

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

Soutenu publiquement le 30 Septembre 2016

Par Melle Camille VERLHAC

Conformément aux dispositions du Décret du 10 septembre 1990

tient lieu de

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

**DEVELOPPEMENT D'UNE SOLUTION ORALE PEDIATRIQUE DE CLONIDINE
POUR LA PREMEDICATION ANESTHESIQUE EN PEDIATRIE**

Membres du jury :

Président : Pr Bertrand DECAUDIN, PU-PH, Faculté de Pharmacie, Université Lille 2

Assesseur(s) :

Pr Jean-Marc CHILLON, PU-PH, Faculté de Pharmacie, Université Jules Verne-
Picardie

Damien LANNOY, MCU-PH, Faculté de Pharmacie, Université Lille 2

Pierre RICHART, PH, Service d'anesthésie pédiatrique, CHRU de Lille



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

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

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
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.	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 économie Pharmaceutique
Mme	ROMOND	Marie Bénédicte	Bactériologie
Mme	SAHPAZ	Sevser	Pharmacognosie
M.	SERGHÉRAERT	Eric	Droit et économie 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.	BORDAGE	Simon	Pharmacognosie
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
Mme	GENAY	Stéphanie	Pharmacologie Galénique
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
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	LEHMANN	Hélène	Droit et Economie Pharmaceutique
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.	PIVÀ	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.	WILLEMAGNE	Baptiste	Chimie Organique
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)
Mme	LELEU-CHAVAIN	Natascha	ICPAL

Professeurs Agrégés

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	MAYES	Martine	Anglais
M.	MORGENROTH	Thomas	Droit et Economie 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 Economie Pharmaceutique

Maîtres de Conférences ASSOCIES - mi-temps

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	BERTOUX	Elisabeth	Pharmacie Clinique – Biomathématiques
M.	BRICOTEAU	Didier	Biomathématiques
M.	CUCCHI	Malgorzata	Information Médicale
M.	FRIMAT	Bruno	Pharmacie Clinique
M.	GILLOT	François	Droit et économie Pharmaceutique
M.	MASCAUT	Daniel	Pharmacie Clinique
M.	ZANETTI	Sébastien	Biomathématiques

AHU

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	DEKYNDT	Bérengère	Pharmacie Galénique
M.	PEREZ	Maxime	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 mon Président de thèse :

Monsieur le Professeur Bertrand DECAUDIN, PU-PH au CHRU de Lille

Vous me faites l'honneur de présider le jury de cette thèse et je vous en remercie. Veuillez trouver ici l'expression de toute ma gratitude et de mon profond respect.

Aux membres du jury :

Monsieur le Professeur Jean-Marc CHILLON, PU-PH au CHU d'Amiens

Je vous remercie de l'attention que vous portez à mon travail et de l'honneur que vous me faites par votre présence. Soyez assurée de ma sincère reconnaissance.

Monsieur le Docteur Pierre RICHART, Médecin anesthésiste, au CHRU de Lille

Pour l'intérêt que vous portez à mon travail et l'honneur que vous me faites de siéger parmi les membres du jury, veuillez trouver ici l'expression de ma sincère reconnaissance. Recevez ici le témoignage de mon profond respect.

A mon Directeur de thèse

Monsieur le Docteur Damien LANNOY

Vous m'avez fait l'honneur d'encadrer ce travail. Je vous remercie pour votre confiance, votre disponibilité et votre bonne humeur. Travailler avec vous cette année a été un réel plaisir. Veuillez trouver ici l'expression de mes sentiments les plus sincères.

Je tiens également à remercier :

Dr Christophe BERNERON pour l'aide apportée au cours de ce travail et son accueil au laboratoire de contrôle.

Dr Florence BOURDON pour son aide et sa disponibilité tout au long de l'année écoulée.

Dr Emilie FREALLE et Dr Marie TITECAT pour leur accueil au sein de leur laboratoire ainsi que pour leur disponibilité et leur aide précieuse pour l'analyse microbiologique.

Christine DHORNE pour son aide, sa disponibilité et les bons moments passés au laboratoire de contrôle.

