

Les hormones contenues dans des échantillons de sang total sont sujettes à protéolyse [357]. Les échantillons sanguins ont été prélevés dans des tubes avec héparinate de lithium afin de récupérer le plasma pour les dosages de glycémie et d'insulinémie. La principale difficulté déjà largement décrite dans la littérature réside dans le risque de sous-estimation de l'insulinémie lors d'un dosage par immunoanalyse en cas d'hémolyse [412]. En effet, la destruction des globules rouges entraîne la libération d'une insulinasé, enzyme responsable de la dégradation de l'insuline présente dans le prélèvement. De manière assez logique, la dégradation d'insuline est proportionnelle à l'intensité de l'hémolyse [413]. Ce phénomène d'hémolyse est plus courant lorsque que le prélèvement est effectué avec un cathéter court [414] (ce qui est le cas dans notre procédure), cependant il n'était pas possible de prélever les échantillons sanguins avec une aiguille au risque de blesser le lapin lors de son maintien en place. Dans le but de limiter la dégradation de l'insuline, le plasma a été conservé à +4°C dès que possible. L'une des solutions décrites pour limiter l'action de l'insulinasé consiste à ajouter dans les échantillons des adjuvants tels que l'acide p-chloromercuriphenyl sulfonique [415] mais les manipulations pré analytiques étant déjà chronophages, nous avons décidé de ne pas avoir recours à ce type d'ajout.

Afin de savoir quel kit immunométrique employer au cours de la procédure et considérant que les animaux pouvaient sécréter de l'insuline endogène en plus de l'insuline exogène qui était administrée via le MNP, il était indispensable d'évaluer la réactivité croisée des anticorps des 2 kits de dosage (IRMA et IECL). L'évaluation menée au cours des essais préliminaires a été précédée par une estimation reposant sur les différences de structure protéique entre l'insuline de lapin et l'insuline humaine, mises en regard des épitopes reconnus par les couples d'anticorps des kits immunométriques. La paire d'anticorps du kit Elecsys (IECL) ne présente qu'une très faible réactivité croisée avec l'insuline de lapin, ce qui était prévisible compte tenu des différences dans les formules des insuline humaine et lagomorphe et des épitopes reconnus par les anticorps du kit d'IECL ([Annexe E](#)). A l'inverse, une réactivité croisée importante du kit d'IRMA avec l'insuline de lapin pouvait être prédite en se basant sur les données

disponibles pour l'insuline porcine (différence avec l'insuline humaine d'un acide aminé en position 30 de la chaîne B, tout comme pour l'insuline de lapin, conférant une réactivité croisée de 100%). Etant donné la grande différence de réactivité croisée avec l'insuline lagomorphe, il a été possible de déduire l'insulinémie de lapin par le calcul de la différence d'insulinémie mesurée par IRMA – IECL dans les parties du protocole 1.

Afin de s'affranchir de la sécrétion endogène d'insuline, la seconde partie de la procédure a été menée après avoir induit un diabète chez les animaux. Plusieurs molécules sont connues pour détruire les cellules pancréatiques après administration parentérale (intraveineuse ou intrapéritonéale) : la streptozotocine et l'alloxan [416].

Les posologies retrouvées dans la littérature sont quelque peu variables :

- streptozotocine 30 à 50 mg/kg en IV
- alloxan 100-200 mg/kg en IP [417] ou 70 [418] à 150 mg/kg dans du NaCl 0,9% [419] en IV

C'est l'alloxan, dont le mécanisme d'action est connu qui a été choisi. Son produit de réduction (l'acide dialurique) induit un cycle redox entraînant la formation de radicaux superoxyde. L'action de ces derniers, associée à une augmentation de la concentration intracytosolique en calcium provoque la destruction rapide des cellules bêta des îlots de Langerhans [416].

Au début des essais, la dose de 150 mg/kg a été administrée pour être revue à la baisse (100 mg/kg) suite au décès d'animaux par relargage aigu d'insuline.

Seuls les lapins considérés comme diabétiques (ayant une glycémie à jeun > 200 mg/dL au moins 2 jours après l'injection [417]) ont été inclus dans le protocole 2. La glycémie seuil définissant le diabète peut parfois être plus élevée (> 300 mg/dL à 3 jours et 3 semaines après l'injection [419]).

L'une des solutions qui aurait pu être envisagée pour inhiber la sécrétion d'insuline endogène consisterait en la perfusion de somatostatine [411].

Dans le protocole 2, on retrouve une différence notable entre l'insulinémie humaine de la partie 2 et celle de la partie 3. Sachant qu'après 12 heures d'attente on retrouve une

diminution d'environ 40% de la teneur en insuline humaine dans le MNP, nous avons calculé l'insulinémie équivalente à 60% de celle quantifiée par IECL dans la partie 2. Cette estimation est superposable à la cinétique d'insulinémie de la partie 2. Cela nous permet de conclure que la diminution de la teneur en insuline observée *in vitro* est retrouvée *in vivo*. La glycation perdure donc après administration dans le compartiment sanguin.

Si l'on s'intéresse aux résultats du protocole 1, la comparaison des  $C_m$  orienterait vers une bioactivité significativement plus importante de l'insuline lorsqu'elle est ajoutée extemporanément que dans les autres conditions. La comparaison entre les parties 1 et 3 ne retrouve pas de différence statistiquement significative sur la concentration maximale en insuline de lapin sécrétée. Ceci permettrait de conclure quant à une perte d'activité hypoglycémiant de l'insuline lors de la glycation *in vitro* dans la poche contenant le MNP.

En revanche, la comparaison des  $Gly_{50}$  n'est pas cohérente avec l'hypothèse que nous venons d'avancer puisqu'aucune différence significative n'est retrouvée entre les parties 2 et 3.

L'une des possibilités à envisager serait que la quantité d'insuline administrée au cours de la perfusion (soit 1,6 UI d'insuline humaine) serait insuffisante pour permettre de compenser les 11,2 g de glucose apportés par le MNP sur la même durée de perfusion. Une étude d'activité de l'insuline menée chez l'homme suivait pourtant les mêmes quantités [411]: 0,8 UI/h d'insuline pour 5g/h de glucose (apporté à partir d'une solution de glucose 20%). L'hypothèse permettant d'expliquer l'absence d'efficacité de l'insuline chez le lapin réside dans la différence de volume de distribution qui existe entre l'homme (ayant un compartiment sanguin de 6 à 8 litres) et le lapin (environ 200 mL), entraînant ainsi une glycémie plus élevée chez l'animal.

Afin de se rapprocher de la méthodologie des monographies et des travaux de la littérature, il serait envisageable de réitérer ces essais en procédant à une administration des MNP  $\pm$  insuline sous la forme de bolus avec un suivi glycémique rapproché, permettant de limiter le volume perfusé aux lapins (et donc d'améliorer leur

tolérance à la procédure). Le dosage de la glycémie permettrait le calcul de l'aire sous la courbe qui serait comparé en fonction du MNP administré.

Comme nous l'avons constaté, ce modèle d'expérimental *in vivo* tente de reproduire une situation clinique. Théoriquement le fait d'utiliser un modèle animal permet de limiter les variabilités interindividuelles des réponses physiologique et pharmacologique. Cependant, force est de constater que cette variabilité est toujours significative entre les lapins. Ainsi, on comprend aisément les difficultés rencontrées lors des études sur l'espèce humaine où la population est plus hétérogène.

## Conclusions et perspectives

---

Cette étude de stabilité a été menée afin de définir les conséquences de l'administration conjointe de l'insuline humaine et des mélanges de nutrition parentérale ternaire. Une revue de la littérature a permis d'identifier les limites des études *in vitro* et *in vivo* déjà publiées à ce sujet, soulignant le besoin de réalisation d'une étude de stabilité portant à la fois sur la stabilité du mélange de nutrition parentérale mais également de l'insuline humaine lorsque ces deux médicaments sont mis en contact.

L'étude de stabilité physique de l'émulsion a démontré la stabilité du mélange ternaire sur une durée de 7 jours après ajout de l'insuline. Cette étude devra cependant être complétée par la mesure du potentiel zêta et le versant chimique de la stabilité devra être exploré.

L'étude de stabilité de l'insuline humaine, menée avec une technique immunométrique permettant la quantification de l'insuline sans étape d'extraction préalable à l'analyse, a mis en évidence une diminution de la teneur en insuline de l'ordre de 30% sur 24 heures. Cette diminution suivait une cinétique en 2 étapes : une diminution marquée dans les 6 premières heures, suivie d'une phase en plateau.

Cette étude a été complétée par l'identification des facteurs influençant la stabilité de l'insuline. La teneur en glucose, le niveau de pH et le temps sont les 3 facteurs en interaction, qui impacte le plus cette stabilité. La teneur en acides aminés joue également un rôle. Ces facteurs expliquent en association 67% environ de la diminution de la teneur en insuline dans le MNP ternaire.

Ensuite, une méthode par HPLC-MS/MS a été validée afin de mener l'étude de stabilité de l'insuline dans un mélange binaire de NP. Cette étude a permis de mettre en évidence l'apparition d'insuline glyquée, suivant la diminution de l'insuline native. Cette étude a également permis de constater la réversibilité de la réaction de glycation en milieu acide, expliquant la stabilité de l'insuline dans la solution de glucose isolée d'une poche d'Olimel®. La rapidité du phénomène de glycation *in vitro* dans des conditions non

réductrices et sa réversibilité n'avaient jamais été démontrées jusqu'à présent. Ces travaux doivent être poursuivis afin d'identifier les 2 signaux d'insuline glyquée observés, le(s) site(s) de glycation de la protéine par clivage enzymatique. Une étude de stabilité portant sur différentes concentrations en insuline pourra également être réalisée.

Enfin, l'étude *in vivo* menée chez l'animal a permis de confirmer la persistance de la glycation de l'insuline dans le plasma et de confirmer une diminution de l'activité hypoglycémiant de l'insuline glyquée (déjà décrite dans la littérature). Cependant, la puissance statistique limitée par le faible nombre de lapins rend d'autres études d'expérimentation animale nécessaires avant de mener des essais cliniques chez l'Homme.

## Références bibliographiques

---

1. Haute Autorité de Santé - Évaluation diagnostique de la dénutrition protéino-énergétique des adultes hospitalisés [Internet]. [cité 28 févr 2019]. Disponible sur: [https://www.has-sante.fr/portail/jcms/c\\_432199/fr/evaluation-diagnostique-de-la-denutrition-proteino-energetique-des-adultes-hospitalises](https://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_432199/fr/evaluation-diagnostique-de-la-denutrition-proteino-energetique-des-adultes-hospitalises)
2. Farigon N, Miolanne M, Montel F, Dadet S, Slim K, Cano N, Boirie Y. Dénutrition du sujet obèse. *Nutr Clin Métabolisme*. 1 févr 2015;29(1):50-3.
3. Lahaye C, Gentes E, Farigon N, Miolanne M, Pouget M, Palmier C, Venant V, Bouteloup C, Boirie Y. Comment définir et diagnostiquer la dénutrition chez le sujet obèse ? *Nutr Clin Métabolisme*. 1 oct 2017;31(4):276-81.
4. nutritionDay worldwide [Internet]. [cité 1 mars 2019]. Disponible sur: <https://www.nutritionday.org/>
5. Payette H, Coulombe C, Boutier V, Gray-Donald K. Weight loss and mortality among free-living frail elders: a prospective study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. sept 1999;54(9):M440-445.
6. Potter JF, Schafer DF, Bohi RL. In-hospital mortality as a function of body mass index: an age-dependent variable. *J Gerontol*. mai 1988;43(3):M59-63.
7. Herrmann FR, Safran C, Levkoff SE, Minaker KL. Serum albumin level on admission as a predictor of death, length of stay, and readmission. *Arch Intern Med*. janv 1992;152(1):125-30.
8. Beau P. Épidémiologie de la dénutrition chez le malade hospitalisé. In: Cano N, Barnoud D, Schneider SM, Vasson M-P, Hasselmann M, Leverve X, éditeurs. *Traité de nutrition artificielle de l'adulte* [Internet]. Paris: Springer Paris; 2007 [cité 1 mars 2019]. p. 1093-102. Disponible sur: [https://doi.org/10.1007/978-2-287-33475-7\\_80](https://doi.org/10.1007/978-2-287-33475-7_80)
9. Quilliot D, Ronan T. *Traité de Nutrition Clinique* [Internet]. 4e édition. K'Noë; 2016 [cité 1 juin 2017]. Disponible sur: <http://sfnep.org/pratiques-cliniques-et-recommandations/ouvrages/achats-en-ligne/trait%C3%A9-de-nutrition-detail>
10. Gustafsson UO, Ljungqvist O. Perioperative nutritional management in digestive tract surgery. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. sept 2011;14(5):504-9.
11. Lew CCH, Yandell R, Fraser RJL, Chua AP, Chong MFF, Miller M. Association Between Malnutrition and Clinical Outcomes in the Intensive Care Unit: A Systematic Review [Formula: see text]. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. juill 2017;41(5):744-58.
12. Kisser U, Kufeldt J, Adderson-Kisser C, Becker S, Baumeister P, Reiter M, Harréus U, Thomas MN, Rittler P. Clinical impact of malnutrition on complication rate and length of stay in elective ENT patients: a prospective cohort study. *Eur Arch Oto-Rhino-Laryngol Off J Eur Fed Oto-Rhino-Laryngol Soc EUFOS Affil Ger Soc Oto-Rhino-Laryngol - Head Neck Surg*. août 2016;273(8):2231-7.
13. Felder S, Lechtenboehmer C, Bally M, Fehr R, Deiss M, Faessler L, Kutz A, Steiner D, Rast AC, Laukemann S, Kulkarni P, Stanga Z, Haubitz S, Huber A, Mueller B, Schuetz P. Association of nutritional risk and adverse medical outcomes across different medical inpatient populations. *Nutr Burbank Los Angel Cty Calif*. déc 2015;31(11-12):1385-93.
14. Funamizu N, Nakabayashi Y, Iida T, Kurihara K. Geriatric nutritional risk index predicts surgical site infection after pancreaticoduodenectomy. *Mol Clin Oncol*. sept 2018;9(3):274-8.
15. Braga M, Baccari P, Scaccabarozzi S, Fiacco E, Radaelli G, Gallus G, DiPalo S, DiCarlo V, Cristallo M. Prognostic role of preoperative nutritional and immunological assessment in the surgical patient. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. avr 1988;12(2):138-42.

16. Incalzi RA, Gemma A, Capparella O, Cipriani L, Landi F, Carbonin P. Energy intake and in-hospital starvation. A clinically relevant relationship. *Arch Intern Med.* 26 févr 1996;156(4):425-9.
17. Allard JP, Keller H, Jeejeebhoy KN, Laporte M, Duerksen DR, Gramlich L, Payette H, Bernier P, Vesnaver E, Davidson B, Teterina A, Lou W. Malnutrition at Hospital Admission-Contributors and Effect on Length of Stay: A Prospective Cohort Study From the Canadian Malnutrition Task Force. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2016;40(4):487-97.
18. Di Costanzo J. Influence de l'état nutritionnel préopératoire sur la morbidité postopératoire. *Ann Fr Anesth Réanimation.* 1 janv 1995;14:33-8.
19. Hill A, Nesterova E, Lomivorotov V, Efremov S, Goetzenich A, Benstoem C, Zamyatin M, Chourdakis M, Heyland D, Stoppe C. Current Evidence about Nutrition Support in Cardiac Surgery Patients—What Do We Know? *Nutrients* [Internet]. 11 mai 2018;10(5). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5986477/>
20. Jeejeebhoy KN, Keller H, Gramlich L, Allard JP, Laporte M, Duerksen DR, Payette H, Bernier P, Vesnaver E, Davidson B, Teterina A, Lou W. Nutritional assessment: comparison of clinical assessment and objective variables for the prediction of length of hospital stay and readmission. *Am J Clin Nutr.* mai 2015;101(5):956-65.
21. Cerantola Y, Grass F, Cristaudi A, Demartines N, Schäfer M, Hübner M. Perioperative Nutrition in Abdominal Surgery: Recommendations and Reality [Internet]. *Gastroenterology Research and Practice.* 2011 [cité 1 oct 2018]. Disponible sur: <https://www.hindawi.com/journals/grp/2011/739347/>
22. Thibault R, Francon D, Eloumou S, Piquet M-A. Évaluation de l'état nutritionnel péri-opératoire. *Nutr Clin Métabolisme.* 1 déc 2010;24(4):157-66.
23. Ostrowska J, Szostak-Węgierek D, Jeznach-Steinhagen A. Nutritional status in patients aged over 65 years and its influence on the quantity and type of complications occurring 3, 6 and 12 months after hospitalisation: a clinical prospective study. *J Hum Nutr Diet Off J Br Diet Assoc.* 29 juill 2018;
24. Bally MR, Blaser Yildirim PZ, Bounoure L, Gloy VL, Mueller B, Briel M, Schuetz P. Nutritional Support and Outcomes in Malnourished Medical Inpatients: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Intern Med.* janv 2016;176(1):43-53.
25. Cano-Torres EA, Simental-Mendía LE, Morales-Garza LA, Ramos-Delgado JM, Reyes-Gonzalez MM, Sánchez-Nava VM, Barragán-Berlanga A de J, Rangel-Rodríguez I, Guerrero-Romero F. Impact of Nutritional Intervention on Length of Hospital Stay and Mortality among Hospitalized Patients with Malnutrition: A Clinical Randomized Controlled Trial. *J Am Coll Nutr.* juin 2017;36(4):235-9.
26. Bourke CD, Berkley JA, Prendergast AJ. Immune Dysfunction as a Cause and Consequence of Malnutrition. *Trends Immunol.* juin 2016;37(6):386-98.
27. Hung K-Y, Chen Y-M, Wang C-C, Wang Y-H, Lin C-Y, Chang Y-T, Huang K-T, Lin M-C, Fang W-F. Insufficient Nutrition and Mortality Risk in Septic Patients Admitted to ICU with a Focus on Immune Dysfunction. *Nutrients.* 10 févr 2019;11(2).
28. Losada-Barragán M, Umaña-Pérez A, Cuervo-Escobar S, Berbert LR, Porrozzi R, Morgado FN, Mendes-da-Cruz DA, Savino W, Sánchez-Gómez M, Cuervo P. Erratum: Protein malnutrition promotes dysregulation of molecules involved in T cell migration in the thymus of mice infected with *Leishmania infantum*. *Sci Rep.* 25 2017;7:46809.
29. Savino W, Dardenne M. Nutritional imbalances and infections affect the thymus: consequences on T-cell-mediated immune responses. *Proc Nutr Soc.* nov 2010;69(4):636-43.
30. Prietl B, Treiber G, Pieber TR, Amrein K. Vitamin D and immune function.

Nutrients. 5 juill 2013;5(7):2502-21.

31. Wu D, Lewis ED, Pae M, Meydani SN. Nutritional Modulation of Immune Function: Analysis of Evidence, Mechanisms, and Clinical Relevance. *Front Immunol.* 2018;9:3160.
32. López Plaza B, Bermejo López LM. Nutrition and immune system disorders. *Nutr Hosp.* 15 2017;34(Suppl 4):68-71.
33. Tannou T, Koeberle S, Manckoundia P, Aubry R. Multifactorial immunodeficiency in frail elderly patients: Contributing factors and management. *Med Mal Infect.* 16 févr 2019;
34. Wilson JM. The evaluation of the worth of early disease detection. *J R Coll Gen Pract.* nov 1968;16 Suppl 2:48-57.
35. Jensen GL, Cederholm T, Correia MITD, Gonzalez MC, Fukushima R, Higashiguchi T, Baptista GA de, Barazzoni R, Blaauw R, Coats AJS, Crivelli A, Evans DC, Gramlich L, Fuchs-Tarlovsky V, Keller H, Llido L, Malone A, Mogensen KM, Morley JE, Muscaritoli M, Nyulasi I, Pirlich M, Pisprasert V, Schueren M de van der, Siltharm S, Singer P, Tappenden KA, Velasco N, Waitzberg DL, Yamwong P, Yu J, Compher C, Gossuin AV. GLIM Criteria for the Diagnosis of Malnutrition: A Consensus Report From the Global Clinical Nutrition Community. *J Parenter Enter Nutr.* 2019;43(1):32-40.
36. Poulia K-A, Klek S, Doundoulakis I, Bouras E, Karayiannis D, Baschali A, Passakiotou M, Chourdakis M. The two most popular malnutrition screening tools in the light of the new ESPEN consensus definition of the diagnostic criteria for malnutrition. *Clin Nutr Edinb Scotl.* 2017;36(4):1130-5.
37. Cederholm T, Bosaeus I, Barazzoni R, Bauer J, Van Gossuin A, Klek S, Muscaritoli M, Nyulasi I, Ockenga J, Schneider SM, de van der Schueren M a. E, Singer P. Diagnostic criteria for malnutrition - An ESPEN Consensus Statement. *Clin Nutr Edinb Scotl.* juin 2015;34(3):335-40.
38. Braga M, Ljungqvist O, Soeters P, Fearon K, Weimann A, Bozzetti F, ESPEN. ESPEN Guidelines on Parenteral Nutrition: surgery. *Clin Nutr Edinb Scotl.* août 2009;28(4):378-86.
39. Sowerbutts AM, Lal S, Sremanakova J, Clamp A, Todd C, Jayson GC, Teubner A, Raftery A-M, Sutton EJ, Hardy L, Burden S. Home parenteral nutrition for people with inoperable malignant bowel obstruction. *Cochrane Database Syst Rev.* 10 août 2018;8:CD012812.
40. Ponta ML, Rabbione L, Borgio C, Quirico E, Patrino E, Petrachi MN, Giroto E, Sillano M, Geninatti S, Zanardi M, Pezzana A. Assessing the appropriateness of parenteral nutrition use in hospitalized patients. A comparison on parenteral nutrition bag prescription in different wards and nutritional outcomes. *Clin Nutr ESPEN.* juin 2018;25:87-94.
41. Brennan GT, Ha I, Hogan C, Nguyen E, Jamal MM, Bechtold ML, Nguyen DL. Does preoperative enteral or parenteral nutrition reduce postoperative complications in Crohn's disease patients: a meta-analysis. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2018;30(9):997-1002.
42. Bielawska B, Allard JP. Parenteral Nutrition and Intestinal Failure. *Nutrients* [Internet]. 6 mai 2017;9(5). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5452196/>
43. Brown SK, Davies N, Smyth E, Heather N, Cole C, Keys SC, Beattie RM, Batra A. Intestinal failure: the evolving demographic and patient outcomes on home parenteral nutrition. *Acta Paediatr Oslo Nor* 1992. déc 2018;107(12):2207-11.
44. Hurt RT, Steiger E. Early History of Home Parenteral Nutrition: From Hospital to Home. *Nutr Clin Pract Off Publ Am Soc Parenter Enter Nutr.* oct 2018;33(5):598-613.

