

**MEMOIRE
POUR LE DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
DE PHARMACIE HOSPITALIERE ET DES COLLECTIVITES**

**Soutenu publiquement le Vendredi 03 Juillet 2015
Par M. Clément DAVID**

**Conformément aux dispositions du Décret du 10 septembre 1990
tient lieu de**

THESE EN VUE DU DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

**ETUDE DE STABILITE DE COLLYRES FORTIFIES A LA VANCOMYCINE
(50MG/ML)**

Membres du jury :

Président :

M. le Professeur Bertrand Décaudin

Professeur des Universités – Praticien Hospitalier, Faculté de pharmacie, Centre Hospitalier
Universitaire de Lille

Assesseur(s) :

M. le Docteur Christophe Berneron

Praticien Hospitalier, Service de la Pharmacie, Centre Hospitalier Universitaire de Lille

M. le Docteur Damien Lannoy

Praticien hospitalier, MCU, Service de la Pharmacie, Centre Hospitalier Universitaire de Lille

Mme. le Docteur Aurélie Terrier Lenglet

Praticien Hospitalier, MCU, Centre de Recherche Clinique, Centre Hospitalier Universitaire
d'Amiens



Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX

☎ 03.20.96.40.40 - 📠 : 03.20.96.43.64



Université Lille 2 – Droit et Santé

Président :	Professeur Xavier VANDENDRIESSCHE
Vice- présidents :	Professeur Alain DUROCHER Professeur Régis BORDET Professeur Eric KERCKHOVE Professeur Eric BOULANGER Professeur Frédéric LOBEZ Professeur Damien CUNY Professeur Benoit DEPREZ Professeur Murielle GARCIN Monsieur Pierre RAVAUX Monsieur Larbi AIT-HENNANI Monsieur Antoine HENRY
Directeur Général des Services :	Monsieur Pierre-Marie ROBERT

Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Doyen :	Professeur Damien CUNY
Vice-Doyen, 1 ^{er} assesseur :	Professeur Bertrand DECAUDIN
Assesseur en charge de la pédagogie	Dr. Annie Standaert
Assesseur en charge de la recherche	Pr. Patricia Melnyk
Assesseur délégué à la scolarité	Dr. Christophe Bochu
Assesseur délégué en charge des relations internationales	Pr. Philippe Chavatte
Assesseur délégué en charge de la vie étudiante	M. Thomas Morgenroth
Chef des services administratifs :	Monsieur Cyrille PORTA

Liste des Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	ALLORGE	Delphine	Toxicologie
M.	BROUSSEAU	Thierry	Biochimie
Mme	CAPRON	Monique	Immunologie
M.	DECAUDIN	Bertrand	Pharmacie Galénique
M.	DINE	Thierry	Pharmacie clinique
M.	DUBREUIL	Luc	Bactériologie
Mme	DUPONT-PRADO	Annabelle	Hématologie
M.	DUTHILLEUL	Patrick	Hématologie
M.	GRESSIER	Bernard	Pharmacologie
M.	LUYCKX	Michel	Pharmacie clinique
M.	ODOU	Pascal	Pharmacie Galénique
M.	DEPREUX	Patrick	Chimie Organique (ICPAL)

Liste des Professeurs des Universités

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	ALIOUAT	El Moukhtar	Parasitologie
Mme	AZAROUAL	Nathalie	Physique
M.	BERTHELOT	Pascal	Chimie Thérapeutique 1
M.	CAZIN	Jean-Louis	Pharmacologie – Pharmacie clinique
M.	CHAVATTE	Philippe	Chimie Thérapeutique 2
M.	COURTECUISSÉ	Régis	Sciences végétales et fongiques
M.	CUNY	Damien	Sciences végétales et fongiques
Mme	DELBAERE	Stéphanie	Physique
M.	DEPREZ	Benoît	Chimie Générale
Mme	DEPREZ	Rebecca	Chimie Générale
M.	DUPONT	Frédéric	Sciences végétales et fongiques
M.	DURIEZ	Patrick	Physiologie
M.	GARÇON	Guillaume	Toxicologie
Mme	GAYOT	Anne	Pharmacotechnie Industrielle
M.	GESQUIÈRE	Jean-Claude	Chimie Organique
M.	GOOSSENS	Jean François	Chimie Analytique
Mme	GRAS	Hélène	Chimie Thérapeutique 3
M.	HENNEBELLE	Thierry	Pharmacognosie
M.	LEMDANI	Mohamed	Biomathématiques
Mme	LESTAVEL	Sophie	Biologie Cellulaire
M.	LUC	Gerald	Physiologie
Mme	MELNYK	Patricia	Chimie thérapeutique 2
Mme	MUHR – TAILLEUX	Anne	Biochimie
Mme	PAUMELLE-LESTRELIN	Réjane	Biologie Cellulaire
Mme	PERROY – MAILLOLS	Anne Catherine	Droit et déontologie pharmaceutique
Mme	ROMOND	Marie Bénédicte	Bactériologie
Mme	SAHPAZ	Sevser	Pharmacognosie
M.	SERGHÉRAERT	Eric	Droit et déontologie pharmaceutique
M.	SIEPMANN	Juergen	Pharmacotechnie Industrielle
M.	STAELS	Bart	Biologie Cellulaire
M	TARTAR	André	Chimie Organique
M.	VACCHER	Claude	Chimie Analytique
M.	WILLAND	Nicolas	Chimie organique
M.	MILLET	Régis	Chimie Thérapeutique (ICPAL)

Liste des Maîtres de Conférences - Praticiens Hospitaliers

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	BALDUYCK	Malika	Biochimie
Mme	GARAT	Anne	Toxicologie
Mme	GOFFARD	Anne	Bactériologie
M.	LANNOY	Damien	Pharmacie Galénique
Mme	ODOU	Marie Françoise	Bactériologie
M.	SIMON	Nicolas	Pharmacie Galénique

Liste des Maîtres de Conférences

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	AGOURIDAS	Laurence	Chimie thérapeutique 2
Mme	ALIOUAT	Cécile Marie	Parasitologie (90%)
M.	ANTHERIEU	Sébastien	Toxicologie
Mme	AUMERCIER	Pierrette	Biochimie

Mme	BANTUBUNGI	Kadiombo	Biologie cellulaire
Mme	BARTHELEMY	Christine	Pharmacie Galénique
Mme	BEHRA	Josette	Bactériologie
M	BELARBI	Karim	Pharmacologie
M.	BERTHET	Jérôme	Physique
M.	BERTIN	Benjamin	Immunologie
M.	BLANCHEMAIN	Nicolas	Pharmacotechnie industrielle
M.	BOCHU	Christophe	Physique
M.	BRIAND	Olivier	Biochimie
Mme	CACHERA	Claude	Biochimie
M.	CARNOY	Christophe	Immunologie
Mme	CARON	Sandrine	Biologie cellulaire (80%)
Mme	CHABÉ	Magali	Parasitologie (80%)
Mme	CHARTON	Julie	Chimie Organique (80%)
M	CHEVALIER	Dany	Toxicologie
M.	COCHELARD	Dominique	Biomathématiques
Mme	DANEL	Cécile	Chimie Analytique
Mme	DEMANCHE	Christine	Parasitologie (80%)
Mme	DEMARQUILLY	Catherine	Biomathématiques
Mme	DUMONT	Julie	Biologie cellulaire
M.	FARCE	Amaury	Chimie Thérapeutique 2
Mme	FLIPO	Marion	Chimie Organique
Mme	FOULON	Catherine	Chimie Analytique
M.	GELEZ	Philippe	Biomathématiques
M.	GERVOIS	Philippe	Biochimie
Mme	GRAVE	Béatrice	Toxicologie
Mme	GROSS	Barbara	Biochimie
Mme	HAMOUDI	Chérifa Mounira	Pharmacotechnie industrielle
Mme	HANNOTHIAUX	Marie-Hélène	Toxicologie
Mme	HELLEBOID	Audrey	Physiologie
M.	HERMANN	Emmanuel	Immunologie
Mme	HOUSSIN-THUILLIER	Pascale	Hématologie
M.	KAMBIA	Kpakpaga Nicolas	Pharmacologie
M.	KARROUT	Youness	Pharmacotechnie Industrielle
Mme	LALLOYER	Fanny	Biochimie
M.	LEBEGUE	Nicolas	Chimie thérapeutique 1
Mme	LECOEUR	Marie	Chimie Analytique
Mme	LIPKA	Emmanuelle	Chimie Analytique
Mme	MARTIN	Françoise	Physiologie
M.	MOREAU	Pierre Arthur	Sciences végétales et fongiques
Mme	MUSCHERT	Susanne	Pharmacotechnie industrielle
Mme	NEUT	Christel	Bactériologie
Mme	NIKASINOVIC	Lydia	Toxicologie
Mme	PINÇON	Claire	Biomathématiques
M.	PIVA	Frank	Biochimie
Mme	PLATEL	Anne	Toxicologie
M.	RAVAUX	Pierre	Biomathématiques
Mme	RIVIERE	Céline	Pharmacognosie
Mme	ROGER	Nadine	Immunologie
M.	ROUMY	Vincent	Pharmacognosie
Mme	SEBTI	Yasmine	Biochimie
Mme	SIEPMANN	Florence	Pharmacotechnie Industrielle
Mme	SINGER	Elisabeth	Bactériologie
Mme	STANDAERT	Annie	Parasitologie
M.	TAGZIRT	Madjid	Hématologie

M.	WELTI	Stéphane	Sciences végétales et fongiques
M.	YOUS	Saïd	Chimie Thérapeutique 1
M.	ZITOUNI	Djamel	Biomathématiques
M.	FURMAN	Christophe	Pharmacobiochimie (ICPAL)
Mme	GOOSSENS	Laurence	Chimie Organique (ICPAL)

Professeurs Agrégés

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	MAYES	Martine	Anglais
M.	MORGENROTH	Thomas	Droit et déontologie pharmaceutique

Professeurs Certifiés

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	HUGES	Dominique	Anglais
Mlle	FAUQUANT	Soline	Anglais
M.	OSTYN	Gaël	Anglais

Professeur Associé - mi-temps

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	DHANANI	Alban	Droit et déontologie pharmaceutique

Maîtres de Conférences ASSOCIES - mi-temps

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	BERTOUX	Elisabeth	Pharmacie Clinique - Biomathématiques
M.	BRICOTEAU	Didier	Biomathématiques
M.	FIEVET	Pierre	Information Médicale
M.	FRIMAT	Bruno	Pharmacie Clinique
M.	MASCAUT	Daniel	Pharmacie Clinique
M.	WATRELOS	Michel	Droit et déontologie pharmaceutique
M.	ZANETTI	Sébastien	Biomathématiques

AHU

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	DROUET	Maryline	Pharmacie Galénique
Mme	GENAY	Stéphanie	Pharmacie Galénique

Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX

Tel. : 03.20.96.40.40 - Télécopie : 03.20.96.43.64

<http://pharmacie.univ-lille2.fr>

L'Université n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses ; celles-ci sont propres à leurs auteurs.

Remerciements

A Monsieur le Professeur Bertrand Décaudin,

Vous me faites l'honneur de juger ce travail et de présider ce jury. Veuillez trouver ici l'expression de ma reconnaissance et de mon profond respect.

A Monsieur le Docteur Christophe Berneron,

Je vous remercie d'avoir pris la direction de cette thèse et de l'aide et des conseils que vous m'avez apportés dès mon arrivée au CHRU.

A Madame le Docteur Aurélie Terrier Lenglet,

Je vous remercie d'avoir accepté de prendre part à ce jury et à l'attention que vous avez portée à ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de ma gratitude

A Monsieur Le Docteur Damien Lannoy

Je vous suis très reconnaissant de faire parti de ce jury. Merci du temps consacré à la réalisation des collyres, de l'intérêt et du suivi que vous m'avez apporté tout au long de ce travail.

Merci également à

A Madame Nathalie Azaroual, Madame Marie-Françoise Odou, Madame Christel Neut, Madame Maryline Drouet, Madame Christine Dhorne, Madame Karine Velghe pour leur aide précieuse et à la réalisation de ce travail.

Merci surtout,

A mes parents, sur qui j'ai toujours pu compter.

A mes amis et en particulier à son altesse royale, la princesse Emmanuelle, qui a du prendre sur elle pendant plus d'un an afin de supporter mes sautes d'humeur. A Basile, mon cher coloc, crème des crèmes. A Amélie pour son éternel sourire qui a su me détendre dans les heures sombres. Aux Dunkerquoises, Audy et ses colliers et Charlène pour tous ces bons moments passés de Caen à Lille. A Pauline, pour sa voix qui ferait pâlir la Callas. A Simon Rodier pour ces petites balades champêtres qui m'ont fait découvrir les canards. A Simon Hennebicq, celui qui ne traine jamais, mon ami de toujours.

A Eléonore, sans qui je n'aurais jamais fait l'internat.

A mes amis angevins, thaïlandais, bretons, caennais, d'Allemagne, sud-africains et lillois.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	8
LISTE DES FIGURES.....	11
LISTE DES TABLEAUX	12
GLOSSAIRE	13
INTRODUCTION.....	14
I. MISE EN PLACE DE L'ETUDE DE STABILITE DES COLLYRES A LA VANCOMYCINE	15
1. Définitions :	15
1.1. Préparations ophtalmiques	15
1.2. La stérilité	15
1.3. Les constantes physicochimiques	15
1.3.1. La teneur.....	15
1.3.2. Osmolalité	15
1.3.3. pH	15
1.3.4. Limpidité.....	16
1.3.5. Coloration	16
1.4. La vancomycine	16
1.4.1. Présentation de la vancomycine	16
1.4.2. Indications de la vancomycine	16
1.4.3. Préparation des collyres à la vancomycine	17
1.4.4. Utilisation des collyres à la vancomycine	17
2. Matériel.....	18
2.1. Matières premières.....	18
2.1.1. Vancomycine	18
2.1.2. Céfuroxime	18
2.1.3. Réactifs, solvants de reconstitution et contenants.....	18
2.2. Stabilité physico-chimique	19
2.2.1. Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP)	19
2.2.2. Mesure de l'osmolalité.....	19
2.2.3. Mesure du pH.....	19
2.2.4. Contrôle visuel (couleur et limpidité).....	19
2.2.5. Contrôles des particules non visibles	19
2.3. Stabilité microbiologique	20
2.3.1. Matériel garantissant la stérilité	20
2.3.2. Matériel lors du prélèvement	20
2.3.3. Bouillons de culture.....	20
2.3.4. Incubateurs.....	20
3. Méthodes	21

3.1.	Profil général de l'étude	21
3.2.	Préparation des collyres à la vancomycine	22
3.3.	Stabilité physicochimique.....	23
3.3.1.	Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP)	23
3.3.1.1.	Choix des conditions opératoires	23
3.3.1.2.	Choix de la phase mobile, de la longueur d'onde et du débit.....	23
3.3.1.3.	Choix de l'étalon interne	24
3.3.1.4.	Conditions opératoires retenues.....	25
3.3.1.5.	Gamme d'étalonnage	25
3.3.1.6.	Produits de dégradation.....	27
3.3.1.7.	Mesure des échantillons	28
3.3.2.	Mesure de l'osmolalité.....	29
3.3.3.	Mesure du pH.....	29
3.3.4.	Contrôle visuel (limpidité et couleur).....	29
3.3.5.	Recherche des particules non visibles.....	29
3.4.	Stabilité microbiologique	30
3.4.1.	Conditions d'utilisation et de validation des bouillons de culture.....	30
3.4.2.	Technique d'analyse de la stérilité des collyres fortifiés.....	31
II.	RESULTATS	33
1.	Stabilité physicochimique.....	33
1.1.	Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP)	33
1.1.1.	Choix de l'étalon interne	33
1.1.2.	Gamme d'étalonnage et répétabilité	33
1.1.3.	Produits de dégradation.....	35
1.1.4.	Mesure des échantillons	36
1.2.	Mesure de l'osmolalité.....	39
1.3.	Mesure du pH.....	40
1.4.	Contrôle visuel (couleur et limpidité).....	42
1.5.	Analyse des particules non visibles	43
1.6.	Analyse du précipité des collyres conservés à température ambiante	44
2.	Stabilité microbiologique	45
2.1.	Validation des bouillons de cultures	45
2.2.	Stérilité des échantillons	45
III.	DISCUSSION.....	47
1.	Conditions générales de l'étude.....	47
1.1.	Matériel utilisé	47
1.2.	Choix des conditions opératoires.....	48
2.	Stabilité des collyres à la vancomycine (50mg/ml)	49
2.1.	Stabilité physicochimique.....	49
2.2.	Stabilité microbiologique	52

2.3.	Efficacité antibactérienne des collyres.....	52
2.4.	En pratique	53
CONCLUSION.....		54
BIBLIOGRAPHIE		55
ANNEXES		58
	Annexe 1.....	58
	Annexe 2 :.....	59
	Annexe 3 :.....	60
	Annexe 4.....	62

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Structure moléculaire de la vancomycine	16
Figure 2 : Flacons de collyres en polyéthylène.....	18
Figure 3 : Chromatographie Liquide Haute Performance Shimadzu®, colonne C18 Nova-Pak® et précolonne µBondapak®	19
Figure 4 : Compteur de particules non visibles	20
Figure 5 : Etiquette des collyres à la vancomycine	22
Figure 6 : Spectre de la vancomycine.....	24
Figure 7 : Procès du test de stérilité par filtration sur membrane.....	32
Figure 8 : Chromatogramme de la vancomycine (200µg/ml) et de la céfuroxime (25µg/ml)	33
Figure 9 : Résultats et droites d'étalonnage de la vancomycine avec trois gammes différentes.....	34
Figure 10 : Profil d'exactitude des gammes d'étalonnage de la vancomycine	35
Figure 11 : Perte AUC de la vancomycine avec les différentes méthodes de dégradations forcées	36
Figure 12: Profil de dégradation de la vancomycine à $\lambda = 280\text{nm}$	36
Figure 13 : Variation de la concentration de vancomycine dans le temps et seuil d'acceptabilité lot 4°C)	37
Figure 14 : Variation des concentrations en vancomycine avec seuil d'acceptabilité (lot TA)	38
Figure 15 : Variation des moyennes d'osmolalité en fonction du temps avec écart-type	40
Figure 16 : Variations des moyennes de pH en fonction du temps avec écart-type	41
Figure 17 : Coloration des collyres (M3) N°28-30-58-60 en comparaison avec de l'eau ppi	43
Figure 18 : Précipité observé dans les collyres conservés à température ambiante à M2.....	43
Figure 19 : Spectre du précipité (0.1mg/ml) et spectre de la vancomycine SANDOZ® (0.1mg/ml).....	44
Figure 20 : Chromatogramme du précipité (1mg/ml).....	44
Figure 21 : Réarrangement de la vancomycine en produits de dégradation cristallins CDP-I [26].....	50
Figure 22 : Chromatogramme d'un collyre (dilué au 1/500e) conservé 20 jours à +25°C [22].....	50
Figure 23 : Zone d'inhibition [31] et de CMI [30] de la vancomycine en fonction du temps.....	53