L'équipe de la pharmacie du CHRU, en particulier les secteurs des préparations et de l'approvisionnement pour leur soutien et leur bonne humeur.

Enfin, je tiens à dédier cette thèse :

A tous mes co-internes du « Nord », pour l'incroyable aventure de ces quatre dernières années. Un grand merci en particulier à Héroïse et Delphine pour leur bonne humeur et leur soutien indéfectible quel que soit le moment ou la distance. Merci également à Héroïne et Elodie pour les bons moments passés avec vous.

A mes amies de longue date, Arpita, Gaëlle, Elisabeth et Marie pour votre soutien malgré mon départ vers le « grand Nord ». Merci pour tous les bons souvenirs et ceux à venir.

A toute ma famille, pour tous les souvenirs et instants partagés dans ce coin perdu mais chaleureux qu'est la Corrèze.

A mon frère, voyageur dans l'âme, pour tous les moments de complicité.

A mes parents pour leur soutien au cours de ces longues années d'études et leurs conseils avisés. Merci d'être toujours là pour moi.

.

Table des matières

I	Introduction.....	16
II	Matériels et méthode.....	18
PARTIE 1 : Développement d'une forme galénique adaptée de clonidine chez l'enfant.....		18
II.1	Faisabilité et formulation	18
II.2	Matières premières employées dans la formulation	18
II.3	Fabrication du lot en pharmacie hospitalière.....	18
PARTIE 2 : Mise au point d'une méthode analytique et étude de stabilité physico-chimique de la solution		19
II.4	Conditions chromatographiques.....	19
II.5	Produits et réactifs.....	19
II.6	Protocoles analytiques	20
II.6.1	Spécificité de la méthode	20
II.6.1.1	Spécificité vis-à-vis des excipients	20
II.6.1.2	Dégradation forcée.....	20
II.6.2	Recherche de l'effet matrice	21
II.6.3	Validation de la méthode analytique	21
II.6.3.1	Préparation de la gamme d'étalonnage et des QC.....	21
II.6.3.2	Protocole de validation	22
II.6.4	Etude de stabilité physico-chimique.....	22
II.6.4.1	Conditions de conservation	22
II.6.4.2	Paramètres analysés.....	23
II.6.4.3	Temps de prélèvements.....	23
PARTIE 3 : Etude de la contamination microbiologique de la solution de clonidine .		24
II.7	Etude de la contamination microbiologique : mise au point de la méthode d'analyse.....	24
II.7.1	Fertilité des milieux	25
II.7.2	Applicabilité de la méthode	25
II.8	Etude la contamination microbiologique de la préparation.....	28
III	Résultats	29
PARTIE 1 : Développement d'une forme galénique adaptée de clonidine chez l'enfant.....		29
III.1	Faisabilité et formulation	29

III.1.1	Faisabilité de la préparation au regard de l'indication et des effets indésirables	29
III.1.1.1	Mécanisme d'action et pharmacocinétique.....	29
III.1.1.2	Effets indésirables	29
III.1.1.3	Utilisation en prémédication anesthésique chez l'enfant	30
III.1.2	Faisabilité et formulation au regard des aspects pharmaceutiques	32
III.1.2.1	Recherche d'alternatives	32
III.1.2.2	Choix du principe actif et des excipients.....	33
III.1.2.3	Choix de la concentration en saccharine.....	36
PARTIE 2 : Mise au point d'une méthode analytique et étude de stabilité physico-chimique de la solution		38
III.2	Mise au point des conditions chromatographiques et spécificité	38
III.3	Dégradation forcée	39
III.4	Effet matrice	40
III.5	Validation de la méthode chromatographique	40
III.5.1	Fonction de réponse et linéarité.....	40
III.5.2	Fidélité et justesse	41
III.5.3	Profil d'exactitude.....	42
III.5.4	Limites basses de détection et de quantification.....	42
III.6	Etude de stabilité.....	43
III.6.1	Evolution de la teneur au cours du temps.....	43
III.6.2	Evolution des autres paramètres au cours du temps	44
PARTIE 3 : Etude de la contamination microbiologique de la solution de clonidine .		46
III.7	Contamination microbiologique	46
III.7.1	Neutralisation de l'effet antimicrobien du sorbate de potassium	46
III.7.2	Choix de la méthode d'ensemencement et validation de l'applicabilité de la méthode.....	49
III.7.3	Recherche d' <i>E.coli</i> : validité de la méthode	52
III.8	Etude de la contamination microbiologique de la solution.....	52
IV	Discussion	54
IV.1	Formulation	54
IV.2	Validation de la méthode.....	55
IV.3	Stabilité physicochimique	55
IV.4	Contamination microbiologique	56