45. Riera P, Garrido-Alejos G, Cardenete J, Moliner E, Zapico-Muñiz E, Cardona D, Garin N. Physicochemical Stability and Sterility of Standard Parenteral Nutrition Solutions and Simulated Y-Site Admixtures for Neonates. *Nutr Clin Pract Off Publ Am Soc Parenter Enter Nutr.* 21 févr 2018;
46. Blackmer AB, Partipilo ML. Three-in-one parenteral nutrition in neonates and pediatric patients: risks and benefits. *Nutr Clin Pract Off Publ Am Soc Parenter Enter Nutr.* juin 2015;30(3):337-43.
47. D'Angio RG, Riechers KC, Gilsdorf RB, Constantino JM. Effect of the mode of lipid administration on parenteral nutrition-related infections. *Ann Pharmacother.* janv 1992;26(1):14-7.
48. Boullata JI, Gilbert K, Sacks G, Labossiere RJ, Crill C, Goday P, Kumpf VJ, Mattox TW, Plogsted S, Holcombe B, American Society for Parenteral and Enteral Nutrition. A.S.P.E.N. clinical guidelines: parenteral nutrition ordering, order review, compounding, labeling, and dispensing. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* avr 2014;38(3):334-77.
49. Mena KDR, Espitia OLP, Vergara JAD. Management of Ready-to-Use Parenteral Nutrition in Newborns: Systematic Review. *J Parenter Enter Nutr* [Internet]. 0(0). Disponible sur: <https://onlinelibrary-wiley-com.doc-distant.univ-lille2.fr/doi/abs/10.1002/jpen.1165>
50. Corriol O, Crauste-Manciet S, Arnaud P, Brion F, Brossard D, Causse R, Chaumeil J-C, Collomp R, Cynober L, Darbord J-C, de Launet Q, Deprez M, Gard C, Lagarde A, Mazère J, Meunier P, Navas D, Neuville S, Préaux N, Provot S, Rambourg P, Saubion J-L, Yona YT. Recommandations pour la préparation des mélanges de nutrition parentérale. *Nutr Clin Métabolisme.* janv 2005;19(1):30-55.
51. Chaieb D S, Chaumeil JC, Jebnoun S, Khrouf N, Hedhili A, Sfar S. Effect of the intravenous lipid emulsions on the availability of calcium when using organic phosphate in TPN admixtures. *Pharm Res.* nov 2008;25(11):2545-54.
52. Ribeiro D de O, Lobo BW, Volpato NM, da Veiga VF, Cabral LM, de Sousa VP. Influence of the calcium concentration in the presence of organic phosphorus on the physicochemical compatibility and stability of all-in-one admixtures for neonatal use. *Nutr J.* 26 oct 2009;8:51.
53. BT M. FDA safety alert: hazards of precipitation associated with parenteral nutrition. - PubMed - NCBI [Internet]. [cité 12 mars 2019]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8788339>
54. Hill SE, Heldman LS, Goo ED, Whippo PE, Perkinson JC. Fatal microvascular pulmonary emboli from precipitation of a total nutrient admixture solution. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* févr 1996;20(1):81-7.
55. Staun M, Pironi L, Bozzetti F, Baxter J, Forbes A, Joly F, Jeppesen P, Moreno J, Hébuterne X, Pertkiewicz M, Mühlebach S, Shenkin A, Van Gossum A, ESPEN. ESPEN Guidelines on Parenteral Nutrition: home parenteral nutrition (HPN) in adult patients. *Clin Nutr Edinb Scotl.* août 2009;28(4):467-79.
56. Singer P, Berger MM, Van den Berghe G, Biolo G, Calder P, Forbes A, Griffiths R, Kreyman G, Leverve X, Pichard C, Espen null. ESPEN Guidelines on Parenteral Nutrition: intensive care. *Clin Nutr Edinb Scotl.* août 2009;28(4):387-400.
57. al BM et. Monitoring nutrition in the ICU. - PubMed - NCBI [Internet]. [cité 30 sept 2018]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov.ressources-electroniques.univ-lille.fr/pubmed/30077342>
58. Domellöf M, Szitanyi P, Simchowitz V, Franz A, Mimouni F, ESPGHAN/ESPEN/ESPR/CSPEN working group on pediatric parenteral nutrition. ESPGHAN/ESPEN/ESPR guidelines on pediatric parenteral nutrition: Iron and trace

minerals. *Clin Nutr Edinb Scotl.* 18 juin 2018;

59. Pironi L, Arends J, Bozzetti F, Cuerda C, Gillanders L, Jeppesen PB, Joly F, Kelly D, Lal S, Staun M, Szczepanek K, Van Gossum A, Wanten G, Schneider SM, Home Artificial Nutrition & Chronic Intestinal Failure Special Interest Group of ESPEN. ESPEN guidelines on chronic intestinal failure in adults. *Clin Nutr Edinb Scotl.* avr 2016;35(2):247-307.

60. Stehle P, Stoffel-Wagner B, Kuhn KS. Parenteral trace element provision: recent clinical research and practical conclusions. *Eur J Clin Nutr.* août 2016;70(8):886-93.

61. Gagnon G, Voirol P, Soguel L, Boulat O, Berger MM. Trace element monitoring in the ICU: quality and economic impact of a change in sampling practice. *Clin Nutr Edinb Scotl.* juin 2015;34(3):422-7.

62. Berger MM, Roussel A-M. Complémentation ou supplémentation en oligo-éléments : qui, pourquoi, comment ? *Nutr Clin Métabolisme.* mai 2017;31(2):93-102.

63. Faintuch J, Faintuch JJ, Toledo M, Nazario G, Machado MC, Raia AA. Hyperamylasemia associated with zinc overdose during parenteral nutrition. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* nov 1978;2(5):640-5.

64. Brocks A, Reid H, Glazer G. Acute intravenous zinc poisoning. *Br Med J.* 28 mai 1977;1(6073):1390-1.

65. Shike M. Copper in parenteral nutrition. *Gastroenterology.* nov 2009;137(5 Suppl):S13-17.

66. Blaszyk H, Wild PJ, Oliveira A, Kelly DG, Burgart LJ. Hepatic copper in patients receiving long-term total parenteral nutrition. *J Clin Gastroenterol.* avr 2005;39(4):318-20.

67. Howard L, Ashley C, Lyon D, Shenkin A. Autopsy tissue trace elements in 8 long-term parenteral nutrition patients who received the current U.S. Food and Drug Administration formulation. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* oct 2007;31(5):388-96.

68. Hardy G. Manganese in parenteral nutrition: who, when, and why should we supplement? *Gastroenterology.* nov 2009;137(5 Suppl):S29-35.

69. Dickerson RN. Manganese intoxication and parenteral nutrition. *Nutr Burbank Los Angel Cty Calif.* août 2001;17(7-8):689-93.

70. Boulétreau PH, Bost M, Fontanges E, Lauerjat M, Gutknecht C, Ecochard R, Delmas PD, Chambrier C. Fluoride exposure and bone status in patients with chronic intestinal failure who are receiving home parenteral nutrition. *Am J Clin Nutr.* juin 2006;83(6):1429-37.

71. Vanek VW, Borum P, Buchman A, Fessler TA, Howard L, Jeejeebhoy K, Kochevar M, Shenkin A, Valentine CJ, Novel Nutrient Task Force, Parenteral Multi-Vitamin and Multi-Trace Element Working Group, American Society for Parenteral and Enteral Nutrition (A.S.P.E.N.) Board of Directors. A.S.P.E.N. position paper: recommendations for changes in commercially available parenteral multivitamin and multi-trace element products. *Nutr Clin Pract Off Publ Am Soc Parenter Enter Nutr.* août 2012;27(4):440-91.

72. Shenkin A. Selenium in intravenous nutrition. *Gastroenterology.* nov 2009;137(5 Suppl):S61-69.

73. Jin J, Mulesa L, Carrilero Rouillet M. Trace Elements in Parenteral Nutrition: Considerations for the Prescribing Clinician. *Nutrients.* 28 avr 2017;9(5).

74. Manzanares W, Langlois PL, Heyland DK. Pharmacconutrition with selenium in critically ill patients: what do we know? *Nutr Clin Pract Off Publ Am Soc Parenter Enter Nutr.* févr 2015;30(1):34-43.

75. Allingstrup M, Afshari A. Selenium supplementation for critically ill adults. *Cochrane Database Syst Rev.* 27 juill 2015;(7):CD003703.

76. Langlois PL, Hardy G, Manzanares W. Pharmaconutrition with intravenous selenium in intensive care: The end of an era? *Nutr Burbank Los Angel Cty Calif.* 2018;45:142-4.
77. Livingstone C. Zinc: physiology, deficiency, and parenteral nutrition. *Nutr Clin Pract Off Publ Am Soc Parenter Enter Nutr.* juin 2015;30(3):371-82.
78. Mirtallo J, Canada T, Johnson D, Kumpf V, Petersen C, Sacks G, Seres D, Guenter P. Safe Practices for Parenteral Nutrition. *J Parenter Enter Nutr.* 11 janv 2004;28(6):S39-70.
79. Koretz RL, Lipman TO, Klein S, American Gastroenterological Association. AGA technical review on parenteral nutrition. *Gastroenterology.* oct 2001;121(4):970-1001.
80. Maskarinec SA, Fowler VG. Persistent Rash in a Patient Receiving Total Parenteral Nutrition. *JAMA.* 24 mai 2016;315(20):2223-4.
81. Palm E, Dotson B. Copper and Zinc Deficiency in a Patient Receiving Long-Term Parenteral Nutrition During a Shortage of Parenteral Trace Element Products. *JPEN J Parenter Enter Nutr.* nov 2015;39(8):986-9.
82. Baruch D, Naga L, Driscoll M, Kao G. Acrodermatitis enteropathica from zinc-deficient total parenteral nutrition. *Cutis.* juin 2018;101(6):450-3.
83. Fessler TA. Trace elements in parenteral nutrition: a practical guide for dosage and monitoring for adult patients. *Nutr Clin Pract Off Publ Am Soc Parenter Enter Nutr.* déc 2013;28(6):722-9.
84. Cecchi Tenerini R. Evaluation des pratiques en matière de nutrition parentérale pédiatrique [Internet]. 2015 janv [cité 15 juin 2017]. Disponible sur: <http://www.igas.gouv.fr/IMG/pdf/2014-168R.pdf>
85. Fonzo-Christe C, Bouchoud L, Pfister R. Incompatibilités médicamenteuses et nutrition parentérale en néonatalogie. *Nutr Clin Métabolisme.* févr 2017;31(1):24-7.
86. Mühlebach S. Basics in clinical nutrition: Drugs and nutritional admixtures. *E-SPEN Eur E-J Clin Nutr Metab.* 1 juin 2009;4(3):e134-6.
87. Jeppsson RI, Sjöberg B. Compatibility of parenteral nutrition solutions when mixed in a plastic bag. *Clin Nutr Edinb Scotl.* mars 1984;2(3-4):149-58.
88. Mühlebach S. Practical aspects of multichamber bags for total parenteral nutrition. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* mai 2005;8(3):291-5.
89. Driscoll DF, Blackburn GL. Total parenteral nutrition 1990. A review of its current status in hospitalised patients, and the need for patient-specific feeding. *Drugs.* sept 1990;40(3):346-63.
90. Costa S, Postaire M, Corriol O. Adjonction de la vancomycine dans un mélange nutritif parentéral pédiatrique : étude de stabilité à long terme. *Nutr Clin Métabolisme.* 1 janv 1990;4(3):163-6.
91. Bouchoud L, Fonzo-Christe C, Klingmüller M, Bonnabry P. Compatibility of Intravenous Medications With Parenteral Nutrition In Vitro Evaluation. *J Parenter Enter Nutr.* 1 mai 2013;37(3):416-24.
92. Staven V, Wang S, Grønlie I, Tho I. Development and evaluation of a test program for Y-site compatibility testing of total parenteral nutrition and intravenous drugs. *Nutr J.* 22 mars 2016;15:29.
93. Télessy IG, Balogh J, Turmezei J, Dredán J, Zelkó R. Stability assessment of o/w parenteral nutrition emulsions in the presence of high glucose and calcium concentrations. *J Pharm Biomed Anal.* 10 sept 2011;56(2):159-64.
94. Leplay C, Nouman M, Jaskowiec C, Thiriart N, Poullain S. Qualification d'un automate de laboratoire pour le contrôle physicochimique des mélanges de nutrition parentérale en milieu ternaire. *Pharm Hosp Clin.* 1 déc 2014;49(4):334-5.

95. Manning RJ, Washington C. Chemical stability of total parenteral nutrition mixtures. *Int J Pharm.* 15 mars 1992;81(1):1-20.
96. Hardy G, Puzovic M. Formulation, stability, and administration of parenteral nutrition with new lipid emulsions. *Nutr Clin Pract Off Publ Am Soc Parenter Enter Nutr.* nov 2009;24(5):616-25.
97. Slattery E, Rumore MM, Douglas JS, Seres DS. 3-in-1 vs 2-in-1 parenteral nutrition in adults: a review. *Nutr Clin Pract Off Publ Am Soc Parenter Enter Nutr.* oct 2014;29(5):631-5.
98. Chaumeil J-C, Brossard D. Stabilité des émulsions lipidiques utilisées en nutrition parentérale. *Nutr Clin Métabolisme.* 1993;7(1):55-64.
99. Black CD, Popovich NG. A study of intravenous emulsion compatibility: effects of dextrose, amino acids, and selected electrolytes. *Drug Intell Clin Pharm.* mars 1981;15(3):184-93.
100. Pertkiewicz M, Cosslett A, Mühlebach S, Dudrick SJ. Basics in clinical nutrition: Stability of parenteral nutrition admixtures. *E-SPEN Eur E-J Clin Nutr Metab.* juin 2009;4(3):e117-9.
101. Burnham WR, Hansrani PK, Knott CE, Cook JA, Davis SS. Stability of a fat emulsion based intravenous feeding mixture. *Int J Pharm.* 1 déc 1982;13(1):9-22.
102. Collomp R, Peroux E, Pons J. Importance of cation concentrations on the stability of parenteral nutrition solutions. *Reprod Nutr Dev.* 1996;36(4):416-7.
103. Watrobska-Swietlikowska D, Szlagatys-Sidorkiewicz A, Łuszkiewicz K. Evaluation of physical stability of all in one parenteral admixtures for pediatric home care with high electrolytes concentrations. *Nutr Hosp.* 1 janv 2014;31(1):236-43.
104. Watrobska-Swietlikowska D, Szlagatys-Sidorkiewicz A, MacLoughlin R. The presence of inorganic calcium in pediatric parenteral admixtures. *Nutr Hosp.* 10 janv 2018;35(1):11-8.
105. Washington C. The electrokinetic properties of phospholipid-stabilized fat emulsions. II. Droplet mobility in mixed electrolytes. *Int J Pharm.* 15 janv 1990;58(1):13-7.
106. Ricard C, Fortuné R, Fussellier M, Bardet L, Florent M. Importance du pH et de la composition des solutions d'acides aminés sur la stabilité des mélanges ternaires pour nutrition parentérale totale. *Nutr Clin Métabolisme.* 1 janv 1995;9(1):3-13.
107. Athanasiou C, Hatziantoniou S, Skouroliakou M, Markantonis-Kyroudis S. Assessment of the physicochemical stability of all-in-one parenteral emulsions for neonates according to USP specifications. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* sept 2014;38(7):867-72.
108. Emulsions Pharmacopée française XIe édition [Internet]. 1987. Disponible sur: [https://www.ansm.sante.fr/var/ansm\\_site/storage/original/application/481f85f6fc3c4213083d387a3ad83527.pdf](https://www.ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/481f85f6fc3c4213083d387a3ad83527.pdf)
109. Chapter <729> Globule size distribution in lipid injectable emulsions. *U S Pharmacop 42th Ed Natl Formul 37th Ed.* 2020;6888-91.
110. Driscoll DF. Stability and compatibility assessment techniques for total parenteral nutrition admixtures: setting the bar according to pharmacopeial standards. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* mai 2005;8(3):297-303.
111. Driscoll DF, Bhargava HN, Li L, Zaim RH, Babayan VK, Bistrrian BR. Physicochemical stability of total nutrient admixtures. *Am J Health-Syst Pharm AJHP Off J Am Soc Health-Syst Pharm.* 15 mars 1995;52(6):623-34.
112. Hu Y-T, Ting Y, Hu J-Y, Hsieh S-C. Techniques and methods to study functional characteristics of emulsion systems. *J Food Drug Anal.* 1 janv 2017;25(1):16-26.

113. USP. Lipid injectable emulsions. The United States Pharmacopeia 42/National Formulary 37; 2020. pp. 2588–2590. [Internet]. 2020. Disponible sur: uspnf.com
114. Driscoll DF, Etzler F, Barber TA, Nehne J, Niemann W, Bistran BR. Physicochemical assessments of parenteral lipid emulsions: light obscuration versus laser diffraction. *Int J Pharm.* 21 mai 2001;219(1-2):21-37.
115. Balet A, Cardona D, Jané S, Molins-Pujol AM, Sánchez Quesada JL, Gich I, Mangués MA. Effects of multilayered bags vs ethylvinyl-acetate bags on oxidation of parenteral nutrition. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* avr 2004;28(2):85-91.
116. Breaux CW, Duke D, Georgeson KE, Mestre JR. Calcium phosphate crystal occlusion of central venous catheters used for total parenteral nutrition in infants and children: prevention and treatment. *J Pediatr Surg.* sept 1987;22(9):829-32.
117. Knowles JB, Cusson G, Smith M, Sitrin MD. Pulmonary deposition of calcium phosphate crystals as a complication of home total parenteral nutrition. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* avr 1989;13(2):209-13.
118. Shay DK, Fann LM, Jarvis WR. Respiratory distress and sudden death associated with receipt of a peripheral parenteral nutrition admixture. *Infect Control Hosp Epidemiol.* déc 1997;18(12):814-7.
119. Raupp P, von Kries R, Pfahl HG, Manz F. Glycero- vs glucose-phosphate in parenteral nutrition of premature infants: a comparative in vitro evaluation of calcium/phosphorus compatibility. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* août 1991;15(4):469-73.
120. Costello I, Powell C, Williams AF. Sodium glycerophosphate in the treatment of neonatal hypophosphataemia. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* juill 1995;73(1):F44-45.
121. Ronchera-Oms CL. Organic phosphates in parenteral nutrient admixtures. *Am J Health-Syst Pharm AJHP Off J Am Soc Health-Syst Pharm.* 15 juin 1996;53(12):1462-3.
122. Watrobska-Swietlikowska D, Kwidzyska A, Szlagatys-Sidorkiewicz A, Sznitowska M, Klek S. Finding new solutions in pediatric parenteral admixtures: how to improve quality and to deal with shortages. *Nutr Hosp.* 1 juill 2014;30(1):84-93.
123. Allwood MC, Kearney MC. Compatibility and stability of additives in parenteral nutrition admixtures. *Nutr Burbank Los Angel Cty Calif.* sept 1998;14(9):697-706.
124. Robinson LA, Wright BT. Central venous catheter occlusion caused by body-heat-mediated calcium phosphate precipitation. *Am J Hosp Pharm.* janv 1982;39(1):120-1.
125. Schuetz DH, King JC. Compatibility and stability of electrolytes, vitamins and antibiotics in combination with 8% amino acids solution. *Am J Hosp Pharm.* janv 1978;35(1):33-44.
126. Sturgeon RJ, Athanikar NK, Henry RS, Jurgens RW, Welco AD. Titratable acidities of crystalline amino acid admixtures. *Am J Hosp Pharm.* mars 1980;37(3):388-90.
127. Mirtallo JM, Rogers KR, Johnson JA, Fabri PJ, Schneider PJ. Stability of amino acids and the availability of acid in total parenteral nutrition solutions containing hydrochloric acid. *Am J Hosp Pharm.* nov 1981;38(11):1729-31.
128. van den Berg L, Soliman FS. Composition and pH changes during freezing of solutions containing calcium and magnesium phosphate. *Cryobiology.* 1 juill 1969;6(1):10-4.
129. Eur. Ph., General, particulate contamination: visible particles, In : The European Pharmacopoeia, tenth ed., Chapter 2.9.20 (2019).
130. Eur. Ph., General, particulate contamination: sub-visible particles, In : The European Pharmacopoeia, tenth ed., Chapter 2.9.19 (2019).
131. Huston RK, Christensen JM, Alshahrani SM, Mohamed SM, Heisel CF, Stout KN. Calcium Chloride and Calcium Gluconate in Neonatal Parenteral Nutrition Solutions with

- Added Cysteine: Compatibility Studies Using Laser Light Obscuration Methodology. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 29 août 2018;
132. Chappuy L, Charroin C, Vételé F, Durand T, Quessada T, Klotz M-C, Pirot F, Bréant V, Aulagner G. Étude de stabilité et de stérilité des poches de nutrition parentérale pour patients à domicile fabriquées à l'aide de l'automate BAXA® EM 2400. *Ann Pharm Fr.* nov 2013;71(6):401-9.
133. Unger N, Holzgrabe U. Stability and assessment of amino acids in parenteral nutrition solutions. *J Pharm Biomed Anal.* 5 janv 2018;147:125-39.
134. Spikes JD, Livingston R. The Molecular Biology of Photodynamic Action: Sensitized Photooxidations in Biological Systems<sup>1</sup> <sup>1</sup>The preparation of this paper was supported in part by the U.S. Atomic Energy Commission under Contract No. AT(11-1)-875,<sup>2</sup> <sup>2</sup>The following abbreviations are used: ATP, adenosine triphosphate; DNA, deoxyribonucleic acid; FMN, riboflavin-5'-phosphate; NAD, nicotinamide adenine dinucleotide; NADH, reduced NAD; NADP, NAD phosphate; NADPH, reduced NADP; poly A, polymer of adenylic acid; poly C., polymer of cytidylic acid; poly U, polymer of uridylic acid; poly AG, copolymer of A and guanylic acid; poly UA, copolymer of U and A; poly UC, copolymer of U and C; poly UG, copolymer of U and G; poly UAC, copolymer of U, A, and C; RNA, ribonucleic acid; mRNA, messenger RNA; tRNA, transfer or soluble RNA; Tris buffer, tris(hydroxymethyl)aminomethane buffer; and TMV, tobacco mosaic virus. In: Augenstein LG, Mason R, Zelle M, éditeurs. *Advances in Radiation Biology* [Internet]. Elsevier; 1969 [cité 24 oct 2019]. p. 29-121. Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781483231228500081>
135. Bhatia J, Stegink LD, Ziegler EE. Riboflavin Enhances Photo-oxidation of Amino Acids under Simulated Clinical Conditions. *J Parenter Enter Nutr.* 5 janv 1983;7(3):277-9.
136. Eur. Ph., General, Amino acid analysis, In, *The european Pharmacopoeia*, tenth ed., Chapter 2.2.56.
137. Adriaens P, Meesschaert B, Wuyts W, Vanderhaeghe H, Eyssen H. Separation of ninhydrin-positive compounds on a single-column amino acid analyzer using lithium buffers. *J Chromatogr.* 1 oct 1977;140(1):103-8.
138. Yailian A-L, Serre C, Fayard J, Faucon M, Thomaré P, Filali S, Pivot C, Vételé F, Pirot F, Olivier E. Production and stability study of a hospital parenteral nutrition solution for neonates. *J Pharm Anal.* 1 avr 2019;9(2):83-90.
139. Davidek T, Clety N, Devaud S, Robert F, Blank I. Simultaneous quantitative analysis of maillard reaction precursors and products by high-performance anion exchange chromatography. *J Agric Food Chem.* 3 déc 2003;51(25):7259-65.
140. Lavoie JC, Bélanger S, Spalinger M, Chessex P. Admixture of a multivitamin preparation to parenteral nutrition: the major contributor to in vitro generation of peroxides. *Pediatrics.* mars 1997;99(3):E6.
141. Silvers KM, Darlow BA, Winterbourn CC. Lipid peroxide and hydrogen peroxide formation in parenteral nutrition solutions containing multivitamins. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* févr 2001;25(1):14-7.
142. Jalabert A, Grand A, Steghens J-P, Barbotte E, Pigue C, Picaud J-C. Lipid peroxidation in all-in-one admixtures for preterm neonates: impact of amount of lipid, type of lipid emulsion and delivery condition. *Acta Paediatr Oslo Nor* 1992. sept 2011;100(9):1200-5.
143. Dine T, Gressier B, Luyckx M, Gottrand F, Michaud L, Kambia N. Plasma malondialdehyde levels in children on 12-hour cyclic parenteral nutrition: are there health risks? *Pediatr Dev Pathol Off J Soc Pediatr Pathol Paediatr Pathol Soc.* août

2014;17(4):286-91.

144. King HM, Cosslett AG, Thomas CP, Price-Davies R. A HPLC method to monitor the occurrence of lipid peroxidation in intravenous lipid emulsions used in parenteral nutrition using in-line UV and charged aerosol detection. *Clin Nutr ESPEN*. déc 2018;28:96-102.

145. Kambia N, Dine T, Gressier B, Frimat B, Cazin J-L, Luyckx M, Brunet C, Michaud L, Gottrand F. Correlation between exposure to phthalates and concentrations of malondialdehyde in infants and children undergoing cyclic parenteral nutrition. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. mai 2011;35(3):395-401.

146. Kwon T-W, Watts BM. Determination of Malonaldehyde by Ultraviolet Spectrophotometry. *J Food Sci*. 1 nov 1963;28(6):627-30.

147. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*. 1 juin 1979;95(2):351-8.

148. Czauderna M, Kowalczyk J, Marounek M. The simple and sensitive measurement of malondialdehyde in selected specimens of biological origin and some feed by reversed phase high performance liquid chromatography. *J Chromatogr B*. 1 août 2011;879(23):2251-8.

149. Yailian A-L, Serre C, Fayard J, Faucon M, Thomaré P, Filali S, Pivot C, Vételé F, Pirot F, Olivier E. Production and stability study of a hospital parenteral nutrition solution for neonates. *J Pharm Anal [Internet]*. 11 janv 2018 [cité 8 avr 2019]; Disponible sur:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2095177918300029>

150. Tolbert B, Ward J. Dehydroascorbic Acid. In: *Ascorbic Acid: Chemistry, Metabolism, and Uses [Internet]*. AMERICAN CHEMICAL SOCIETY; 1982 [cité 10 avr 2019]. p. 101-23. (Advances in Chemistry; vol. 200). Disponible sur: <https://doi.org/10.1021/ba-1982-0200.ch005>

151. Proot P, De Pourcq L, Raymakers AA. Stability of ascorbic acid in a standard total parenteral nutrition mixture. *Clin Nutr Edinb Scotl*. oct 1994;13(5):273-9.