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Temps d'analyses et calculs du nombre de collyres et de bouillons de culture nécessaires pour l'étude.....	21
Tableau II : Identification des collyres à la vancomycine et temps d'analyse.....	23
Tableau III : Gamme d'étalonnage et points qualités pour le dosage de la vancomycine par CLHP	27
Tableau IV : Méthode de dégradation forcée à l'acide et à la base concentrés	27
Tableau V : Préparation des échantillons à analyser	28
Tableau VI : Ordre d'injection des échantillons	29
Tableau VII : Dégradation forcée de la vancomycine (200µg/ml) à l'acide chlorhydrique et à la soude	35
Tableau VIII : Dégradation forcée de la vancomycine (200µg/ml) à la chaleur	35
Tableau IX : Résultats des concentrations des collyres à la vancomycine à 50mg/ml conservés à 4°C au cours du temps.....	37
Tableau X : Résultats des concentrations des collyres à la vancomycine à 50mg/ml conservés à température ambiante au cours du temps	38
Tableau XI : Osmolalité des collyres à la vancomycine au cours du temps	39
Tableau XII : Mesures du pH des collyres à la vancomycine au cours du temps	41
Tableau XIII : Couleur et limpidité des collyres à la vancomycine au cours du temps.....	42
Tableau XIV : Valeur des AUC du précipité	44
Tableau XV : Validation des bouillons de cultures à J7 et J14.....	45
Tableau XVI : Résultats microbiologiques des collyres à la vancomycine au cours du temps	46
Tableau XVII : Nombre de collyres produits par le préparatoire de la pharmacie du CHRU de Lille en 2014.....	53

GLOSSAIRE

ACN= Acétonitrile

AUC = Air Under the Curve = Aire sous la courbe

CDP = Crystalline degradation products

CLHP = Chromatographie Liquide Haute Performance

CMI = Concentration Minimale Inhibitrice

GERPAC = Groupe d'Évaluation et de Recherche sur la Protection en Atmosphère contrôlée

ICH = International Conference on Harmonisation

PE = Polyéthylène

PPI = Pour Préparation Injectable

PQ = Points Qualités

PVC = Polychlorure de Vinyle

RMN = Résonance Magnétique Nucléaire

TA = Température Ambiante

UV = Ultra Violet

INTRODUCTION

Les infections oculaires telles que les kératites ou conjonctivites ont pris de l'essor ces dernières années, notamment à cause du port de plus en plus fréquent de lentilles de contact et du nombre croissant d'interventions chirurgicales de la cornée (ex : cataracte). Il est estimé 5000 cas de kératites bactériennes en France par an (500.000 cas/an dans le monde) avec une majorité de cocci Gram positif (50 à 90%)(1) (2) (3). Le meilleur moyen de lutter contre ces infections est l'usage d'un ou de plusieurs collyres d'antibiotiques. Malgré la présence d'antibiotiques sous forme de spécialité, certains cas, comme les kératites graves et abcès sévères nécessitent l'utilisation de collyres fortement concentrés et indisponibles sur le marché (4). Le préparatoire de la Pharmacie à Usage Intérieure prend ainsi le relais pour fournir ces collyres dit « fortifiés ». Au CHRU de Lille sont produits hebdomadairement des collyres à la vancomycine, ceftazidime, amikacine, amphotéricine B, PHMB et voriconazole. Pour gagner en efficacité, à l'image de nombreux hôpitaux en France, il est donc envisagé de réaliser qu'une seule production de collyres tous les trois mois, garantissant ainsi un produit toujours disponible pour les services de soins vu la quantité fabriquée et un temps économisé pour le préparatoire.

Afin de mettre en place ce système de production, il est important de s'assurer de la stabilité de ces collyres, d'un point de vue physicochimique, microbiologique et galénique. Il est donc réalisé une étude de stabilité des collyres fortifiés à la vancomycine en suivant les recommandations du Groupe d'Evaluation et de Recherche sur la Protection en Atmosphère contrôlée (GERPAC)(5).

I. MISE EN PLACE DE L'ETUDE DE STABILITE DES COLLYRES A LA VANCOMYCINE

1. Définitions :

1.1. Préparations ophtalmiques

Les préparations ophtalmiques sont des préparations liquides, semi-solides ou solides stériles destinées à être appliquées sur le globe oculaire et/ou les conjonctives ou à être introduites dans le sac conjonctival. Plusieurs catégories de préparations ophtalmiques peuvent être distinguées : les collyres, les solutions pour le lavage oculaire, les poudres pour collyres ou pour lavage ophtalmique, les préparations ophtalmiques semi-solides et les inserts ophtalmiques (6).

Les collyres sont des solutions, des émulsions ou des suspensions stériles aqueuses ou huileuses, contenant une ou plusieurs substances actives et destinées à l'instillation oculaire.

1.2. La stérilité

La stérilité se définit comme l'absence de tout micro-organisme viable. Pour les préparations, la stérilité peut être obtenue en premier lieu par stérilisation terminale, par filtration stérilisante, ou préparation en milieu aseptique (7).

1.3. Les constantes physicochimiques

1.3.1. La teneur

La teneur est la quantité de principe actif présent dans un échantillon. Elle est exprimée ici en concentration (unité de poids /mL) ou en pourcentage par rapport à une valeur cible. La teneur en principe actif doit être compris entre 90-110% de la valeur cible.

1.3.2. Osmolalité

L'osmolalité ξ , permet de mesurer la contribution des différents solutés présents dans une solution à la pression osmotique de cette solution. L'osmolalité tolérée usuellement pour l'œil est comprise entre 225 et 482 mosmol/kg (8).

1.3.3. pH

Le pH est un nombre qui représente conventionnellement la concentration en ions hydrogène d'une solution aqueuse. Le pH d'une solution à examiner s'exprime alors par rapport à celui d'une solution de référence (pH_s) suivant l'équation de Nernst :

$$pH = pH_s - (E - E_s) / k$$

E est la tension en volts de la cellule à examiner, E_s , la tension en volts de la cellule renfermant la solution de pH connu (pH_s) et k la variation de tension par variation d'une unité pH, exprimée en volts. L'œil peut supporter une variation de pH de 3 à 10 (9).

1.3.4. Limpidité

Une solution limpide est une préparation liquide monophasique dans laquelle les substances actives et excipients sont a priori totalement dissous (5). L'absence de particules visibles est constatée par une méthode visuelle (10).

1.3.5. Coloration

Une préparation pharmaceutique sous forme de solution doit garder tout au long de sa conservation ses caractères organoleptiques, notamment une couleur constante. Un changement de couleur signifie un changement de composition (5). L'appréciation de la couleur de la solution est évaluée par une méthode visuelle (10).

1.4. La vancomycine

1.4.1. Présentation de la vancomycine

La vancomycine (figure 1) est un antibiotique appartenant à la famille des glycopeptides dont l'activité bactéricide s'exerce par inhibition de la biosynthèse du peptidoglycane de la paroi bactérienne en ciblant l'undécaprényl-phosphate, transporteur transmembranaire des précurseurs de la paroi (11). La vancomycine possède un spectre antibactérien limité aux bactéries Gram positif (notamment les staphylocoques). Les glycopeptides sont des antibiotiques temps-dépendants. Les doses devront être répétées plusieurs fois par jour pour maintenir une concentration en antibiotique supérieur à la concentration minimale inhibitrice (CMI) de la bactérie.

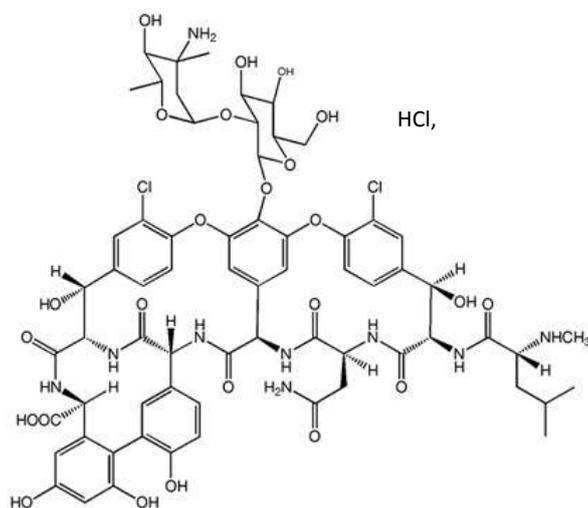


Figure 1 : Structure moléculaire du chlorhydrate de vancomycine

1.4.2. Indications de la vancomycine

L'indication principale des collyres fortifiés est le traitement des kératites bactériennes graves. Une kératite grave est définie par rapport au diamètre de la lésion, de sa localisation autour de l'axe

optique, de son infiltration du stroma et s'il existe ou non une inflammation de la chambre intérieure, une sclérite ou une endophtalmie associée. Une kératite non grave se résout en 48 -72 heures. L'avantage des collyres fortifiés est surtout une concentration supérieure en antibiotique à celle des collyres commercialisés permettant ainsi une meilleure pénétration oculaire et une meilleure efficacité (12). A noter que ces collyres peuvent provoquer des effets indésirables notamment une toxicité sur la surface oculaire (retard de cicatrisation, allergies, sténoses canaliculaire...) (2).

1.4.3. Préparation des collyres à la vancomycine

La préparation des collyres fortifiés à la vancomycine consiste en une dilution réalisée, à partir d'une poudre pour préparation injectable, dans un environnement aseptique (sous hotte à flux d'air laminaire ou sous isolateur). Il n'est pas possible de réaliser une stérilisation terminale du collyre. Certains hôpitaux (Lausanne) effectuent une lyophilisation de manière à augmenter la conservation. De manière à disposer d'une préparation stérile, il est possible de réaliser celle-ci à partir de matières premières stériles ; la garantie maximale consiste à employer des spécialités de qualité injectable. Les flacons de poudre de vancomycine sont reconstitués avec un solvant adéquat (de l'eau pour préparation injectable (PPI) dans notre cas) ; le volume pour la reconstitution est injecté manuellement ou à l'aide d'une pompe péristaltique. Une fois la poudre entièrement dissoute, les solutions sont transférées toujours avec la pompe dans une poche vide stérile. Après homogénéisation, la solution de vancomycine est répartie dans chaque flacon stérile après avoir été filtré (avec une porosité de 0,22 μ m) ceci afin d'assurer la stérilité de la préparation. Les flacons sont alors rebouchés avec un embout collyre puis fermés sans ajout d'agents conservateurs. Les flacons peuvent être en verre (de type II) ou en plastique.

Il est à noter qu'en l'absence d'agent conservateur antimicrobien, les collyres doivent être conditionnés en récipients unidoses ou en récipients multidoses empêchant la contamination microbienne du contenu après ouverture (6). La Pharmacopée n'impose pas d'ajout de conservateurs si le principe actif est doté d'une activité antimicrobienne (9). A l'échelle hospitalière, seuls les conditionnements multidoses existent. Ces préparations multidoses sont conditionnées en récipients permettant l'administration à plusieurs reprises d'une goutte de la préparation. Les récipients contiennent au maximum 10mL de préparation.

1.4.4. Utilisation des collyres à la vancomycine

Les posologies habituelles pour les collyres à la vancomycine peuvent aller jusqu'à 1 goutte toutes les heures dans le cas des kératites bactériennes graves (13). Ces collyres sont généralement prescrits pendant une à deux semaines voir plus selon la clinique. Il est impératif de conserver le flacon à une température voisine de 4°C. L'utilisateur devra veiller à bien se laver les mains avant et après l'instillation. Il est indispensable de ne pas toucher l'œil, la paupière ou les cils avec l'embout du récipient afin d'éviter une contamination bactérienne.

2. Matériel

2.1. Matières premières

2.1.1. Vancomycine

Pour la fabrication des collyres : vancomycine Sandoz® 1g, poudre pour préparation injectable, lot EC0066 de péremption 08/2015

Pour la mise au point de la méthode et la fabrication de solutions pour les points qualités lors des dosages : vancomycine poudre, matière première à usage pharmaceutique.

2.1.2. Céfuroxime

Céfuroxime Farmabios®, matière première, lot 22400D2 0581124 G420

2.1.3. Réactifs, solvants de reconstitution et contenants

a) Préparation des collyres :

- Eau stérile Versilène® Fresenius, 1000 mL, lot 14B16E3C, péremption 01/2017
- Flacons, inserts et bouchons sont en polyéthylène, Bexen Oiarso (Figure 2).



Figure 2 : Flacons de collyres en polyéthylène

b) Méthodes de dosages

- Eau stérile Versilène® Fresenius, 1000 mL
- Chlorure de sodium 0,9% freeflex® Fresenius Kabi, 1000 mL
- Acétonitrile HPLC-R Biosolve®, lot 922131, péremption le 03/2016
- Acétate de sodium anhydre, référence SO00351000, Scharlau®
- Acide acétique glacial RPE 1L, référence 401391, Carlo Erba®

2.2. Stabilité physico-chimique

2.2.1. Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP)

La chromatographie liquide haute performance est une technique de séparation chromatographique reposant sur la distribution différentielle des espèces entre deux phases non miscibles : Une phase stationnaire contenue sur une colonne et une phase mobile liquide qui traverse cette phase stationnaire. Elle permet de déterminer la concentration en principe actif.

Le système est composée d'une pompe LC-20AD, Shimadzu®, d'un détecteur UV/Visible Perkin Elmer Series 200® et d'un module de communication CBM-20A, Shimadzu® qui permet l'interface entre le détecteur et le logiciel : LC solution, version 1.25, numéro 223-07340-91, Shimadzu corporation®. Le matériel utilisé pour séparer les molécules étudiées sont une colonne C18 Nova-Pak® 4µm ; 4,6x150mm, référence WAT044375, Waters® et une précolonne µBondapak™ C18 10µm, référence WAT044480, Waters®.



Figure 3 : Chromatographie Liquide Haute Performance Shimadzu®, colonne C18 Nova-Pak® et précolonne µBondapak®

2.2.2. Mesure de l'osmolalité

- Micro-Osmomètre modèle 3300, Advanced®

2.2.3. Mesure du pH

- pH-mètre HI 223, Hanna Instruments®

2.2.4. Contrôle visuel (couleur et limpidité)

- Fonds noir et blanc (apparentés à une mireuse) avec une rampe d'éclairage

2.2.5. Contrôles des particules non visibles

- Automated Parenteral Sampling System (APSS-2000)®, Particle Measuring Systems®



Figure 4 : Compteur de particules non visibles

2.3. Stabilité microbiologique

2.3.1. Matériel garantissant la stérilité

- Hotte à flux d'air laminaire horizontal, permettant la protection des échantillons.
- Autoclave, permettant la stérilisation du matériel par le procédé de chaleur humide.

2.3.2. Matériel lors du prélèvement

- Flacons 120 mL, verre, col large, référence 215.2638, VWR®
- Bouchons, référence 215.2685, VWR®
- Membranes filtrantes stériles Sartorius en nitrate de cellulose avec pores de 0,45µm, 47 mm, référence 611.0675, VWR®
- Consommables : compresses stériles, ciseaux stériles, seringues stériles 1 mL, seringues stériles 50 mL, aiguilles stériles, gants stériles, pschitt Surfianos®, alcool 70° et champs stériles
- Matériel réutilisable : rampe à vide Combisart® Sartorius Stedim biotech, verrerie, réservoirs et pinces en métal à autoclaver après chaque manipulation.

2.3.3. Bouillons de culture

- Diluant peptone sel 500 g, référence CM0733B, Oxoid Microbiology products®
- Bouillon au Thioglycollate avec Reszurine 500 g, référence 356-4084, Bio-rad®
- Milieu caséine soja T.C.S. 500 g, référence 64144, Bio-rad®

2.3.4. Incubateurs

- Incubateurs à 22°C et à 35°C
- Réfrigérateur à 4±2°C

3. Méthodes

3.1. Profil général de l'étude

L'objectif de l'étude est de démontrer une stabilité physico-chimique et microbiologique des collyres à la vancomycine à 50mg/mL selon les conditions de préparation propres au CHRU de Lille. Après une revue exhaustive de la littérature, il est décidé de tester deux conditions de conservation. Bien que plusieurs études (9) (14) montrent l'intérêt d'une conservation des collyres au congélateur (-18°C), ce mode de conservation n'est pas retenu du fait d'une décongélation difficile à maîtriser et d'une stabilité fortement réduite après décongélation. Il est donc retenu une comparaison d'une conservation au Réfrigérateur (4°C) (lot 4°C) et à température ambiante avec 60% d'humidité (lot TA). Dans les deux cas les flacons sont conservés à l'abri de la lumière.

Au vue des données de la littérature (Annexe 1), il est choisi de tester une durée d'étude de 4 mois pour les collyres conservés à 4°C et 3 mois pour ceux conservés à température ambiante.

Comme l'exige la Pharmacopée Européenne pour l'étude microbiologique, un minimum de 4 unités de chaque lot doit être analysé (5). En plus de ce facteur et afin de produire un nombre de collyres suffisant, il est important de prendre en compte les différents temps d'analyses. Une analyse est obligatoire à T0 afin de s'assurer d'une part de la stérilité de la production, et d'autre part de constater des concentrations en vancomycine acceptables. Le T0 est ensuite pris comme repère pour toutes les autres analyses à venir.

Le premier mois étant critique, une analyse physicochimique et microbiologique est réalisée à J7, J14, J21 et J28. Le reste des analyses se font à M2, M3 pour les deux lots et M4 pour le lot 4°C. Le moindre écart avant la fin programmée de l'analyse met automatiquement fin à l'étude. Les temps d'analyse avec le nombre de flacons de collyres sont répertoriés dans le tableau I.

Temps	0	J7	J14	J21	J28	M2	M3	M4	TOTAL
Tx	T0	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	8
Collyres lot 4°C	4	4	4	4	4	4	4	4	32
Collyres lot TA	4	4	4	4	4	4	4	-	28
Membranes	8	8	8	8	8	8	8	4	60
Bouillons Thioglycolate	8	8	8	8	8	8	8	4	60
Bouillons Caséine soja	8	8	8	8	8	8	8	4	60

Tableau I : Temps d'analyses et calculs du nombre de collyres et de bouillons de culture nécessaires pour l'étude

A chaque temps d'analyse, est réalisé dans cet ordre:

- Un contrôle de la stérilité
- Un dosage par chromatographie liquide haute performance
- Une mesure de l'osmolalité
- Une mesure du pH
- Un contrôle visuel de la limpidité et de la couleur

L'analyse microbiologique est pratiquée en premier car les analyses physicochimiques ne permettent pas de conserver une stérilité du collyre.

Les résultats sont rapportés dans un tableau Excel.