V	Conclusion.....	58
VI	Bibliographie.....	59
	ANNEXE 1 : Méthodes chromatographiques indicatrices de stabilité de dosage de la clonidine : revue de la littérature.....	65
	ANNEXE 2 : Caractéristiques des milieux cités en microbiologie.....	66
	ANNEXE 3 : Utilisation de la clonidine en prémédication anesthésique en pédiatrie : revue de la littérature.....	68
	ANNEXE 4 : Tableau récapitulatif des formulations orales liquides de clonidine.....	74
	ANNEXE 5 : Fiche d'instruction : fabrication de la solution de clonidine à 10 µg/mL	75
	ANNEXE 6 : Fiche de fabrication : Solution de clonidine 10 µg/mL.....	77

Abréviations

ACN : Acétonitrile

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

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

BCP : Pourpre de bromocrésol

BPP : Bonnes Pratiques de Préparation

CBP : Centre de Biologie et Pathologie

CHRU : Centre Hospitalier Régional Universitaire

DGAT : Dénombrement des Germes Aérobieux Totaux

DMLT : Dénombrement des Moisissures et Levures Totales

EPPI : Eau Pour Préparation Injectable

FDA : Food and Drug Administration

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

GRAS: Generally Recognized as Safe

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

HCl : Acide chlorhydrique

ICH : International Council for Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use

LBDD : Limite Basse de Détection

LBDQ : Limite Basse de Quantification

PA : Principe Actif

PCA : Plate Count Agar

PE : Pharmacopée Européenne

PSM : Poste de Sécurité Microbiologique

PUI : Pharmacie à Usage Intérieur

MPUP : Matière Première à Usage Pharmaceutique

NaOH : Hydroxyde de sodium

QC : Contrôle qualité

SCR : Substance Chimique de Référence

SFAR : Société Française d'Anesthésie et Réanimation

SFPC : Société Française de Pharmacie Clinique

UFC : Unité Formant Colonie

Liste des tableaux

Tableau I: Résumé du protocole de dégradation	20
Tableau II: Préparation de la gamme d'étalonnage	21
Tableau III: Préparation des contrôles qualité	22
Tableau IV: Souches de référence utilisées	26
Tableau V: Exigences de la Pharmacopée Européenne concernant la qualité microbiologique des préparations orales aqueuses.....	28
Tableau VI: Concentration en saccharine des différentes solutions testées.....	36
Tableau VII: Appréciation du goût d'une solution de saccharine à différentes concentrations	37
Tableau VIII: Recherche de l'effet matrice: résultats statistiques de la comparaison des droites d'étalonnage.....	40
Tableau IX: Fidélité et justesse du dosage de la clonidine	41
Tableau X: Biais relatifs calculés	41
Tableau XI: Etude de l'effet antimicrobien du sorbate de potassium sur <i>E. coli</i> et <i>S.aureus</i>	47
Tableau XII: Etude de l'effet antimicrobien du sorbate de potassium sur <i>A. brasiliensis</i> et <i>C. albicans</i>	48
Tableau XIII : Résultats des méthodes d'ensemencement testées pour <i>E. coli</i> et <i>S. aureus</i>	50
Tableau XIV : Résultats des méthodes d'ensemencement testées pour <i>A. brasiliensis</i> et <i>C. albicans</i>	51
Tableau XV: Recherche d' <i>E.coli</i>	52
Tableau XVI: Etude de la contamination microbiologique de la solution de clonidine à 2,5 mois	52