152. Ribeiro DO, Pinto DC, Lima LMTR, Volpato NM, Cabral LM, de Sousa VP. Chemical stability study of vitamins thiamine, riboflavin, pyridoxine and ascorbic acid in parenteral nutrition for neonatal use. *Nutr J*. 14 mai 2011;10:47.

153. Watrobska-Swietlikowska D, MacLoughlin R. The effect of UV-protected ethylene vinyl acetate (EVA) bags on the physicochemical stability of pediatric parenteral nutrition admixtures. *Daru J Fac Pharm Tehran Univ Med Sci*. juin 2019;27(1):255-64.

154. Laborie S, Lavoie J-C, Chessex P. Paradoxical Role of Ascorbic Acid and Riboflavin in Solutions of Total Parenteral Nutrition: Implication in Photoinduced Peroxide Generation. *Pediatr Res*. mai 1998;43(5):601-6.

155. Grand A, Jalabert A, Mercier G, Florent M, Hansel-Esteller S, Cambonie G, Steghens J-P, Picaud J-C. Influence of vitamins, trace elements, and iron on lipid peroxidation reactions in all-in-one admixtures for neonatal parenteral nutrition. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. juill 2011;35(4):505-10.

156. Uccello-Barretta G, Balzano F, Aiello F, Falugiani N, Desideri I. Stability of hydrophilic vitamins mixtures in the presence of electrolytes and trace elements for parenteral nutrition: a nuclear magnetic resonance spectroscopy investigation. *J Pharm Biomed Anal*. 25 mars 2015;107:7-10.

157. Boddapati S, Yang K, Murty R. Intravenous solution compatibility and filter-retention characteristics of trace-element preparations. *Am J Hosp Pharm*. nov 1981;38(11):1731-6.

158. Nordfjeld K, Pedersen JL, Rasmussen M, Gaunø Jensen V. Storage of mixtures for

- total parenteral nutrition III. Stability of vitamins in TPN mixtures. *J Clin Hosp Pharm.* déc 1984;9(4):293-301.
159. Shearer CA, Bozian RC. The availability of trace elements in intravenous hyperalimentation solutions. 1977. *Ann Pharmacother.* mai 2007;41(5):873-7.
160. McGee CD, Mascarenhas MG, Ostro MJ, Tsallas G, Jeejeebhoy KN. Selenium and vitamin E stability in parenteral solutions. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* oct 1985;9(5):568-70.
161. Bates CG, Greiner G, Gegenheimer A. Precipitate in admixtures of new amino acid injection. *Am J Hosp Pharm.* juill 1984;41(7):1312, 1316.
162. Lindström AL, Walz I, Wärnheim T. Precipitation of trace elements in parenteral nutrition mixtures. *Clin Nutr Edinb Scotl.* oct 1999;18(5):323.
163. Cochran EB, Boehm KA. Prefilter and postfilter cysteine/cystine and copper concentrations in pediatric parenteral nutrition solutions. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* oct 1992;16(5):460-3.
164. Allwood MC, Martin H, Greenwood M, Maunder M. Precipitation of trace elements in parenteral nutrition mixtures. *Clin Nutr.* 1 oct 1998;17(5):223-6.
165. Harraki B, Guiraud P, Rochat MH, Alary J, Favier A. Interactions related to trace elements in parenteral nutrition. *Pharm Acta Helv.* déc 1995;70(4):269-78.
166. Foinard A, Perez M, Barthélémy C, Lannoy D, Flamein F, Storme L, Addad A, Bout M-A, Décaudin B, Odou P. In Vitro Assessment of Interaction Between Amino Acids and Copper in Neonatal Parenteral Nutrition. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2016;40(6):827-34.
167. Thibault M. Possible Incompatibility between Amino Acids and Copper in Solutions for Pediatric Parenteral Nutrition. *Can J Hosp Pharm.* mars 2014;67(2):160-4.
168. Levander OA. Considerations in the design of selenium bioavailability studies. *Fed Proc.* avr 1983;42(6):1721-5.
169. Ganther HE, Kraus RJ. Chemical stability of selenious acid in total parenteral nutrition solutions containing ascorbic acid. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* avr 1989;13(2):185-8.
170. Séguier J-C. Médicaments et nutrition parentérale. *Nutr Clin Métabolisme.* 1 déc 1999;13:35s-7s.
171. Zaccardelli DS, Krcmarik CS, Wolk R, Khalidi N. Stability of imipenem and cilastatin sodium in total parenteral nutrient solution. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* juin 1990;14(3):306-9.
172. Minebois C, Landelle C, Daloiso F, Tirard A, Dionnet D, Wroblewski I, Debillon T, Trouiller P, Mallaret MR. Évaluation des pratiques professionnelles d'administration des poches de nutrition parentérale en réanimation néonatale et pédiatrique. *Nutr Clin Métabolisme.* févr 2017;31(1):4-9.
173. Cardona D, Nadal M, Estelrich J, Mangues MA. Review of drug stability in parenteral nutrition admixtures. *E-SPEN J.* août 2013;8(4):e135-40.
174. Trissel LA, Gilbert DL, Martinez JF, Baker MB, Walter WV, Mirtallo JM. Compatibility of medications with 3-in-1 parenteral nutrition admixtures. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* avr 1999;23(2):67-74.
175. Trissel LA, Gilbert DL, Martinez JF, Baker MB, Walter WV, Mirtallo JM. Compatibility of parenteral nutrient solutions with selected drugs during simulated Y-site administration. *Am J Health-Syst Pharm AJHP Off J Am Soc Health-Syst Pharm.* 1 juin 1997;54(11):1295-300.
176. Kalikstad B, Skjerdal Å, Hansen TWR. Compatibility of drug infusions in the NICU. *Arch Dis Child.* 1 sept 2010;95(9):745-8.

177. Husson E, Crauste-Manciet S, Hadj-Salah È, Séguier J-C, Brossard D. Stabilité galénique de mélanges commercialisés de nutrition parentérale en présence de médicaments : médicaments dans le mélange. *Nutr Clin Métabolisme*. 1 mars 2003;17(1):8-14.
178. Husson E, Crauste-Manciet S, Hadj-Salah E, Séguier J-C, Brossard D. Stabilité galénique de mélanges commercialisés de nutrition parentérale en présence de médicaments. (ii) : médicaments perfusés en Y. *Nutr Clin Métabolisme*. juin 2003;17(2):72-9.
179. Doglietto GB, Bellantone R, Bossola M, Perri V, Ratto C, Pacelli F, Sofo L, Migliore A, Manna R, Crucitti F. Insulin adsorption to three-liter ethylen vinyl acetate bags during 24-hour infusion. *J Parenter Enter Nutr*. oct 1989;13(5):539-41.
180. Jack T, Boehne M, Brent BE, Hoy L, Köditz H, Wessel A, Sasse M. In-line filtration reduces severe complications and length of stay on pediatric intensive care unit: a prospective, randomized, controlled trial. *Intensive Care Med*. juin 2012;38(6):1008-16.
181. Hartman C, Shamir R, Simchowitz V, Lohner S, Cai W, Decsi T, Braegger C, Bronsky J, Cai W, Campoy C, Carnielli V, Darmaun D, Decsi T, Domellöf M, Embleton N, Fewtrell M, Mis NF, Franz A, Goulet O, Hartman C, Hill S, Hojsak I, Iacobelli S, Jochum F, Joosten K, Kolaček S, Koletzko B, Ksiazek J, Lapillonne A, Lohner S, Mesotten D, Mihályi K, Mihatsch WA, Mimouni F, Mølgaard C, Moltu SJ, Nomayo A, Picaud JC, Prell C, Puntis J, Riskin A, Pipaon MSD, Senterre T, Shamir R, Simchowitz V, Szitanyi P, Tabbers MM, Akker CHBVD, Goudoever JBV, Kempen AV, Verbruggen S, Wu J, Yan W. ESPGHAN/ESPEN/ESPR/CSPEN guidelines on pediatric parenteral nutrition: Complications. *Clin Nutr*. 1 déc 2018;37(6):2418-29.
182. Reber E, Messerli M, Stanga Z, Mühlebach S. Pharmaceutical Aspects of Artificial Nutrition. *J Clin Med*. 19 nov 2019;8(11).
183. Staven V, Iqbal H, Wang S, Grønlie I, Tho I. Physical compatibility of total parenteral nutrition and drugs in Y-site administration to children from neonates to adolescents. *J Pharm Pharmacol*. avr 2017;69(4):448-62.
184. Gostyńska A, Stawny M, Dettlaff K, Jelińska A. The Interactions between Ciprofloxacin and Parenteral Nutrition Admixtures. *Pharmaceutics*. 27 déc 2019;12(1).
185. Watrobska-Swietlikowska D, Pietka M, Klek S. Evaluation of Y-site compatibility of home total parenteral nutrition and intravenous loop diuretics. *Medicine (Baltimore)*. mai 2019;98(21):e15747.
186. Greenhill K, Hornsby E, Gorman G. Investigations of Physical Compatibilities of Commonly Used Intravenous Medications with and without Parenteral Nutrition in Pediatric Cardiovascular Intensive Care Unit Patients. *Pharm Basel Switz*. 4 mai 2019;12(2).
187. Fox LM, Wilder AG, Foushee JA. Physical compatibility of various drugs with neonatal total parenteral nutrient solution during simulated Y-site administration. *Am J Health-Syst Pharm AJHP Off J Am Soc Health-Syst Pharm*. 15 mars 2013;70(6):520-4.
188. Trissel LA, Gilbert DL, Martinez JF, Baker MB, Walter WV, Mirtallo JM. Compatibility of medications with 3-in-1 parenteral nutrition admixtures. *JPEN J Parenter Enter Nutr*. avr 1999;23(2):67-74.
189. Robinson CA. Y-Site Compatibility of Medications with Parenteral Nutrition. mars 2009;48-56.
190. Miranda TMM, Ferraresi A de A. Compatibility: drugs and parenteral nutrition. *Einstein Sao Paulo Braz*. mars 2016;14(1):52-5.
191. Tomczak S, Stawny M, Dettlaff K, Kieliszek M, Słomińska D, Jelińska A. Physicochemical Compatibility and Stability of Linezolid with Parenteral Nutrition. *Mol*

Basel Switz. 29 mars 2019;24(7).

192. Aeberhard C, Steuer C, Saxer C, Huber A, Stanga Z, Mühlebach S. Physicochemical stability and compatibility testing of levetiracetam in all-in-one parenteral nutrition admixtures in daily practice. *Eur J Pharm Sci Off J Eur Fed Pharm Sci.* 1 janv 2017;96:449-55.
193. Garcia J, Garg A, Song Y, Fotios A, Andersen C, Garg S. Compatibility of intravenous ibuprofen with lipids and parenteral nutrition, for use as a continuous infusion. *PLoS ONE* [Internet]. 3 janv 2018;13(1). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5752020/>
194. Baumgartner TG, Henderson GN, Fox J, Gondi U. Stability of ranitidine and thiamine in parenteral nutrition solutions. *Nutrition.* 1 juin 1997;13(6):547-53.
195. Mediavilla MM, Molina A, Navarro L, Grau L, Pujol MD, Cardenete J, Cardona D, Riera P. Physicochemical Compatibility of Amiodarone with Parenteral Nutrition. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 10 juill 2018;
196. Schilling RJ, Mitra AK. Pharmacodynamics of insulin following intravenous and enteral administrations of porcine-zinc insulin to rats. *Pharm Res.* août 1992;9(8):1003-9.
197. Stawny M, Gostyńska A, Olijarczyk R, Jelińska A, Ogrodowczyk M. Stability of high-dose thiamine in parenteral nutrition for treatment of patients with Wernicke's encephalopathy. *Clin Nutr Edinb Scotl.* 11 déc 2019;
198. Stawny M, Gostyńska A, Dettlaff K, Jelińska A, Głowska E, Ogrodowczyk M. Effect of Lipid Emulsion on Stability of Ampicillin in Total Parenteral Nutrition. *Nutrients.* 6 mars 2019;11(3).
199. Campbell AL, Petrovski M, Senarathna SG, Mukadam N, Strunk T, Batty KT. Compatibility of pentoxifylline and parenteral medications. *Arch Dis Child.* 23 déc 2019;
200. Maroulis J, Kalfarentzos F. Complications of parenteral nutrition at the end of the century. *Clin Nutr Edinb Scotl.* oct 2000;19(5):295-304.
201. Ziegler TR. Parenteral Nutrition in the Critically Ill Patient. *N Engl J Med.* 10 sept 2009;361(11):1088-97.
202. Wouters Y, Roosenboom B, Causevic E, Kievit W, Groenewoud H, Wanten GJA. Clinical outcomes of home parenteral nutrition patients using taurolidine as catheter lock: A long-term cohort study. *Clin Nutr Edinb Scotl.* 20 sept 2018;
203. Egberg MD, Galanko JA, Barnes EL, Kappelman MD. Thrombotic and Infectious Risks of Parenteral Nutrition in Hospitalized Pediatric Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis.* 21 févr 2019;25(3):601-9.
204. McNeice A, Scott R, Rafferty GP, Cash WJ, Turner GB. The hepatobiliary complications of malnutrition and nutritional support in adults. *Ir J Med Sci.* 31 mai 2018;
205. Costa S, Iannotta R, Maggio L, Barone G, Serrao F, Vento G. Fish oil-based lipid emulsion in the treatment of parenteral nutrition-associated cholestasis. *Ital J Pediatr.* 23 août 2018;44(1):101.
206. Christian VJ, Tallar M, Walia CLS, Sieracki R, Goday PS. Systematic Review of Hypersensitivity to Parenteral Nutrition. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* nov 2018;42(8):1222-9.
207. Btaiche IF, Khalidi N. Metabolic complications of parenteral nutrition in adults, part 1. *Am J Health-Syst Pharm AJHP Off J Am Soc Health-Syst Pharm.* 15 sept 2004;61(18):1938-49.
208. Nunes G, Brito M, Santos CA, Fonseca J. Refeeding syndrome in the gastroenterology practice: how concerned should we be? *Eur J Gastroenterol Hepatol.*

2018;30(11):1270-6.

209. Lheureux O, Prevedello D, Preiser J-C. Update on glucose in critical care. *Nutr Burbank Los Angel Cty Calif.* mars 2019;59:14-20.

210. International Hypoglycaemia Study Group. Hypoglycaemia, cardiovascular disease, and mortality in diabetes: epidemiology, pathogenesis, and management. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 26 mars 2019;

211. Cryer PE. Death during intensive glycemic therapy of diabetes: mechanisms and implications. *Am J Med.* nov 2011;124(11):993-6.

212. Frier BM. Defining hypoglycaemia: what level has clinical relevance? *Diabetologia.* janv 2009;52(1):31-4.

213. Amiel SA, Dixon T, Mann R, Jameson K. Hypoglycaemia in Type 2 diabetes. *Diabet Med J Br Diabet Assoc.* mars 2008;25(3):245-54.

214. Cryer PE. Preventing hypoglycaemia: what is the appropriate glucose alert value? *Diabetologia.* janv 2009;52(1):35-7.

215. McMahon MM, Nystrom E, Braunschweig C, Miles J, Compher C, American Society for Parenteral and Enteral Nutrition (A.S.P.E.N.) Board of Directors, American Society for Parenteral and Enteral Nutrition. A.S.P.E.N. clinical guidelines: nutrition support of adult patients with hyperglycemia. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* janv 2013;37(1):23-36.

216. Jakoby MG, Nannapaneni N. An insulin protocol for management of hyperglycemia in patients receiving parenteral nutrition is superior to ad hoc management. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* mars 2012;36(2):183-8.

217. Klek S. Hypoglycemia in hospitalized patients receiving parenteral nutrition. *Nutrition.* 1 févr 2015;31(2):413-4.

218. Kampfrath T, Rosenblatt DA, Lenhardt R, Nelson L, Jortani SA. Undetected hypoglycemia in a patient receiving TPN. *Clin Chim Acta.* 23 sept 2013;424:96-8.

219. Allweis TM, Rimon B, Freund HR. Malnutrition-associated reactive hypoglycemia induced by TPN. *Nutr Burbank Los Angel Cty Calif.* mars 1997;13(3):222-4.

220. Oliveira G, Tapia MJ, Ocón J, Cabrejas-Gómez C, Ballesteros-Pomar MD, Vidal-Casariago A, Arraiza-Irigoyen C, Olivares J, Conde-García MC, García-Manzanares Á, Botella-Romero F, Quílez-Toboso RP, Matía P, Rubio MÁ, Chicharro L, Burgos R, Pujante P, Ferrer M, Zugasti A, Petrina E, Manjón L, Diéguez M, Carrera MJ, Vila-Bundo A, Urgelés JR, Aragón-Valera C, Sánchez-Vilar O, Bretón I, García-Peris P, Muñoz-Garach A, Márquez E, Del Olmo D, Pereira JL, Tous MC. Hypoglycemia in noncritically ill patients receiving total parenteral nutrition: a multicenter study. (Study group on the problem of hyperglycemia in parenteral nutrition; Nutrition area of the Spanish Society of Endocrinology and Nutrition). *Nutr Burbank Los Angel Cty Calif.* janv 2015;31(1):58-63.

221. Cook CB, Kongable GL, Potter DJ, Abad VJ, Leija DE, Anderson M. Inpatient glucose control: a glycemic survey of 126 U.S. hospitals. *J Hosp Med.* nov 2009;4(9):E7-14.

222. ChrisAnderson D, Heimburger DC, Morgan SL, Geels WJ, Henry KL, Conner W, Hensrud DD, Thompson G, Weinsier RL. Metabolic complications of total parenteral nutrition: effects of a nutrition support service. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* juin 1996;20(3):206-10.

223. Lee H, Koh SO, Park MS. Higher dextrose delivery via TPN related to the development of hyperglycemia in non-diabetic critically ill patients. *Nutr Res Pract.* oct 2011;5(5):450-4.

224. Pleva M, Mirtallo JM, Steinberg SM. Hyperglycemic events in non-intensive care unit patients receiving parenteral nutrition. *Nutr Clin Pract Off Publ Am Soc Parenter Enter Nutr.* nov 2009;24(5):626-34.

225. Sarkisian S, Fenton TR, Shaheen AA, Raman M. Parenteral nutrition-associated

- hyperglycemia in noncritically ill inpatients is associated with higher mortality. *Can J Gastroenterol J Can Gastroenterol*. juill 2010;24(7):453-7.
226. Pasquel FJ, Spiegelman R, McCauley M, Smiley D, Umpierrez D, Johnson R, Rhee M, Gatcliffe C, Lin E, Umpierrez E, Peng L, Umpierrez GE. Hyperglycemia during total parenteral nutrition: an important marker of poor outcome and mortality in hospitalized patients. *Diabetes Care*. avr 2010;33(4):739-41.
227. Cheung NW, Napier B, Zaccaria C, Fletcher JP. Hyperglycemia is associated with adverse outcomes in patients receiving total parenteral nutrition. *Diabetes Care*. oct 2005;28(10):2367-71.
228. García Martínez T, Montañes Pauls B, Vicedo Cabrera AM, Liñana Granell C, Ferrando Piqueres R. Predictive factors of hyperglycemia in hospitalized adults receiving total parenteral nutrition. *Farm Hosp Organo Of Expresion Cient Soc Espanola Farm Hosp*. 1 nov 2017;41(6):667-73.
229. McClave SA, Taylor BE, Martindale RG, Warren MM, Johnson DR, Braunschweig C, McCarthy MS, Davanos E, Rice TW, Cresci GA, Gervasio JM, Sacks GS, Roberts PR, Compher C, Society of Critical Care Medicine, American Society for Parenteral and Enteral Nutrition. Guidelines for the Provision and Assessment of Nutrition Support Therapy in the Adult Critically Ill Patient: Society of Critical Care Medicine (SCCM) and American Society for Parenteral and Enteral Nutrition (A.S.P.E.N.). *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. févr 2016;40(2):159-211.
230. Roehl KA, Lach K, Coltman AE, Bacon CA, Singh S, Peterson SJ, Sowa DC. Predictors of insulin requirements among hospitalized adults receiving parenteral nutrition. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. nov 2013;37(6):755-62.
231. Campbell IT. Limitations of nutrient intake. The effect of stressors: trauma, sepsis and multiple organ failure. *Eur J Clin Nutr*. avr 1999;53 Suppl 1:S143-147.
232. Watters JM, Norris SB, Kirkpatrick SM. Endogenous glucose production following injury increases with age. *J Clin Endocrinol Metab*. sept 1997;82(9):3005-10.
233. Mi D, Wang P, Yang B, Pu Y, Yang Z, Liu L. Correlation of hyperglycemia with mortality after acute ischemic stroke. *Ther Adv Neurol Disord*. 2018;11:1756285617731686.
234. Capes SE, Hunt D, Malmberg K, Gerstein HC. Stress hyperglycaemia and increased risk of death after myocardial infarction in patients with and without diabetes: a systematic overview. *Lancet Lond Engl*. 4 mars 2000;355(9206):773-8.
235. McAlister FA, Majumdar SR, Blitz S, Rowe BH, Romney J, Marrie TJ. The Relation Between Hyperglycemia and Outcomes in 2,471 Patients Admitted to the Hospital With Community-Acquired Pneumonia. *Diabetes Care*. 1 avr 2005;28(4):810-5.
236. Toro-Polo LM, Ortiz-Lozada RY, Chang-Grozo SL, Hernandez AV, Escalante-Kanashiro R, Solari-Zerpa L. Glycemia upon admission and mortality in a pediatric intensive care unit. *Rev Bras Ter Intensiva*. déc 2018;30(4):471-8.
237. Coudenys E, De Waele E, Meers G, Collier H, Pen JJ. Inadequate glycemic control in patients receiving parenteral nutrition lowers survival: A retrospective observational trial. *Clin Nutr Exp*. 1 févr 2018;17:1-7.
238. Tran HV, Gore JM, Darling CE, Ash AS, Kiefe CI, Goldberg RJ. Hyperglycemia and risk of ventricular tachycardia among patients hospitalized with acute myocardial infarction. *Cardiovasc Diabetol*. 19 2018;17(1):136.
239. Jafar N, Edriss H, Nugent K. The Effect of Short-Term Hyperglycemia on the Innate Immune System. *Am J Med Sci*. févr 2016;351(2):201-11.
240. Turina M, Fry DE, Polk HC. Acute hyperglycemia and the innate immune system: clinical, cellular, and molecular aspects. *Crit Care Med*. juill 2005;33(7):1624-33.

241. Kaneshige H. Nonenzymatic glycosylation of serum IgG and its effect on antibody activity in patients with diabetes mellitus. *Diabetes*. juill 1987;36(7):822-8.
242. Van den Berghe G, Wouters PJ, Bouillon R, Weekers F, Verwaest C, Schetz M, Vlasselaers D, Ferdinande P, Lauwers P. Outcome benefit of intensive insulin therapy in the critically ill: Insulin dose versus glycemic control. *Crit Care Med*. févr 2003;31(2):359-66.
243. Ingels C, Vanhorebeek I, Van den Berghe G. Glucose homeostasis, nutrition and infections during critical illness. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. janv 2018;24(1):10-5.
244. Li W, Roy Choudhury G, Winters A, Prah J, Lin W, Liu R, Yang S-H. Hyperglycemia Alters Astrocyte Metabolism and Inhibits Astrocyte Proliferation. *Aging Dis*. août 2018;9(4):674-84.
245. Sonnevile R, den Hertog HM, Güiza F, Gunst J, Derese I, Wouters PJ, Brouland J-P, Polito A, Gray F, Chrétien F, Charlier P, Annane D, Sharshar T, Van den Berghe G, Vanhorebeek I. Impact of hyperglycemia on neuropathological alterations during critical illness. *J Clin Endocrinol Metab*. juin 2012;97(6):2113-23.
246. Bosarge PL, Shoultz TH, Griffin RL, Kerby JD. Stress-induced hyperglycemia is associated with higher mortality in severe traumatic brain injury. *J Trauma Acute Care Surg*. août 2015;79(2):289-94.
247. Saxena A, Anderson CS, Wang X, Sato S, Arima H, Chan E, Muñoz-Venturelli P, Delcourt C, Robinson T, Stapf C, Lavados PM, Wang J, Neal B, Chalmers J, Heeley E, INTERACT2 Investigators. Prognostic Significance of Hyperglycemia in Acute Intracerebral Hemorrhage: The INTERACT2 Study. *Stroke*. mars 2016;47(3):682-8.
248. Atamna A, Ayada G, Akirov A, Shochat T, Bishara J, Elis A. High blood glucose variability is associated with bacteremia and mortality in patients hospitalized with acute infection. *QJM Mon J Assoc Physicians*. 1 févr 2019;112(2):101-6.
249. Kumar PR, Crotty P, Raman M. Hyperglycemia in Hospitalized Patients Receiving Parental Nutrition Is Associated with Increased Morbidity and Mortality: A Review. *Gastroenterol Res Pract*. 3 août 2010;2011:e760720.
250. der Voort PHJ, Feenstra RA, Bakker AJ, Heide L, Boerma EC, van der Horst ICC. Intravenous glucose intake independently related to intensive care unit and hospital mortality: an argument for glucose toxicity in critically ill patients. *Clin Endocrinol (Oxf)*. févr 2006;64(2):141-5.
251. Lin L-Y, Lin H-C, Lee P-C, Ma W-Y, Lin H-D. Hyperglycemia correlates with outcomes in patients receiving total parenteral nutrition. *Am J Med Sci*. mai 2007;333(5):261-5.
252. Oliveira G, Tapia MJ, Ocón J, Cabrejas-Gómez C, Ballesteros-Pomar MD, Vidal-Casariago A, Arraiza-Irigoyen C, Olivares J, Conde-García MDC, García-Manzanares A, Botella-Romero F, Quílez-Toboso RP, Cabrerizo L, Matia P, Chicharro L, Burgos R, Pujante P, Ferrer M, Zugasti A, Prieto J, Diéguez M, Carrera MJ, Vila-Bundo A, Urgelés JR, Aragón-Valera C, Rovira A, Bretón I, García-Peris P, Muñoz-Garach A, Márquez E, Del Olmo D, Pereira JL, Tous MC, Study Group of Hyperglycemia in Parenteral Nutrition: Nutrition Area of the Spanish Society of Endocrinology and Nutrition (SEEN). Parenteral nutrition-associated hyperglycemia in non-critically ill inpatients increases the risk of in-hospital mortality (multicenter study). *Diabetes Care*. mai 2013;36(5):1061-6.
253. Drincic AT, Knezevich JT, Akkireddy P. Nutrition and Hyperglycemia Management in the Inpatient Setting (Meals on Demand, Parenteral, or Enteral Nutrition). *Curr Diab Rep*. 2017;17(8):59.
254. Pasquel FJ, Smiley D, Spiegelman R, Lin E, Peng L, Umpierrez GE. Hyperglycemia

is associated with increased hospital complications and mortality during parenteral nutrition. *Hosp Pract* 1995. avr 2011;39(2):81-8.