3.2. Préparation des collyres à la vancomycine

Les collyres sont reconstitués au CHRU de Lille sous hotte à flux laminaire contenue dans un environnement de classe B (15). Trente flacons de vancomycine 1g sont reconstitués avec de l'eau ppi. Le remplissage et le vidage des flacons de vancomycine se font à l'aide d'une pompe péristaltique Repeater BAXA® qui injecte un volume standardisé de 20ml pour chaque flacon. Après reconstitution des flacons, les 30 x 20ml sont transvasés dans une poche vide stérile de volume adaptée en PVC. Après s'être assuré de l'homogénéité de la poche de 600mL à une concentration de 50mg/mL, 10mL de solution sont introduits dans 60 flacons en polyéthylène après avoir été filtré par un filtre en ligne de 0,22 µm. Une fois le remplissage terminé, le compte-gouttes et le bouchon sont positionnés sur chaque flacon (Fiche de fabrication en annexe 2).

Les collyres destinés à être conservé à une température de 4°C sont étiquetés avec des numéros pairs. Ceux conservés à température ambiante de 25°C, sont étiquetés avec des numéros impairs.

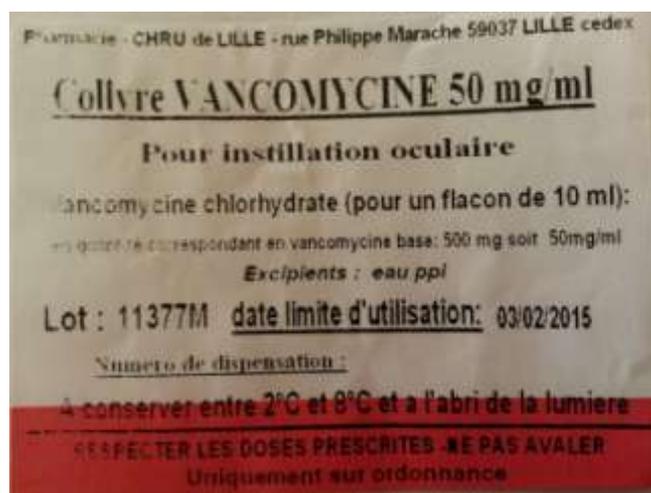


Figure 5 : Etiquette des collyres à la vancomycine

Les collyres sont alors conservés à la température adéquate et étudiés à un temps bien précis (tableau II). A un instant t et pour une condition de conservation propre, il est analysé 4 échantillons

dont 2 ont été reconstitués à des temps éloignés afin de s'assurer de la bonne homogénéité de remplissage au cours du temps.

TEMPS	4°C	TA
J0	2-4 / 34-36	1-3 / 33-35
J7	6-8 / 38-40	5-7 / 37-39
J14	10-12 / 42-44	9-11 / 41-43
J21	14-16 / 46-48	13-15 / 45-47
J30	18-20 / 50-52	17-19 / 49-51
M2	22-24 / 54-56	21-23 / 53-55
M3	26-28 / 58-60	25-27 / 57-59
M4	30-32 / 62-64	X

Tableau II : Identification des collyres à la vancomycine et temps d'analyse

3.3. Stabilité physicochimique

3.3.1. Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP)

3.3.1.1. Choix des conditions opératoires

Le dosage de la vancomycine par CLHP est une méthode sensible et est bien détaillé dans la littérature, c'est pourquoi cette technique de dosage a été retenue (Annexe 3). L'utilisation d'une CLHP permet d'isoler les différents constituants d'un mélange et de les quantifier. Cette technique séparative est basée sur les différences de répartition des molécules entre deux phases non-miscibles. D'une part, la phase stationnaire qui est une colonne C18, apolaire et d'autre part la phase mobile, constituée principalement d'eau et donc polaire. Outre la colonne, la CLHP est composé d'un injecteur qui délivre un volume constant à chaque analyse, d'une pompe à haute pression (près de 160 bar) pour permettre une élution régulière de l'éluant et d'un détecteur qui analyse l'échantillon en fonction de sa densité optique (16). Ainsi, il est important de bien fixer la longueur d'onde à laquelle on travaille afin d'obtenir une absorbance sensible et le plus spécifique possible. Le détecteur utilisé est opérationnel dans l'UV/Visible. L'ensemble du système est relié à un module de communication qui permet l'interprétation des résultats via un logiciel informatique.

3.3.1.2. Choix de la phase mobile, de la longueur d'onde et du débit

La phase mobile est à choisir avec précaution. Elle est en effet primordiale car s'est par son intermédiaire que les molécules sont éluées et donc séparées. La phase stationnaire étant une colonne C18 apolaire, la phase mobile doit avoir une polarité contraire pour éluer les produits. Ces derniers selon leur polarité ont une affinité plus ou moins grande avec la phase mobile et sont donc élués à des temps différents. Il est donc possible de séparer les différentes molécules présentes dans la phase mobile si la méthode d'analyse est adaptée.

La vancomycine est une molécule hydrophile polaire (3). Plusieurs phases mobiles sont retrouvées dans la littérature pour la séparation de la molécule (Annexe 3). Après quelques tests permettant d'évaluer la bonne qualité du pic et un temps d'élution correcte. Il a été retenu une phase mobile polaire essentiellement composée d'eau ppi.

La phase mobile est préparée selon le protocole suivant :

Préparation d'une solution de tampon acétate :

- Prélever 6 g d'acide acétique glacial dans un bécher et transvaser le tout dans une fiole jaugée de 1000 mL
- Prélever 0,68 g d'acétate de sodium sur papier plié puis introduire la poudre dans la fiole jaugée de 1000 mL.
- Compléter la fiole jaugée à 1000 mL avec de l'eau PPI en s'assurant que la poudre soit complètement dissoute.
- Laisser la fiole 2 minutes aux ultrasons

Préparation de la phase mobile :

- Transvaser environ 150 mL de tampon de la fiole jaugée dans une éprouvette. Ajouter précisément 100 mL d'Acétonitrile (ACN) dans la fiole jaugée et compléter à 1000 mL avec le tampon présent dans l'éprouvette. Au final : 900 mL de tampon acétate et 100 mL d'ACN.
- Agiter la fiole par retournements.
- Filtrer la solution avec un filtre à 0,22µm et une pompe à vide pour dégazer.

La phase mobile est préparée la veille au soir et rince la colonne pendant 12 heures à un débit de 0,1ml/min.

Le détecteur de la CLHP permet une mesure de la longueur d'onde dans l'UV-Visible. Il est donc impératif que la vancomycine et que l'étalon interne possèdent des caractéristiques spectrales de 200 à 750nm (UV de 200 à 400nm et visible de 400 à 750nm). Le détecteur CLHP utilisé ne possédant pas de barrette de diodes, une longueur d'onde bien précise doit être choisie. Un spectre de la vancomycine est donc réalisé grâce à un spectrophotomètre (figure 6). En comparant les longueurs d'ondes déjà choisie dans la littérature (Annexe 3), il a été décidé de travailler à une longueur d'onde sensible et spécifique de 280 nm.

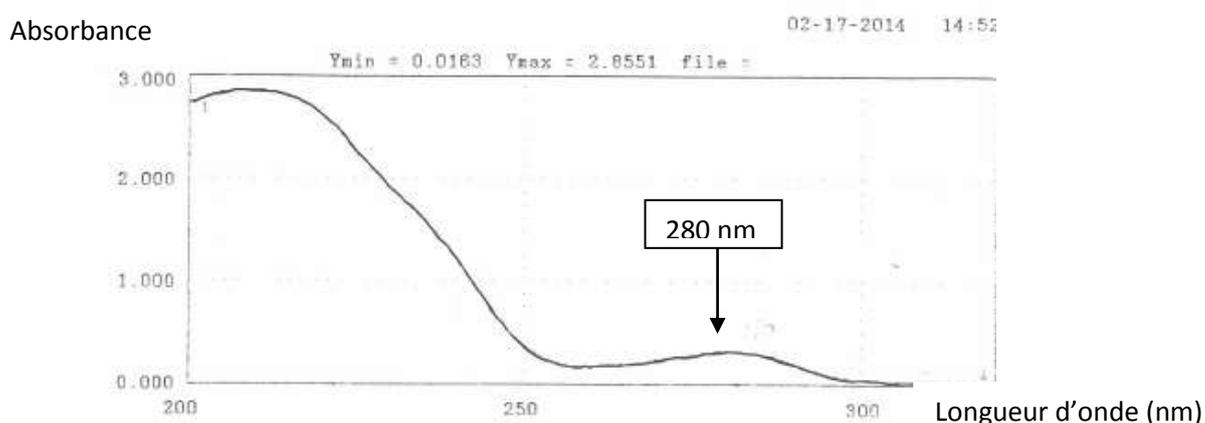


Figure 6 : Spectre de la vancomycine

3.3.1.3. Choix de l'étalon interne

L'utilisation d'un étalon interne dans une analyse chromatographique n'est pas obligatoire. Cependant il permet de s'affranchir des variabilités au cours d'une même analyse ou entre deux analyses différentes (Volume d'injection, température, pression différents) (5). Ainsi, il est obtenu un résultat homogène indépendant des conditions d'utilisation. L'étalon interne doit répondre à plusieurs critères afin qu'il soit satisfaisant. En premier lieu, il doit être détecté à la même longueur

d'onde que la molécule d'intérêt (ce point est important dans notre expérience car la CLHP ne possède pas de barrettes de diodes). Ensuite l'étalon interne doit avoir un profil différent de la molécule à tester. Son temps de rétention doit être bien distinct et séparé et ne doit surtout pas se superposer au pic de la molécule à analyser. La séparation des pics est évaluée par le facteur de résolution R, celui-ci devant être supérieur à 1.5 pour obtenir une bonne séparation (17). Enfin, il doit être stable pendant toute la durée de l'analyse.

La céfuroxime a l'avantage d'être absorbé à une longueur d'onde de 280 nm et d'avoir son pic d'absorption assez proche de celui de la vancomycine (18).

3.3.1.4. Conditions opératoires retenues

La colonne C18 Nova-Pak® 4µm ; 4,6x150mm, référence WAT044375, Waters® est donc retenue. L'analyse se déroule à une longueur d'onde de 280nm avec une phase mobile tampon acétate/ ACN 90:10 v:v d'un débit de 1,2ml/min.

3.3.1.5. Gamme d'étalonnage

Pour procéder à des dosages en CLHP, il est nécessaire de réaliser une gamme d'étalonnage. Celle-ci est réalisée en dosant une substance de référence dont la teneur est parfaitement connue et maîtrisée. Les échantillons de vancomycine sont conservés à 4°C pour éviter toute dégradation du principe actif.

La gamme d'étalonnage conduit à l'obtention d'une équation de droite avec laquelle le calcul des concentrations des échantillons inconnus est possible.

La gamme d'étalonnage doit être préalablement validée avant tout dosage en routine. Plusieurs tests sont donc à réaliser : la calibration, la fidélité et l'exactitude (5).

- **La calibration**

La droite d'étalonnage obtenue doit être linéaire. La linéarité de cette technique analytique est sa capacité dans un intervalle de dosage donné d'obtenir des résultats directement proportionnels à la quantité en principe actif contenu dans l'échantillon. Pour se faire, il est réalisé trois gammes indépendantes afin d'obtenir une équation de droite la plus fiable possible. La linéarité est exprimée par le coefficient de corrélation R^2 qui doit être le plus proche possible de 1.

- **La fidélité**

La fidélité garantit l'homogénéité des mesures réalisées à partir d'un même échantillon. Elle est représentée par le calcul du coefficient de variation et renseigne uniquement sur la distribution des erreurs aléatoires. La fidélité se traduit par plusieurs définitions :

- La répétabilité, qui étudie pour une méthode d'analyse fixée, la cohérence des résultats d'une expérience réalisée avec des échantillons identiques, préparés par une même personne et analysés dans les mêmes conditions opératoires dans un laps de temps très court. La répétabilité est étudiée ici par la répétition d'analyse de 3 fois 4 points qualité (PQ). Ce processus est réalisé à trois temps différents. Au final, la répétabilité est interprétée sur l'analyse de 36 PQ.

- La reproductibilité concerne des résultats d'essais indépendants obtenus avec une méthode d'analyse fixée et des échantillons d'essai identique. Les résultats ne varient donc pas selon un autre opérateur ou un autre appareillage.

- **L'exactitude**

L'exactitude traduit l'erreur systématique d'une méthode de dosage. Elle représente l'écart entre la valeur moyenne des résultats mesurés et une valeur théorique considérée comme vraie. L'exactitude est calculée par le rapport des concentrations calculées sur les concentrations théoriques. Le résultat permet d'obtenir le taux de recouvrement (R) défini par l'équation suivante :

$$R (\%) = (C_{\text{calculées}} / C_{\text{théoriques}}) \times 100$$

Afin d'évaluer l'exactitude d'une manière globale conformément aux règles fixées par l'International Conference on Harmonisation (ICH) (19), il est utilisé le test : *β-expectation tolerance interval* qui est établi par un test de Student ($\alpha = 5\%$) (20). Les ddl sont obtenus par la formule suivante : $ddl = k \times j - n$, où k, j et n représentent les niveaux de concentration ($k = 4$), le nombre de jours de validation ($j = 3$) et le nombre de répétition ($n = 3$), respectivement (21). Ce test est basé sur l'erreur totale (erreur systémique + erreur aléatoire), erreur qui prend en compte la justesse (biais) et la fidélité intermédiaire (écart-type). Ce test permet alors la réalisation d'un profil d'exactitude. Une fois l'intervalle de tolérance calculé et compris dans les limites d'acceptation (10%), la méthode est déclarée fiable et viable pour quantifier les échantillons (22).

- **Gamme d'étalonnage**

La gamme se représente sous forme de 5 points de gamme (G) répartis de 60 à 140% (5) de la valeur cible et 4 points intermédiaires (PQ), contrôle qualité. Afin d'avoir une bonne sensibilité, les concentrations cibles sont calculées vis-à-vis des données de la littérature (14) (8). La valeur retenue pour l'analyse des collyres à la vancomycine est de 200µg/mL, la gamme d'étalonnage sera donc basée sur celle-ci et répétée 3 fois pour être valide. Les données sont entrées dans un tableur Excel®, où les tests statistiques sont calculés.

Il a été au préalable produit 2 solutions de vancomycine et de céfuroxime de la façon suivante :

- S1 = Mettre 50 mg de vancomycine dans une fiole jaugée de 50 mL et compléter au trait de jauge avec de l'eau PPI. **S1 = 1 mg/mL**
- S2 = Mettre 12,5 mg de cefuroxime dans une fiole jaugée de 50 mL et compléter au trait de jauge avec de l'eau PPI. **S2 = 0,25 mg/mL**

Les concentrations en étalon interne sont calculées en fonction de l'AUC de la vancomycine. Les signaux de la vancomycine et de l'étalon interne de céfuroxime doivent être du même ordre de grandeur pour garder une bonne interprétation.

N°	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	G	G	G	G	G	PQ	PQ	PQ	PQ
VAN µg/mL	100	150	200	250	300	125	175	225	275
CEF µg/MI	25	25	25	25	25	25	25	25	25
S1 µL	100	150	200	250	300	125	175	225	275
S2 µL	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Eau PPI µL	800	750	700	650	600	775	725	675	625

Tableau III : Gamme d'étalonnage et points qualités pour le dosage de la vancomycine par CLHP

Les solutions sont préparées grâce à des micropipettes de 200 µL et de 1000 µL dans des tubes à hémolyse. Ces derniers sont conservés à une température inférieure à 8°C tout le long de l'expérience. Une fois la colonne rincée trente minutes à l'eau ppi puis une heure au minimum avec la phase mobile, il est injecté 3x50µL d'un blanc (eau ppi) dans la boucle de la CLHP avec une calibration du détecteur à la longueur d'onde souhaitée. Les résultats sont exprimés en AUC et le rapport des AUC de la vancomycine et de la céfuroxime ont permis de créer une droite d'étalonnage. Pour chaque droite le coefficient de corrélation doit être calculé et être le plus proche de 1.

3.3.1.6. Produits de dégradation

Lors d'une étude de stabilité, il est important d'être en mesure de mettre en évidence l'apparition de produits de dégradation. La méthode doit être suffisamment sensible pour détecter les produits de dégradation en faible quantité et suffisamment résolutive pour les distinguer de la vancomycine. Afin d'identifier ces produits, il est nécessaire de réaliser une dégradation forcée. Pour ce faire, des variations importantes de température et de pH vont être nécessaires pour dégrader la vancomycine. Le but n'étant pas de détruire toute la molécule originelle mais d'en détruire environ 20% en mettant en évidence les produits de dégradations (5). Les solutions de vancomycine subissent des traitements à l'acide et à la base (tableau IV):

Dégradation à l'acide	Volume en mL	Volume en mL	Dégradation à la base	Volume en mL	Volume en mL
vancomycine 800 µg/mL	2	2	vancomycine 800 µg/mL	2	2
HCl 0,1 N	2	0	NaOH 0,1 N	2	0
HCl 0,5 N	0	2	NaOH 0,5 N	0	2
1H puis neutraliser avec :			1H puis neutraliser avec :		
NaOH 0,1 N	2	0	HCl 0,1 N	2	0
NaOH 0,5 N	0	2	HCl 0,5 N	0	2
Phase mobile	2	2	Phase mobile	2	2
Total	8	8	Total	8	8

Tableau IV : Méthode de dégradation forcée à l'acide et à la base concentrés

Une dégradation à la chaleur est également réalisée. Plusieurs solutions de vancomycine sont fabriquées et mises 5H au bain-marie à 80°C. Une analyse par CLHP est réalisée toutes les heures jusqu'à 20% de dégradation de la vancomycine.

Les résultats des chromatogrammes sont comparés au chromatogramme initial avant dégradation. La méthode doit permettre une séparation des produits de dégradation du principe actif. L'étalon interne ne doit pas interférer ou masquer ces produits.

3.3.1.7. Mesure des échantillons

Les échantillons de collyres à la vancomycine sont analysés par la méthode CLHP. Les AUC de la vancomycine et de l'étalon interne sont calculées. Les rapports de ces AUC sont incorporées à l'équation de droite d'étalonnage obtenue lors de la validation de la méthode. Le résultat final est alors exprimé en concentration de vancomycine (mg/mL).

- **Préparation des échantillons à analyser**

Il est nécessaire de travailler avec les mêmes concentrations qu'utilisées lors de la validation de la gamme en cherchant une dilution ayant une concentration en milieu de gamme soit 200µg/ml. La concentration en étalon interne est aussi fixée à 25µg/ml. Chaque dilution est analysée 3 fois afin d'être le plus fidèle possible (coefficient de variation le plus faible possible). Trois points qualité « PQ » sont préparés extemporanément avec une concentration connue de vancomycine pour s'assurer de la reproductibilité de la méthode. Ces PQ devant avoir une variation inférieure à 5%.