Liste des figures

Figure 1: Structure chimique du chlorhydrate de clonidine	33
Figure 2 : Analyse de la solution de clonidine a 10 µg/mL selon les conditions analytiques avec ACN/tampon phosphate 5/95 v/v	38
Figure 3 Chromatogrammes à J3 des protocoles de dégradation forcée dans les conditions analytiques ACN/Tampon phosphate 5/95 v/v.....	39
Figure 4 : Fonction de réponse.....	41
Figure 5 : Profil d'exactitude	42
Figure 6 : Evolution au cours du temps de la variation de la concentration en clonidine des solutions stockées à température ambiante et entre +2°C et +8°C	43
Figure 7: Comparaison des chromatogrammes de la solution de clonidine stockée à température ambiante à J0 et J61	44
Figure 8 : Evolution au cours du temps du pH des solutions stockées à température ambiante et entre +2°C et +8°C.....	45
Figure 9 : Evolution au cours du temps de l'osmolalité des solutions stockées à température ambiante et entre +2°C et +8°C	45

I INTRODUCTION

Parmi toutes les spécialités pharmaceutiques avec autorisation de mise sur le marché (AMM) disponibles en France, peu sont destinées à un usage pédiatrique. De ce fait la prescription hors AMM dans ce contexte, notamment en milieu hospitalier est estimée entre 11 et 80% des situations, en fonction des âges et des spécialités (1). Aussi une enquête réalisée auprès de médecins d'un hôpital pédiatrique parisien révèle que dans 59%, les médicaments sont indiqués pour des indications validées en pédiatrie mais pour des tranches d'âges ou de poids différents de ceux de l'AMM (2).

L'utilisation hors AMM est souvent due à l'absence d'essais cliniques et l'absence de formes galéniques adaptées chez l'enfant. En 2006, afin de développer la mise sur le marché de spécialités adaptées à la pédiatrie, un règlement européen est adopté et vise à inciter les industriels à développer des médicaments destinés à cette catégorie de patients (3). En effet, les industriels sont moins enclins à les développer du fait des risques et de la complexité de mettre en place des essais cliniques en pédiatrie, d'une population cible moins importante que chez l'adulte ainsi que des aspects financiers, le retour sur investissement étant considéré comme insuffisant (4).

Le manque de médicaments destinés à l'usage chez l'enfant nécessite dans ce contexte la mise au point et la fabrication par les pharmacies à usage intérieur (PUI) de préparations magistrales et hospitalières à visée pédiatrique (5).

La clonidine, développée dans les années 1960, est utilisée chez l'adulte dans le traitement de l'hypertension artérielle dans le cadre de l'AMM. Chez l'enfant, l'emploi de la clonidine est effectuée hors-AMM.

Ainsi il est rapporté l'emploi chez l'enfant de la molécule dans le traitement du syndrome d'hyperactivité avec déficit de l'attention, en particulier en association avec le méthylphénidate (6,7). La clonidine est utilisée en seconde intention, notamment en cas d'hyperactivité associée à une agressivité (8). Une formulation orale à libération prolongée est d'ailleurs disponible aux Etats-Unis chez l'enfant à partir de 6 ans dans cette indication (8). La clonidine est recommandée au niveau européen dans le traitement des tics et du syndrome de Gilles de la Tourette (6,9,10).

Dans les troubles neuro-développementaux et notamment chez les enfants autistes, la clonidine est utilisée dans les troubles du sommeil, du fait de ses propriétés sédatives (11–13).

La clonidine a aussi été étudiée dans le traitement du syndrome de sevrage néonatal, associée à un morphinique, de manière à raccourcir la durée du traitement, sans preuve de son efficacité (14–18).

En anesthésie, la clonidine en injectable est utilisée chez l'enfant comme adjuvant dans les anesthésies locorégionales, pour permettre une amélioration et un prolongement de l'effet antalgique (19–21). La Société Française d'Anesthésie et Réanimation (SFAR) recommande de ne pas dépasser la dose de 2 µg/kg chez l'enfant afin de limiter l'apparition d'effets indésirables (22).