255. Llop JM, Leiva E, Mateu-de Antonio J, Berlana D, Badia M, Casasín T, Miana M, Pons M, Maroto M, Chicharro L, López-Suñé E, Díaz-Munio E, Sevilla D, Martínez I, Vitales M, Casajuana MT, Bobis MA. Study of hyperglycemia in non critically-ill patients receiving parenteral nutrition: incidence and risk factors. *Nutr Hosp.* oct 2012;27(5):1521-6.

256. Ma J, Gao M, Pan R, He L, Zhao L, Liu J, Liu H. Hyperglycemia is associated with cardiac complications in elderly nondiabetic patients receiving total parenteral nutrition. *Medicine (Baltimore)*. févr 2018;97(6):e9537.

257. Sheean PM, Braunschweig C, Rich E. The incidence of hyperglycemia in hematopoietic stem cell transplant recipients receiving total parenteral nutrition: a pilot study. *J Am Diet Assoc.* sept 2004;104(9):1352-60.

258. Sheean PM, Freels SA, Helton WS, Braunschweig CA. Adverse clinical consequences of hyperglycemia from total parenteral nutrition exposure during hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant.* juin 2006;12(6):656-64.

259. Jin Y, Yong C, Ren K, Li D, Yuan H. Effects of Post-Surgical Parenteral Nutrition on Patients with Gastric Cancer. *Cell Physiol Biochem Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol.* 11 sept 2018;49(4):1320-8.

260. Marsillio LE, Ginsburg SL, Rosenbaum CH, Coffin SE, Naim MY, Priestley MA, Srinivasan V. Hyperglycemia at the Time of Acquiring Central Catheter-Associated Bloodstream Infections Is Associated With Mortality in Critically Ill Children. *Pediatr Crit Care Med J Soc Crit Care Med World Fed Pediatr Intensive Crit Care Soc.* sept 2015;16(7):621-8.

261. Gosmanov AR, Umpierrez GE. Management of hyperglycemia during enteral and parenteral nutrition therapy. *Curr Diab Rep.* févr 2013;13(1):155-62.

262. Valero MA, León-Sanz M, Escobar I, Gomis P, de la Cámara A, Moreno JM. Evaluation of nonglucose carbohydrates in parenteral nutrition for diabetic patients. *Eur J Clin Nutr.* déc 2001;55(12):1111-6.

263. Lidder P, Flanagan D, Fleming S, Russell M, Morgan N, Wheatley T, Rahamin J, Shaw S, Lewis S. Combining enteral with parenteral nutrition to improve postoperative glucose control. *Br J Nutr.* juin 2010;103(11):1635-41.

264. Vennard KC, Selen DJ, Gilbert MP. The management of hyperglycemia in noncritically-ill hospitalized patients treated with continuous enteral or parenteral nutrition. *Endocr Pract Off J Am Coll Endocrinol Am Assoc Clin Endocrinol.* 23 juill 2018;

265. De Flines J, Paquot N, Preiser J-C. Gestion de l'hyperglycémie au cours d'une nutrition parentérale. *Nutr Clin Métabolisme.* sept 2012;26(3):143-7.

266. van den Berghe G, Wouters P, Weekers F, Verwaest C, Bruyninckx F, Schetz M, Vlasselaers D, Ferdinande P, Lauwers P, Bouillon R. Intensive insulin therapy in critically ill patients. *N Engl J Med.* 8 nov 2001;345(19):1359-67.

267. Krinsley JS. Effect of an intensive glucose management protocol on the mortality of critically ill adult patients. *Mayo Clin Proc.* août 2004;79(8):992-1000.

268. McDonnell ME, Umpierrez GE. Insulin Therapy for the Management of Hyperglycemia in Hospitalized Patients. *Endocrinol Metab Clin North Am.* mars 2012;41(1):175-201.

269. Vanhorebeek I, Ingels C, Van den Berghe G. Intensive insulin therapy in high-risk cardiac surgery patients: evidence from the Leuven randomized study. *Semin Thorac Cardiovasc Surg.* 2006;18(4):309-16.

270. NICE-SUGAR Study Investigators, Finfer S, Chittock DR, Su SY-S, Blair D, Foster D, Dhingra V, Bellomo R, Cook D, Dodek P, Henderson WR, Hébert PC, Heritier S, Heyland DK, McArthur C, McDonald E, Mitchell I, Myburgh JA, Norton R, Potter J, Robinson BG, Ronco JJ. Intensive versus conventional glucose control in critically ill patients. *N Engl J Med.* 26 mars 2009;360(13):1283-97.
271. Griesdale DEG, de Souza RJ, van Dam RM, Heyland DK, Cook DJ, Malhotra A, Dhaliwal R, Henderson WR, Chittock DR, Finfer S, Talmor D. Intensive insulin therapy and mortality among critically ill patients: a meta-analysis including NICE-SUGAR study data. *CMAJ Can Med Assoc J J Assoc Medicale Can.* 14 avr 2009;180(8):821-7.
272. Van den Berghe G, Schetz M, Vlasselaers D, Hermans G, Wilmer A, Bouillon R, Mesotten D. Clinical review: Intensive insulin therapy in critically ill patients: NICE-SUGAR or Leuven blood glucose target? *J Clin Endocrinol Metab.* sept 2009;94(9):3163-70.
273. Brunkhorst FM, Engel C, Bloos F, Meier-Hellmann A, Ragaller M, Weiler N, Moerer O, Gruendling M, Oppert M, Grond S, Olthoff D, Jaschinski U, John S, Rossaint R, Welte T, Schaefer M, Kern P, Kuhnt E, Kiehntopf M, Hartog C, Natanson C, Loeffler M, Reinhart K, German Competence Network Sepsis (SepNet). Intensive insulin therapy and pentastarch resuscitation in severe sepsis. *N Engl J Med.* 10 janv 2008;358(2):125-39.
274. De La Rosa GDC, Donado JH, Restrepo AH, Quintero AM, González LG, Saldarriaga NE, Bedoya M, Toro JM, Velásquez JB, Valencia JC, Arango CM, Aleman PH, Vasquez EM, Chavarriaga JC, Yepes A, Pulido W, Cadavid CA, Grupo de Investigacion en Cuidado intensivo: GICI-HPTU. Strict glycaemic control in patients hospitalised in a mixed medical and surgical intensive care unit: a randomised clinical trial. *Crit Care Lond Engl.* 2008;12(5):R120.
275. Smiley D, Umpierrez GE. Management of hyperglycemia in hospitalized patients. *Ann N Y Acad Sci.* nov 2010;1212:1-11.
276. Lena D, Kalfon P, Preiser J-C, Ichai C. Glycemic control in the intensive care unit and during the postoperative period. *Anesthesiology.* févr 2011;114(2):438-44.
277. Preiser J-C, Devos P. Clinical experience with tight glucose control by intensive insulin therapy. *Crit Care Med.* sept 2007;35(9 Suppl):S503-507.
278. Ramos A, Rabasa F, Mendoza L, Cardenete J, Gill P, Morilla A, Cardona D, Pérez A. Differences in Glycemic Control in Diabetic and Non-diabetic Patients with Parenteral Nutrition Using a Basal plus Correction Insulin Regimen: An Observational, Retrospective Study. *Diabetes Ther Res Treat Educ Diabetes Relat Disord.* juin 2018;9(3):1359-67.
279. Jacobi J, Bircher N, Krinsley J, Agus M, Braithwaite SS, Deutschman C, Freire AX, Geehan D, Kohl B, Nasraway SA, Rigby M, Sands K, Schallom L, Taylor B, Umpierrez G, Mazuski J, Schunemann H. Guidelines for the use of an insulin infusion for the management of hyperglycemia in critically ill patients. *Crit Care Med.* déc 2012;40(12):3251-76.
280. Oliveira G, García-Luna PP, Pereira JL, Rebollo I, García-Almeida JM, Serrano P, Irlés JA, Muñoz-Aguilar A, Molina MJ, Tapia MJ, GARIN Group Andalusian Group for Nutrition Reflection and Investigation. Recommendations of the GARIN group for managing non-critically ill patients with diabetes or stress hyperglycaemia and artificial nutrition. *Nutr Hosp.* déc 2012;27(6):1837-49.
281. Quilliot D, Durain D, Malgras A. Principes de prise en charge de l'hyperglycémie au cours de la nutrition artificielle. *Nutr Clin Métabolisme.* févr 2012;26(1):40-2.
282. Stentz FB, Umpierrez GE, Cuervo R, Kitabchi AE. Proinflammatory cytokines, markers of cardiovascular risks, oxidative stress, and lipid peroxidation in patients with

hyperglycemic crises. *Diabetes*. août 2004;53(8):2079-86.

283. Berger MM, Reintam-Blaser A, Calder PC, Casaer M, Hiesmayr MJ, Mayer K, Montejo JC, Pichard C, Preiser J-C, van Zanten ARH, Bischoff SC, Singer P. Monitoring nutrition in the ICU. *Clin Nutr*. 1 avr 2019;38(2):584-93.

284. Umpierrez GE, Hellman R, Korytkowski MT, Kosiborod M, Maynard GA, Montori VM, Seley JJ, Van den Berghe G. Management of Hyperglycemia in Hospitalized Patients in Non-Critical Care Setting: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 1 janv 2012;97(1):16-38.

285. Société Francophone de Nutrition Clinique et Métabolisme. Principes de prise en charge de l'hyperglycémie au cours de la nutrition artificielle [Internet]. <https://www.sfnm.org/>. [cité 26 sept 2018]. Disponible sur: [https://www.sfnm.org/images/stories/Unequestion/1Q1F-Hyperglycemie\\_et\\_NA\\_11\\_09.pdf](https://www.sfnm.org/images/stories/Unequestion/1Q1F-Hyperglycemie_et_NA_11_09.pdf)

286. Fatati G, Cortinovis F, Fontana L, Fusco MA, Leotta S, Marelli G, Mirri E, Parillo M, Sukkar SG, Tagliaferri M, Tomasi F, Tubili C. ADI-AMD recommendations on insulin treatment during artificial nutrition. *Mediterr J Nutr Metab*. 1 avr 2010;3(1):81-95.

287. Fatati G, Grandone I, Palazzi M, Weber P, Mirri E. Use of neutral protamine lispro insulin (NPL) in patients with hyperglycemia receiving parenteral nutrition. *Clin Ter*. 2014;165(1):e17-23.

288. Kinnare KF, Bacon CA, Chen Y, Sowa DC, Peterson SJ. Risk factors for predicting hypoglycemia in patients receiving concomitant parenteral nutrition and insulin therapy. *J Acad Nutr Diet*. févr 2013;113(2):263-8.

289. Hakeam HA, Mulia HA, Azzam A, Amin T. Glargine Insulin Use Versus Continuous Regular Insulin in Diabetic Surgical Noncritically Ill Patients Receiving Parenteral Nutrition: Randomized Controlled Study. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. sept 2017;41(7):1110-8.

290. Olveira G, Abuín J, López R, Herranz S, García-Almeida JM, García-Malpartida K, Ferrer M, Cancer E, Luengo-Pérez LM, Álvarez J, Aragón C, Ocón MJ, García-Manzanares Á, Bretón I, Serrano-Aguayo P, Pérez-Ferre N, López-Gómez JJ, Olivares J, Arraiza C, Tejera C, Martín JD, García S, Abad ÁL, Alhambra MR, Zugasti A, Parra J, Torrejón S, Tapia MJ. Regular insulin added to total parenteral nutrition vs subcutaneous glargine in non-critically ill diabetic inpatients, a multicenter randomized clinical trial: INSUPAR trial. *Clin Nutr Edinb Scotl*. 20 mars 2019;

291. Truong S, Park A, Kamalay S, Hung N, Meyer JG, Nguyen N, Momenzadeh A. Glycemic Control in Adult Surgical Patients Receiving Regular Insulin Added to Parenteral Nutrition vs Insulin Glargine: A Retrospective Chart Review. *Nutr Clin Pract Off Publ Am Soc Parenter Enter Nutr*. 29 janv 2019;

292. Kinnare KF, Bacon CA, Chen Y, Sowa DC, Peterson SJ. Risk Factors for Predicting Hypoglycemia in Patients Receiving Concomitant Parenteral Nutrition and Insulin Therapy. *J Acad Nutr Diet*. 1 févr 2013;113(2):263-8.

293. Olveira G, Tapia MJ, Ocón J, Cabrejas-Gómez C, Ballesteros-Pomar MD, Vidal-Casariego A, Arraiza-Irigoyen C, Olivares J, Conde-García MDC, García-Manzanares A, Botella-Romero F, Quílez-Toboso RP, Cabrerizo L, Matia P, Chicharro L, Burgos R, Pujante P, Ferrer M, Zugasti A, Prieto J, Diéguez M, Carrera MJ, Vila-Bundo A, Urgelés JR, Aragón-Valera C, Rovira A, Bretón I, García-Peris P, Muñoz-Garach A, Márquez E, Del Olmo D, Pereira JL, Tous MC, Study Group of Hyperglycemia in Parenteral Nutrition: Nutrition Area of the Spanish Society of Endocrinology and Nutrition (SEEN). Parenteral nutrition-associated hyperglycemia in non-critically ill inpatients increases the risk of in-hospital mortality (multicenter study). *Diabetes Care*. mai 2013;36(5):1061-6.

294. McMahon MM. Management of parenteral nutrition in acutely ill patients with hyperglycemia. *Nutr Clin Pract Off Publ Am Soc Parenter Enter Nutr.* avr 2004;19(2):120-8.
295. McCowen KC, Bistrian BR. Hyperglycemia and Nutrition Support: Theory and Practice. *Nutr Clin Pract.* 2004;19(3):235-44.
296. Madsen H. The Hitchhiker's Guide to Parenteral Nutrition Management for Adult Patients [Internet]. ResearchGate. [cité 5 févr 2020]. Disponible sur: [https://www.researchgate.net/publication/242664206\\_The\\_Hitchhiker's\\_Guide\\_to\\_Parenteral\\_Nutrition\\_Management\\_for\\_Adult\\_Patients](https://www.researchgate.net/publication/242664206_The_Hitchhiker's_Guide_to_Parenteral_Nutrition_Management_for_Adult_Patients)
297. Sajbel TA, Dutro MP, Radway PR. Use of separate insulin infusions with total parenteral nutrition. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* févr 1987;11(1):97-9.
298. Oghazian MB, Javadi MR, Radfar M, Torkamandi H, Sadeghi M, Hayatshahi A, Gholami K. Effectiveness of regular versus glargine insulin in stable critical care patients receiving parenteral nutrition: a randomized controlled trial. *Pharmacotherapy.* févr 2015;35(2):148-57.
299. McCulloch A, Bansiya V, Woodward JM. The addition of insulin to home parenteral nutrition for the control of hyperglycaemia: A case series. *Clin Nutr ESPEN.* avr 2019;30:204-7.
300. Study Group Of Hyperglycemia In Parenteral Nutrition Nutrition Area Of The Spanish Society Of Endocrinology And Nutrition Seen null, Oliveira G, Tapia MJ, Ocón J, Cabrejas-Gómez C, Ballesteros-Pomar MD, Vidal-Casariago A, Arraiza-Irigoyen C, Olivares J, Conde-García MC, García-Manzanares Á, Botella-Romero F, Quílez-Toboso RP, Cabrerizo L, Matía P, Chicharro L, Burgos R, Pujante P, Ferrer M, Zugasti A, Petrina E, Manjón L, Diéguez M, Carrera MJ, Vila-Bundo A, Urgelés JR, Aragón-Valera C, Sánchez-Vilar O, Bretón I, García-Peris P, Muñoz-Garach A, Márquez E, del Olmo D, Pereira JL, Tous MC. Prevalence of diabetes, prediabetes, and stress hyperglycemia: insulin therapy and metabolic control in patients on total parenteral nutrition (prospective multicenter study). *Endocr Pract Off J Am Coll Endocrinol Am Assoc Clin Endocrinol.* janv 2015;21(1):59-67.
301. Andersen S, Andersen A, Ringholm L, Hansen CP, Storkholm J, Lillpers K, Schiøtz C, Mathiesen ER. Parenteral nutrition and insulin per protocol improve diabetes management after total pancreatectomy. *Dan Med J.* avr 2018;65(4).
302. Kampfrath T, Rosenblatt DA, Lenhardt R, Nelson L, Jortani SA. Undetected hypoglycemia in a patient receiving TPN. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem.* 23 sept 2013;424:96-8.
303. American Diabetes Association. 14. Diabetes Care in the Hospital: Standards of Medical Care in Diabetes-2018. *Diabetes Care.* 2018;41(Suppl 1):S144-51.
304. Christianson MA, Schwartz MW, Suzuki N. Determinants of insulin availability in parenteral nutrition solutions. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* févr 2006;30(1):6-9.
305. Rusavý Z, Sramek V, Suchat R, Lacigova S, Topolcan O. Effects of carrier solution on insulin bioavailability. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* déc 2004;28(6):439-41.
306. Marcuard SP, Dunham B, Hobbs A, Caro JF. Availability of insulin from total parenteral nutrition solutions. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* juin 1990;14(3):262-4.
307. Ichikawa E, Kimura M, Mori H, Yamazaki F, Hirano K. Apparent increase of insulin peak area in HPLC analysis of a preparation consisting of a mixture of insulin and total parenteral nutrition. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* août 2006;54(8):1196-9.
308. Yu K-H, Tsao H-L, Lin S-J, Chen C-Y. Quantitative analysis of insulin in total parenteral nutrition bag in Taiwan. *J Food Drug Anal.* janv 2016;24(1):214-9.
309. Forchielli ML, Bongiovanni F, Platé L, Piazza G, Puggioli C, D'Alise A, Bersani G.

- Insulin Instability in Parenteral Nutrition Admixtures. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* juill 2018;42(5):907-12.
310. Bassons T, Maria Sanchez J, Bassas L, Cardona D, Ordonez J, Bonal J. Insulina recuperada según los componentes de la nutrición parenteral. *Rev SENPE.* mars 1985;4(1):93-9.
311. Weber SS, Wood WA, Jackson EA. Availability of insulin from parenteral nutrient solutions. *Am J Hosp Pharm.* avr 1977;34(4):353-7.
312. Canivet B, Berre A, Macchi P, Grimaud D, Maestracci P, Freychet P. [Adsorption of insulin introduced directly into perfusion bottles]. *Pathol Biol (Paris).* janv 1983;31(1):37-40.
313. Hewson M, Nawadra V, Oliver J, Odgers C, Plummer J, Simmer K. Insulin infusions in the neonatal unit: delivery variation due to adsorption. *J Paediatr Child Health.* juin 2000;36(3):216-20.
314. Masse M, Maton M, Genay S, Blanchemain N, Barthélémy C, Décaudin B, Odou P. In vitro assessment of the influence of intravenous extension set materials on insulin aspart drug delivery. *PloS One.* 2018;13(8):e0201623.
315. Ciszewska M, Knyt A, Kopec B, Pertkiewicz M. Insulin availability from all in one and fat-free nutrients admixtures. *Clin Nutr.* 1994;13, Supplement 1:56.
316. Driscoll DF, Thoma A, Franke R, Klütsch K, Nehne J, Bistrrian BR. Lipid globule size in total nutrient admixtures prepared in three-chamber plastic bags. *Am J Health-Syst Pharm AJHP Off J Am Soc Health-Syst Pharm.* 1 avr 2009;66(7):649-56.
317. Washington C. The stability of intravenous fat emulsions in total parenteral nutrition mixtures. *Int J Pharm.* 1 déc 1990;66(1-3):1-21.
318. Driscoll DF, Giampietro K, Wichelhaus DP, Peterss H, Nehne J, Niemann W, Bistrrian BR. Physicochemical stability assessments of lipid emulsions of varying oil composition. *Clin Nutr Edinb Scotl.* avr 2001;20(2):151-7.
319. Driscoll DF. The Significance of Particle/Globule-Sizing Measurements in the Safe Use of Intravenous Lipid Emulsions. *J Dispers Sci Technol.* 11 janv 2002;23(5):679-87.
320. Driscoll DF, Bacon MN, Bistrrian BR. Effects of In-Line Filtration on Lipid Particle Size Distribution in Total Nutrient Admixtures. *J Parenter Enteral Nutr.* 1996;20(4):296-301.
321. Ayers P, Adams S, Boullata J, Gervasio J, Holcombe B, Kraft MD, Marshall N, Neal A, Sacks G, Seres DS, Worthington P, American Society for Parenteral and Enteral Nutrition. A.S.P.E.N. parenteral nutrition safety consensus recommendations. *J Parenter Enteral Nutr.* avr 2014;38(3):296-333.
322. McKinnon BT. FDA safety alert: hazards of precipitation associated with parenteral nutrition. *Nutr Clin Pract Off Publ Am Soc Parenter Enteral Nutr.* avr 1996;11(2):59-65.
323. Nutrition parentérale en néonatalogie - Recommandation de bonne pratique [Internet]. Haute Autorité de Santé. [cité 10 févr 2020]. Disponible sur: [https://www.has-sante.fr/jcms/c\\_2859140/fr/nutrition-parenterale-en-neonatalogie-recommandation-de-bonne-pratique](https://www.has-sante.fr/jcms/c_2859140/fr/nutrition-parenterale-en-neonatalogie-recommandation-de-bonne-pratique)
324. Davis SS, Galloway M, Burnham WR, Stevens L. In vitro and clinical studies on intravenous feeding mixtures comprising fat emulsion, amino acid and electrolytes. *Clin Nutr.* 1 févr 1986;5(1):21-7.
325. Stawny M, Olijarczyk R, Jaroszkiewicz E, Jelińska A. Pharmaceutical Point of View on Parenteral Nutrition [Internet]. *The Scientific World Journal.* 2013 [cité 8 mars 2019]. Disponible sur: <https://www.hindawi.com/journals/tswj/2013/415310/>
326. Driscoll DF, Silvestri AP, Bistrrian BR. Stability of MCT/LCT-based total nutrient

- admixture for neonatal use over 30 hours at room temperature: applying pharmacopeial standards. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* juin 2010;34(3):305-12.
327. Han J, Davis SS, Washington C. Physical properties and stability of two emulsion formulations of propofol. *Int J Pharm.* 14 mars 2001;215(1-2):207-20.
328. Hippalgaonkar K, Majumdar S, Kansara V. Injectable lipid emulsions-advancements, opportunities and challenges. *AAPS PharmSciTech.* déc 2010;11(4):1526-40.
329. Godel H, Graser T, Földi P, Pfaender P, Fürst P. Measurement of free amino acids in human biological fluids by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr.* 3 août 1984;297:49-61.
330. Tovsen ML, Smistad G, Bjerke TM, Tønnesen HH, Kristensen S. Physicochemical Stability of Emulsions and Admixtures for Parenteral Nutrition during Irradiation by Glass-Filtered Daylight at Standardized Conditions. *PDA J Pharm Sci Technol.* juin 2015;69(3):346-54.
331. Andersen L, Jørgensen PN, Jensen LB, Walsh D. A new insulin immunoassay specific for the rapid-acting insulin analog, insulin aspart, suitable for bioavailability, bioequivalence, and pharmacokinetic studies. *Clin Biochem.* nov 2000;33(8):627-33.
332. Agin A, Jeandidier N, Gasser F, Grucker D, Sapin R. Use of insulin immunoassays in clinical studies involving rapid-acting insulin analogues: Bi-insulin IRMA preliminary assessment. *Clin Chem Lab Med.* 2006;44(11):1379-82.
333. Peterman S, Niederkofler EE, Phillips DA, Krastins B, Kiernan UA, Tubbs KA, Nedelkov D, Prakash A, Vogelsang MS, Schoeder T, Couchman L, Taylor DR, Moniz CF, Vadali G, Byram G, Lopez MF. An automated, high-throughput method for targeted quantification of intact insulin and its therapeutic analogs in human serum or plasma coupling mass spectrometric immunoassay with high resolution and accurate mass detection (MSIA-HR/AM). *Proteomics.* juin 2014;14(12):1445-56.
334. Liu T-C, Chen M-J, Ren Z-Q, Hou J-Y, Lin G-F, Wu Y-S. Development of an improved time-resolved fluoroimmunoassay for simultaneous quantification of C-peptide and insulin in human serum. *Clin Biochem.* avr 2014;47(6):439-44.
335. Luo X, Xu Q, James T, Davis JJ. Redox and label-free array detection of protein markers in human serum. *Anal Chem.* 3 juin 2014;86(11):5553-8.
336. European Pharmacopoeia Commission. Intitulé Insulin, Human. In *European Pharmacopoeia 8th Edition 2014 (8.2)*. PP 2491-2493.
337. Chambers EE, Fountain KJ, Smith N, Ashraf L, Karalliedde J, Cowan D, Legido-Quigley C. Multidimensional LC-MS/MS enables simultaneous quantification of intact human insulin and five recombinant analogs in human plasma. *Anal Chem.* 7 janv 2014;86(1):694-702.
338. Henry H, Lannoy D, Simon N, Seguy D, D'Herbomez M, Barthélémy C, Décaudin B, Dine T, Odou P. Immunoassay quantification of human insulin added to ternary parenteral nutrition containers: comparison of two methods. *Anal Bioanal Chem.* mai 2017;409(14):3677-84.
339. Hubert P, Nguyen-Huu J-J, Boulanger B, Chapuzet E, Cohen N, Compagnon P-A, Dewé W, Feinberg M, Laurentie M, Mercier N, Muzard G, Valat L, Rozet E. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures. A SFSTP proposal--part III. *J Pharm Biomed Anal.* 21 sept 2007;45(1):82-96.
340. Mendes-Plogin A, Georges A, Valli N, Dartiguelongue H, Dubernet M-F, Bordenave L. Dosage immunoradiométrique du peptide natriurétique de type B (BNP) : étude analytique et clinique de la trousse IRMA BNP Cis bio international. *Immuno-Anal Biol Spéc.* oct 2002;17(5):336-40.