Les solutions mères sont préparées de la façon suivante :

- **PQ** : Préparer une solution mère S_{PQ} (1mg/ml) : 50mg de vancomycine dans une fiole jaugée de 50ml. Filtrer la solution avec un papier filtre.
- **Etalon interne** : Préparer une solution mère de céfuroxime S_{ET} (0.25mg/ml) : 12.5mg de céfuroxime dans une fiole jaugée de 50ml. Filtrer la solution avec un papier filtre.
- **Collyre** : Préparer des solutions mères pour chaque collyre S_{xc} (1mg/ml) : 200µL de collyre x dans une fiole jaugée de 10mL

Les échantillons à analyser sont préparés dans des tubes à hémolyse de la façon suivante :

Collyre VANCO	PQ N°1-2-3	COLLYRES x8
S_{xc} (1 mg/mL)	-	200 µL
S_{ET} (0,25 mg/mL)	100 µL	100 µL
Eau ppi	700 µL	700 µL
S_{PQ} (1 mg/mL)	200 µL	-
<i>Concentrations vancomycine</i>	<i>200µg/mL</i>	<i>200µg/mL</i>
<i>Concentrations céfuroxime</i>	<i>25µg/mL</i>	<i>25µg/mL</i>

Tableau V : Préparation des échantillons à analyser

- **Injection des échantillons**

Les échantillons sont ensuite injectés à raison de 3 x 50µL dans la boucle de la CLHP dans l'ordre suivant : (C_x = collyre N°x)

PQ ₁	C ₁ x 3	C ₃ x 3	C ₅ x 3	C ₇ x 3	PQ ₂	C ₂ x 3	C ₄ x 3	C ₆ x 3	C ₈ x 3	PQ ₃
-----------------	--------------------	--------------------	--------------------	--------------------	-----------------	--------------------	--------------------	--------------------	--------------------	-----------------

Tableau VI : Ordre d'injection des échantillons

3.3.2. Mesure de l'osmolalité

L'osmolalité est mesurée grâce à un osmomètre par la mesure de l'abaissement cryoscopique ΔT (23). Une faible quantité de collyre est prélevée à l'aide d'une pipette et insérée dans la machine. Il s'en suit une congélation de l'échantillon et la mesure de l'abaissement cryoscopique. Elle est exprimée en mmosmol/kg,

$$\xi = [\Delta T / 1,86] \times 1000 \text{ mosmol/kg}$$

3.3.3. Mesure du pH

Le pH des collyres est mesuré par un pH-mètre. La détermination potentiométrique du pH est effectuée par mesure de la différence de potentiel entre 2 électrodes plongeant dans la solution à examiner (24). La sonde est plongée dans le collyre à la vancomycine. Après avoir attendu la stabilisation de la valeur numérique du pH, le résultat est obtenu directement.

3.3.4. Contrôle visuel (limpidité et couleur)

- **Limpidité**

Le contrôle de la limpidité se fait par analyse visuelle des échantillons dans des tubes à essais identiques, de verre neutre, incolore et transparent. L'échantillon est alors comparé à de l'eau R. Les liquides sont examinés dans l'axe du tube sur fond noir en opérant à la lumière diffuse du jour. Un liquide est considéré comme limpide si sa limpidité correspond à celle de l'eau R (25).

- **Couleur**

Le changement de couleur d'une solution pharmaceutique est un marqueur de changement de composition du produit. La couleur des collyres sera déterminée par un contrôle visuel en comparant dans un tube à essai le collyre à un instant t et de l'eau ppi. Il ne doit pas y avoir de différence visible.

3.3.5. Recherche des particules non visibles

La contamination particulaire des collyres est composée de particules étrangères, non dissoutes et mobiles, autres que des bulles de gaz, qui ont été involontairement introduites dans ces préparations (25). Dans ce cas, une augmentation importante de particules non visibles est la première étape vers une agrégation et formation de particules visibles (de 50 µm à 100 µm). La présence ou non de particules non visibles est détectée selon le procédé de comptage des particules par blocage de la lumière, décrite à la Pharmacopée Européenne. Une lumière laser traverse l'échantillon de collyre en mouvement, la présence des particules entraîne une diminution de la lumière qui est proportionnelle à la taille des particules.

Le matériel utilisé est testé préalablement afin de confirmer que la technique en elle-même, ne soit pas pourvoyeuse de particules. Pour cela 5 échantillons de 5mL d'eau exempte de particules R sont analysés. Le nombre de particules de 10µm ou plus doit être inférieur à 25 pour les 25mL réunis.

Trois collyres de 10mL sont mélangés afin d'obtenir un volume supérieur à 25mL comme le recommande la Pharmacopée Européenne. Les bulles de gaz éventuellement formées sont éliminées en laissant l'échantillon 2 minutes aux ultrasons.

Il est prélevé à 4 reprises un volume de 5 mL pour analyse dans le compteur à particules, les premiers 5mL étant rejetés. Le nombre moyen de particules est calculé en fonction du nombre de particules de taille supérieure ou égale à 10µm et à 25µm. La préparation est jugée conforme si le nombre moyen de particules présentes dans les unités examinées n'est pas supérieur à 6000 par récipient pour les particules de taille supérieure ou égale à 10µm et à 600 par récipient les particules de taille supérieure ou égale à 25µm (25) (26).

3.4. Stabilité microbiologique

3.4.1. Conditions d'utilisation et de validation des bouillons de culture

3.4.1.1. Conditions générales :

Une des conditions nécessaire au contrôle des collyres à la vancomycine est de s'assurer qu'ils restent stériles tout au long de l'étude. Il est donc indispensable de réaliser à chaque analyse une étude microbiologique. Cet essai suit les prescriptions établies par la Pharmacopée Européenne. Les collyres sont ensemencés dans des bouillons de culture dont l'efficacité est préalablement validée.

La Pharmacopée Européenne recommande l'utilisation de deux bouillons de culture d'un volume voisin de 55mL : Le milieu liquide au thioglycolate, principalement destiné à la recherche des bactéries anaérobies mais également aérobies et le milieu à l'hydrolysate de caséine et de soja convenant davantage à la recherche des levures et moisissures ainsi que des bactéries aérobies (7) (5).

Le milieu thioglycolate une fois fabriqué, est conservé à température ambiante à l'abri de la lumière. Une fois la mise en culture du collyre, il est incubé à 35°C pendant 14 jours.

Le milieu à l'hydrolysate de caséine et de soja est également conservé à température ambiante à l'abri de la lumière. Il est quant à lui incubé à une température de 22°C pendant 14 jours.

Un échantillon est dit stérile, si aucune pousse bactérienne n'est détectée dans les 14 jours après incubation (7).

Les bouillons de cultures sont fabriqués peu avant le début de l'étude et identifiés par un numéro de lot. Chaque lot est ensuite testé afin de vérifier :

- La fertilité des milieux de cultures utilisés pour l'ensemencement
- La vérification que la préparation ne présente pas par elle-même un effet inhibiteur sur la croissance microbienne.

3.4.1.2. Test de croissance :

Chaque lot de milieux de culture est testé afin de s'assurer de leur capacité à détecter la présence de microorganismes (bactéries aérobies, bactéries anaérobies, levures et moisissures). Pour se faire, des souches bactériennes sont incubées dans les milieux de thioglycolate et d'hydrolysate de caséine soja. Le bouillon répond au test de validation si une croissance bactérienne est détectée après quelques jours d'incubation dans les conditions qui sont propres à chaque bouillon (5).

Les bactéries testées sont : *Stenotrophomonas maltophilia* (bactérie aérobie stricte à bacille Gram négatif), *Staphylococcus aureus* (bactérie anaérobie facultative à cocci Gram positif) et *Escherichia coli* (bactérie aérobie facultative à bacille Gram négatif) (Annexe 4).

3.4.1.3. Témoin négatif :

Un témoin négatif est également nécessaire pour montrer que la méthode utilisée n'est pas source d'une contamination bactérienne (Annexe 4).

3.4.2. Technique d'analyse de la stérilité des collyres fortifiés

La technique d'analyse doit se dérouler dans des conditions aseptiques afin d'éviter toute contamination bactérienne qui ne soit pas liée au collyre. Les manipulations se font donc sous hotte à flux laminaire.

L'ensemencement choisi est la filtration sur membrane, méthode plus sensible que l'ensemencement direct et à employer en premier lieu. Une membrane en nitrate de cellulose qui a servi préalablement à filtrer les collyres est donc incubée dans les différents bouillons de culture. Ces membranes sont adaptées à la filtration des solutions aqueuses (7). La taille des pores de 0.45µm retient suffisamment les microorganismes tout en permettant un débit de filtration élevé sous vide (5) (8).

Sous hotte à flux laminaire a été installée sur un champ stérile, une rampe à vide Combissart® présentant trois entrées où sont positionnés les entonnoirs en inox reliée à une pompe à vide (Figure 7).

Les instruments stériles sont directement déposés sur le champ stérile alors que les flacons contenant les collyres, les liquides de rinçage et les bouillons de cultures sont préalablement désinfectés par du Surfanios®. Les membranes de nitrate de cellulose sont déposées grâce à une pince stérile sur les membranes de filtration au niveau du système clos puis l'entonnoir en inox est positionné au-dessus de chaque membrane.

Le nombre minimal d'unités à analyser pour les préparations ophtalmiques selon la Pharmacopée Européenne est de 4 unités quel que soit le volume pour un lot inférieur à 100 unités (7). Par conséquent, il est analysé 4 collyres conservés à température ambiante et 4 conservés à 4°C. Le volume de collyre nécessaire pour contrôler la stérilité est de 1 mL. En effet la pharmacopée impose un volume de 1 mL quel que soit le volume de la préparation pour les liquides antibiotiques (5).

Après avoir désinfecté le collyre et mis en place la rampe de filtration avec les membranes et les entonnoirs, le bouchon du collyre est retiré en veillant à ne pas toucher le compte-gouttes du flacon. Un millilitre du collyre est prélevé avec une seringue stérile à travers le compte-gouttes et transvasé sur la membrane. La rampe de filtration ne comportant que trois filtres, l'expérience est réalisée à un

instant t avec trois collyres. Une fois les 3 x 1mL de collyres transvasés sur les membranes, la pompe est mise en route. Les membranes sont rincées avec 3 x 100 mL de peptone sel à 9,5 g/L. La peptone est préférée à de l'eau ppi car étant isotonique elle conserve mieux l'intégrité des bactéries. Elle permet un bon rinçage de la membrane et réduit le risque d'inhibition de croissance provoqués par les résidus d'antibiotiques adsorbés.

Une fois le rinçage terminé, le vide est coupé de façon stérile. Le but étant d'éviter un retour des liquides de rinçage vers la membrane. Une fois les entonnoirs retirés, les membranes sont découpées à l'aide d'une paire de ciseaux stériles à usage unique et une pince désinfectée avec de l'alcool éthylique à 70°. La première partie de la membrane est incorporée dans un flacon à col large (afin de limiter au maximum un contact entre le verre et la membrane) contenant un milieu caséine soja. La seconde moitié est incorporée dans le flacon contenant le milieu thioglycolate.

L'expérience est rééditée jusqu'à ce que les 8 collyres soient analysés. Si la rampe reste la même pendant le procès, de nouveaux entonnoirs stériles sont utilisés.

Les 8 flacons de thioglycolate sont alors incubés à 35°C pendant 14 jours avec une lecture intermédiaire à 7 jours. Idem pour les 8 flacons de caséine soja, incubés quant à eux à 22°.

Le collyre est défini stérile si aucune pousse n'est détecté durant ces 14 jours dans les 2 conditions de culture.

A la fin de l'expérience, le matériel réutilisable est lavé puis stérilisé à la chaleur humide.

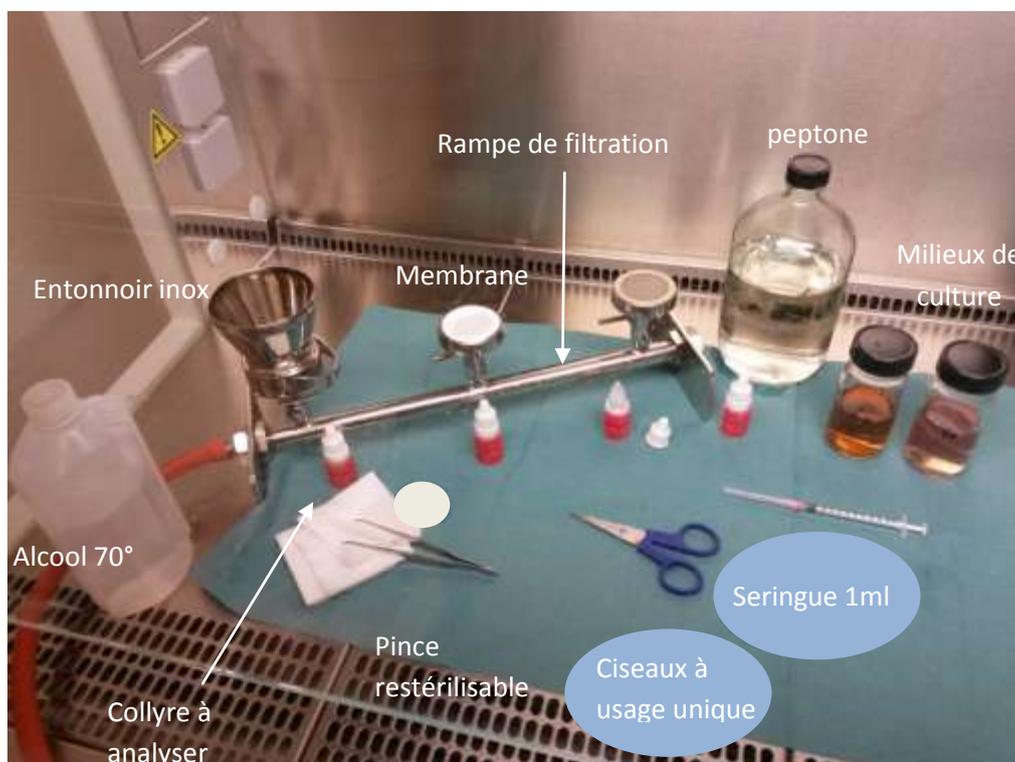


Figure 7 : Présentation du matériel : test de stérilité par filtration sur membrane

II. RESULTATS

1. Stabilité physicochimique

1.1. Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP)

1.1.1. Choix de l'étalon interne

L'étalon interne est une solution de céfuroxime 0,25mg/mL.

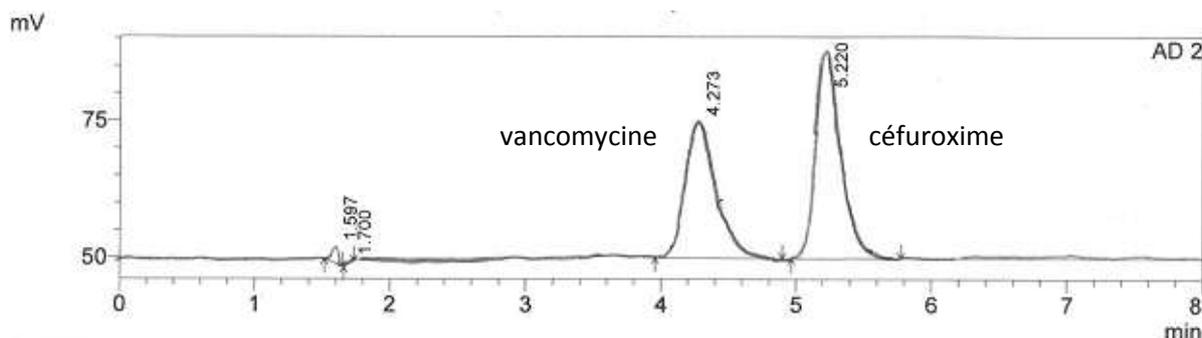


Figure 8 : Chromatogramme de la vancomycine (200µg/ml) et de la céfuroxime (25µg/ml)

Les pics de vancomycine et de céfuroxime sont séparés et d'AUC du même ordre. La résolution est calculée selon la formule suivante :

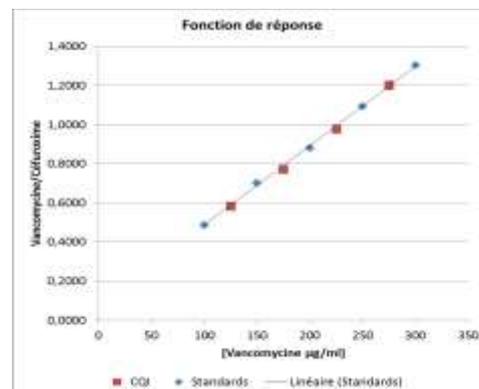
$$R = 2 \frac{(t_{r2} - t_{r1})}{(\omega_1 + \omega_2)}$$

t_{r2} : temps de rétention du céfuroxime (min) = 5,22
 t_{r1} : temps de rétention de la vancomycine (min) = 4,273
 ω_1 : base du pic de la vancomycine (min) = 0,5
 ω_2 : base du pic du céfuroxime (min) = 0,4

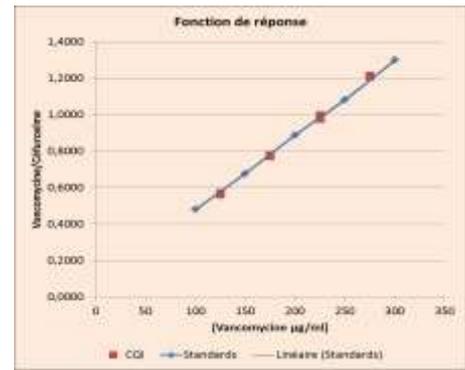
R = 2,1. Avec une valeur de R supérieure à 1,5, les pics sont correctement séparés (27)

1.1.2. Gamme d'étalonnage et répétabilité

Gamme 1 (µg/ml)	100	150	200	250	300
AUCv/AUCc	0,487	0,7020	0,8820	1,094	1,304
C recalculée	99,634	152,675	197,002	249,437	301,253
Résidus	-0,37	2,67	-3,00	-0,56	1,25
R ²	0,999273851				
CV %	3.18				
Droite	y = 0,004056x + 0,082748				



Gamme 2 (µg/ml)	100	150	200	250	300
AUCv/AUCc	0,480	0,677	0,889	1,081	1,301
C recalculée	98,016	146,613	198,779	246,147	300,335
Résidus	-1,98	-3,39	-1,22	-3,85	0,34
R ²	0,999619497				
CV%	2.18				
Droite	$y = 0,004089x + 0,067780$				



Gamme 3 (µg/ml)	100	150	200	250	300
AUCv/AUCc	0,487	0,7019	0,8815	1,094	1,304
C recalculée	99,634	152,675	197,002	249,437	301,253
Résidus	-0,37	2,67	-3,00	-0,56	1,25
R ²	0,9992680				
CV %	3.17				
Droite	$y = 0,004054x + 0,083045$				

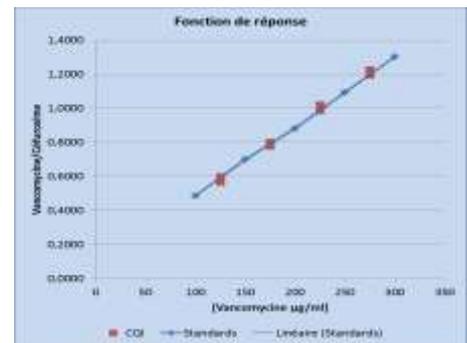


Figure 9 : Résultats et droites d'étalonnage de la vancomycine avec trois gammes différentes

L'équation de droite de calibration est obtenue avec la moyenne des trois droites des gammes de la vancomycine : $y = 0,00406631x + 0,07785755$

La linéarité des droites est confirmée par un coefficient de régression R² proche de 1.