En prémédication anesthésique, la clonidine est une molécule prometteuse. Actuellement, le midazolam est souvent cité et employé chez l'enfant dans cette indication. Le service d'anesthésie du CHRU de Lille souhaite réaliser un essai clinique multicentrique afin de comparer l'utilisation de midazolam et celle de clonidine par voie orale et nasale dans la prémédication anesthésique chez l'enfant.

Aucune forme orale adaptée n'existant chez l'enfant, la pharmacie du CHRU de Lille a mis au point une formulation orale de clonidine adaptée.

Les objectifs de ce travail sont donc :

- Le développement d'une forme galénique adaptée de clonidine chez l'enfant,
- L'étude de stabilité physico-chimique de la solution ; avec nécessité préalable de mettre au point une méthode analytique permettant la détection et la quantification de la clonidine, et d'éventuels produits de dégradation,
- L'étude de la contamination microbiologique de la solution de clonidine.

II MATÉRIELS ET MÉTHODE

PARTIE 1 : DÉVELOPPEMENT D'UNE FORME GALÉNIQUE ADAPTÉE DE CLONIDINE CHEZ L'ENFANT

II.1 FAISABILITÉ ET FORMULATION

Une première revue de la littérature scientifique a été effectuée afin de déterminer la faisabilité de la préparation au regard de l'indication et des effets indésirables de la clonidine.

De même, une seconde revue de la littérature a été faite au regard de la formulation galénique, la pertinence pharmaceutique, la réglementation et les alternatives disponibles.

II.2 MATIÈRES PREMIÈRES EMPLOYÉES DANS LA FORMULATION

Le chrohydrate de clonidine (Lot :14H11-B04, Exp : 04/01/2019) et l'acide citrique monohydraté (Lot : 15185303, Exp : 31/05/2018) proviennent de chez Inresa (Bartenheim, France).

Le citrate de potassium tripotassique (Lot :15030124/A, Exp :01/2019), le sorbate de potassium (Lot :12110013/B, Exp :11/2017) et la saccharine sodique (Lot :13010152/A, Exp :01/2017) proviennent du laboratoire Cooper (Melun, France).

L'eau stérile utilisée est fournie par le laboratoire Fresenius Kabi (Sèvres, France).

Toutes les matières premières utilisées sont de qualité pharmaceutique.

II.3 FABRICATION DU LOT EN PHARMACIE HOSPITALIÈRE

Le lot de la préparation a été fabriqué au préparatoire de la pharmacie du CHRU de Lille (D. LANNOY), en conformité avec les Bonnes Pratiques de Préparation (BPP, 2007) (23).

PARTIE 2 : MISE AU POINT D'UNE MÉTHODE ANALYTIQUE ET ÉTUDE DE STABILITÉ PHYSICO-CHIMIQUE DE LA SOLUTION

II.4 CONDITIONS CHROMATOGRAPHIQUES

Les analyses ont été réalisées sur un système chromatographique liquide Ultimate 3000[®] Thermo Scientific (Villebon-sur-Yvette, France, Pays) composé d'une pompe quaternaire (LPG 3400SD série : 8086502), d'un passeur automatique d'échantillons à 20°C (WPS 3000TSL série : 8090784), d'un four à effet Peltier (TCC 3000 série : 6001884) et d'un détecteur à barrettes de diode (DAD3000 série : 8091713). Le logiciel de traitement de données utilisé est Chroméléon 7 (Version 3.04).

Une revue de la littérature scientifique sur les méthodes de dosage de la clonidine a été réalisée (Annexe 1) et une nouvelle méthode de dosage a été mise au point et validée.

Les échantillons sont analysés sur une pré-colonne Hypersil Gold 10 x 3 mm (3 µm) et une colonne C18 Hypersil Gold (Thermo Scientific) de dimension 100 x 3 mm (3 µm) à une température de 40°C. Le volume d'injection est de 10 µL. La phase mobile est composée d'un mélange d'acétonitrile et de tampon phosphate 25 mM pH=4,5 en proportion 5/95 (v/v). Les composants sont élués à un débit de 0,5 mL/min en mode isocratique. La longueur d'onde de détection est de 210 nm.