341. Feldman JM, Chapman BA. Radioimmunoassay of insulin in serum and plasma. *Clin Chem.* nov 1973;19(11):1250-4.
342. Sapin R. [Interferences in immunoassays: Mechanisms and outcomes in endocrinology]. *Ann Endocrinol.* nov 2008;69(5):415-25.
343. Owen WE, Roberts WL. Cross-reactivity of three recombinant insulin analogs with five commercial insulin immunoassays. *Clin Chem.* janv 2004;50(1):257-9.
344. Petty C, Cunningham NL. Insulin adsorption by glass infusion bottles, polyvinylchloride infusion containers, and intravenous tubing. *Anesthesiology.* avr 1974;40(4):400-4.
345. Goebel-Stengel M, Stengel A, Taché Y, Reeve JR. The importance of using the optimal plasticware and glassware in studies involving peptides. *Anal Biochem.* 1 juill 2011;414(1):38-46.
346. Cuatrecasas P, Hollenberg MD. Binding of insulin and other hormones to non-receptor materials: saturability, specificity and apparent « negative cooperativity ». *Biochem Biophys Res Commun.* 6 janv 1975;62(1):31-41.
347. Mollmann SH, Bukrinsky JT, Frokjaer S, Elofsson U. Adsorption of human insulin and AspB28 insulin on a PTFE-like surface. *J Colloid Interface Sci.* 1 juin 2005;286(1):28-35.
348. Nault L, Vendrely C, Bréchet Y, Bruckert F, Weidenhaupt M. Peptides that form  $\beta$ -sheets on hydrophobic surfaces accelerate surface-induced insulin amyloid aggregation. *FEBS Lett.* 2 mai 2013;587(9):1281-6.
349. Nault L, Guo P, Jain B, Bréchet Y, Bruckert F, Weidenhaupt M. Human insulin adsorption kinetics, conformational changes and amyloid aggregate formation on hydrophobic surfaces. *Acta Biomater.* févr 2013;9(2):5070-9.
350. Pandey LM, Le Denmat S, Delabouglise D, Bruckert F, Pattanayek SK, Weidenhaupt M. Surface chemistry at the nanometer scale influences insulin aggregation. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 1 déc 2012;100:69-76.
351. Cuatrecasas P, Hollenberg MD. Binding of insulin and other hormones to non-receptor materials: Saturability, specificity and apparent “negative cooperativity”. *Biochem Biophys Res Commun.* 6 janv 1975;62(1):31-41.
352. Cecil R, Robinson GB. The “specific” binding of insulin to polyethylene and other materials. *Biochim Biophys Acta BBA - Gen Subj.* 8 sept 1975;404(1):164-8.
353. Jakobsson T, Shulman R, Gill H, Taylor K. The Impact of Insulin Adsorption onto the Infusion Sets in the Adult Intensive Care Unit. *J Diabetes Sci Technol Online.* janv 2009;3(1):213-4.
354. Zahid N, Taylor KMG, Gill H, Maguire F, Shulman R. Adsorption of insulin onto infusion sets used in adult intensive care unit and neonatal care settings. *Diabetes Res Clin Pract.* juin 2008;80(3):e11-13.
355. Ley S, Ammann J, Herder C, Hartmann M, Kindgen-Milles D. Variable adsorption of insulin at catheter materials used in intensive care units: polyethylene vs polyurethane - possible cause for hypoglycemia during intensive insulin treatment? *Crit Care.* 2007;11(Suppl 2):P127.
356. Chantelau E, Lange G, Gasthaus M, Boxberger M, Berger M. Interaction between plastic catheter tubings and regular insulin preparations used for continuous subcutaneous insulin-infusion therapy. *Diabetes Care.* juin 1987;10(3):348-51.
357. Livesey JH, Donald RA. Prevention of adsorption losses during radioimmunoassay of polypeptide hormones: effectiveness of albumins, gelatin, caseins, Tween 20 and plasma. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem.* 4 août 1982;123(1-2):193-8.
358. Suelter CH, DeLuca M. How to prevent losses of protein by adsorption to glass

- and plastic. *Anal Biochem.* nov 1983;135(1):112-9.
359. Seres DS. Insulin adsorption to parenteral infusion systems: case report and review of the literature. *Nutr Clin Pract Off Publ Am Soc Parenter Enter Nutr.* juin 1990;5(3):111-7.
360. Peterson L, Caldwell J, Hoffman J. Insulin adsorbance to polyvinylchloride surfaces with implications for constant-infusion therapy. *Diabetes.* janv 1976;25(1):72-4.
361. Simeon PS, Geffner ME, Levin SR, Lindsey AM. Continuous insulin infusions in neonates: pharmacologic availability of insulin in intravenous solutions. *J Pediatr.* mai 1994;124(5 Pt 1):818-20.
362. Furberg H, Jensen AK, Salbu B. Effect of pretreatment with 0.9% sodium chloride or insulin solutions on the delivery of insulin from an infusion system. *Am J Hosp Pharm.* sept 1986;43(9):2209-13.
363. Thompson CD, Vital-Carona J, Faustino EVS. The effect of tubing dwell time on insulin adsorption during intravenous insulin infusions. *Diabetes Technol Ther.* oct 2012;14(10):912-6.
364. Fuloria M, Friedberg MA, DuRant RH, Aschner JL. Effect of flow rate and insulin priming on the recovery of insulin from microbore infusion tubing. *Pediatrics.* déc 1998;102(6):1401-6.
365. Simmons A, Allwood MC. Sorption to Plastic Syringes of Drugs Administered by Syringe Pump. *J Clin Pharm Ther.* 1 mars 1981;6(1):71-3.
366. Brange J, Havelund S, Hommel E, Sørensen E, Kühl C. Neutral insulin solutions physically stabilized by addition of Zn<sup>2+</sup>. *Diabet Med J Br Diabet Assoc.* déc 1986;3(6):532-6.
367. Brange J, Langkjaer L. Chemical stability of insulin. 3. Influence of excipients, formulation, and pH. *Acta Pharm Nord.* 1992;4(3):149-58.
368. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxid Med Cell Longev* [Internet]. 2014 [cité 6 sept 2016];2014. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4066722/>
369. Picaud JC, Steghens JP, Auxenfans C, Barbieux A, Laborie S, Claris O. Lipid peroxidation assessment by malondialdehyde measurement in parenteral nutrition solutions for newborn infants: a pilot study. *Acta Paediatr Oslo Nor* 1992. févr 2004;93(2):241-5.
370. Attri AK, Fernández C, Minton AP. pH-dependent self-association of zinc-free insulin characterized by concentration-gradient static light scattering. *Biophys Chem.* mai 2010;148(1-3):28-33.
371. Quinn R, Andrade JD. Minimizing the aggregation of neutral insulin solutions. *J Pharm Sci.* déc 1983;72(12):1472-3.
372. Brange J, Havelund S, Hougaard P. Chemical stability of insulin. 2. Formation of higher molecular weight transformation products during storage of pharmaceutical preparations. *Pharm Res.* juin 1992;9(6):727-34.
373. Hjorth CF, Hubálek F, Andersson J, Poulsen C, Otzen D, Naver H. Purification and Identification of High Molecular Weight Products Formed During Storage of Neutral Formulation of Human Insulin. *Pharm Res.* 14 janv 2015;
374. Abdel-Wahab YH, O'Harte FP, Ratcliff H, McClenaghan NH, Barnett CR, Flatt PR. Glycation of insulin in the islets of Langerhans of normal and diabetic animals. *Diabetes.* nov 1996;45(11):1489-96.
375. Abdel-Wahab YH, O'Harte FP, Boyd AC, Barnett CR, Flatt PR. Glycation of insulin

- results in reduced biological activity in mice. *Acta Diabetol.* déc 1997;34(4):265-70.
376. Monographie de produit - Lévémir - Canada. 2017.
377. Hubert P, Nguyen-Huu J-J, Boulanger B, Chapuzet E, Chiap P, Cohen N, Compagnon P-A, Dewé W, Feinberg M, Lallier M, Laurentie M, Mercier N, Muzard G, Nivet C, Valat L, Rozet E. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures. A SFSTP proposal--part II. *J Pharm Biomed Anal.* 21 sept 2007;45(1):70-81.
378. Zhu X, Liu J, Wu J, Cao R, Li T. Pharmacokinetic study of HS061, a new human insulin, in non-diabetic rat using ultra performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B.* 15 sept 2014;967:50-6.
379. Hunter SJ, Boyd AC, O'Harte FPM, McKillop AM, Wiggam MI, Mooney MH, McCluskey JT, Lindsay JR, Ennis CN, Gamble R, Sheridan B, Barnett CR, McNulty H, Bell PM, Flatt PR. Demonstration of Glycated Insulin in Human Diabetic Plasma and Decreased Biological Activity Assessed by Euglycemic-Hyperinsulinemic Clamp Technique in Humans. *Diabetes.* 2 janv 2003;52(2):492-8.
380. Dolhofer R, Wieland OH. Preparation and biological properties of glycosylated insulin. *FEBS Lett.* 1 avr 1979;100(1):133-6.
381. Boyd AC, Abdel-Wahab YHA, McKillop AM, McNulty H, Barnett CR, O'Harte FPM, Flatt PR. Impaired ability of glycated insulin to regulate plasma glucose and stimulate glucose transport and metabolism in mouse abdominal muscle. *Biochim Biophys Acta BBA - Gen Subj.* 1 sept 2000;1523(1):128-34.
382. Lapolla A, Tessari P, Poli T, Valerio A, Duner E, Iori E, Fedele D, Crepaldi G. Reduced in vivo biological activity of in vitro glycosylated insulin. *Diabetes.* juin 1988;37(6):787-91.
383. O'Harte FPM, Højrup P, Barnett CR, Flatt PR. Identification of the site of glycation of human insulin. *Peptides.* 1996;17(8):1323-30.
384. Guedes S, Vitorino R, Domingues MRM, Amado F, Domingues P. Mass Spectrometry Characterization of the Glycation Sites of Bovine Insulin by Tandem Mass Spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom.* juill 2009;20(7):1319-26.
385. Amaya J, Lee TC, Chichester CO. Biological inactivation of proteins by the Maillard reaction. Effect of mild heat on the tertiary structure of insulin. *J Agric Food Chem.* juin 1976;24(3):465-7.
386. Soboleva A, Vikhnina M, Grishina T, Frolov A. Probing Protein Glycation by Chromatography and Mass Spectrometry: Analysis of Glycation Adducts. *Int J Mol Sci.* 28 nov 2017;18(12).
387. Horvat S, Jakas A. Peptide and amino acid glycation: new insights into the Maillard reaction. *J Pept Sci Off Publ Eur Pept Soc.* mars 2004;10(3):119-37.
388. Guedes S, Vitorino R, Domingues MRM, Amado F, Domingues P. Oxidative modifications in glycated insulin. *Anal Bioanal Chem.* juill 2010;397(5):1985-95.
389. Alavi P, Yousefi R, Amirghofran S, Karbalaeei-Heidari HR, Moosavi-Movahedi AA. Structural analysis and aggregation propensity of reduced and nonreduced glycated insulin adducts. *Appl Biochem Biotechnol.* juin 2013;170(3):623-38.
390. O'Harte FPM, Boyd AC, McKillop AM, Abdel-Wahab YHA, McNulty H, Barnett CR, Conlon JM, Højrup P, Flatt PR. Structure, antihyperglycemic activity and cellular actions of a novel diglycated human insulin. *Peptides.* oct 2000;21(10):1519-26.
391. Farah MA, Bose S, Lee J-H, Jung H-C, Kim Y. Analysis of glycated insulin by MALDI-TOF mass spectrometry. *Biochim Biophys Acta BBA - Gen Subj.* 10 oct 2005;1725(3):269-82.
392. Boyd AC, Abdel-Wahab YHA, McKillop AM, McNulty H, Barnett CR, O'Harte FPM,

- Flatt PR. Impaired ability of glycated insulin to regulate plasma glucose and stimulate glucose transport and metabolism in mouse abdominal muscle. *Biochim Biophys Acta BBA - Gen Subj.* 1 sept 2000;1523(1):128-34.
393. Higgins PJ, Bunn HF. Kinetic analysis of the nonenzymatic glycosylation of hemoglobin. *J Biol Chem.* 25 mai 1981;256(10):5204-8.
394. Flückiger R, Gallop PM. Measurement of nonenzymatic protein glycosylation. *Methods Enzymol.* 1984;106:77-87.
395. McKillop AM, Meade A, Flatt PR, O'Harte FPM. Evaluation of the site(s) of glycation in human proinsulin by ion-trap LCQ electrospray ionization mass spectrometry. *Regul Pept.* 15 mai 2003;113(1-3):1-8.
396. Pullen RA, Lindsay DG, Wood SP, Tickle IJ, Blundell TL, Wollmer A, Krail G, Brandenburg D, Zahn H, Gliemann J, Gammeltoft S. Receptor-binding region of insulin. *Nature.* 5 févr 1976;259(5542):369-73.
397. Brange J, Langkjoer L. Insulin structure and stability. *Pharm Biotechnol.* 1993;5:315-50.
398. Baudys M, Uchio T, Mix D, Wilson D, Kim SW. Physical stabilization of insulin by glycosylation. *J Pharm Sci.* janv 1995;84(1):28-33.
399. Märki F, Albrecht W. Biological activity of synthetic human insulin. *Diabetologia.* août 1977;13(4):293-5.
400. U.S. Pharmacopeia, Insulin assays, Chapter 121 (2015).
401. European Pharmacopeia Commission, Intitulé « Analyse statistique des résultats des dosages et essais biologiques » 5.1.5 Double essai croisé.
402. Remillard RL. Parenteral Nutrition Support in Rabbits and Ferrets. *J Exot Pet Med.* oct 2006;15(4):248-54.
403. Kuwahara T, Asanami S, Kubo S. Experimental infusion phlebitis: tolerance osmolality of peripheral venous endothelial cells. *Nutr Burbank Los Angel Cty Calif.* juin 1998;14(6):496-501.
404. Demircan M, Gurunluoglu K, Karaman A, Mizrak B. Damaging Effects of Total Parenteral Nutrition Formula on Vascular Endothelium. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* oct 2015;61(4):464-8.
405. DeFronzo RA, Tobin JD, Andres R. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol.* sept 1979;237(3):E214-223.
406. Bouché C, Fetita L-S, Gautier J-F. Comment évaluer la sensibilité à l'insuline chez l'homme?: How to assess insulin sensitivity in humans? *Médecine Mal Métaboliques.* juin 2009;3(3):287-93.
407. Muniyappa R, Lee S, Chen H, Quon MJ. Current approaches for assessing insulin sensitivity and resistance in vivo: advantages, limitations, and appropriate usage. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* janv 2008;294(1):E15-26.
408. Georgiev IP, Kanelov IN, Georgieva TM, Ivanov V, Dimitrova S, Iliev Y, Nikolov J, Lazarov L, Roussenov A. Evaluation of insulin resistance in obese castrated New Zealand white rabbits. *Rev Méd Vét.* 2009;6.
409. Peitl B, Németh J, Pankucsi C, Szilvássy Z. Insulin sensitization induced by oral cicletanine in conscious rabbits. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* sept 2006;373(6):429-39.
410. Lin S, Chien YW. A new bioassay for insulin in conscious rabbits by continuous measurement of glycemic responses. *J Pharm Sci.* juin 1995;84(6):742-9.
411. Waldhäusl WK, Bratusch-Marrain PR, Vierhapper H, Nowotny P. Insulin pharmacokinetics following continuous infusion and bolus injection of regular porcine and human insulin in healthy man. *Metabolism.* mai 1983;32(5):478-86.

412. Chevenne D, Letailleur A, Trivin F, Porquet D. Effect of hemolysis on the concentration of insulin in serum determined by RIA and IRMA. *Clin Chem.* févr 1998;44(2):354-6.
413. Ziegler M, Michael R, Hommel H, Klatt D. The Interference of Hemolysis on Radioimmunoassay of Insulin and its Prevention by Pre-Incubation with Anti-Insulin Serum. *J Clin Endocrinol Metab.* 1 août 1972;35(2):317-8.
414. Raisky F, Gauthier C, Marchal A, Blum D. Haemolyzed samples: responsibility of short catheters. *Ann Biol Clin (Paris).* 1994;52(7-8):523-7.
415. Sapin R, Ongagna JC, Gasser F, Grucker D. Insulin measurements in haemolysed serum: influence of insulinase inhibitors. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem.* 8 juin 1998;274(1):111-7.
416. Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res Acad Sci Bohemoslov.* 2001;50(6):537-46.
417. Katsumata K, Katsumata K, Katsumata Y. Protective effect of diltiazem hydrochloride on the occurrence of alloxan- or streptozotocin-induced diabetes in rats. *Horm Metab Res Horm Stoffwechselforschung Horm Métabolisme.* nov 1992;24(11):508-10.
418. Derde S, Vanhorebeek I, Güiza F, Derese I, Gunst J, Fahrenkrog B, Martinet W, Vervenne H, Ververs E-J, Larsson L, Van den Berghe G. Early parenteral nutrition evokes a phenotype of autophagy deficiency in liver and skeletal muscle of critically ill rabbits. *Endocrinology.* mai 2012;153(5):2267-76.
419. Hou C-J, Liu J-L, Li X, Bi L-J. Insulin promotes bone formation in augmented maxillary sinus in diabetic rabbits. *Int J Oral Maxillofac Surg.* mars 2012;41(3):400-7.

## Annexes

---

### Annexe A: Compositions des spécialités pharmaceutiques

#### ➤ Insuline

##### ○ *Umuline rapide*<sup>®</sup>

- Présentation : Flacon 10 ml (100 UI/ml) :

UMULINE RAPIDE 100 UI/ml, solution injectable en flacon

UMULINE RAPIDE est une solution aqueuse stérile, limpide et incolore d'insuline humaine.

1 ml contient : 100 UI d'insuline humaine (produite dans *Escherichia coli* par la technique de l'ADN recombinant).

- Composition :

Un flacon contient 10 ml correspondant à 1000 UI d'insuline soluble.

*Excipients* : métacrésol, glycérol, eau pour préparations injectables. Peuvent être utilisés pour ajuster le pH : acide chlorhydrique et/ou hydroxyde de sodium.

- Posologie et mode d'administration :

La posologie est déterminée par le médecin, selon les besoins du patient.

UMULINE RAPIDE, UMULINE NPH/NPH KWIKPEN et UMULINE PROFIL 30/PROFIL 30 KWIKPEN doivent être injectées par voie sous-cutanée, mais peuvent également, bien que cela ne soit pas recommandé, être injectées par voie intramusculaire. UMULINE RAPIDE peut également être administré par voie intraveineuse.

➤ Spécialités entrant dans le mélange de nutrition parentérale

○ *OlimeI® N7E*

**1. DENOMINATION DU MEDICAMENT ↴**

OLIMEL N7E, émulsion pour perfusion

**2. COMPOSITION QUALITATIVE ET QUANTITATIVE ↴**

OLIMEL N7E, émulsion pour perfusion, se présente sous la forme d'une poche à 3 compartiments. Chaque poche contient une solution glucidique avec du calcium, une émulsion lipidique et une solution d'acides aminés avec d'autres électrolytes:

	Contenu par poche		
	1 000 mL	1 500 mL	2 000 mL
Solution de glucose à 35 % (correspondant à 35 g/100 mL)	400 mL	600 mL	800 mL
Solution d'acides aminés à 11,1 % (correspondant à 11,1 g/100 mL)	400 mL	600 mL	800 mL
Emulsion lipidique à 20 % (correspondant à 20 g/100 mL)	200 mL	300 mL	400 mL

Composition de l'émulsion reconstituée, après mélange des contenus des 3 compartiments :

Substances actives	1 000 mL	1 500 mL	2 000 mL
Huile d'olive raffinée + huile de soja raffinée <sup>a</sup>	40,00 g	60,00 g	80,00 g
Alanine	6,41 g	9,61 g	12,82 g
Arginine	4,34 g	6,51 g	8,68 g
Acide aspartique	1,28 g	1,92 g	2,56 g
Acide glutamique	2,21 g	3,32 g	4,42 g
Glycine	3,07 g	4,60 g	6,14 g
Histidine	2,64 g	3,97 g	5,29 g
Isoleucine	2,21 g	3,32 g	4,42 g
Leucine	3,07 g	4,60 g	6,14 g
Lysine (sous forme d'acétate de lysine)	3,48 g (4,88 g)	5,23 g (7,31 g)	6,97 g (9,75 g)
Méthionine	2,21 g	3,32 g	4,42 g
Phénylalanine	3,07 g	4,60 g	6,14 g
Proline	2,64 g	3,97 g	5,29 g
Sérine	1,75 g	2,62 g	3,50 g
Thréonine	2,21 g	3,32 g	4,42 g
Tryptophane	0,74 g	1,10 g	1,47 g
Tyrosine	0,11 g	0,17 g	0,22 g
Valine	2,83 g	4,25 g	5,66 g
Acétate de sodium, trihydraté	1,50 g	2,24 g	2,99 g
Glycérophosphate de sodium hydraté	3,67 g	5,51 g	7,34 g
Chlorure de potassium	2,24 g	3,35 g	4,47 g
Chlorure de magnésium, hexahydraté	0,81 g	1,22 g	1,62 g
Chlorure de calcium, dihydraté	0,52 g	0,77 g	1,03 g
Glucose anhydre (sous forme de glucose monohydraté)	140,00 g (154,00 g)	210,00 g (231,00 g)	280,00 g (308,00 g)

<sup>a</sup> : Mélange d'huile d'olive raffinée (environ 80 %) et d'huile de soja raffinée (environ 20 %) correspondant à un ratio acides gras essentiels / acides gras totaux de 20 %.