La précision est confirmée de part des coefficients de variation largement inférieurs à 10% (3,18% ; 2,18% ; 3,17%).

Des Points Qualités (PQ = CQI) sont réalisés à chaque fois pour s'assurer de la bonne linéarité de la gamme, ils sont représentés sur les droites d'étalonnage (figure 9)

Le profil d'exactitude (Figure 10) montre que l'intervalle de tolérance β est compris dans les limites d'acceptation $\pm 10\%$ pour un risque de 5% (ddl = 9) (5). La méthode de validation de la gamme est donc valide et fiable :

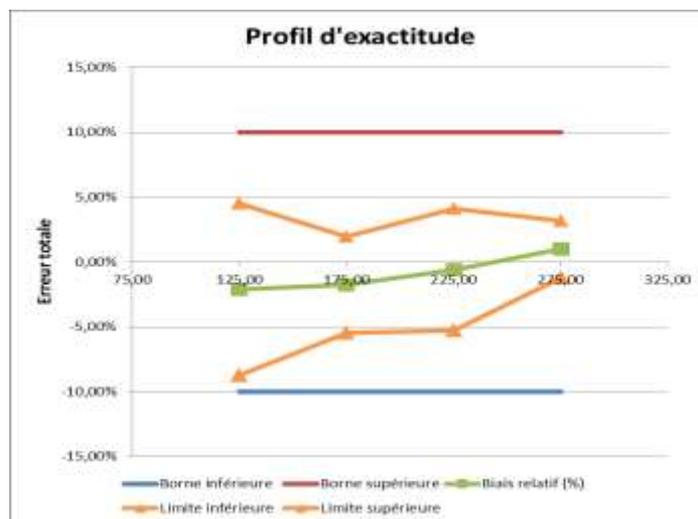


Figure 10 : Profil d'exactitude des gammes d'étalonnage de la vancomycine

1.1.3. Produits de dégradation

Les résultats des AUC obtenus par la HPLC après dégradation forcée sont exprimés dans les tableaux VII et VIII.

	T0	HCl 0,1 N	HCl 0,5 N	NaOH 0,1 N	NaOH 0,5 N
Vancomycine (µg/mL)	200	200	200	200	200
AUC (vanco)	403806	346265,6	322684,8	295902,4	250201,6
Hauteur (vanco)	29954	26260,9	24075,5	22157,5	18851
Temps de rétention (min) (vanco)	3,507	3,491	3,58	3,579	3,583
AUC 1	0	NI	NI	NI	NI
AUC 2	0	NI	NI	NI	NI
AUC 3	0	NI	NI	NI	NI
temps de rétention (min) 1	0	1,5	1,5	1	1
temps de rétention (min) 2	0	0	0	1,5	1,5
temps de rétention (min) 3	0	0	0	2	2
Perte AUC en %	0%	14%	20%	27%	38%

Tableau VII : Dégradation forcée de la vancomycine (200µg/ml) à l'acide chlorhydrique et à la soude

	80°C 1H	80°C 2H	80°C 3H	80°C 4H	80°C 5H
Vancomycine (µg/mL)	200	200	200	200	200
AUC (vanco)	384118,4	345574	325488,7	296317	304195,2
Hauteur (vanco)	29313,6	26362,9	25103	22594	23031
Temps de rétention (min) (vanco)			3,485	3,479	3,585
AUC 1	NI	12566	20006,4	19385	13315,2
AUC 2	NI	NI	17680	15868	17142,4
AUC 3	NI	NI	NI	NI	32860
temps de rétention (min) 1	1	1	4,117	4,103	1,561
temps de rétention (min) 2	1,5	1,5	6,913	6,905	2,248
temps de rétention (min) 3	0	7	1-2-3-4	1-2-3-4	4,242
Perte AUC en %	5%	14%	19%	27%	25%

Tableau VIII : Dégradation forcée de la vancomycine (200µg/ml) à la chaleur

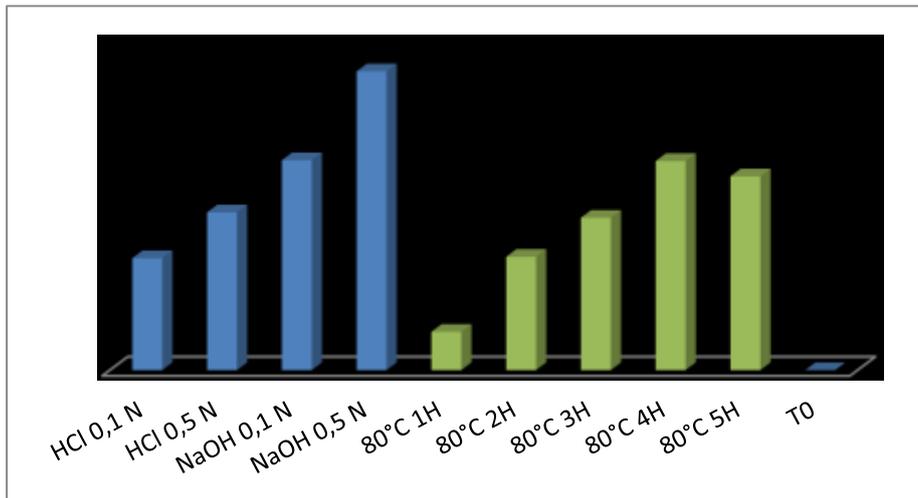


Figure 11 : Perte (%) AUC de la vancomycine avec les différentes méthodes de dégradations forcées

La vancomycine est plus facilement dégradée en milieu basique qu'en milieu acide. Elle est également dégradée à la chaleur (figure 11). Le profil de dégradation est représenté avec la figure 12. Les nouveaux pics détectés correspondant à l'apparition des produits de dégradation n'interfèrent pas avec l'étalon interne ni avec la vancomycine (absence de superposition de pics).

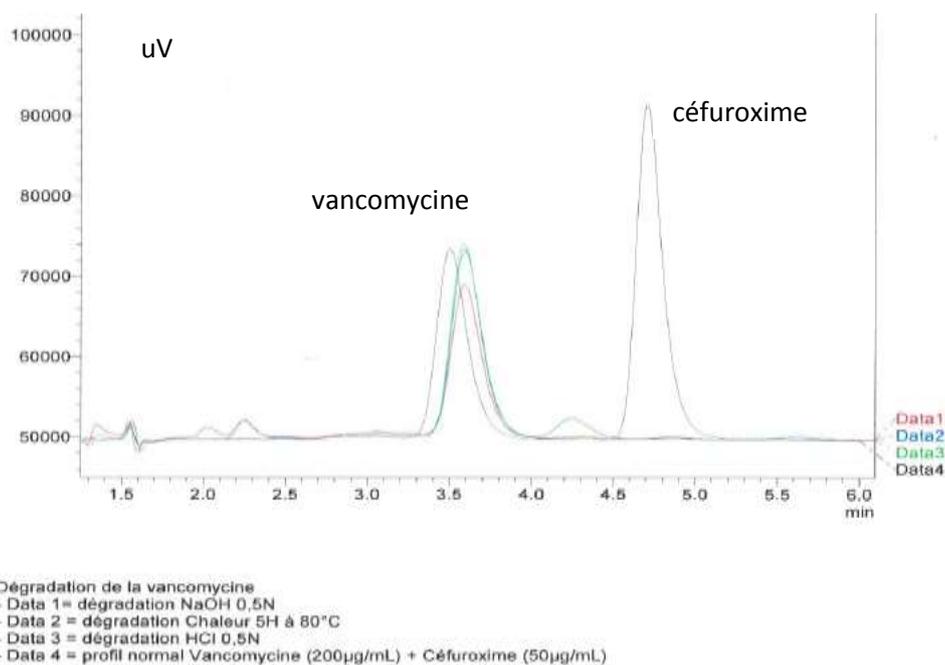


Figure 12: Profil de dégradation de la vancomycine à $\lambda = 280\text{nm}$

1.1.4. Mesure des échantillons

Chaque échantillon est dosé 3 fois. La concentration en vancomycine (x) est déterminée par le rapport des AUC de la vancomycine et de la céfuroxime (y) selon la droite d'étalonnage :

$$y = 0,00406631x + 0,07785755$$

. Les résultats sont répertoriés dans le tableau IX et X.

J	N° Collyre	moyenne AUCv / AUCc	Concentration mesurée en vancomycine (mg/ml)	% perte / [théorique initiale]	% Concentration restante	moyenne % Concentration restante	ecart type % Concentration restante	Intervalle de confiance % restant ($\alpha=0,05$)
J1	2	0,861	48,17	4%	96%	98%	3%	3%
	4	0,905	51,00	-2%	102%			
	34	0,86	48,09	4%	96%			
	36	0,861	48,18	4%	96%			
J7	6	0,861	48,15	4%	96%	99%	2%	2%
	8	0,895	50,48	-1%	101%			
	38	0,885	49,63	1%	99%			
	40	0,881	49,37	1%	99%			
J14	10	0,832	46,35	7%	93%	95%	2%	2%
	12	0,859	48,13	4%	96%			
	42	0,852	47,6	5%	95%			
	44	0,855	47,79	4%	96%			
J21	14	0,838	46,72	7%	93%	95%	1%	1%
	16	0,854	47,73	5%	95%			
	46	0,857	47,88	4%	96%			
	48	0,84	46,89	6%	94%			
J28	18	0,835	46,55	7%	93%	93%	2%	2%
	20	0,831	46,34	7%	93%			
	50	0,819	45,58	9%	91%			
	52	0,853	47,68	5%	95%			
M2	22	0,861	48,14	4%	96%	95%	2%	2%
	24	0,833	46,46	7%	93%			
	54	0,866	48,46	3%	97%			
	56	0,839	46,8	6%	94%			
M3	28	0,792	43,93	12%	88%	89%	2%	2%
	30	0,787	43,59	13%	87%			
	58	0,808	44,92	10%	90%			
	60	0,815	45,31	9%	91%			

Tableau IX : Résultats des concentrations des collyres à la vancomycine à 50mg/ml conservés à 4°C au cours du temps

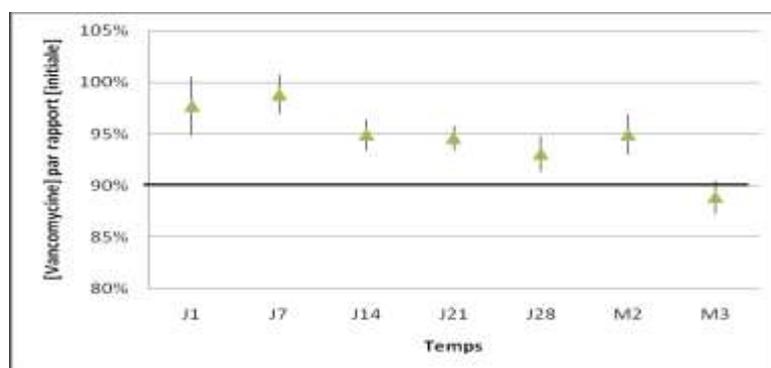


Figure 13 : Variation de la concentration de vancomycine dans le temps et seuil d'acceptabilité lot 4°C)

J	N° Collyre	moyenne AUCv / AUCc	Concentration mesurée en Vancomycine (mg/ml)	% perte / [théorique initiale]	% Concentration restante	moyenne % Concentration restante	ecart type % Concentration restante	Intervalle de confiance % restant ($\alpha=0,05$)
J1	1	0,858	47,99	4%	96%	95%	2%	2%
	3	0,857	47,89	4%	96%			
	33	0,834	46,53	7%	93%			
	35	0,837	46,7	7%	93%			
J7	5	0,855	47,79	4%	96%	96%	3%	3%
	7	0,89	49,96	0%	100%			
	37	0,875	49,03	2%	98%			
	39	0,829	46,21	8%	92%			
J14	9	0,83	46,23	8%	92%	93%	1%	1%
	11	0,829	46,16	8%	92%			
	41	0,842	46,97	6%	94%			
	43	0,839	46,78	6%	94%			
J21	13	0,795	44,11	12%	88%	89%	2%	2%
	15	0,791	43,83	12%	88%			
	45	0,794	44,05	12%	88%			
	47	0,828	46,13	8%	92%			
J28	17	0,73	40,08	20%	80%	80%	1%	1%
	19	0,739	40,69	19%	81%			
	49	0,732	40,24	20%	80%			
	51	0,723	39,69	21%	79%			

Tableau X : Résultats des concentrations des collyres à la vancomycine à 50mg/ml conservés à température ambiante au cours du temps

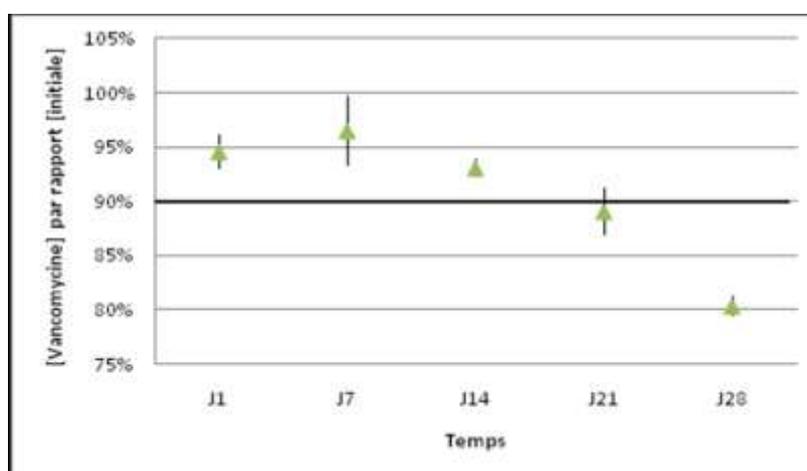


Figure 14 : Variation des concentrations en vancomycine avec seuil d'acceptabilité (lot TA)

Les dosages des collyres conservés à température ambiante s'arrêtent à J28 de par la forte baisse en teneur en principe actif (≈10% perte par rapport à la concentration initiale théorique). L'étude aurait pu être arrêtée dès J21 mais afin de confirmer ces résultats, il a été décidé de poursuivre le dosage à J28.

Il n'a pas été détecté de produits de dégradation au chromatogramme hormis lors de l'analyse du précipité.

En conclusion, sur la seule base de la concentration en vancomycine, les collyres conservés à 4°C sont stables jusqu'à M2, c'est-à-dire 2 mois. Les collyres conservés à température ambiante sont stables 14 jours.

1.2. Mesure de l'osmolalité

Les résultats de l'osmolalité sont représentés dans le tableau XI :

Temps	N° Collyre à 4°C	osmolalité mmos/kg	Moyenne	écart type	N° Collyre à TA	osmolalité mmos/kg	Moyenne	écart type
J1	2	48	50,000	1,826	1	48	50,000	3,559
	4	51			3	47		
	34	49			33	55		
	36	52			35	50		
J7	6	47	48,750	1,708	5	50	49,500	1,000
	8	49			7	50		
	38	51			37	50		
	40	48			39	48		
J14	10	48	48,000	0,000	9	50	50,250	1,258
	12	48			11	52		
	42	48			41	49		
	44	48			43	50		
J21	14	49	50,000	2,000	13	53	52,750	0,957
	16	53			15	52		
	46	49			45	52		
	48	49			47	54		
J28	18	50	48,500	1,732	17	52	51,500	1,000
	20	47			19	50		
	50	50			49	52		
	52	47			51	52		
M2	22	48	47,500	0,577	X			
	24	48						
	54	47						
	56	47						
M3	28	48	49,000	2,000	X			
	30	48						
	58	52						
	60	48						

Tableau XI : Osmolalité des collyres à la vancomycine au cours du temps

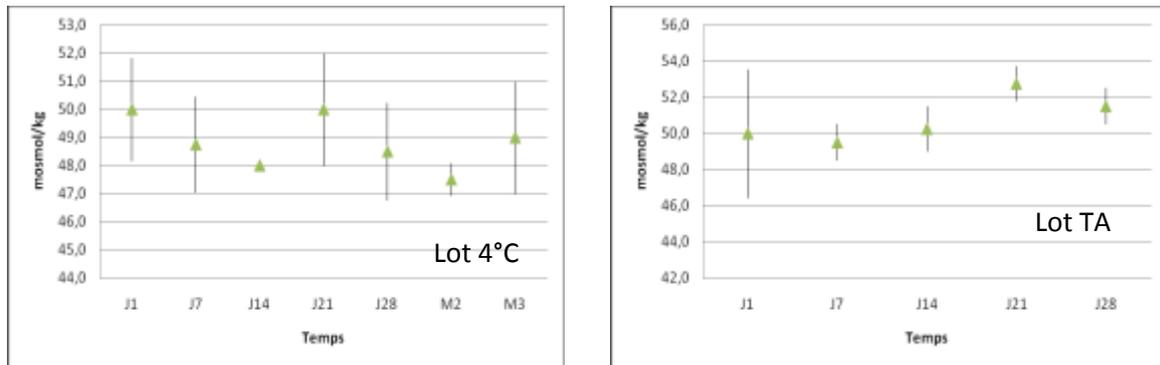


Figure 15 : Variation des moyennes d'osmolalité en fonction du temps avec écart-type

Il n'y a pas de variation significative de l'osmolalité au cours du temps quel que soit les conditions de conservation. Les mesures de l'osmolalité n'ont pas été effectuées après M2 pour les collyres conservés à température ambiante du fait de la non stabilité démontrée par le dosage.