II.5 PRODUITS ET RÉACTIFS

Le chlorhydrate de clonidine SCR est fourni par l'*European Pharmacopeia Reference Standard* (Strasbourg, France).

L'acétonitrile provient de chez VWR (Fontenay-sous-bois, France), le phosphate monopotassique est fourni par Merck (Darmstch, Allemagne).

II.6 PROTOCOLES ANALYTIQUES

L'ensemble des contrôles analytiques ont été réalisés au sein du laboratoire de contrôle de la pharmacie du CHRU de Lille (C. BERNERON).

L'ensemble des protocoles visant à mettre au point la méthode de dosage ainsi que la réalisation de l'étude de stabilité sont basés sur les recommandations de la Société Française de Pharmacie Clinique (SFPC) et du GERPAC ainsi que sur celles de l'ICH (International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use) (24–27).

II.6.1 SPÉCIFICITÉ DE LA MÉTHODE

II.6.1.1 SPÉCIFICITÉ VIS-À-VIS DES EXCIPIENTS

La spécificité vis-à-vis des excipients a été déterminée en effectuant l'analyse d'un blanc matrice comprenant l'ensemble des excipients (acide citrique, citrate de potassium, saccharine, sorbate de potassium, eau stérile). Le chromatogramme est comparé à celui de la solution de clonidine pure. L'absence de réponse au temps de rétention de la clonidine démontre la spécificité.

II.6.1.2 DÉGRADATION FORCÉE

L'objectif est de vérifier la spécificité de la méthode vis-à-vis des produits de dégradation.

Afin de dégrader la molécule de clonidine, une solution à 400 µg/mL de clonidine (SF) est préparée. Cette solution est mise en contact avec des solutions d'HCl 5N, de NaOH 5N ainsi que d'un agent oxydant (peroxyde d'hydrogène 30%) (Tableau I). Les solutions sont chauffées à 100°C au bain-marie pendant 3 jours.

TABLEAU I: RESUME DU PROTOCOLE DE DEGRADATION

Solution	N°1	N°2	N°3	N°4	N°5
SF (mL)	2	2	2		
HCl 5N (mL)	2			2	
NaOH 5N (mL)		2			
H ₂ O ₂ 30%(mL)			2		2
Eau stérile (mL)				2	2

Après neutralisation, la solution de concentration finale 100 µg/mL est ensuite injectée dans le système chromatographique.

II.6.2 RECHERCHE DE L'EFFET MATRICE

L'évaluation de l'effet matrice est effectuée en préparant cinq gammes avec excipients et cinq gammes sans excipient. A partir de solutions à 10 µg/mL, des gammes de 5 concentrations différentes sont préparées (1,5 µg/mL, 2 µg/mL, 2,5 µg/mL, 3 µg/mL, 3,5 µg/mL). Les pentes et les ordonnées à l'origine des gammes avec et sans excipients sont ensuite comparées à l'aide d'un test de Student (risque α de 5%).

II.6.3 VALIDATION DE LA MÉTHODE ANALYTIQUE

II.6.3.1 PRÉPARATION DE LA GAMME D'ÉTALONNAGE ET DES QC

A partir d'une solution mère de clonidine à 1 mg/mL, une solution fille à 10 µg/mL est préparée. Une gamme d'étalonnage en 5 points avec des concentrations allant de 60% à 140% de la concentration cible est préparée selon le tableau II. De même, 4 contrôles qualités internes sont préparés à partir d'une deuxième solution à 10 µg/mL (Tableau III). Pour chaque solution, 10 µL sont ensuite injectés dans la colonne chromatographique.