Apports nutritionnels de l'émulsion reconstituée pour chaque volume de poche :

	1 000 mL	1 500 mL	2 000 mL
Lipides	40 g	60 g	80 g
Acides aminés	44,3 g	66,4 g	88,6 g
Azote	7,0 g	10,5 g	14,0 g
Glucose	140,0 g	210,0 g	280,0 g
Energie:			
Calories totales env.	1 140 kcal	1 710 kcal	2 270 kcal
Calories non protéiques	960 kcal	1 440 kcal	1 920 kcal
Calories glucidiques	560 kcal	840 kcal	1 120 kcal
Calories lipidiques <sup>a</sup>	400 kcal	600 kcal	800 kcal
Ratio calories non protéiques / azote	137 kcal/g	137 kcal/g	137 kcal/g
Ratio calories glucidiques / lipidiques	58/42	58/42	58/42
Ratio calories lipidiques / calories totales	35 %	35 %	35 %
Electrolytes:			
Sodium	35,0 mmol	52,5 mmol	70,0 mmol
Potassium	30,0 mmol	45,0 mmol	60,0 mmol
Magnésium	4,0 mmol	6,0 mmol	8,0 mmol
Calcium	3,5 mmol	5,3 mmol	7,0 mmol
Phosphate <sup>b</sup>	15,0 mmol	22,5 mmol	30,0 mmol
Acétate	45 mmol	67 mmol	89 mmol
Chlorure	45 mmol	68 mmol	90 mmol
pH	6,4	6,4	6,4
Osmolarité	1 360 mosm/L	1 360 mosm/L	1 360 mosm/L

<sup>a</sup> : Inclut les calories des phosphatides d'œuf purifié

<sup>b</sup> : Inclut les phosphates apportés par l'émulsion lipidique

### 3. FORME PHARMACEUTIQUE ↴

Après reconstitution :

Emulsion pour perfusion.

Aspect avant reconstitution :

- les solutions d'acides aminés et de glucose sont claires, incolores ou légèrement jaunes;
- l'émulsion lipidique est homogène et d'aspect laiteux.

### Supplémentations

La capacité de la poche est suffisante pour permettre des suppléments tels que des vitamines, des électrolytes et des oligo-éléments.

Toute supplémentation (y compris de vitamines) peut être faite dans le mélange reconstitué (après ouverture des soudures non permanentes et mélange du contenu des trois compartiments).

Des vitamines peuvent également être ajoutées au compartiment de glucose avant reconstitution du mélange (avant rupture des soudures non permanentes et mélange des trois compartiments).

Pour les suppléments aux formules contenant des électrolytes, les électrolytes déjà présents dans la poche doivent être pris en compte.

Les suppléments doivent se faire dans des conditions d'asepsie et par un personnel qualifié.

Des électrolytes peuvent être ajoutés à OLIMEL N7E, dans les limites du tableau ci-dessous :

	Pour 1 000 mL		
	Quantité présente	Addition supplémentaire maximale	Quantité totale maximale
Sodium	35 mmol	115 mmol	150 mmol
Potassium	30 mmol	120 mmol	150 mmol
Magnésium	4,0 mmol	1,6 mmol	5,6 mmol
Calcium	3,5 mmol	1,5 (0,0 <sup>a</sup> ) mmol	5,0 (3,5 <sup>a</sup> ) mmol
Phosphate inorganique	0 mmol	3,0 mmol	3,0 mmol
Phosphate organique	15 mmol <sup>b</sup>	10 mmol	25 mmol <sup>b</sup>

<sup>a</sup> : Valeur correspondant à l'ajout de phosphate inorganique

<sup>b</sup> : Inclut les phosphates provenant de l'émulsion lipidique

#### *Oligo-éléments et vitamines:*

La stabilité a été démontrée avec les préparations de vitamines et d'oligoéléments disponibles dans le commerce (contenant 1 mg de fer maximum).

La compatibilité pour d'autres suppléments est disponible sur demande.

En cas de supplémentation, l'osmolarité finale du mélange doit être mesurée avant administration par une veine périphérique.

Pour effectuer une supplémentation :

- Respecter les conditions d'asepsie,
- Préparer le site d'injection de la poche,
- Ponctionner le site d'injection et injecter les additifs à l'aide d'une aiguille pour injection ou d'un dispositif de reconstitution,
- Mélanger le contenu de la poche et les additifs.

### 4.5. Interactions avec d'autres médicaments et autres formes d'interactions ↴

#### Aucune étude d'interaction n'a été réalisée.

OLIMEL N7E ne doit pas être administré simultanément avec une transfusion sanguine par la même tubulure de perfusion en raison du risque de pseudo-agglutination.

Les lipides contenus dans cette émulsion peuvent interférer avec les résultats de certains examens de laboratoire (par exemple, bilirubine, lactate déshydrogénase, saturation du sang en oxygène, hémoglobine sanguine) si le prélèvement sanguin a été réalisé avant l'élimination des lipides (ceux-ci sont normalement éliminés après 5 à 6 heures sans apport de lipides).

Des précipités de ceftriaxone-calcium peuvent se former si la ceftriaxone est mélangée avec des solutions contenant du calcium dans la même ligne d'administration intraveineuse. La ceftriaxone ne doit pas être mélangée ni administrée simultanément par voie intraveineuse avec des solutions contenant du calcium, comme OLIMEL N7E, par la même ligne de perfusion (ex., raccord en Y). Néanmoins, la ceftriaxone et des solutions contenant du calcium peuvent être administrées séquentiellement, l'une après l'autre, si les lignes de perfusion sont minutieusement rincées entre les perfusions avec un liquide compatible (voir rubriques 4.4 et 6.2).

OLIMEL N7E contient de la vitamine K, naturellement présente dans les émulsions lipidiques. La teneur en vitamine K dans les posologies recommandées d'OLIMEL N7E ne devrait pas influencer les effets des dérivés de la coumarine.

En raison de la teneur en potassium d'OLIMEL N7E, une attention particulière doit être observée chez les patients traités par des diurétiques d'épargne potassique (par exemple, amiloride, spironolactone, triamterène), des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (IEC), des antagonistes du récepteur de l'angiotensine II ou les immunosuppresseurs tacrolimus ou ciclosporine en raison du risque d'hyperkaliémie.

## 6. DONNEES PHARMACEUTIQUES ↴

### 6.1. Liste des excipients ↴

#### Compartiment de l'émulsion lipidique:

Phosphatides d'œuf purifié, glycérol, oléate de sodium, hydroxyde de sodium (pour ajustement du pH), eau pour préparations injectables.

#### Compartiment de la solution d'acides aminés avec des électrolytes:

Acide acétique glacial (pour ajustement du pH), eau pour préparations injectables.

#### Compartiment de la solution de glucose avec du calcium:

Acide chlorhydrique (pour ajustement du pH), eau pour préparations injectables.

### 6.2. Incompatibilités ↴

Ne pas ajouter d'autres médicaments ou substances à tout composant de la poche ou à l'émulsion reconstituée sans vérifier préalablement leur compatibilité et la stabilité de la préparation obtenue (notamment la stabilité de l'émulsion lipidique).

Des incompatibilités peuvent se produire par exemple avec une acidité excessive (pH faible) ou une teneur non appropriée en cations divalents ( $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$ ), ce qui peut déstabiliser l'émulsion lipidique.

Comme avec tous les mélanges pour nutrition parentérale, il convient de tenir compte des taux de calcium et de phosphate. Un ajout excessif de calcium et de phosphate, en particulier sous forme de sels minéraux, peut entraîner la formation de précipités de phosphate de calcium.

OLIMEL N7E contient des ions calcium qui constituent un risque supplémentaire de coagulation en cas de précipitation dans du sang ou des composants sanguins contenant un agent conservateur/anticoagulant du type citrate.

La ceftriaxone ne doit pas être mélangée ni administrée simultanément par voie intraveineuse avec des solutions contenant du calcium, comme OLIMEL N7E, à l'aide de la même ligne de perfusion (ex., raccord en Y) en raison du risque de précipitation entre le sel de calcium et la ceftriaxone (voir rubriques 4.4 et 4.5).

En raison du risque de précipitation, OLIMEL N7E ne doit pas être administré par la même ligne de perfusion que l'ampicilline ou la fosphénytoïne ni mélangé à ces deux produits.

Vérifier la compatibilité avec les solutions administrées simultanément par le même set d'administration, cathéter ou canule.

Ne pas administrer avant, pendant ou après une transfusion sanguine en utilisant le même équipement en raison du risque de pseudo-agglutination.

### 6.3. Durée de conservation ↴

2 ans si le suremballage est intact.

#### Après reconstitution:

Il est recommandé d'utiliser le produit immédiatement après ouverture des soudures non permanentes situées entre les 3 compartiments. Toutefois, une fois reconstituée, la stabilité de l'émulsion a été démontrée pendant 7 jours (entre 2°C et 8°C), suivis de 48 heures à une température ne dépassant pas 25°C.

#### Après ajout de suppléments (électrolytes, oligo-éléments et vitamines, voir rubrique 6.6):

Pour des mélanges spécifiques, la stabilité en cours d'utilisation a été démontrée pendant 7 jours (entre 2°C et 8°C), suivis de 48 heures à une température ne dépassant pas 25°C.

Toutefois, du point de vue microbiologique, le produit après mélange doit être utilisé immédiatement. En cas d'utilisation non immédiate, les durées et conditions de conservation, après mélange et avant utilisation, relèvent de la seule responsabilité de l'utilisateur et ne devraient pas dépasser 24 heures à une température comprise entre 2°C et 8°C, sauf si l'addition de suppléments a été réalisée en conditions d'asepsie dûment contrôlées et validées.

○ Cernevit®

CERNEVIT, poudre pour solution injectable ou pour perfusion

**2. COMPOSITION QUALITATIVE ET QUANTITATIVE ↗**

1 flacon (5 mL) contient :

Rétinol (Vitamine A) .....	3500 UI
sous forme de palmitate de rétinol	
Cholécalciférol (Vitamine D3).....	220 UI
Alpha-tocophérol (Vitamine E).....	11,200 UI
quantité correspondant à DL alpha-tocophérol.....	10,200 mg
Acide ascorbique (Vitamine C).....	125,000 mg
Thiamine (Vitamine B1) .....	3,510 mg
sous forme de Tétrahydrate de cocarboxylase.....	5,800 mg
Riboflavine (Vitamine B2) .....	4,140 mg
sous forme de phosphate sodique de riboflavine dihydraté.....	5,670 mg
Pyridoxine (Vitamine B6).....	4,530 mg
sous forme de chlorhydrate de pyridoxine.....	5,500 mg
Cyanocobalamine (Vitamine B12).....	0,006 mg
Acide folique (Vitamine B9).....	0,414 mg
Acide pantothénique (Vitamine B5).....	17,250 mg
sous forme de dexpanthénol.....	16,150 mg
<u>Biotine (Vitamine B8).....</u>	<u>0,069 mg</u>
Nicotinamide (Vitamine PP).....	46,000 mg

Pour la liste complète des excipients, voir rubrique 6.1.

**3. FORME PHARMACEUTIQUE ↗**

Poudre pour solution injectable ou pour perfusion.

Gâteau lyophilisé jaune orangé.

**4. DONNEES CLINIQUES ↗**

**4.1. Indications thérapeutiques ↗**

Supplémentation vitaminique injectable ou pour perfusion chez les patients recevant une nutrition parentérale.

Réservé à l'adulte et à l'enfant de plus de 11 ans.

○ Nutryelt®

**1. DENOMINATION DU MEDICAMENT ↗**

NUTRYELT, solution à diluer pour perfusion

**2. COMPOSITION QUALITATIVE ET QUANTITATIVE ↗**

Composition de NUTRYELT exprimée en quantité de sel par ampoule (10 ml) et par litre.

NUTRYELT	Quantités théoriques de matières premières sous forme anhydre	
	Pour 1 ampoule (µg/10 ml)	Pour 1 litre (mg)
Gluconate de zinc	69700	6970,0
Gluconate de cuivre	2142,4	214,24
Gluconate de manganèse	445,69	44,569
Fluorure de sodium	2099,5	209,95
Iodure de potassium	170,06	17,006
Selenite de sodium	153,32	15,332
Molybdate de sodium	42,93	4,293
Chlorure chromique	30,45	3,045
Gluconate ferreux	7988,2	798,82

Contenu d'une ampoule de 10 ml

	NUTRYELT	NUTRYELT
	Composition molaire (µmol / 10 ml)	Composition massique (µg / 10 ml)
Zn	153	10000
Cu	4,7	300
Mn	1,0	55
F	50	950
I	1,0	130
Se	0,9	70
Mo	0,21	20
Cr	0,19	10
Fe	18	1000

Pour la liste complète des excipients, voir rubrique 6.1

**3. FORME PHARMACEUTIQUE ↗**

Solution à diluer pour perfusion

Solution claire, limpide et légèrement jaune.

Densité 1.0

pH 2,6 - 3,2

Osmolalité 60-100 mosm/kg

Osmolarité 60-100 mosm/l

**4. DONNEES CLINIQUES ↗**

**4.1. Indications thérapeutiques ↗**

NUTRYELT est utilisé dans le cadre d'un protocole nutritionnel par voie intraveineuse pour couvrir les besoins de base ou modérément augmentés en oligo-éléments au cours de la nutrition parentérale.

## Annexe B : Dispositifs d'administration entrant dans le montage de perfusion

### ➤ Tubulure

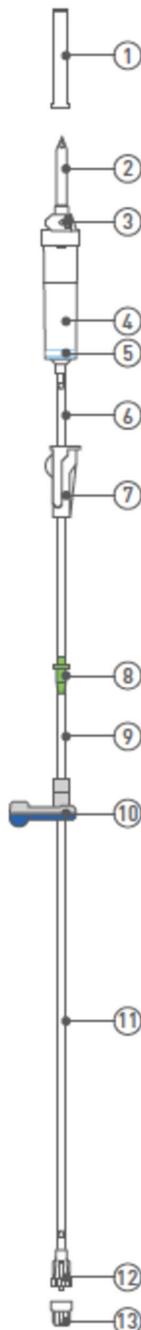
# VL ST00

ref. M46441000

ref. M46441000S (O-ring version)

Set for infusion,  
15 µm filter

To infuse fluid bags or bottles with Volumat Agilia / Volumat MC Agilia infusion pumps.



#### DESCRIPTION

1. Protective cap
2. Vented spike
3. Air inlet with antibacterial filter and air ventilation flap
4. Transparent drip chamber
5. 15 µm filter
6. PVC tubing (DEHP-free): diameter 3 x 4.1 mm, length ~ 90 cm
7. Roller clamp
8. Green connector
9. Calibrated silicone pumping segment
10. Blue Safeclick: anti free-flow safety clamp
11. PVC tubing (DEHP-free): diameter 3 x 4.1 mm, length ~ 165 cm
12. Male luer lock
13. Protective cap

Approximate length: 285 cm  
Approximate priming volume: 25 mL  
Main materials: PVC, silicone  
**DEHP-free, latex-free**

#### PACKAGING

- Case quantity: 70 units (14x5).
- Pallet of 2240 sets.

#### TYPICAL APPLICATIONS

- Infusion of drugs / fluids
  - having no particular filtration requirements
  - available in bags or bottles
  - having no particular incompatibility.
- Can be used for Parenteral nutrition.

#### NOT TO BE USED FOR / IN

- Blood cells.
- Infusion of drugs known to be incompatible with PVC (e.g trinitrine, isosorbide dinitrate, sodium nitroprussiate...).
- Light sensitive drugs (unless other precautions are taken to protect the drug against direct light).
- Primary / secondary mode with Volumat MC Agilia.

➤ Filtre



## Lipipor™ TNA2E Filter for Parenteral Nutrition (EU)

### Patient Protection

- **Air:** preventing embolism by position - independent air elimination
- **Particles:** protecting the circulatory system against the undesirable effects of particulate contamination in peripheral and central venous infusions
- **Enlarged lipid droplets:** significantly reducing the number of enlarged droplets (>5 µm) in admixtures<sup>1</sup>
- **Microbes:** reducing the risk from inadvertently contaminated infusates, particularly with fungi of clinical importance

[Read More](#)

### Technical Specification

Filter Medium	Low protein binding 1.2 µm polyethersulfone Supor® membrane
Retention of <i>Candida albicans</i>	100% removal of a total challenge of up to 10 <sup>4</sup> for 24 h <sup>9,11</sup>
Tubing Extensions	Non-phthalate PVC, 3mm ID
Hold up Volume (Filter housing + extension tubings)	12 mL (approximately)
Maximum Recommended Flow Rate	
a. Pumped	500 mL/hr*
b. Under gravity	500 mL/hr*
Maximum Working Pressure	2 bar (30 psi)
Luer Lock Connectors (in accordance with ISO 594-2: 1998)	Female inlet Male Outlet
Sterilization Method	Gamma irradiation
Usage	Single patient use. Change at 24 h. Where aseptically attached in an aseptic environment to a single infusion system and container of infusate that are intended for 2 days continuous pumped infusion, the filter may be used for up to 48 h.

**Annexe C** : Test de Wilcoxon de comparaison de l'évolution de la concentration en insuline dans le MNP en fonction de la nature du contenant

Echantillon	Insuline	Concentration théorique	Concentrations moyennes obtenues							
			H0	H1	H2	H4	H6	H8	H14	H20
Fiole 1	Umuline	100	95,79	90,80	86,70	78,89	74,62	67,02	75,21	70,19
Fiole 2	Umuline	100	94,62	93,08	88,98	80,14	76,54	75,50	68,68	x
Fiole 3	Umuline	100	97,28	93,42	89,44	82,89	73,97	75,07	70,05	67,81
Poche 1	Umuline	100	88,80	86,80	83,69	73,19	67,31	66,82	67,35	64,48
Poche 2	Umuline	100	94,20	89,37	82,83	71,99	69,04	63,74	68,97	x
Poche 3	Umuline	100	90,38	89,18	82,93	74,04	68,61	67,08	68,61	62,96
<b>p (significativité)</b>			<b>p=0,181</b>	<b>p=0,181</b>	<b>p=0,181</b>	<b>p=0,181</b>	<b>p=0,181</b>	<b>p=0,181</b>	<b>p=0,483</b>	<b>p=0,371</b>

## **DEMANDE D'AUTORISATION DE PROJET UTILISANT DES ANIMAUX A DES FINS SCIENTIFIQUES**

**Ce formulaire a pour objectif de rassembler les informations permettant au comité d'éthique dont relève l'établissement utilisateur où sera réalisé le projet utilisant des animaux à des fins scientifiques, d'évaluer éthiquement le projet et au Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche d'autoriser le projet suite à l'évaluation éthique.**

**Le fichier de ce formulaire ainsi que la notice d'aide pour le renseigner peuvent être demandés à : [autorisation-projet@recherche.gouv.fr](mailto:autorisation-projet@recherche.gouv.fr)**

**Le projet est défini comme un programme de travail répondant à un objectif scientifique défini, utilisant un ou plusieurs modèles animaux et impliquant une ou plusieurs procédures expérimentales (article R-214-89 du Code rural et de la pêche maritime).**

**Le formulaire renseigné sera envoyé par lettre recommandée avec accusé de réception à l'adresse suivante :  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche – Direction Générale pour la Recherche et l'Innovation – Secrétariat « Autorisation de projet » - 1, rue Descartes, 75231 PARIS cedex 5**

**N.B. A l'exception des duplications des blocs permises et repérées par ■■■, aucune modification des items de ce formulaire ne doit être effectuée.**

### **1. INFORMATIONS GÉNÉRALES**

#### **1.1. TITRE DU PROJET :**

Evaluation de l'administration d'insuline humaine après ajout direct dans un mélange de nutrition parentérale ternaire.

#### **1.2. Durée du projet :**

5 ans

#### **1.3. Date prévue de début du projet :**

01/01/2017

## 2. RÉSUMÉ NON TECHNIQUE

La dénutrition est un facteur de risque d'augmentation de la morbi-mortalité et de prolongation de la durée d'hospitalisation, quelle que soit la catégorie de patients. Par conséquent, elle doit faire partie intégrante de la prise en charge thérapeutique de ces derniers. Le recours à la nutrition parentérale est obligatoire lorsque la voie entérale est contre-indiquée ou insuffisante, cependant, l'administration de nutrition parentérale provoque très fréquemment des hyperglycémies pouvant être délétères et nécessitant la mise en place d'un traitement hypoglycémiant par insulinothérapie, y compris chez des patients non diabétiques. L'ajout d'insuline dans les poches de nutrition parentérale n'est recommandé par les sociétés savantes de nutrition entérale et parentérale, que si sa stabilité ainsi que celle du mélange de nutrition parentérale ont été respectivement démontrées. La présente étude s'inscrit dans cette situation. L'objectif principal est de mettre en évidence la perte ou le maintien de l'activité biologique hypoglycémiante de l'insuline après son ajout dans un mélange de nutrition parentérale ternaire supplémenté en vitamines et oligo-éléments. Cette étude s'appuiera sur des données d'expérimentation animale menée chez le lapin. La règle des 3R est respectée dans notre protocole. Le nombre d'animaux nécessaire sera de 12 afin de garantir une puissance statistique suffisante tout en limitant le nombre d'animaux. Aucune solution *in vitro* ne saurait remplacer l'emploi d'animaux. Les lapins se verront administrer au moyen d'une pompe spécifique, un mélange de nutrition parentérale ternaire (composé de glucides, acides aminés et lipides, les trois macronutriments indispensables) enrichi en vitamines et oligo-éléments. Ce dernier sera supplémenté par un ajout d'insuline humaine recombinante. L'administration de la nutrition parentérale ainsi que les prélèvements seront facilités par l'emploi d'un cathéter de dimension adaptée. Des prélèvements sanguins destinés à la réalisation d'une cinétique seront effectués au niveau de la veine marginale de l'oreille des animaux. Des dosages glycémiques et insulinémiques seront réalisés à partir de ces prélèvements au moyen de méthodes immunométriques validées dans un milieu sérique. Une seconde partie du protocole consistera à mener cette même étude sur les animaux rendus diabétiques afin de s'affranchir de leur propre sécrétion d'insuline. Cela permettra de déterminer la réactivité croisée des kits immunométriques de dosage de l'insuline, vis à vis de l'insuline de lapin et de conforter les résultats de la première partie du protocole. La réutilisation des animaux du premier protocole permet de réduire le nombre total d'animaux employés. Les animaux seront mis à jeun dans les 6 heures précédant les expériences, afin de limiter leur inconfort durant la période de 2 heures de perfusion de la nutrition parentérale. En dehors des périodes d'expérimentation, ils bénéficieront de nourriture et d'hydratation *ad libitum*, ainsi que d'un cycle jour/nuit de 12h/12h, au sein d'une animalerie agréée, dont l'autorité de tutelle a signé la Charte nationale portant sur l'éthique de l'expérimentation animale. Seule la douleur infligée lors de la pose du cathéter est envisagée et celle-ci se verra atténuée au moyen de l'emploi d'une crème anesthésiante. Les animaux seront hébergés par

binôme au sein de l'animalerie avec une maîtrise des températures et un enrichissement dans les cages. Des points limites (perte de poids supérieure à 20% en deux semaines, signes d'insuffisance cardiaque post administration...) seront appliqués.

### **3. INFORMATIONS ADMINISTRATIVES ET RÉGLEMENTAIRES**

#### **3.1. L'établissement utilisateur (EU)**

##### **3.1.1. Agrément de l'EU où seront utilisés les animaux :**

- Nom : Laboratoire de Pharmacologie, Faculté de Pharmacie, Université Lille 2
- Numéro d'agrément : D 59-35008
- Date de délivrance de l'agrément : 15 juin 2016
- Nom et prénom du responsable : M. le Professeur Bernard GRESSIER
- Adresse électronique du responsable :bernard.gressier@univ-lille2.fr
- Nom et prénom de la personne délégataire du responsable présente dans l'EU : M. KAMBIA Nicolas
- Adresse électronique de ce délégataire : nicolas.kambia@univ-lille2.fr

##### **3.1.2. Comité d'éthique agréé par le MESR dont relève l'EU :**

C2EA-75 Comité d'éthique d'expérimentation animale en Nord-Pas de Calais

##### **3.1.3. Responsable(s) de la mise en œuvre générale du projet dans l'EU et de sa conformité à l'autorisation de projet :**

Nombre de responsables :

2

Responsable : (niveau 1 DUEC expérimentation animale)

- Nom et prénom : KAMBIA Nicolas
- Adresse postale (avec le nom du laboratoire) : Laboratoire de Pharmacologie, Faculté de Pharmacie, 3 rue du Professeur Laguesse, BP 83, 59006 Lille cedex
- Adresse électronique : nicolas.kambia@univ-lille2.fr
- Téléphone : 03.20.96.49.67

Responsable : (niveau 1 DUEC expérimentation animale)

- Nom et prénom : HENRY Héloïse
- Adresse postale (avec le nom du laboratoire) : Laboratoire de Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière, Faculté de Pharmacie, 3 rue du Professeur Laguesse, BP 83, 59006 Lille cedex
- Adresse électronique : heloise.henry@univ-lille2.fr
- Téléphone : 06.21.92.58.26

### 3.1.4. Responsable(s) du bien-être des animaux :

Nombre de responsables :

1

Responsable :

- Nom et prénom : KAMBIA Nicolas
- Adresse postale (avec le nom du laboratoire) :
- Adresse électronique : nicolas.kambia@univ-lille2.fr
- Téléphone : 03.20.96.49.67

...