1.3. Mesure du pH

Les résultats des mesures du pH sont répertoriés dans le tableau XII :

Temps	N° Collyre à 4°C	pH	Moyenne pH	écart type pH	N° Collyre à TA	pH	Moyenne pH	écart type pH
J1	2	3,62	3,555	0,045	1	3,6	3,650	0,042
	4	3,52			3	3,66		
	34	3,53			33	3,7		
	36	3,55			35	3,64		
J7	6	3,53	3,475	0,044	5	3,65	3,548	0,102
	8	3,49			7	3,62		
	38	3,44			37	3,47		
	40	3,44			39	3,45		
J14	10	3,5	3,455	0,086	9	3,64	3,600	0,057
	12	3,55			11	3,6		
	42	3,36			41	3,52		
	44	3,41			43	3,64		
J21	14	3,43	3,420	0,130	13	3,62	3,605	0,010
	16	3,6			15	3,6		
	46	3,33			45	3,6		
	48	3,32			47	3,6		
J28	18	3,5	3,425	0,050	17	3,7	3,700	0,000
	20	3,4			19	3,7		
	50	3,4			49	3,7		
	52	3,4			51	3,7		
M2	22	3,42	3,488	0,091	X			
	24	3,58						
	54	3,4						
	56	3,55						
M3	28	3,57	3,490	0,054	X			
	30	3,47						
	58	3,46						
	60	3,46						

Tableau XII : Mesures du pH des collyres à la vancomycine au cours du temps

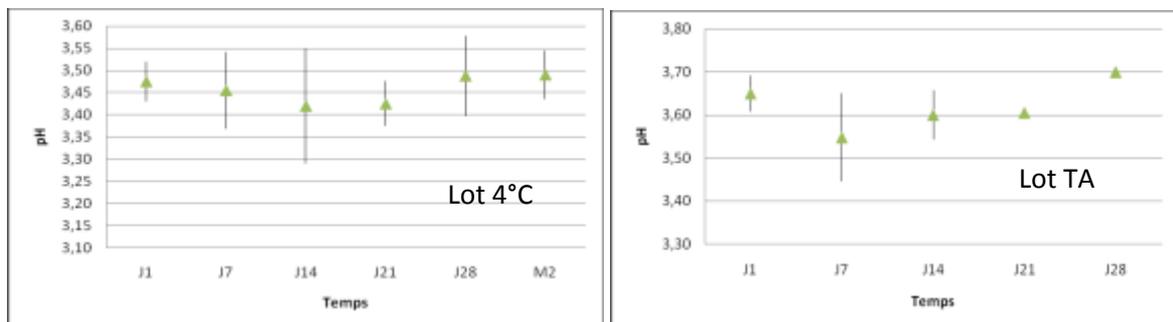


Figure 16 : Variations des moyennes de pH en fonction du temps avec écart-type

Pour les collyres conservés à 4°C le pH varie de +/- 0.3 (max 3.62, min 3.32)

Pour les collyres conservés à température ambiante, le pH varie de +/- 0.25 (max 3.7 ; min 3.45)

1.4. Contrôle visuel (couleur et limpidité)

Les résultats des contrôles de couleur et de limpidité sont répertoriés dans le tableau XIII :

Temps	N° Collyre à 4°C	Couleur	Limpidité	N° Collyre à TA	Couleur	limpidité
J1	2	INCOLORE	LIMPIDE	1	INCOLORE	LIMPIDE
	4			3		
	34			33		
	36			35		
J7	6	INCOLORE	LIMPIDE	5	INCOLORE	LIMPIDE
	8			7		
	38			37		
	40			39		
J14	10	INCOLORE	LIMPIDE	9	INCOLORE	LIMPIDE
	12			11		
	42			41		
	44			43		
J21	14	INCOLORE	LIMPIDE	13	INCOLORE	LIMPIDE
	16			15		
	46			45		
	48			47		
J28	18	INCOLORE	LIMPIDE	17	très légèrement jaunâtre	LIMPIDE
	20			19		
	50			49		
	52			51		
M2	22	INCOLORE	LIMPIDE	21	très légèrement jaunâtre	Précipité blanc cristallin
	24			23		
	54			53		
	56			55		
M3	28	Très légèrement jaunâtre	LIMPIDE	X		
	30					
	58					
	60					

Tableau XIII : Couleur et limpidité des collyres à la vancomycine au cours du temps

Les collyres à la vancomycine conservés à 4°C sont incolores au moins pendant 2 mois et restent limpides tout le long de l'étude. Les collyres conservés à température ambiante subissent une altération de couleur (figure 17) à partir de J28 et l'apparition d'un précipité blanc important à partir du 2^{ème} mois (figure 18). A noter qu'un précipité est également détecté après deux mois de conservation à température ambiante avec un flacon en verre.

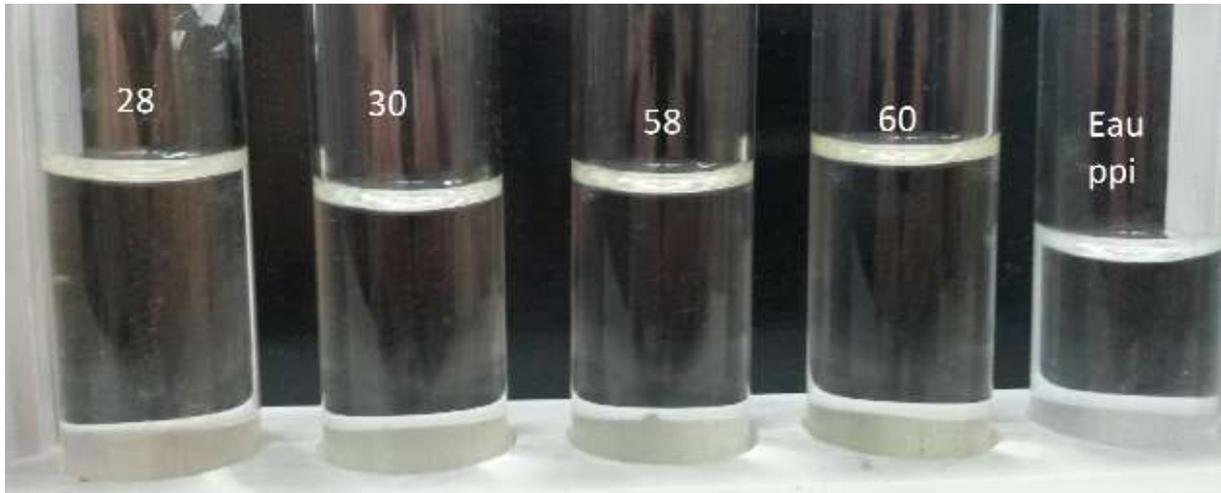


Figure 17 : Coloration des collyres N°28-30-58-60 (M3) en comparaison avec de l'eau ppi



Figure 18 : Précipité observé dans les collyres conservés à température ambiante à M2

Il est recueilli environ 100mg de précipité pour un flacon de collyre soit 20% des 500mg de vancomycine présent sous forme soluble initialement. A M2 les pertes mesurées avec la CLHP sont également de l'ordre de 20%.

1.5. Analyse des particules non visibles

Une analyse est effectuée sur les collyres conservés à 4°C à M3. Le nombre de particules supérieures à 10µm est de 110 et le nombre supérieur à 25µm est de 5.6 pour l'ensemble des trois échantillons.

1.6. Analyse du précipité des collyres conservés à température ambiante

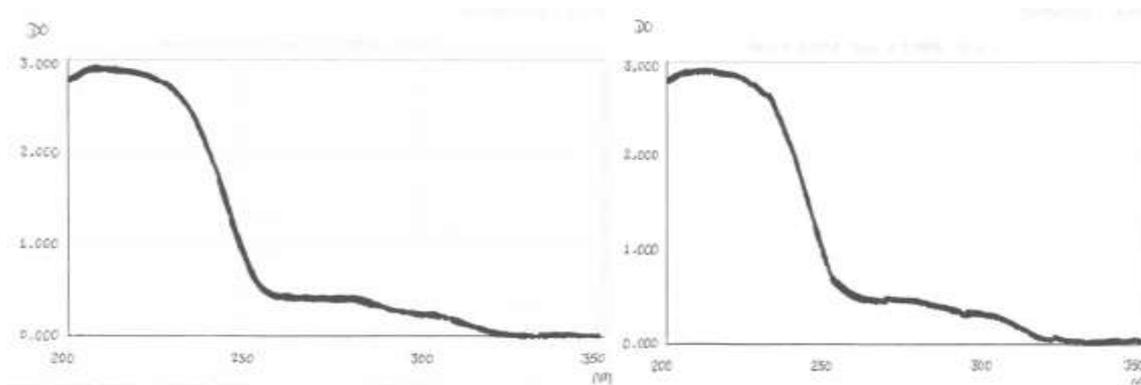


Figure 19 : Spectre du précipité (0.1mg/ml) et spectre de la vancomycine SANDOZ® (0.1mg/ml)

Les spectres du précipité et de la vancomycine Sandoz® sont similaires.

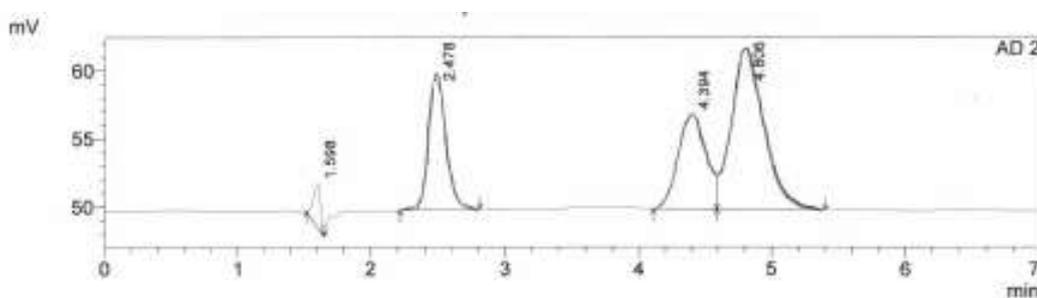


Figure 20 : Chromatogramme du précipité (1mg/ml)

Il est clairement observé deux pics importants à 2.4 min et à 4.8min (Figure 20). La vancomycine est détectée à 4.3 min avec une AUC diminuée. Le précipité et la vancomycine ayant le même spectre, ils absorbent tous les deux à 280nm.

D'un point de vue massique :

Temps de rétention (min)	AUC (Mv/min)	AUC Total (Mv/min)
Produit inconnu 2.4	86 483	$\Sigma = 380\ 562$
vancomycine 4.39	104 664	
Produit inconnu 4.8	195 355	
vancomycine témoin	NC	410 000

Tableau XIV : Valeur des AUC du précipité

La somme des AUC des produits inconnus et de la vancomycine dans l'échantillon analysé est proche de l'AUC de référence de la vancomycine.

2. Stabilité microbiologique

2.1. Validation des bouillons de cultures

Les résultats microbiologiques concernant les bouillons de cultures sont répertoriés dans le tableau XV.

Milieux de culture Bactérie testée	J7		J14	
	Thioglycolate 32°C	Caséine soja 25°C	Thioglycolate 32°C	Caséine soja 25°C
Blanc	STERILE	STERILE	STERILE	STERILE
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	POUSSE BACTERIENNE	POUSSE BACTERIENNE	POUSSE BACTERIENNE	POUSSE BACTERIENNE
<i>Staphylococcus aureus</i>	POUSSE BACTERIENNE	POUSSE BACTERIENNE	POUSSE BACTERIENNE	POUSSE BACTERIENNE
<i>Escherichia coli</i>	POUSSE BACTERIENNE	POUSSE BACTERIENNE	POUSSE BACTERIENNE	POUSSE BACTERIENNE

Tableau XV : Validation des bouillons de cultures à J7 et J14

Les bouillons de culture thioglycolate et caséine soja sont stériles comme le confirme l'absence de pousse microbienne dans les flacons blancs et sont positifs avec les souches testées.

2.2. Stérilité des échantillons

Les résultats des tests microbiologiques des collyres à la vancomycine sont répertoriés dans le tableau XVI :

Temps		N° Collyre à 4°C	Stérilité caséine soja	Stérilité thioglycolate		N° Collyre à TA	Stérilité caséine soja	Stérilité thioglycolate
J1		2	STERILE	STERILE		1	STERILE	STERILE
		4	STERILE	STERILE		3	STERILE	STERILE
		34	STERILE	STERILE		33	STERILE	STERILE
		36	STERILE	STERILE		35	STERILE	STERILE
J7		6	STERILE	STERILE		5	STERILE	STERILE
		8	STERILE	STERILE		7	STERILE	STERILE
		38	STERILE	STERILE		37	STERILE	STERILE
		40	STERILE	STERILE		39	STERILE	STERILE
J14		10	STERILE	STERILE		9	STERILE	STERILE
		12	STERILE	STERILE		11	STERILE	STERILE
		42	STERILE	STERILE		41	STERILE	STERILE
		44	STERILE	STERILE		43	STERILE	STERILE
J21		14	STERILE	STERILE		13	STERILE	STERILE
		16	STERILE	STERILE		15	STERILE	STERILE
		46	STERILE	STERILE		45	POUSSE	STERILE
		48	STERILE	STERILE		47	STERILE	STERILE
J28		18	STERILE	STERILE		17	STERILE	STERILE
		20	STERILE	STERILE		19	STERILE	STERILE
		50	STERILE	STERILE		49	STERILE	STERILE
		52	STERILE	STERILE		51	STERILE	STERILE
M2		22	STERILE	STERILE		21	X	X
		24	STERILE	STERILE		23	X	X
		54	STERILE	STERILE		53	X	X
		56	STERILE	STERILE		55	X	X

Tableau XVI : Résultats microbiologiques des collyres à la vancomycine au cours du temps

Une pousse microbienne est détectée avec le collyre N°45 conservé à température ambiante (moisissure). Il s'agit probablement d'une contamination environnementale lors de la manipulation. Pour des raisons techniques, il n'a pas été possible d'identifier ce germe et de conclure qu'il s'agissait bien d'une contamination externe.

Les tests de stérilités ne sont pas effectués à partir de M2 pour les collyres conservés à température ambiante du fait de la non stabilité physicochimique démontrée.

III. DISCUSSION

1. Conditions générales de l'étude

1.1. Matériel utilisé

- **Les collyres : flacons et reconstitution**

Pour des raisons pratiques, le préparatoire de la pharmacie a voulu utiliser des flacons en polyéthylène au lieu du verre ; en effet des fuites sont parfois rapportées lors de la connexion avec l'embout compte-goutte. Par ailleurs, l'utilisation des flacons de verre nécessite en amont leur lavage, leur conditionnement et la stérilisation. Ces flacons en plastique sont fournis en planche de 63 unités remplies par l'intermédiaire d'une pompe de manière automatisée. Ils sont d'autre part plus légers et plus résistants.

Le polyéthylène est un plastique qui interagit généralement pas ou peu avec son contenant. C'est une des raisons qui a fait choisir ce type de plastique plutôt qu'un autre comme le Polychlorure de Vinyle (PVC) par exemple. Cependant l'apparition d'un précipité dans les collyres conservés à température ambiante et les analyses de Wood et Al (28), laissent penser que le polyéthylène puisse réagir avec le contenu. Cependant, il est noté l'apparition d'un précipité similaire apparaissant dans des flacons en verre issu d'une autre production.

Les flacons en polyéthylène ont par ailleurs l'inconvénient de ne pas être aussi transparent que le verre, ce qui peut être pratique pour détecter la présence d'un précipité ou de particules visibles.

Le choix de l'eau ppi comme agent de reconstitution est discutable de par l'hypotonie de la préparation. La plupart des études ont choisi soit le NaCl 0.9% soit le Glucose 5% afin d'avoir une osmolalité plus adaptée à l'œil (Annexe 1).

- **La phase mobile pour CLHP:**

Plusieurs phases mobiles ont été testées avant de sélectionner celle utilisée (Tampon acétate/Acétonitrile 90/10 (v/v)). Le méthanol est souvent utilisé comme solvant mais les résultats se sont montrés peu concluants avec la colonne C18 utilisée. En effet les pics étaient étalés et peu interprétables. Il a donc été décidé d'utiliser de l'acétonitrile bien que plus toxique (3). Le but n'étant pas seulement d'éluer la vancomycine mais aussi son étalon interne. La céfuroxime a été retenue car disponible immédiatement au laboratoire de contrôle et avait été déjà utilisée pour ce type d'étude (18). Après plusieurs mélanges, les pics de vancomycine et de céfuroxime étaient symétriques, bien séparés et avec un temps d'élution acceptable.

1.2. Choix des conditions opératoires

- **Conservations**

Trois conditions de conservations avaient tout d'abord été retenues. Toutes, à l'abri de la lumière :

- Température ambiante (25°C avec 60% d'humidité)
- Au réfrigérateur (4±2°C)
- Au congélateur (-18±2°C)

La conservation par congélation n'a finalement pas été retenue car il aurait été difficile en pratique de mettre en place un stockage au congélateur. Ces collyres étant donnés généralement en urgences ou en rétrocession, l'étape de décongélation pouvait s'avérer longue et non totalement maîtrisée. Pourtant cette technique de congélation a fait ses preuves (75 à 90 jours de stabilité) (9) (14) et est utilisée par certaines PUI. D'un point de vue microbiologique, la congélation permet une conservation bien meilleure que les deux autres conditions par inhibition des pousses bactériennes (les bactéries psychrophiles pouvant se développer à 4°C) (14).

La conservation à 4°C est le type de conservation de référence dans la littérature (Annexe 1), car limitant la pousse bactérienne, et la dégradation des principes actifs étant souvent un phénomène cinétique, le froid ralentit alors la vitesse de la réaction chimique. Le stockage est facile à la PUI et il n'existe pas de problème de décongélation.

La conservation à température ambiante a été retenue par la facilité de sa mise en place et de sa conservation, notamment par le patient. Il n'y a en effet que peu de contrainte dans ce cas là. Cette conservation est un élément de comparaison avec la conservation à 4°C. Conscient que la stabilité physicochimique est moins bonne à température ambiante qu'à 4°C, le temps d'analyse est moins long.

- **Durée de l'étude**

L'objectif de 4 mois de stabilité à 4°C et 3 mois à température ambiante pour les collyres à la vancomycine a été décidé au vue des études déjà parues dans la littérature et regroupées dans l'annexe 1. S'il est vrai qu'aucune étude ne montre une stabilité supérieure à 84 jours à 4°C et 47 jours à température ambiante (28), il a été décidé de mener l'étude sur 120 jours à 4°C et 80 jours à température ambiante. Les conditions opératoires étant différentes et l'utilisation de l'eau ppi comme reconstituant étant peu utilisée, une durée d'étude plus longue a été prévue.

- **CLHP**

Le choix de la longueur d'onde est crucial pour pouvoir détecter la molécule recherchée. Le choix de la longueur d'onde dans la littérature est variable. Certains ont fait le choix de se placer à 198nm, 220nm, 229nm et 247nm où l'absorbance est plus élevée qu'à 280nm. Cependant le fait d'augmenter en sensibilité contraint à réduire la spécificité. En effet, de nombreuses molécules absorbent à ces longueurs d'ondes. La CLPH utilisée ne possède pas de détecteur à barrette de diodes d'où l'utilité de se placer à 280nm afin d'avoir le maximum de spécificité. Il est indispensable que l'étalon interne soit lui aussi repéré à cette même longueur d'onde, ce qui est le cas à 280nm pour la céfuroxime (18).