TABLEAU II: PREPARATION DE LA GAMME D'ETALONNAGE

Concentration (µg/mL)	1,5	2	2,5	3	3,5
% concentration cible	60	80	100	120	140
Solution à 10µg/mL (µL)	60	80	100	120	140
Tampon Phosphate (µL)	320	300	280	260	240
ACN (µL)	20	20	20	20	20

TABLEAU III: PREPARATION DES CONTROLES QUALITE

Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	1,75	2,25	2,75	3,25
Solution à 10 $\mu\text{g/mL}$ (μL)	70	90	110	130
Tampon Phosphate (μL)	310	290	270	250
ACN (μL)	20	20	20	20
Volume final (μL)	400	400	400	400

II.6.3.2 PROTOCOLE DE VALIDATION

Pour valider la méthode chromatographique, nous avons réalisé un profil d'exactitude (28,29). L'analyse de la gamme d'étalonnage et des contrôles qualités est réalisée sur 3 jours consécutifs.

La fidélité et la justesse de la méthode de dosage de la clonidine ont été déterminées à l'aide de 4 contrôles qualités externes de clonidine (1,75 ; 2,25 ; 2,75 ; 3,25 $\mu\text{g/mL}$). Chaque jour, 3 séries indépendantes de ces 4 contrôles qualités sont préparées et analysées.

L'exactitude représente l'erreur totale. Comme il s'agit d'une matrice non complexe, les limites d'acceptation choisies sont +/- 10%. La méthode permet donc de quantifier la clonidine avec une exactitude inférieure à +/- 10% dans la gamme d'étalonnage choisie, au risque α de 5%.

Les limites basses de détection (LBDD) et de quantification (LBDQ) de la méthode ont été calculées à partir d'un blanc ($n = 6$). La valeur de LBDD correspond à un rapport signal/bruit de 3,3 et celle de LBDQ correspond à un rapport de 10.

II.6.4 ETUDE DE STABILITÉ PHYSICO-CHIMIQUE

II.6.4.1 CONDITIONS DE CONSERVATION

Pendant l'étude de stabilité, les flacons sont stockés couchés (de manière à favoriser le contact de la solution avec les différents constituants du flacon et du bouchon), à l'abri de la lumière, selon deux conditions de conservation différentes :

- Stockage entre +2°C et +8°C
- Stockage dans une enceinte climatisée à 25°C, 60% d'humidité résiduelle comme recommandé par l'ICH (au laboratoire de biopharmacie à la faculté de Pharmacie) (25).

II.6.4.2 PARAMÈTRES ANALYSÉS

A chaque temps d'analyse, deux flacons de chaque condition de conservation sont analysés. Plusieurs paramètres sont étudiés :

- Etude des propriétés organoleptiques : odeur, couleur de la solution, limpidité.
- Dosage de la teneur en clonidine et des produits de dégradation par HPLC : 2 mesures sont réalisées sur chaque flacon. Pour le PA, les résultats de la concentration en PA sont exprimés en pourcentage de la concentration à J0. Un écart de plus ou moins 10% de l'intervalle de confiance par rapport au pourcentage à J0 est toléré (24).

Pour chaque échantillon testé, 100µL de la solution de clonidine à 10 µg/mL sont ajoutés à 280 µL de tampon phosphate 25 mM pH=4,5 et 20 µL d'acétonitrile. Après agitation, 10 µL sont injectés en UPLC.

- Détermination du pH : en effet une variation pourrait signifier un phénomène d'altération.
- Détermination de l'osmolalité ; ainsi une valeur élevée de l'osmolalité aurait une incidence en terme de tolérance chez certaines populations pédiatriques (30). De plus, une variation pourrait signifier un phénomène d'altération. Trois mesures sont réalisées sur chaque flacon.

II.6.4.3 TEMPS DE PRÉLÈVEMENTS

L'étude de stabilité est organisée pour une durée initiale d'un an, avec les temps de prélèvement suivants : J0 (post-production), J1, J7, J15, J30, J60, J90, J120, J365.