## 3.2. Le personnel

### - Compétences des personnes participant au projet :

- |   |         |
|---|---------|
| ▪ la conception des procédures expérimentales et des projets<br>non | Ⓐ oui ○ |
| ▪ l'application de procédures expérimentales aux animaux<br>non     | Ⓐ oui ○ |
| ▪ les soins aux animaux<br>non                                      | Ⓐ oui ○ |
| ▪ la mise à mort des animaux<br>non                                 | Ⓐ oui ○ |

## 3.3. Le projet

### 3.3.1. L'objectif du projet :

Est-il :

- justifié du point de vue éducatif ? ○
- requis par la loi ? ○
- justifié du point de vue scientifique ? Ⓐ
- Informations sur cette justification :

Justification d'un point de vue scientifique : cette étude s'inscrit dans le cadre du traitement ou de la prophylaxie de la dénutrition chez l'homme. L'objectif est ici de déterminer les conditions de prise en charge de l'état d'hyperglycémie induit par la nutrition parentérale.

### **3.3.2. Description du projet :**

La dénutrition est un facteur de risque d'augmentation de la morbi-mortalité et de prolongation de la durée d'hospitalisation, quelle que soit la catégorie de patients. Dès lors que la voie entérale est contre-indiquée ou insuffisante, le recours à la voie parentérale est nécessaire. Cependant, l'administration de nutrition parentérale provoque très fréquemment des hyperglycémies pouvant être délétères et nécessitant la mise en place d'un traitement hypoglycémiant par insulinothérapie, y compris chez des patients non diabétiques. L'ajout d'insuline dans les poches de nutrition parentérale n'est recommandé par les sociétés savantes de nutrition entérale et parentérale, que si sa stabilité ainsi que celle du mélange de nutrition parentérale ont été respectivement démontrées. Or des essais *in vitro* préalables nous ont permis de mettre en évidence une diminution de la concentration en insuline dans le milieu au cours du temps, sans pouvoir conclure sur l'origine du phénomène. Ainsi, l'objectif principal est de mettre en évidence la perte ou le maintien de l'activité biologique hypoglycémiant de l'insuline après son ajout dans un mélange de nutrition parentérale ternaire supplémenté en vitamines et oligo-éléments. Le critère principal d'évaluation est l'évolution insulinémique et glycémique à la phase de plateau de perfusion. Les critères secondaires sont l'aire sous la courbe moyennée de l'insulinémie ou de la glycémie et l'ensemble des données incluses dans la cinétique. Cette étude *in vivo* s'appuiera sur des données d'expérimentation animale menée chez le lapin. Le nombre d'animaux nécessaire sera de 12 au minimum. Les lapins se verront administrer au moyen d'une pompe spécifique, un mélange de nutrition parentérale ternaire (composé de glucides, acides aminés et lipides, les trois macronutriments indispensables) supplémenté en vitamines et oligo-éléments. Ce mélange aura préalablement subi un ajout d'insuline humaine recombinante. L'administration de la nutrition parentérale ainsi que les prélèvements seront facilités par l'emploi d'un cathéter de dimension adaptée. Des prélèvements sanguins destinés à la réalisation d'une cinétique seront effectués au niveau de la veine marginale de l'oreille des animaux. Des dosages glycémiques et insulinémiques seront réalisés à partir de ces prélèvements au moyen de méthodes immunométriques validées dans un milieu sérique. Une seconde partie du protocole consistera à mener cette même étude sur les animaux rendus diabétiques afin de s'affranchir de leur propre sécrétion d'insuline. Cela permettra de déterminer la réactivité croisée des kits immunométriques de dosage de l'insuline, vis à vis de l'insuline de lapin et de conforter les résultats de la première partie du protocole. Les animaux seront mis à jeun dans les heures précédant les expériences, afin de limiter leur inconfort durant la période de 2 heures de perfusion de la nutrition parentérale. Le choix de la durée de perfusion s'appuie sur les résultats

observés lors de nos études *in vitro* (diminution d'environ 30% de la concentration en insuline dans le milieu au cours des 3 premières heures). En dehors des périodes d'expérimentation, ils bénéficieront de nourriture et d'hydratation *ad libitum*, ainsi que d'un cycle jour/nuit de 12h/12h, au sein d'une animalerie agréée, dont l'autorité de tutelle a signé la Charte nationale portant sur l'éthique de l'expérimentation animale. Seule la douleur infligée lors de la pose du cathéter est envisagée et celle-ci se verra atténuée au moyen de l'emploi d'une crème anesthésiante.

**3.3.3. Précisez, le cas échéant, la ou les méthodes de mise à mort prévue(s) :**

Surdose d'anesthésique, avec sédation préalable. Injection intraveineuse de pentobarbital sodique (Dolethal®) (1 mL/kg ; injection lente de la moitié de la dose, puis après installation de l'apnée, injection de la seconde moitié).

**3.3.4. Précisez, le cas échéant, les éléments scientifiques justifiant la demande de dérogation concernant la méthode de mise à mort envisagée :**

**3.3.5. Stratégie d'expérimentation ou d'observation et approche statistique utilisée afin de réduire au minimum le nombre d'animaux, la douleur, la souffrance et l'angoisse, infligées et l'impact environnemental, le cas échéant – si une étude statistique est prévue, indiquez et justifiez les tests choisis :**

Certains points limites détaillés au paragraphe 3.4.13. Seront appliquées. EN cas d'atteinte de l'un de ces points limites, le vétérinaire référent de la structure sera contacté et donnera la démarche à suivre. Au vu du faible nombre d'animaux et de la succession de 3 tests au sein de chaque procédure, les analyses statistiques seront basées sur une ANOVA en mesures répétées avec ajustement en première intention (à partir des valeurs d'insulinémie ou de glycémie observées au plateau de perfusion) ou sur les comparaisons d'aires sous la courbe moyennées en seconde intention. Le second protocole sur les animaux rendus diabétiques permettra de supprimer le biais possible rencontré avec la sécrétion insulinique endogène des animaux.

## **3.4. Les animaux**

**3.4.1. Justifiez la nécessité d'avoir recours à des animaux pour atteindre les objectifs du projet :**

L'objectif de ce projet de recherche est de permettre la mise en application d'une

pratique en services de soins, chez l'homme. Les méthodes de quantification de l'insuline dans le mélange de nutrition parentérale ternaire reposent sur le principe de reconnaissance de l'insuline par des couples d'anticorps (techniques dites « sandwich »), mais ces méthodes bien qu'ayant été validées, ne permettent en aucun cas d'apporter des informations sur le maintien, la modification ou la perte de l'activité biologique de l'insuline. Dès lors, des méthodes *in vivo* sont indispensables afin de conclure sur ce paramètre. Cependant, les études cliniques chez l'homme doivent être précédées d'études menées *in vivo* chez l'animal.

### 3.4.2. Espèces animales ou types d'animaux utilisés :

- |   |                                     |
|---|-------------------------------------|
| Souris ( <i>Mus musculus</i> )  | <input type="checkbox"/>            |
| Rats ( <i>Rattus norvegicus</i> )   | <input type="checkbox"/>            |
| Cobayes ( <i>Cavia porcellus</i> )  | <input type="checkbox"/>            |
| Hamsters (syriens) ( <i>Mesocricetus auratus</i> )  | <input type="checkbox"/>            |
| Hamsters (chinois) ( <i>Cricetulus griseus</i> )  | <input type="checkbox"/>            |
| Gerbilles de Mongolie ( <i>Meriones unguiculatus</i> )  | <input type="checkbox"/>            |
| Autres rongeurs ( <i>Rodentia</i> )   | <input type="checkbox"/>            |
| Lapins ( <i>Oryctolagus cuniculus</i> )   | <input checked="" type="checkbox"/> |
| Chats ( <i>Felis catus</i> )  | <input type="checkbox"/>            |
| Chiens ( <i>Canis familiaris</i> )  | <input type="checkbox"/>            |
| Furets ( <i>Mustela putorius furo</i> )   | <input type="checkbox"/>            |
| Autres carnivores ( <i>carnivora</i> )  | <input type="checkbox"/>            |
| Chevaux, ânes et croisements ( <i>Equidae</i> )   | <input type="checkbox"/>            |
| Porcs ( <i>Sus scrofa domesticus</i> )  | <input type="checkbox"/>            |
| Caprins ( <i>Capra aegagrus hircus</i> )  | <input type="checkbox"/>            |
| Ovins ( <i>Ovis aries</i> )   | <input type="checkbox"/>            |
| Bovins ( <i>Bos primigenius</i> )   | <input type="checkbox"/>            |
| Prosimiens ( <i>prosimia</i> )  | <input type="checkbox"/>            |
| Ouistitis et tamarins ( <i>par exemple, Callithrix jacchus</i> )                              | <input type="checkbox"/>            |
| Singe cynomolgus ( <i>Macaca fascicularis</i> )   | <input type="checkbox"/>            |
| Singe rhésus ( <i>Macaca mulatta</i> )  | <input type="checkbox"/>            |
| Vervets <i>chlorocebus</i> spp. (généralement soit <i>pygerythrus</i> , soit <i>sabaeus</i> ) | <input type="checkbox"/>            |
| Babouins ( <i>Papio</i> spp.)   | <input type="checkbox"/>            |
| Saimiris (par exemple, <i>Saimiri sciureus</i> )  | <input type="checkbox"/>            |

Autres espèces de primates non humains (autres espèces de <i>Ceboidea</i> et <i>Cercopithecoidea</i> )	<input type="checkbox"/>
Singes anthropoïdes ( <i>Hominoidea</i> )	<input type="checkbox"/>
Autres mammifères (autres <i>Mammalia</i> )	<input type="checkbox"/>
Poules domestiques ( <i>Gallus gallus domesticus</i> )	<input type="checkbox"/>
Autres oiseaux (autres <i>Aves</i> )	<input type="checkbox"/>
Reptiles ( <i>Reptilia</i> )	<input type="checkbox"/>
Grenouilles Rana ( <i>Rana temporaria</i> et <i>Rana pipiens</i> )	<input type="checkbox"/>
Grenouilles Xenopus ( <i>Xenopus laevis</i> et <i>Xenopus tropicalis</i> )	<input type="checkbox"/>
Autres amphibiens (autres <i>Amphibia</i> )	<input type="checkbox"/>
Poissons zèbres ( <i>Danio rerio</i> )	<input type="checkbox"/>
Autres poissons (autres <i>Pisces</i> )	<input type="checkbox"/>
Céphalopodes ( <i>Cephalopoda</i> )	<input type="checkbox"/>

**3.4.3. Justifiez la pertinence de l'(des) espèce(s) animale(s) choisie(s) :**

Le lapin constitue un modèle animal souvent utilisé dans les études précliniques comme le précisent les résumés des caractéristiques de spécialités pharmaceutiques d'insuline (ces derniers décrivent des épreuves d'hypoglycémie chez le lapin). D'autre part, dans le cadre de la perfusion de nutrition parentérale, les rongeurs ne sont pas envisageables car ils ne permettent pas la perfusion d'un volume suffisant de mélange nutritionnel, ni le prélèvement d'un volume sanguin suffisant pour réaliser les dosages plasmatiques. De plus, la veine marginale de l'oreille représente un abord pratique tant pour l'administration que pour le prélèvement.

**3.4.4. S'agit-il de spécimens d'espèces menacées énumérées à l'annexe A du règlement (CE) n° 338/97 du Conseil du 9 décembre 1996 relatif à la protection des espèces de faune et de flore sauvages par le contrôle et leur commerce ?**

oui  non

Si oui, éléments scientifiques démontrant que la finalité de la procédure expérimentale ne peut être atteinte en utilisant d'autres espèces que celles énumérées dans cette annexe :

**3.4.5. S'agit-il de spécimens de primates non humains ?  oui  non**

Si oui, éléments scientifiques démontrant que la finalité de la procédure expérimentale ne peut être atteinte en utilisant d'autres espèces de primates non humains

**3.4.6. S'agit-il d'animaux capturés dans la nature ?**       oui  non

Si oui, éléments scientifiques démontrant que la finalité de la procédure expérimentale ne peut être atteinte en utilisant d'autres animaux que ceux capturés dans la nature :

**3.4.7. S'agit-il d'animaux d'espèces domestiques, errants ou vivant à l'état sauvage ?**       oui  non

Si oui, éléments scientifiques démontrant que la finalité de la procédure expérimentale ne peut être atteinte qu'en utilisant ces animaux.

**3.4.8. Catégorie des animaux utilisés dans le projet :**

**Animaux tenus en captivité (domestiques ou non domestiques)**

**Animaux non domestiques non tenus en captivité**

**Animaux génétiquement altérés**

- **Animaux non domestiques non tenus en captivité**
  - **Si les animaux utilisés sont des spécimens d'espèces protégées en application de l'article L. 411-1 du Code de l'environnement, indiquez les références de la dérogation accordée pour effectuer la capture des animaux dans le milieu naturel (4° de l'article L. 411-2 du Code de l'environnement) :**

- **Si les animaux utilisés sont des spécimens d'espèces dont la chasse est autorisée, indiquez ici les références de l'autorisation de**

**prélèvement accordée pour effectuer la capture des animaux dans le milieu naturel (article L. 424-11 du Code de l'environnement) :**

- **Justification scientifique montrant que l'objectif de la procédure expérimentale ne peut être atteint en utilisant un animal élevé en vue d'une utilisation dans des procédures expérimentales :**

- **Animaux génétiquement altérés**
  - **Animaux génétiquement modifiés**  oui  non  
Si oui :
    - **Création d'une lignée**  oui  non
    - **Maintien d'une lignée établie et/ou utilisation**  oui  non
      - **Phénotype non dommageable**  oui  non
      - **Phénotype dommageable**  oui  non
  - **Souche mutante autre**  oui  non  
Si oui :
    - **Création d'un mutant**  oui  non
    - **Maintien d'une lignée établie et/ou utilisation**  oui  non
      - **Phénotype non dommageable**  oui  non
      - **Phénotype dommageable**  oui  non

#### **3.4.9. Origine des animaux tenus en captivité :**

- **Les animaux destinés à être utilisés dans les procédures expérimentales appartenant aux espèces dont la liste est fixée réglementairement sont-ils élevés à cette fin et proviennent-ils d'éleveurs ou de fournisseurs agréés ?**  
 oui  non
- **Si oui, nombre d'établissements éleveur ou fournisseur agréés fournissant tout ou partie des animaux du projet :**

Etablissement :

- **Nom :**

- **Adresse postale :**



- **Nombre d'établissements éleveur ou fournisseur localisés dans des pays tiers fournissant tout ou partie des animaux du projet ?**

Etablissement :

**Nom de cet éleveur ou fournisseur et pays :**

- **Les animaux sont-ils des animaux réutilisés d'un projet précédent ?**

**Oui**

**non**

Si oui, veuillez compléter le chapitre 4.3 de ce formulaire.

**3.4.10. Nombre estimé d'animaux utilisés dans le projet :**

- **Justification de ce nombre pour chacune des espèces animales utilisées :**

Le nombre d'utilisation de chaque animal est limité par le phénomène d'apparition d'anticorps anti-insuline humaine chez le lapin. En effet, le système immunitaire de l'animal est susceptible d'identifier l'insuline humaine comme étant un élément étranger. Les anticorps produits par le lapin pourraient alors « piéger » l'insuline humaine dans la circulation ce qui fausserait la mesure de l'insulinémie sur le plasma de lapin, mais serait également susceptible de diminuer l'effet biologique de l'insuline. D'autre part, une variabilité génétique concernant la sensibilité à l'insuline peut exister chez les animaux au même titre que chez les hommes, ce qui limite la compilation des résultats. Dès lors, il semble nécessaire de disposer d'un nombre suffisant d'animaux. Enfin, le second protocole repose sur une procédure destinée à rendre les lapins diabétiques. Or la littérature décrit l'échec possible de cette procédure (la probabilité d'échec est de l'ordre de 30%). Ce nombre de 12 lapins minimum, représente la population minimale nécessaire à mettre en évidence une différence significative sur le plan statistique. Les analyses statistiques seront réalisées : sur les critères principaux (valeurs de glycémie et d'insulinémie obtenues au plateau de perfusion par des tests ANOVA en mesures répétées avec ajustement voire par des tests alternatifs non paramétriques) ou sur les critères secondaires (aire sous la courbe moyennée sur l'ensemble des points de la cinétique). Chaque lapin étant son propre témoin au sein d'une procédure et entre les deux procédures, il est envisagé d'effectuer des comparaisons d'évolution de glycémie et d'insulinémies

**3.4.11. Indiquez à quel(s) stade(s) de développement les animaux seront utilisés**

**et le justifier :**

Stade adulte. Les volumes de nutrition parentérale à injecter afin de permettre un suivi suffisant dans la durée, ainsi que les volumes sanguins à prélever sont relativement conséquents. Dans ces conditions, des lapins d'un poids minimum de 3 kgs sont requis. De plus, la veine marginale de l'oreille doit présenter un diamètre suffisamment grand afin de faciliter au maximum la pose du cathéter et de limiter le phénomène d'hémolyse au moment du prélèvement sanguin (en effet, l'hémolyse entraîne la libération de l'insulinase contenue dans les globules rouges, ce qui est responsable d'une valeur faussement diminuée d'insulinémie lors du dosage de celle-ci).

**3.4.12. Indiquez le sexe des animaux utilisés et le justifier :**

Etant donné qu'*a priori* aucune influence du sexe n'est à souligner dans le cadre de ce projet, nous avons choisi d'utiliser préférentiellement des mâles.

**3.4.13. Indiquez pour chaque espèce les points limites adaptés, suffisamment prédictifs et précoces pour permettre de limiter la douleur à son minimum, sans remettre en cause les résultats du projet :**

Les paramètres étudiés au cours de ce protocole sont :

- l'évolution glycémique de l'animal (mesurée à l'aide d'un lecteur de glycémie ou par une méthode à l'hexokinase)
- insulinémie (de l'animal, humaine et totale (somme des 2 précédentes) lors de la première procédure, uniquement l'insulinémie humaine lors de la seconde procédure) mesurée à l'aide de 2 kits distincts. Ces derniers sont respectivement basés sur une méthode d'immunoradiométrie, ou d'immunoélectrochimiluminescence et emploient deux couples d'anticorps différents.

Les points limites choisis sont : détérioration visuelle macroscopique de la veine marginale de l'oreille (œdème, inflammation, hématome non résorbé, infection au point d'injection ou de prélèvement, non réversibles avant le test suivant). Impossibilité de poser le cathéter. Altération de l'état général : perte de poids supérieure ou égale à 10% du poids de départ de l'animal (pesé quotidiennement) en 2 semaines, hyperthermie, comportement inhabituel. Tout changement de comportement de l'animal (repli sur lui-même, anorexie). Signes d'insuffisance cardiaque post perfusion.

**4. LES PROCÉDURES EXPÉRIMENTALES**

## 4.1 Objet(s) visés par les procédures expérimentales

A - La recherche fondamentale.

B - Les recherches transactionnelles ou appliquées menées pour :

- la prévention, la prophylaxie, le diagnostic ou le traitement de maladies, de mauvais états de santé ou d'autres anomalies ou de leurs effets chez l'homme, les animaux ou les plantes ;

- l'évaluation, la détection, le contrôle ou les modifications des conditions physiologiques chez l'homme, les animaux ou les plantes ;

- le bien-être des animaux et l'amélioration des conditions de production des animaux élevés à des fins agronomiques.

C - L'une des finalités visées au point précédent (B) lors de la mise au point, de la production ou des essais de qualité, d'efficacité et d'innocuité de médicaments à usage humain ou vétérinaire, de denrées alimentaires, d'aliments pour animaux et d'autres substances ou produits.

D - La protection de l'environnement naturel dans l'intérêt de la santé ou du bien-être de l'homme ou de l'animal.

E- La recherche en vue de la conservation des espèces.

F- L'enseignement supérieur, ou la formation professionnelle ou technique conduisant à des métiers qui comportent la réalisation de procédures expérimentales sur des animaux ou les soins et l'entretien de ces animaux, ainsi que la formation professionnelle continue dans ce domaine.

G - Les enquêtes médico-légales.

## 4.2 Nombre de procédures expérimentales :

2 (durée totale du protocole : 10 à 12 mois car les lapins seront hébergés par séries de 4 et chaque procédure a une durée prévue de 30 jours, soit 60 jours pour les 2 procédures, auxquels s'ajoutent les semaines d'acclimatation des animaux à réception, et les 2 semaines de délai entre les 2 procédures).

#### 4.2.1 NOM DE LA PROCÉDURE EXPÉRIMENTALE N° 1 :

**Evaluation de l'administration d'insuline humaine après ajout direct dans un mélange de nutrition parentérale ternaire**

#### - PROPOSITION DE CLASSIFICATION DE LA PROCÉDURE SELON LE DEGRÉ DE SÉVÉRITÉ (conformément à l'annexe de l'arrêté relatif à l'autorisation de projet) :

- classe légère
- classe sévère
- classe sans réveil

#### - Description détaillée de la procédure expérimentale :

- Pertinence et justification de la procédure expérimentale :

L'étude *in vivo* de l'activité biologique hypoglycémisante de l'insuline humaine administrée par voie intraveineuse après ajout direct dans une poche de nutrition parentérale ternaire supplémentée en vitamines et oligoéléments ne peut être remplacée par une étude *in vitro* ou *ex vivo* (en effet, il a été décrit dans la littérature que l'étude de la fixation de l'insuline sur les récepteurs à insuline peut être « faussée » par le fait que des fragments issus de l'hydrolyse du peptide peuvent également se lier aux récepteurs à insuline et provoquer leur autophosphorylation). De plus, cette étude présente l'avantage d'être menée en dynamique et de prendre en considération tout le montage de perfusion. Chez les lapins non diabétiques, l'étude permettra le suivi de la glycémie, de l'insulinémie endogène de l'animal mais également de l'insulinémie exogène (insuline humaine ajoutée dans la poche). Les insulinémies seront déterminées à l'aide de 2 kits de dosages contenant 2 paires d'anticorps anti-insuline et pouvant avoir des réactivités croisées différentes avec l'insuline de lapin.

- Indiquez le nombre de lots et le nombre d'animaux par lots, et les justifier :

Il a été décidé de travailler sur 1 lot de 12 lapins au minimum. Une variabilité pouvant exister dans la réponse physiologique à l'insuline ainsi que dans le profil glycémique,

chaque lapin employé sera son propre témoin. Il est nécessaire de prendre en considération qu'un ou deux animaux puissent être exclus du protocole en cours. Le nombre de 12 lapins est donc justifié afin de permettre une puissance statistique suffisante.

- Indiquez le cas échéant le prélèvement, ainsi que la fréquence et le(s) volume(s) prélevés :

Prélèvements réalisés à partir d'un cathéter 24 gauges muni d'un ensemble adaptateur/corps de pompe, dans un tube hépariné pédiatrique. Les animaux seront placés dans une boîte de contention tout au long de la procédure (soit 2 heures au maximum).

- 1<sup>er</sup> test (correspondant au « témoin ») : prélèvements de détermination de la glycémie basale à jeun puis perfusion du mélange de nutrition (Olimel N7E®) à un débit de 45 mL/h à l'aide d'une pompe à perfusion sur une durée maximale de 2 heures. Les prélèvements effectués seront de 1,5 mL environ à 10 reprises (soit 15 mL au total).

- Une période de récupération de 14 jours sera laissée entre chaque test.

- 2<sup>ème</sup> test (correspondant à l'ajout extemporané d'insuline) : prélèvements de détermination de la glycémie basale à jeun puis perfusion du mélange de nutrition contenant de l'insuline à 20 UI/L (ajout dans le respect de conditions aseptiques) à un débit de 45 mL/h à l'aide d'une pompe à perfusion sur une durée maximale de 2 heures. Les prélèvements effectués seront de 1,5 mL environ à 10 reprises (soit 15 mL au total).

- Une période de récupération de 14 jours sera laissée entre chaque test.

- 3<sup>ème</sup> test (correspondant à l'ajout d'insuline et administration différée de 12 heures) : prélèvements de détermination de la glycémie basale à jeun puis perfusion du mélange de nutrition contenant de l'insuline à 20 UI/L préparé plusieurs heures avant dans des conditions aseptiques, à un débit de 45 mL/h à l'aide d'une pompe à perfusion sur une durée maximale de 2 heures. Les prélèvements effectués seront de 1,5 mL environ à 10 reprises (soit 15 mL au total).