2. Stabilité des collyres à la vancomycine (50mg/ml)

2.1. Stabilité physicochimique

- Dosage CLHP et produits de dégradation

Les collyres à la vancomycine 50mg/ml sont stables sur le plan physicochimique 15 jours à température ambiante et 60 jours à 4°C dans notre étude. En effet les concentrations restantes en vancomycine s'avèrent inférieure à 90% de la concentration théorique initiale passé ces délais. Une préparation reste stable d'un point de vue dosage que si la perte en concentration obtenue à un instant t n'excède pas 10%. Cette perte tolérée peut même être de 5% pour les médicaments à marge thérapeutique étroite (ce qui n'est pas le cas de la vancomycine) (5). La CLHP permet d'analyser les AUC de la vancomycine et de la céfuroxime mais également de suivre l'apparition de nouveaux pics pouvant correspondre à des produits de dégradation. Comme le montre la figure 20 représentant le profil du précipité de vancomycine, il est observé deux nouveaux pics dont un ayant le même temps de rétention que la céfuroxime. Ce dernier point peut paraître préoccupant, en effet l'AUC de céfuroxime pourrait se retrouver anormalement surestimé. Ce profil de dégradation n'a pas été observé lors de l'étape de dégradation forcée. Le choix de l'étalon interne aurait pu être rediscuté. Cependant, les pics de produits de dégradation sont observés qu'avec analyse du précipité redissout dans de l'eau et quelques gouttes de soude 0.1N. Ils ne sont pas observés dans le surnageant ce qui permet de garder la céfuroxime comme étalon interne, ce dernier n'interférant donc pas dans le dosage du collyre.

Il n'est pas observé d'autres pics lors de l'analyse des collyres à 280nm. La diminution des AUC de la vancomycine n'est pas compensée par l'augmentation ou l'apparition d'une autre AUC (dans le surnageant). Certains produits de dégradation pourraient absorber à une autre longueur d'onde et ne seraient donc pas détectés à 280nm (29). Concernant l'analyse du précipité, l'AUC des produits de dégradation correspond à la perte d'AUC de la vancomycine. Il est donc permis de dire qu'il existe essentiellement deux grands produits de dégradation de la vancomycine.

Le précipité formé peut résulter d'un réarrangement de la vancomycine en deux produits de dégradation cristallins (*Crystalline degradation products* : CDP-IM et CDP-Im) (8) dénués de propriétés antibiotiques. En solution aqueuse, la vancomycine peut en effet subir une conversion de son dérivé asparagine en isoaspartate via un cycle imide pour former le CDP-I qui est structurellement très proche de la vancomycine. Selon la position du chlore, il est observé 2 types de produits : Le CDP-IM, forme majeure avec un atome de chlore sur la phase concave de la molécule et CDP-Im, forme mineure avec l'atome de chlore sur la phase convexe (28). Cette transformation est représentée par la figure 21:

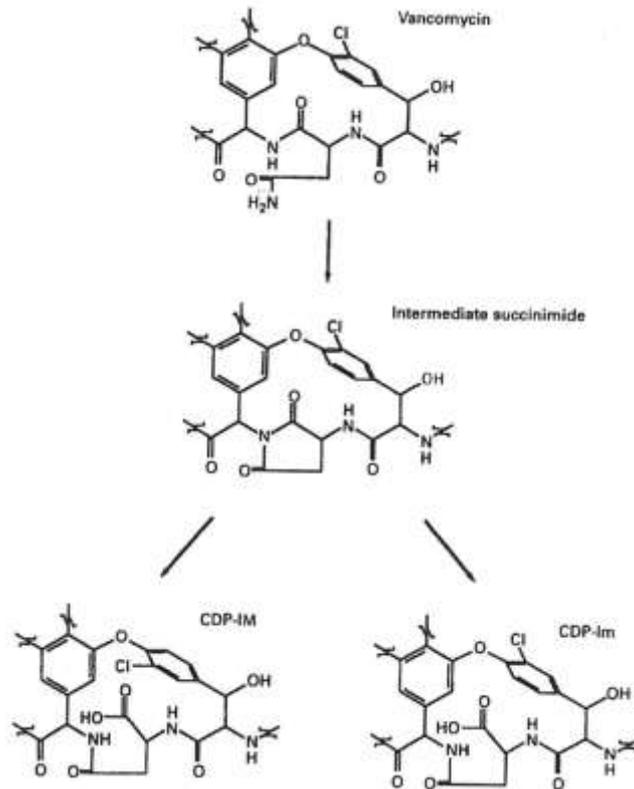


Figure 21 : Réarrangement de la vancomycine en produits de dégradation cristallins CDP-I (28)

Ces deux produits de dégradations ont des temps de rétention différents. Le CDP-Im migrant plus vite que la vancomycine et le CDP-IM migrant plus lentement en CLHP phase inversée. Ces résultats sont retrouvés dans la littérature et représentés par la figure 22 :

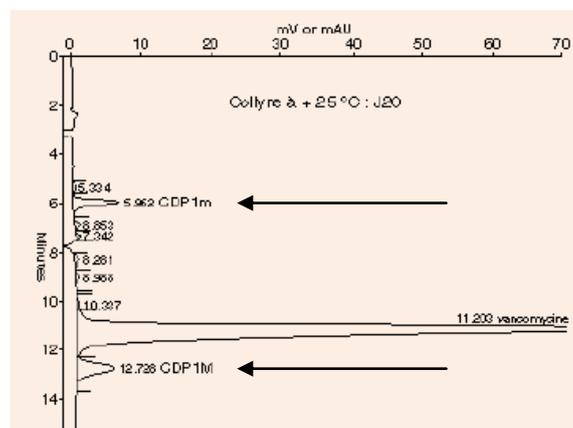


Figure 22 : Chromatogramme d'un collyre (dilué au 1/500e) conservé 20 jours à +25°C (8)

Il se pose la question de la raison de l'apparition de ces produits de dégradation. Une variation de pH est souvent responsable de changement de conformation structurale. La vancomycine peut en effet être dénaturé par une augmentation du pH (30). Cependant le pH est resté stable tout au long de l'étude.

La température joue certainement un rôle dans la précipitation de la vancomycine. En effet il n'a pas été retrouvé de précipité dans les collyres conservés à 4°C (au bout de 2 mois).

L'utilisation de flacons en polyéthylène peut aussi être un facteur influençant la précipitation de part une interaction contenant-contenu. Wood et al ont pu démontrer que la vancomycine précipitait dans des seringues en polyéthylène mais pas dans des seringues en polypropylène (28). Cependant l'apparition d'un précipité dans les mêmes conditions de conservation dans des flacons en verre et après deux mois n'est pas en faveur d'une interaction contenant-contenu.

L'eau ppi qui a permis de reconstituer la poudre de vancomycine est aussi un facteur pouvant influencer la solubilité bien que l'on retrouve des précipitations dans le G5% (9), dans le NaCl0.9% (8) ou d'autres compositions à base d'excipients (31). Le délai d'apparition peut différer selon le reconstituant.

Les spectres du précipité et de la vancomycine SANDOZ® (figure 19) étant les mêmes montrent que ces molécules ont les mêmes propriétés spectrales et confirment bien qu'il est possible de repérer ces produits de dégradation à 280nm lors du dosage par CLHP.

Il serait intéressant d'utiliser la technique de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) afin de confirmer l'identité de ces produits de dégradation.

- **Osmolalité**

L'osmolalité reste stable tout au long de l'étude avec une valeur moyenne proche de 50mmosmol/kg pour les deux conditions de conservation ($48.8\text{mmosmol/kg}\pm 0.94$ à 4°C et 50.8 ± 1.32 à température ambiante). L'utilisation de l'eau ppi, hypotonique est responsable de cette faible osmolalité. L'œil supportant normalement des variations de l'ordre de 225 à 482 mosmol/kg (8), de nombreuses études ont préféré utiliser du NaCl 0.9% ou du Glucose 5% afin d'obtenir des collyres isotoniques. Les cliniciens du service d'ophtalmologie, conscients de cette hypotonie, ne rapportent pas de cas d'intolérance au niveau clinique. L'hypotonie est susceptible d'aider à la pénétration de la vancomycine au niveau de la cornée.

- **pH**

Le pH des collyres à la vancomycine reste également stable au cours du temps et en fonction de la température avec une valeur moyenne de 3.47 ± 0.05 pour les collyres conservés à 4°C et 3.62 ± 0.06 pour ceux conservés à température ambiante. Ces résultats vont dans le sens des études déjà menées, d'une stabilité au niveau du pH au cours du temps (9) (14) (8). L'œil supporte des variations de pH importantes, de 3 à 10 (9). Le pH bas de ces collyres, nécessaire à l'intégrité de la vancomycine permet donc une utilisation de ces collyres sur l'œil humain.

- **Limpidité**

Il est observé une nette différence entre les collyres conservés à température ambiante, où un précipité a été détecté à 2 mois d'analyse et ceux conservés à 4°C qui ne présente aucune particule visible à 3 mois. Comme vu plus haut, le précipité identifié dans les collyres conservés à température ambiante est un double produit de dégradation (CDP).

- **Particules non visibles**

Ce test est obligatoire pour les préparations injectables mais pas pour les collyres. Cependant compte tenu de l'apparition d'un précipité important, il est intéressant d'étudier le taux de particules

non visibles, témoin de cristaux visibles en formation. L'absence de ces particules conforte l'utilisation des collyres en toute sécurité. Un comptage a été réalisé à 3 mois sur des collyres conservés à 4°C et répond conformément aux critères de la Pharmacopée Européenne concernant les préparations injectables.

- **Couleur**

Au temps t0, les collyres sont incolores. Ils le restent jusqu'à J28 pour les collyres conservés à température ambiante et jusqu'à M2 pour ceux conservés à 4°C. Il est observé ainsi une couleur très légèrement jaunâtre témoignant d'un changement physicochimique de la composition.

2.2. Stabilité microbiologique

La stabilité microbiologique est démontrée tout au long de l'étude. Hormis la pousse de moisissure sur un milieu caséine soja, liée très probablement à une contamination lors de la manipulation. La stérilité à J1 a permis de confirmer que la préparation des collyres en milieu aseptique était stérile. Ces résultats concordent avec les études de stérilité présentes dans la littérature. De plus le laboratoire commercialisant les flacons en polyéthylène garantit la stérilité du contenu au moins un an après reconstitution.

La validation de la méthode de stérilité répond aux exigences de la Pharmacopée Européenne. Cette dernière préconise deux méthodes : Ensemencement direct et filtration sur membrane. L'ensemencement direct est une méthode moins sensible (9) mais plus facile à mettre en place. La filtration sur membrane est plus adaptée pour les antibiotiques. La filtration permet d'éluer l'antibiotique pour ne retenir que les éventuels micro-organismes. L'antibiotique ainsi élué n'interagit donc pas avec une éventuelle bactérie en l'empêchant de se développer. Le rinçage de la membrane de nitrate de cellulose par 3 fois 100mL de solution de peptone assure l'élution totale de l'antibiotique. Cette méthode nécessite néanmoins plus de manipulation que l'ensemencement direct, elle est donc plus à risque de contamination accidentelle (5) (cas du flacon 45, caséine soja où il a été détecté une pousse liée à une contamination lors de l'ensemencement) malgré l'utilisation d'une rampe de filtration.

Le choix des milieux de caséine soja et du thioglycolate et des températures adéquates repose sur les préconisations de la Pharmacopée Européenne (7). Ces deux milieux permettant la pousse de la majorité des micro-organismes : bactéries aérobies et anaérobies (thioglycolate) et bactéries aérobies et moisissures (caséine soja).

La recherche d'endotoxine n'est pas réalisée. La stérilité ayant été démontrée à T0, la seule source d'apport d'endotoxines est celle émanant d'une contamination microbienne. Par conséquent, l'essai de stérilité est suffisant pour garantir l'absence d'endotoxines.

2.3. Efficacité antibactérienne des collyres

Cette étude a pu démontrer la stabilité physicochimique et microbiologique des collyres à la vancomycine 50mg/ml. Ces étapes sont suffisantes selon la Pharmacopée Européenne pour valider la stabilité de ces collyres. Il n'a donc pas été testé l'efficacité de l'antibiotique au cours du temps.

L'efficacité de l'antibiotique peut être déterminée en utilisant la technique de diffusion avec les disques Kirby-Bauer et s'exprime en Concentration Minimale Inhibitrice (CMI). Karampatakis et al

(32) ont démontré une efficacité de 4 semaines pour des collyres à la vancomycine 50mg/ml reconstitués dans du BSS et conservés à 4°C (figure 23). Metha et al (33) ont même montré l'efficacité de la vancomycine sur *Staphylococcus aureus* jusqu'à 24 semaines à 4°C (figure 23), même si la concentration restante était proche de 70% en fin d'étude.

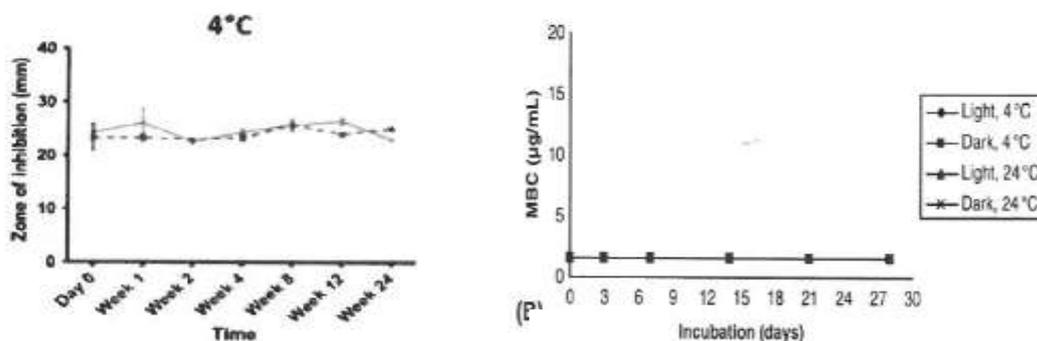


Figure 23 : Zone d'inhibition (33) et de CMI (32) de la vancomycine en fonction du temps

2.4. En pratique

Le préparatoire de la pharmacie du CHRU de Lille a fabriqué en 2014, 397 collyres fortifiés à la vancomycine (50mg/mL), soit environ 8 collyres par semaine. Il s'agit de la deuxième plus importante production de collyres (Tableau XVII). La stabilité ayant été validée à 2 mois à 4°C permettrait de réaliser une production tous les 45 jours d'une cinquantaine de collyres à la vancomycine. Cependant, n'ignorant pas les délais de conservation de 1 mois dans de nombreux centres hospitaliers, il est plus prudent d'établir une péremption de 1 mois à 4°C d'autant plus qu'un seul lot de production ait été contrôlé. Le fait de regrouper les productions en une seule et d'automatiser la préparation à l'aide d'une pompe permet un gain de temps pour la fabrication. Le stock de ces collyres sera augmenté et permettra de mieux gérer les urgences en réduisant le risque de rupture de stock.

Collyres	Production en 2014	Nombre de flacons jetés car périmés
Vancomycine	397	17
Ceftazidime	367	22
Amikacine	350	20
Amphotéricine B	433	30
Voriconazole	368	1

Tableau XVII : Nombre de collyres produits par le préparatoire de la pharmacie du CHRU de Lille en 2014

CONCLUSION

Cette étude a permis de conclure à une stabilité des collyres fortifiés à la vancomycine (50mg/ml) pendant 2 mois lorsque les flacons sont conservés à l'abri de la lumière et à 4°C. La conservation à température ambiante montre une durée d'utilisation moins importante (2 semaines). Le problème majeur rencontré est l'apparition d'un précipité à température ambiante, détecté pour la première fois à M2. La péremption dans certains hôpitaux parisiens avec les mêmes modalités de fabrication et de conservation, est de 1 mois à 4°C dû à ces problèmes de particules. Bien qu'il n'ait pas été détecté l'apparition de particules dans ce lot, il serait intéressant de renouveler l'expérience avec plusieurs lots de productions différentes. Au vue de ces données, il est plus prudent de rester sur une péremption de 1 mois avec une conservation à 4°C, ceux-ci étant stables sur le plan physicochimique (pH, osmolalité, couleur, limpidité, particules non visibles et dosage) et microbiologique (stérilité conservée tout au long de l'étude). La littérature permet également d'assurer en plus de l'intégrité de la vancomycine, un maintien de l'efficacité antibiotique.

En pratique cette étude de stabilité permettra une production des collyres à la vancomycine tous les 30 jours au lieu de toutes les semaines. Cette préparation magistrale devient donc une préparation hospitalière et les intérêts sont multiples : un gain de temps au niveau de la production et un stock permanent à la pharmacie pour une prise en charge des urgences notamment sur les temps de garde. Compte tenu de la production importante des autres collyres fortifiés (amphotéricine B, ceftazidime, amikacine et voriconazole), il serait intéressant de réaliser des études de stabilité en suivant l'exemple de la vancomycine.

BIBLIOGRAPHIE

1. Vidal recos. Infections oculaires. Vidal; 2014.
2. C.Chiquet J-PR. Prescrire les collyres fortifiés. J Fr Ophtalmol. 2007;30(4):423-30.
3. Enrique M, Garcia-Montoya E, Minarro M, Orriols A, Ramon Tico J, Suné-Negre J, et al. Application of an Experimental Design for the optimization and validation of a new HPLC method for the determination of vancomycin in an extemporaneous ophthalmic solution. J Chromatic Sci. 2008;46:828-34.
4. AFSSAPS. Collyres et autres topiques antibiotiques dans les infections oculaires superficielles. 2004.
5. Groupe d'évaluation et de recherche sur la préparation en atmosphère contrôlée. Guide méthodologique des études de stabilité des préparations. Société Française de Pharmacie clinique; 2013.
6. Pharmacopée Européenne. Les préparations ophtalmiques. 2014.
7. Pharmacopée Européenne. Méthodes biologiques: stérilité [Internet]. Pharmacopée européenne; 2014 [cité 2 févr 2014]. Disponible sur: http://online6.edqm.eu.doc-distant.univ-lille2.fr/ep804/NetisUtils/srvrutil_getdoc.aspx/1L34mE34tCZHSCZ0sC356BcXqRG00/20601F.pdf
8. Barbault S, Aymard G, Feldman D, Pointereau A, Thuillier A. Etude de stabilité d'un collyre à la vancomycine à 50mg/ml. J Pharm Clin. 1999;18(2):183-9.
9. Chedru-Legros V, Fines-Guyon M, Chérel A, Perdriel A, Albessard F, Debruyne D, et al. Stabilité à -20°C des collyres antibiotiques renforcés (amikacine, ceftazidime, vancomycine). J Fr Ophtalmol. 2007;30(8):807-13.
10. Pharmacopée Européenne. 2.2.1 Limpidité et degré d'opalescence des liquides. 8ème édition. Strasbourg: Conseil de l'Europe; 2014.
11. Vidal. RCP Vidal Vancomycine [Internet]. 2014 [cité 15 avr 2014]. Disponible sur: <http:// Vidal.ch-cambrai.lan/showProduct.html?productId=17252>
12. Sourdeau P, Evrard J-M, Remy G, Hecq J-D. Stabilité physico-chimique de solutions ophtalmiques renforcées prêtes à l'emploi: une revue de la littérature. Ann Pharm Fr. 2012;70:104-12.
13. Saint-Lorant G, Bechade E, Legros V. Mise en place et validation d'une préparation hospitalière de collyres antibiotiques renforcés pour le traitement des abcès de cornée et des endophtlamies. APHO Nantes. 2004.
14. Sautou-Miranda V, Libert F, Grand-Boyer A, Gellis C, Chopineau J. Impact of deep freezing on the stability of 25mg/ml vancomycin ophtalmic solutions. Int J Pharm. 2002;234:205-12.
15. AFSSAPS. Bonnes Pratiques de Préparation. ANSM; 2007.