- Indiquez le cas échéant les méthodes pour réduire ou supprimer la douleur, la souffrance et l'angoisse (liste des médicaments - anesthésiques, analgésiques, anti-inflammatoires...en précisant les doses, voies, durées et fréquences d'administration), y compris le raffinement des conditions d'hébergement, d'élevage et de soins :

Hébergement au sein de cages homologuées avec plateforme (enrichissement) dans l'animalerie du laboratoire de pharmacologie de la Faculté de Pharmacie de Lille. La zone d'hébergement est tempérée à 20°C et subit un cycle jour/nuit de 12h/12h. Application sur la zone externe de l'oreille 90 minutes avant la pose des cathéters d'une crème anesthésique (Emla®).

- Indiquez le cas échéant les dispositions prises en vue de réduire, d'éviter et d'atténuer toute forme de souffrance des animaux de la naissance à la mort :

Les animaux seront pesés quotidiennement. Toute anomalie physique (du pelage, des griffes...) sera systématiquement recherchée. Un suivi quotidien de la consommation d'eau

et de nourriture sera effectué.

- Indiquez le cas échéant les raisons scientifiques justifiant une dérogation à l'anesthésie des animaux :

- Indiquez le cas échéant les raisons scientifiques justifiant une dérogation aux conditions d'hébergement des animaux :

- **Dispositions prises pour éviter tout double emploi injustifié des procédures expérimentales, le cas échéant :**

- **Devenir des animaux à la fin de cette procédure expérimentale :**

- mise à mort ?

précisez les animaux concernés :

- animal gardé en vie ?

précisez les animaux concernés et si la décision a été prise par le vétérinaire

ou toute autre personne compétente désignée par le responsable du projet :

Animaux conservés en vie afin d'être utilisés dans la procédure expérimentale n°2. La décision de les garder en vie sera prise par le responsable de l'animalerie si aucun problème n'est à déplorer à la fin de la première procédure, ou par le vétérinaire si l'animal devait présenter des signes de faiblesse à l'issue de celle-ci.

- placement ou mise en liberté des animaux ?

précisez les animaux concernés :

#### 4.2.2 NOM DE LA PROCÉDURE EXPÉRIMENTALE N° 2 :

**Evaluation de l'administration d'insuline humaine après ajout direct dans un**

**mélange de nutrition parentérale ternaire : étude chez le lapin diabétique.**

**- PROPOSITION DE CLASSIFICATION DE LA PROCÉDURE SELON LE DEGRÉ DE SÉVÉRITÉ** (conformément à l'annexe de l'arrêté relatif à l'autorisation de projet) :

- classe légère
- classe modérée
- classe sévère
- classe sans réveil

**- Description détaillée de la procédure expérimentale :**

- Pertinence et justification de la procédure expérimentale :

Premièrement, l'administration de nutrition parentérale est effectuée chez tous les patients, qu'ils soient diabétiques ou non. La répétition du protocole précédent chez des lapins rendus diabétiques présente donc un intérêt scientifique. De plus, l'absence totale de sécrétion endogène d'insuline permet d'isoler l'action de l'insuline humaine exogène ajoutée dans la poche, tout en s'affranchissant de l'insuline endogène de lapin. En effet, les deux kits de dosage emploient des couples d'anticorps anti-insuline différents et dont la réactivité croisée avec l'insuline de lapin n'est pas connue. Dès lors, il serait intéressant de mener la procédure expérimentale précédemment détaillée puis de la reproduire à l'identique après avoir induit un diabète chez les lapins. Pour ce faire, nous procéderons à une injection intraveineuse unique d'alloxan (150 mg/kg dilué dans du sérum salé isotonique). Des mesures de glycémie seront ensuite réalisées 48 heures après l'injection d'alloxan. Les lapins présentant une glycémie < 3 g/L seront déclarés non diabétiques et par conséquent exclus de la seconde procédure expérimentale.

- Indiquez le nombre de lots et le nombre d'animaux par lots, et les justifier :

Il a été décidé de travailler sur 1 lot de 12 lapins. Une variabilité pouvant exister dans la réponse physiologique à l'insuline ainsi que dans le profil glycémique, chaque lapin employé sera son propre témoin. Il est nécessaire de prendre en considération qu'un ou deux animaux puissent être exclus du protocole en cours. Le nombre de 12 lapins est donc justifié afin de permettre une puissance statistique suffisante. Ce lot correspond aux 12 lapins précédemment employés dans la procédure expérimentale n°1.

- Indiquez le cas échéant le prélèvement, ainsi que la fréquence et le(s) volume(s) prélevés :

Prélèvements réalisés à partir d'un cathéter 24 gauges muni d'un ensemble adaptateur/corps de pompe, dans un tube hépariné pédiatrique. Les animaux seront placés dans une boîte de contention tout au long de la procédure (soit 2 heures au maximum).

- 1<sup>er</sup> test (correspondant au « témoin ») : prélèvements de détermination de la

glycémie basale à jeun puis perfusion sur une durée de 2 heures maximum du mélange de nutrition (Olimel N7E®) à un débit de 45 mL/h à l'aide d'une pompe à perfusion. Les prélèvements effectués seront de 1,5 mL environ à 10 reprises (soit 15 mL au total).

- Une période de récupération de 14 jours sera laissée entre chaque test.
- 2<sup>ème</sup> test (correspondant à l'ajout extemporané d'insuline): prélèvements de détermination de la glycémie basale à jeun puis perfusion du mélange de nutrition contenant de l'insuline à 20 UI/L (ajout dans le respect de conditions aseptiques) à un débit de 45 mL/h à l'aide d'une pompe à perfusion sur une durée maximale de 2 heures. Les prélèvements effectués seront de 1,5 mL environ à 10 reprises (soit 15 mL au total).
- Une période de récupération de 14 jours sera laissée entre chaque test.
- 3<sup>ème</sup> test (correspondant à l'ajout différé d'insuline): prélèvements de détermination de la glycémie basale à jeun puis perfusion du mélange de nutrition contenant de l'insuline à 20 UI/L préparé plusieurs heures avant dans des conditions aseptiques, à un débit de 45 mL/h à l'aide d'une pompe à perfusion sur une durée maximale de 2 heures. Les prélèvements effectués seront de 1,5 mL environ à 10 reprises (soit 15 mL au total).
- 

- Indiquez le cas échéant les méthodes pour réduire ou supprimer la douleur, la souffrance et l'angoisse (liste des médicaments - anesthésiques, analgésiques, anti-inflammatoires...en précisant les doses, voies, durées et fréquences d'administration), y compris le raffinement des conditions d'hébergement, d'élevage et de soins :

Hébergement au sein de cages homologuées avec plateforme (enrichissement) dans l'animalerie du laboratoire de pharmacologie de la Faculté de Pharmacie de Lille. La zone d'hébergement est tempérée à 20°C et subit un cycle jour/nuit de 12h/12h. Application sur la zone externe de l'oreille 90 minutes avant la pose des cathéters d'une crème anesthésique (Emla®).

- Indiquez le cas échéant les dispositions prises en vue de réduire, d'éviter et d'atténuer toute forme de souffrance des animaux de la naissance à la mort :

Les animaux seront pesés quotidiennement. Toute anomalie physique (du pelage, des griffes...) sera systématiquement recherchée. Un suivi quotidien de la consommation d'eau et de nourriture sera effectué.

- Indiquez le cas échéant les raisons scientifiques justifiant une dérogation à l'anesthésie des animaux :

- Indiquez le cas échéant les raisons scientifiques justifiant une dérogation aux conditions d'hébergement des animaux :

**- Dispositions prises pour éviter tout double emploi injustifié des procédures expérimentales, le cas échéant :**

Non applicable.

**- Devenir des animaux à la fin de cette procédure expérimentale :**

- mise à mort ?    
 précisez les animaux concernés :

tous

- animal gardé en vie ?    
 précisez les animaux concernés et si la décision a été prise par le vétérinaire   
 ou toute autre personne compétente désignée par le responsable du projet :

- placement ou mise en liberté des animaux ?    
 précisez les animaux concernés :



**4.3. Si le projet utilise des animaux réutilisés d'un projet antérieur :**

**- GRAVITÉ RÉELLE DES PROCÉDURES EXPÉRIMENTALES ANTÉRIEURES :**

- légère   
  modérée   
  sévère

Précisez les éléments scientifiques justifiant la demande de dérogation pour autant que les animaux n'aient pas été utilisés plus d'une fois dans une procédure

expérimentale entraînant une douleur intense, de l'angoisse ou une souffrance équivalente :

- Effet cumulatif de cette réutilisation sur les animaux :

- L'avis vétérinaire est-il favorable en prenant en considération le sort de l'animal concerné sur toute sa durée de vie ?  Ooui  Onon

- L'animal réutilisé a-t-il pleinement recouvré son état de santé et de bien-être général ?  Ooui  Onon

**4.4. Cas particulier des projets contenant une procédure expérimentale impliquant une douleur, une angoisse ou une souffrance sévère et susceptible de se prolonger sans qu'il soit possible de les soulager**

- De quelle(s) procédure(s) expérimentale(s) du projet s'agit-il ?

- Justifiez scientifiquement les raisons à l'origine d'une demande de dérogation :

## AVIS DU COMITÉ D'ÉTHIQUE

(à transmettre au secrétariat autorisation de projet :  
[autorisation-projet@recherche.gouv.fr](mailto:autorisation-projet@recherche.gouv.fr))

Le 12 novembre 2017

Référence du dossier 201711081710108 v1

**Titre du Projet : Evaluation de l'administration d'insuline humaine après ajout direct dans un mélange de nutrition parentérale ternaire.**

1- Avis éthique sur le projet :  Favorable  
 Défavorable

Motif(s) en cas d'avis défavorable :

2- Proposition de reclassement des procédures expérimentales selon le degré de gravité indiqué par le responsable de projet :  oui  non

Procédure(s) reclassée(s) et proposition de reclassement :

- o procédure n° :
- reclassement :

(le bloc Procédure(s) reclassée(s) et proposition de reclassement est à reproduire le cas échéant)

3- En application de l'article R.214-120 du décret n°2013-118 du 1<sup>er</sup> février 2013, le projet devra-t-il bénéficier d'une appréciation rétrospective à l'issue de sa réalisation :  oui  non

4- Le cas échéant (cf point 4.3 du dossier), avis sur la réutilisation d'un animal pour autant que l'animal n'ait pas été utilisé, préalablement à ce projet, plus d'une fois dans une procédure expérimentale entraînant une douleur intense, de l'angoisse ou une souffrance équivalente (article R.214-113 du décret n°2013-118 du 1<sup>er</sup> février 2013) :

Favorable  Défavorable

Motif(s) en cas d'avis défavorable :

CEEA Nord - Pas de Calais n°75



**Annexe E:** Comparaison des différences de formule des insulines animales avec l'insuline humaine et réactivité croisée des kits d'IRMA et d'IECMA avec les différentes insulines

Nature de l'insuline (différences avec la formule de l'insuline humaine sur chaîne A/ chaîne B))	Nature du kit de dosage (épitopes reconnus Ac 1/Ac 2) Pourcentage de réaction croisée	
	<b>IRMA</b> (A10-A17/ ?)	<b>IECMA</b> (A7-A10/Cter chaîne B)
Umuline rapide®	100 %	100 %
Bœuf (Ala en 8, Val en 10/Ala en B30)	100 %	25 %
Rat (pos4/pos3, 27-29)	< 0,03 %	?
Novorapid (Asp en B28)	oui	< 0,7 %
Porc (Ala en B30)	100 %	19,2%
Lapin (Ser en B30)	? (100 %)	? (20%)

# ***In vitro* and *in vivo* stability study of human insulin in ternary parenteral nutrition admixture**

## **Abstract**

Undernutrition is a public health problem that is the subject of a national policy whose objectives include prevention and treatment of this condition. Administration of parenteral nutrition (PN) involves metabolic complications, including hyperglycaemia as a major adverse effect. Hyperglycemia increases the morbidity and mortality of patients receiving PN, either in hospital or at home. Therefore, insulin should be administered in conjunction with the administration of PN. Addition of human insulin directly into PN bag is recommended only when the stability of the insulin on the one hand and the PN admixture on the other have been demonstrated.

The main objective of this work is to determine the stability of human insulin and the admixture of ternary PN, mixed together.

In order to achieve this objective, the following studies are being carried out : 1) evaluation of the physical stability of the ternary PN admixture 2) validation of an immunometric method for the quantification of human insulin, in order to measure insulin over a 24-hour period after addition to an industrial ternary parenteral nutrition admixture supplemented with vitamins and trace elements, then to study the impact of different factors (macronutrient composition, packaging, pH, etc.) on the evolution of the insulin concentration in this complex admixture 3) validation of a high performance liquid chromatography method with tandem mass spectrometric detection to quantify insulin and detect glycated insulin in a mixture of binary PN during 24-hour kinetics 4) study of the bioactivity of human insulin, using an animal testing protocol to compare different admixtures administered by infusion (PN, PN with extemporaneous addition of human insulin and PN with insulin added 12 hours prior to administration).

Stability parameters of the PN emulsion show that the nutrient admixture is stable. A 35% loss in insulin content was observed during the 24-hour study on the ternary PN admixture supplemented with vitamins and trace elements with a major decrease during the first 6 hours. This evolution is explained at 67% by the level of dextrose content of the admixture, the nature of the lipid emulsion, the absence of trace elements as well as the pH when taken into consideration with the dextrose content, the time and the amino acid content. The glycation of insulin, as demonstrated by the chromatographic method, explains this decrease in insulin content in the presence of a pH close to neutrality. Total reversibility of insulin glycation is observed when samples are diluted in an acidic medium. During the *in vivo* experiment, the highest lagomorph concentration is lower when human insulin is added extemporaneously to the PN, suggesting that in this condition, human insulin has a higher bioactivity, which is consistent with data in the literature on glycated insulin.

In conclusion, addition of insulin to a ternary PN admixture has the physical stability to ensure the integrity of the emulsion. On the other hand, the insulin stability study revealed the existence of an insulin glycation phenomenon occurring mainly in the first 6 hours of contact with the PN admixture. This glycated insulin showed reduced hypoglycemic activity. Further studies are needed to precise glycation process and complete the chemical stability of the PN admixture.

**Keywords :** Human insulin ; parenteral nutrition solutions ; stability ; immunoassays ; mass spectrometry ; glycation

# Evaluation de la stabilité de l'insuline humaine dans un mélange de nutrition parentérale ternaire : études *in vitro* et *in vivo*

## Résumé

La dénutrition est un problème de santé publique qui fait l'objet d'une politique nationale comportant parmi les objectifs, la prévention et le traitement de cette affection. L'administration de nutrition parentérale (NP) comporte parmi ses effets indésirables métaboliques majeurs, l'hyperglycémie. Celle-ci augmente la morbi-mortalité des patients recevant de la NP, que ce soit à l'hôpital ou au domicile. L'administration d'insuline doit par conséquent accompagner celle de la NP. L'ajout direct d'insuline humaine dans la poche de NP n'est recommandé que lorsque la stabilité de l'insuline d'une part et du mélange de NP d'autre part ont été démontrées.

L'objectif principal de ces travaux de thèse est de déterminer la stabilité de l'insuline humaine et du mélange de NP ternaire lorsqu'ils sont mis en présence l'un de l'autre.

Afin d'atteindre cet objectif, les études suivantes sont mises en œuvre : 1) évaluation de la stabilité physique du mélange de NP ternaire 2) validation d'une méthode immunométrique de quantification de l'insuline humaine afin de doser l'insuline sur une durée de 24 heures après ajout dans un mélange industriel de nutrition parentérale ternaire supplémenté en vitamines et éléments-trace puis d'étudier l'impact de différents facteurs (composition en macronutriments, conditionnement, pH...) sur l'évolution de la concentration en insuline dans ce mélange complexe 3) validation d'une méthode de chromatographie liquide haute performance avec détection par spectrométrie de masse en tandem afin de quantifier l'insuline et détecter l'insuline glyquée dans un mélange de NP binaire au cours d'une cinétique de 24 heures 4) étude de la bioactivité de l'insuline à l'aide d'un protocole d'expérimentation animale, permettant de comparer différents mélanges administrés par perfusion (NP seule, NP avec ajout extemporané d'insuline et NP avec insuline ajoutée 12 heures avant l'administration).

Les paramètres de stabilité de l'émulsion de NP témoignent d'une stabilité du mélange nutritif. Une perte de 35% de la teneur en insuline est observée au cours de l'étude de 24 heures sur le mélange de NP ternaire supplémenté en vitamines et éléments-trace avec une diminution majoritairement au cours des 6 premières heures. Cette évolution est expliquée à 67% par le niveau de teneur en glucose du mélange, la nature de l'émulsion lipidique, l'absence d'éléments-trace ainsi que le pH lorsque celui-ci est pris en considération avec la teneur en glucose, le temps et la teneur en acides aminés. La glycation de l'insuline, mise en évidence à l'aide de la méthode chromatographique, explique cette diminution de la teneur en insuline en présence d'un pH proche de la neutralité. Une réversibilité totale de la glycation de l'insuline est observée lors de la dilution des échantillons dans un milieu acide. Au cours de l'expérimentation *in vivo*, la concentration maximale de l'insuline endogène de lapin est plus faible lorsque l'insuline humaine est ajoutée extemporanément dans la NP, ce qui suggère que dans cette condition, l'insuline humaine possède une bioactivité supérieure. Ce résultat est en accord avec les données de la littérature sur l'insuline glyquée.

En conclusion, l'ajout d'insuline dans un mélange de NP ternaire présente une stabilité physique permettant l'intégrité de l'émulsion. En revanche, l'étude de stabilité de l'insuline a révélé l'existence d'un phénomène de glycation de l'insuline survenant principalement dans les 6 premières heures de contact avec le mélange de NP. Cette insuline glyquée a montré une activité hypoglycémiant réduite. Une étude approfondie du mécanisme de glycation ainsi qu'un complément de l'étude de stabilité du mélange de NP sont nécessaires.

**Mots-clés :** Insuline humaine ; nutrition parentérale ; stabilité ; méthodes immunométriques / immunodosages ; spectrométrie de masse ; glycation





# ***In vitro* and *in vivo* stability study of human insulin in ternary parenteral nutrition admixture**

## **Abstract**

Undernutrition is a public health problem that is the subject of a national policy whose objectives include prevention and treatment of this condition. Administration of parenteral nutrition (PN) involves metabolic complications, including hyperglycaemia as a major adverse effect. Hyperglycemia increases the morbidity and mortality of patients receiving PN, either in hospital or at home. Therefore, insulin should be administered in conjunction with the administration of PN. Addition of human insulin directly into PN bag is recommended only when the stability of the insulin on the one hand and the PN admixture on the other have been demonstrated.

The main objective of this work is to determine the stability of human insulin and the admixture of ternary PN, mixed together.

In order to achieve this objective, the following studies are being carried out : 1) evaluation of the physical stability of the ternary PN admixture 2) validation of an immunometric method for the quantification of human insulin, in order to measure insulin over a 24-hour period after addition to an industrial ternary parenteral nutrition admixture supplemented with vitamins and trace elements, then to study the impact of different factors (macronutrient composition, packaging, pH, etc.) on the evolution of the insulin concentration in this complex admixture 3) validation of a high performance liquid chromatography method with tandem mass spectrometric detection to quantify insulin and detect glycated insulin in a mixture of binary PN during 24-hour kinetics 4) study of the bioactivity of human insulin, using an animal testing protocol to compare different admixtures administered by infusion (PN, PN with extemporaneous addition of human insulin and PN with insulin added 12 hours prior to administration).

Stability parameters of the PN emulsion show that the nutrient admixture is stable. A 35% loss in insulin content was observed during the 24-hour study on the ternary PN admixture supplemented with vitamins and trace elements with a major decrease during the first 6 hours. This evolution is explained at 67% by the level of dextrose content of the admixture, the nature of the lipid emulsion, the absence of trace elements as well as the pH when taken into consideration with the dextrose content, the time and the amino acid content. The glycation of insulin, as demonstrated by the chromatographic method, explains this decrease in insulin content in the presence of a pH close to neutrality. Total reversibility of insulin glycation is observed when samples are diluted in an acidic medium. During the *in vivo* experiment, the highest lagomorph insulin concentration is lower when human insulin is added extemporaneously to the PN, suggesting that in this condition, human insulin has a higher bioactivity, which is consistent with data in the literature on glycated insulin.

In conclusion, addition of insulin to a ternary PN admixture has the physical stability to ensure the integrity of the emulsion. On the other hand, the insulin stability study revealed the existence of an insulin glycation phenomenon occurring mainly in the first 6 hours of contact with the PN admixture. This glycated insulin showed reduced hypoglycemic activity. Further studies are needed to precise glycation process and complete the chemical stability of the PN admixture.

**Keywords :** Human insulin ; parenteral nutrition solutions ; stability ; immunoassays ; mass spectrometry ; glycation

# Evaluation de la stabilité de l'insuline humaine dans un mélange de nutrition parentérale ternaire : études *in vitro* et *in vivo*

## Résumé

La dénutrition est un problème de santé publique qui fait l'objet d'une politique nationale comportant parmi les objectifs, la prévention et le traitement de cette affection. L'administration de nutrition parentérale (NP) comporte parmi ses effets indésirables métaboliques majeurs, l'hyperglycémie. Celle-ci augmente la morbi-mortalité des patients recevant de la NP, que ce soit à l'hôpital ou au domicile. L'administration d'insuline doit par conséquent accompagner celle de la NP. L'ajout direct d'insuline humaine dans la poche de NP n'est recommandé que lorsque la stabilité de l'insuline d'une part et du mélange de NP d'autre part ont été démontrées.

L'objectif principal de ces travaux de thèse est de déterminer la stabilité de l'insuline humaine et du mélange de NP ternaire lorsqu'ils sont mis en présence l'un de l'autre.

Afin d'atteindre cet objectif, les études suivantes sont mises en œuvre : 1) évaluation de la stabilité physique du mélange de NP ternaire 2) validation d'une méthode immunométrique de quantification de l'insuline humaine afin de doser l'insuline sur une durée de 24 heures après ajout dans un mélange industriel de nutrition parentérale ternaire supplémenté en vitamines et éléments-trace puis d'étudier l'impact de différents facteurs (composition en macronutriments, conditionnement, pH...) sur l'évolution de la concentration en insuline dans ce mélange complexe 3) validation d'une méthode de chromatographie liquide haute performance avec détection par spectrométrie de masse en tandem afin de quantifier l'insuline et détecter l'insuline glyquée dans un mélange de NP binaire au cours d'une cinétique de 24 heures 4) étude de la bioactivité de l'insuline à l'aide d'un protocole d'expérimentation animale, permettant de comparer différents mélanges administrés par perfusion (NP seule, NP avec ajout extemporané d'insuline et NP avec insuline ajoutée 12 heures avant l'administration).

Les paramètres de stabilité de l'émulsion de NP témoignent d'une stabilité du mélange nutritif. Une perte de 35% de la teneur en insuline est observée au cours de l'étude de 24 heures sur le mélange de NP ternaire supplémenté en vitamines et éléments-trace avec une diminution majoritairement au cours des 6 premières heures. Cette évolution est expliquée à 67% par le niveau de teneur en glucose du mélange, la nature de l'émulsion lipidique, l'absence d'éléments-trace ainsi que le pH lorsque celui-ci est pris en considération avec la teneur en glucose, le temps et la teneur en acides aminés. La glycation de l'insuline, mise en évidence à l'aide de la méthode chromatographique, explique cette diminution de la teneur en insuline en présence d'un pH proche de la neutralité. Une réversibilité totale de la glycation de l'insuline est observée lors de la dilution des échantillons dans un milieu acide. Au cours de l'expérimentation *in vivo*, la concentration maximale de l'insuline endogène de lapin est plus faible lorsque l'insuline humaine est ajoutée extemporanément dans la NP, ce qui suggère que dans cette condition, l'insuline humaine possède une bioactivité supérieure. Ce résultat est en accord avec les données de la littérature sur l'insuline glyquée.

En conclusion, l'ajout d'insuline dans un mélange de NP ternaire présente une stabilité physique permettant l'intégrité de l'émulsion. En revanche, l'étude de stabilité de l'insuline a révélé l'existence d'un phénomène de glycation de l'insuline survenant principalement dans les 6 premières heures de contact avec le mélange de NP. Cette insuline glyquée a montré une activité hypoglycémiant réduite. Une étude approfondie du mécanisme de glycation ainsi qu'un complément de l'étude de stabilité du mélange de NP sont nécessaires.

**Mots-clés :** Insuline humaine ; nutrition parentérale ; stabilité ; méthodes immunométriques / immunodosages ; spectrométrie de masse ; glycation