16. Pharmacopée Européenne. 2.2.29 Chromatographie liquide. 8ème édition. Strasbourg: Conseil de l'Europe; 2014.
17. Cours de Chromatographie (Master de Chimie) [Internet]. Faculté des Sciences d'Orsay; [cité 17 mars 2015]. Disponible sur: <http://www.masterchimie1.u-psud.fr/Chromatoweb/theoriechromato3.html#A32>
18. Berthoin K, Ampe E, Tulkens P, Carryn S. Correlation between free and total vancomycin serum concentrations in patients treated for Gram-positive infections. *Int J Antimicrob Agents*. 2009;34:555-60.
19. International Conference on Harmonisation (ICH). Validation of analytical procedures: Text and Methology Q2(R1). 2005.
20. Radaniel T, Genay S, Simon N, Feutry F, Quagliozi F, Barthélémy C, et al. Quantification of five plasticizers used in PVC tubing through high performance liquid chromatographic-UV detection. *J Chromatogr B*. 2014;(965):158-63.
21. Schappler J, Guillaume D, Prat J, Veuthey J-L, Rudaz S. Validation of chiral capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry methods for ecstasy and methadone in plasma. *Electrophoresis*. 2008;29:2193-202.
22. Bouklouze A, Cherrah Y. Validation des procédures analytiques selon la nouvelle approche basée sur l'erreur totale (profil d'exactitude). *Technol Lab*. 2009;(14):4-11.
23. Pharmacopée Européenne. 2.2.35. Osmolalité. 8ème édition. Strasbourg: Conseil de l'Europe; 2014.
24. Pharmacopée Européenne. 2.2.3 Détermination potentiométrique du pH. 8ème édition. Strasbourg: Conseil de l'Europe; 2014.
25. Bugmann A. Mise au point d'un protocole de qualification de l'inspection visuelle des médicaments injectables. Université de Genève; 2005.
26. Pharmacopée Européenne. 2.9.19 Contamination particulière: particules non visibles. 8ème édition. Strasbourg: Conseil de l'Europe; 2014.
27. Facteur de résolution en chromatographie [Internet]. [cité 25 avr 2015]. Disponible sur: www.lachimie.fr
28. Wood M., Lund R, Beavan M. Stability of vancomycin in plastic syringes measured by high-performance liquid chromatography. *J Clin Pharm Ther*. 1995;20:319-25.
29. Maillot-Pyszczyk V, Bourdeaux D, Sautou V, Chopineau J. Etude de stabilité de solutions intravitréennes de vancomycine à 10mg/ml. Communication orale présenté à: Hopipharm; 2010; Vittel.
30. Huey-Ping Ng L-ST. Vancomycin causes dangerous precipitation when infused with gelatin fluid. *Anaesthesia*. oct 2000;55(10):1039-40.
31. Ensom M, Decarie D, Lakhani A. Stability of Vancomycin 25 mg/mL in Ora-Sweet and Water in Unit-Dose Cups and Plastic Bottles at 4°C and 25°C. *CJHP*. 2010;63(5):366-72.

32. Karampatakis V, Papanikolaou T, Giannousis M, Goulas A, Mandraveli K, Kilmpasani M, et al. Stability and antibacterial potency of ceftazidime and vancomycin eyedrops reconstituted in BSS against *Pseudomonas aeruginosa* and *staphylococcus aureus*. *Acta Ophthalmol.* 2009;87:555-8.
33. Metha S, Armstrong B, Kim S, Toma H, West J, Yin H, et al. Long-term potency, sterility, and stability of vancomycin, ceftazidime, and moxifloxacin for treatment of bacterial endophthalmitis. *Retina J Retin Vitr Dis.* 2011;31(7):1316-22.
34. Fuhrman C, Stroman R. Stability of vancomycin in an extemporaneously compounded ophthalmic solution. *American journal Health-system Pharmacy.* 1998;55:1386-8.
35. Raju B, Thiagarajan G, Das T. Modified High-Performance Liquid chromatography technique for detection of vancomycin in human vitreous. *Ophthalmic Res.* 2004;36:55-61.

ANNEXES

Annexe 1

Revue de la littérature : stabilité de la Vancomycine

Source	Concentration (mg/ml)	Liquide de reconstitution	Contenant	Durée de conservation	Température
Impact of deep freezing (Sautou)(14)	25	G5%	Verre	90 J	-20°C
Stability of vanco (Ensom)(31)	25	-	Excipient	75 j	4°C
Stability and antibacterial potency (Karanpatadis)(32)	50	BSS	-	≥ 30 J	4° et 24°C
Stabilité à -20°C des collyres atb (Chédru-Legros)(9)	50	NaCl	Verre	75 j à utiliser dans les 3j après décongélation	-20°C
Long term potency, sterility (Metha)(33)	10	NaCl et eau	Seringues	24 s	-20°C et 4°C
Stability of vancomycin in plastic syringes (Wood) (28)	10	NaCl, dextrose 5% et eau ppi	Seringues polyéthylène	29j et 84j	25°C et 4°C
	10	NaCl, dextrose 5% et eau ppi	Seringues polypropylène	47j et 84j	25°C et 4°C
Etude de stabilité d'un collyre à la vancomycine (Barbault)(8)	50	NaCl	verre	15j et 21j	25°C et 4°C
Stability of vancomycin in an extemporaneously (Fuhrman)(34)	31	larmes et eau ppi	plastique	7J et 10j	25°C et 4°C (lampe fluo)
Mise en place et validation d'une préparation hospitalière (Saint-Lorant)(13)	50	G5%	verre	60j	4°C

Annexe 2 :

Fiche de fabrication des collyres fortifiés à la Vancomycine à 50mg/ML

DATE DE FABRICATION		COLLYRES			QUANTITE FABRIQUEE		60 flacons		
N° DE LOT		COLLYRES PREPARES	Formule unitaire	coefficient	Total pour la fabrication	Nom et signature des préparateurs			
mardi 3 juin 2014		DANS L'EAU PPT							
PER		Collyre VANCOMYCINE 50mg/ml 10 ml							
		Vancomycine 1000 mg	1 fl	30	30 fl				
		Eppi	20 ml		600 ml				
DE0303		20 x 500 ml							
EAU POUR PREPARATIONS INJECTABLES VIAFLO		COLLYRES ICI LES ETIQUETTES DES COLLYRES							

Solvent pour préparation parentérale
Eau pour préparations injectables
 Composition : Pour 100 ml :
 Eau pour préparations injectables 100 g
Solution hypertonique
 Contient de 20 pictures de 500 ml.
 Pas d'administration IV directe - A utiliser uniquement comme diluant.

LINE LA NOTICE AVANT UTILISATION.
TENIR HORS DE LA PORTÉE ET DE LA VUE DES ENFANTS.
 Ne pas utiliser si la solution n'est pas limpide et contient des particules visibles.
 Ne pas reconecteur une petite partiellement utilisée.
 Médicament non soumis à prescription médicale.

Traiteur / Expéditeur :
BAXTER SAS
 6 Avenue Louis Pasteur
 78310 MAUREMS
 FRANCE

LOT : 14B16E3C
 EXP : 01 2017



D. AMY 4 -> 31
M. PINTREAU 32 ->



Annexe 3 : Références bibliographiques : Méthodes CLHP Vancomycine

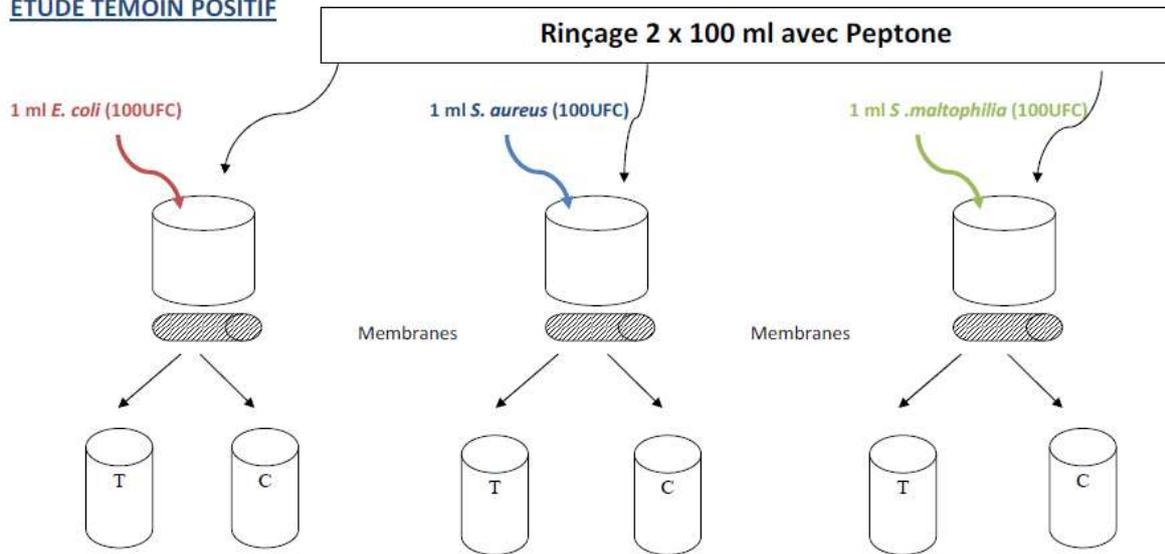
Référence	Molécule	Concentration	Colonne	Phase mobile	Débit	λ nm	Etalon interne	Gamme concentration étalonnage	Produits de dégradation
V. Sautou-Miranda (14)	VANCO collyre	25mg/ml	Lichrospher RP-18, 125 x 4 mm ID, 5 μ m (macherey-Nagel)	Méthanol/eau/tampon phosphate pH3 0.01M 25 :60 :15 (v/v/v)	1,2 ml/min	220	NC	50/100/200/400 μ g/mL	NaOH 5N +100°C pdt 15 min
K. Berthoin (18)	VANCO serum	NA	Atlantis c18, 150mm x 4.6mm Symmetry shield RP18 150 x 4.6mm (Waters)	Acetonitrile/methanol/HCOOH0.1% 63 :27 :10 Tampon phosphate/ Acetonitrile-methanol 70 :30	1ml/min	280	Cefuroxime 2 μ L (0,5g/L)	NR	NC
B. Raju (35)	VANCO hum aq	NA	Zorbax SB-C18 0,46x7,5, 3,5 μ m	Acetonitrile/NaH ₂ PO ₄ (50mM) 10 :90 Ph4	1ml/min	198	NC	50/100/200/400/500 μ g/mL	-
M. Enrique (3)	VANCO collyre	Dilution 1mg/ml	Luna C18 150x46mm, 5 μ m (Phenomenex)	Eau/H ₃ PO ₄ (85%) 99,83 : 0,17 v :v pH3 avec triéthylamine/méthanol 85 :15 v :v	1ml/min	280 40°C	NC	1mg/ml	65°C pdt 24H
V. Chedru (9)	VANCO collyre	50mg/ml	Merk RP select B 150x4,6mm	KH ₂ PO ₄ 0,05M/Acetonitrile v :v 91/9	2ml/min	255	NC	NC	NC
M. Ensom (31)	VANCO orale	25mg/ml	Symmetry RP18 3,0x100 mm (Waters) et RP18 3,9 x 20mm (Waters)	Methanol/acétate d'ammonium 0.01M pH3 26/74 (v/v)	1ml/min	247	Metronidazole 1mg/ml	NR	NaOH 1N 100°C pdt 10min Orasweet et eau à 100°C pdt 18H Précipité à J63
M.J Wood (28)	VANCO injectable	10mg/ml (eau ppi – G5% - NaCl 0.9%)	Colonne 10cm x 4.6mm, 5 μ m	Acetonitrile/eau, 15/85 (v/v) + 0.5ml diethylamine. pH 3.15	1.5ml/min	281	NC	Concentration cible 200 μ g/mL	Variation température et pH. Identification des CDP-IM et CDP-Im (précipités)

Référence	Molécule	Concentration	Colonne	Phase mobile	Débit	λ	Etalon interne	Gamme concentration étalonnage	Produits de dégradation
S. Barbault (8)	VANCO collyre	50mg/ml (NaCl 0.9%)	ODS Lichrosorb RP 18, 250 x 4.6mm 5 μ m (Merk Clevenot)	Acétonitrile/eau 10/90 (v/v) + 500 μ L diéthylamine. pH 3.15	1ml/min	281	NC	10/20/50/100/200 μ g/ml	CDP-IM et CDP-Im
V. Maillot-Pyszek (29)	VANCO sol intravitri	10mg/ml (NaCl 0.9%)	C18 Lichrospher 100 RP 125x4.6mm (Mancherey)	Acétonitrile/tampon H ₂ KPO ₄ 0.1M. 8/92 (v/v) pH3.5	1.5ml/min	220	NC	NR	NaOH 1N, HCl 1N, chaleur, UV
L.C. Fuhrman (34)	VANCO sol ophtalmiq	31mg/ml (larmes artificielles)	C18-Microsorb MV (Rainin inst)	Na ₂ PO ₄ /Acétonitrile 22/78 (v/v) pH2.8	1.5ml/min	229	NC	5-80 μ g/ml	100°C pendant 1H. Précipité à 40°C, pics observés

Annexe 4

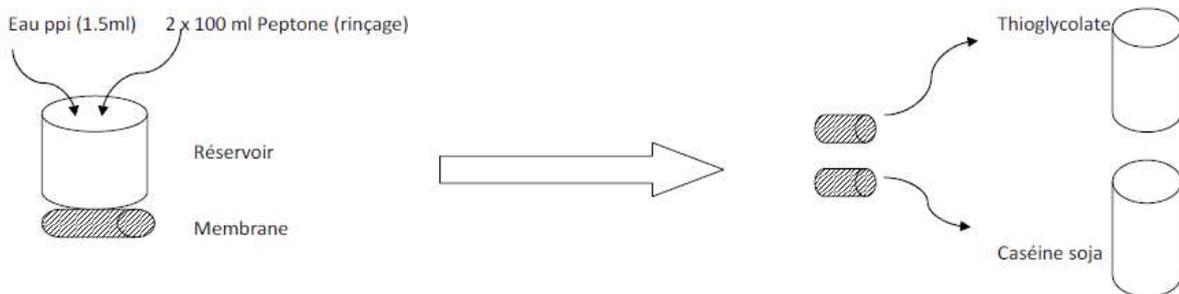
Test de croissance microbologique des bouillons de culture et test témoin négatif

ETUDE TEMOIN POSITIF



T = Bouillon thioglycolate C = Bouillon caséine soja

ETUDE TEMOIN NEGATIF



Université de Lille 2
FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES DE LILLE
MEMOIRE de DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
(tenant lieu de Thèse en vue du Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie)
Année Universitaire 2014/2015

Nom : DAVID

Prénom : Clément

Titre du mémoire / thèse :

ETUDE DE STABILITE DE COLLYRES FORTIFIES A LA VANCOMYCINE (50MG/ML)

Mots-clés : Vancomycine, collyre, stabilité, Chromatographie Liquide Haute Performance

Résumé :

Les collyres à la vancomycine font partie des principaux collyres prescrits par le service d'ophtalmologie. L'objectif est de diminuer le nombre de productions avec un nouveau conditionnement en polyéthylène (PE). Les stabilités physicochimique et microbiologique sont contrôlées. Deux lots de 30 flacons multidoses de collyre à la vancomycine en PE sont conservés à l'abri de la lumière à 4°C (T1) et 25°C/60% d'humidité relative (T2). Des témoins sont réalisés dans un flacon verre type II. L'étude de stabilité est menée selon les recommandations SFPC/GERPAC. 5 paramètres sont évalués à 7 temps d'analyse: osmolalité, pH, limpidité, couleur, recherche de particules non visibles. Le dosage en vancomycine est réalisé par CLHP après mise au point et validation de la méthode permettant l'identification des produits de dégradation de la vancomycine. La stabilité de la solution est validée pour une teneur supérieure à 90% de la valeur à J0. La stérilité des préparations est vérifiée pour chaque temps d'analyse par filtration sur membrane et mise en culture dans des bouillons thioglycolate (à 35°C) et caséine soja (à 22°C) pendant 14 jours. La stérilité est démontrée tout au long de l'étude garantissant une fabrication stérile et l'intégrité du conditionnement. La stabilité physicochimique est validée à 14 jours pour la conservation à T2 et 60 jours à T1. L'osmolalité et le pH restent stables pendant 90 jours. Un précipité blanc cristallin important se forme à T2 entre J28 et J60. Celui-ci s'apparente à deux produits de dégradation dérivés de la vancomycine (les CDP). Une interaction contenant-contenu est écartée car le précipité apparaît à la même période dans les flacons témoins. Une coloration très légèrement jaunâtre est détectée dès J28 pour les flacons conservés à T2 et à J90 pour T1. Les collyres à la vancomycine sont stables 60 jours à 4°C dans les flacons en polyéthylène. Cependant, compte tenu des résultats de certains hôpitaux et du contrôle que d'un unique lot, la production hebdomadaire de 8 flacons peut être remplacée par une production d'une trentaine d'unités tous les 30 jours avec une péremption de 1 mois conservés à 4°C.

Membres du jury :

Président :

Pr Bertrand Décaudin, PU-PH, Faculté de Pharmacie - CHRU de Lille

Assesseur(s) :

Dr Christophe Berneron, PH, Service de Pharmacie, CHRU de Lille

Dr Damien Lannoy, MCU-PH, Faculté de Pharmacie - CHRU de Lille

Dr Aurélie Terrier Lenglet, MCU-PH, Centre de Recherche Clinique – CHU d'Amiens