PARTIE 3 : ETUDE DE LA CONTAMINATION MICROBIOLOGIQUE DE LA SOLUTION DE CLONIDINE

II.7 ETUDE DE LA CONTAMINATION MICROBIOLOGIQUE : MISE AU POINT DE LA MÉTHODE D'ANALYSE

La solution orale de clonidine fabriquée n'a pas de nécessité d'être stérile, cependant son éventuelle contamination et l'effet des conservateurs tout au long de la conservation de la solution se doivent d'être étudiés.

L'étude de cette contamination microbiologique de la préparation s'appuie sur les monographies de la PE :

- 5.1.4 « Qualité microbiologique des préparations pharmaceutiques et des substances pour usage pharmaceutique non stériles » (31)
- 2.6.12 « Contrôle microbiologique des produits non stériles : essais de dénombrement microbien » (32)
- 2.6.13 « Contrôle microbiologique des produits non stériles : recherche de microorganismes spécifiés » (33)

Les manipulations relatives à ces contrôles ont été réalisées au sein des laboratoires d'Hygiène (Dr M. TITECAT) et de Parasitologie-Mycoologie (Dr E. FREALLE), du Centre de Biologie et Pathologie (CBP) du CHRU de Lille. Pour éviter toute contamination extrinsèque, l'ensemble des manipulations liées au contrôle sont réalisées sous PSM II.

Selon la PE, l'étude de la contamination microbiologique de la solution se déroule en trois étapes :

- Une première étape d'étude de la fertilité des milieux utilisés afin de s'assurer de la croissance des souches microbiennes utilisées.
- Une deuxième étape de validation de l'applicabilité de la méthode qui sera ensuite utilisée pour analyser les échantillons. Dans cette partie, il est nécessaire de s'assurer de l'élimination de toute activité antimicrobienne que pourrait posséder la solution, ainsi que de valider la méthode d'ensemencement.
- Dans une dernière étape, les échantillons sont analysés selon la méthode précédemment validée.

II.7.1 FERTILITÉ DES MILIEUX

Les milieux de culture utilisés répondent aux exigences qualité imposées aux laboratoires d'analyses médicales. Le contrôle de leur fertilité est effectué sur chacun des lots reçus par le Centre de Biologie et Pathologie et n'a donc pas été vérifié dans le cadre de notre étude.

Les principales caractéristiques des milieux cités sont présentées en annexe 2.

II.7.2 APPLICABILITÉ DE LA MÉTHODE

- **Neutralisation de l'effet antimicrobien du sorbate de potassium**

La solution de clonidine à 10 µg/mL mise au point contient un conservateur, le sorbate de potassium à la concentration de 0,3%. De manière à ce que celui-ci n'inhibe pas la pousse d'éventuels germes présents au moment du contrôle, il est nécessaire de neutraliser l'activité de ce conservateur.

La PE recommande, afin de neutraliser le sorbate de potassium, de diluer la préparation (32). De plus, l'activité antibactérienne du sorbate de potassium est négligeable quand le pH est supérieur à 6 (34).

Il y a inhibition de la croissance microbologique lorsque le recouvrement microbien de l'échantillon préparé est réduit de plus d'un facteur 2 par rapport au recouvrement de la solution témoin (32).

Un protocole a donc été mis en place afin de vérifier l'inhibition ou non de la croissance microbienne en présence de sorbate de potassium et de valider la neutralisation du conservateur.

Les jours précédents la réalisation du protocole, les souches de référence utilisées (Tableau IV) sont mises en culture. Le jour même, des suspensions sont préparées à partir de ces souches, par mesure de la concentration en MacFarland (bactéries) ou par comptage sur cellule de Malassez (levures et champignons filamenteux), afin d'obtenir des suspensions de 10^3 et 10^4 micro-organismes/mL.

TABLEAU IV: SOUCHES DE REFERENCE UTILISEES

Micro-organismes étudiés	Souches utilisées
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 29213
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	ATCC 16404
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231

En parallèle, la solution de clonidine à 10 µg/mL est diluée sous flux au 1/10, au 1/50 et au 1/100 avec du tampon phosphate pH 7,2.

Pour chaque micro-organisme, respectivement 200 µL de suspension à 10³/mL et 200 µL de suspension à 10⁴/mL sont ajoutés à 1,8 mL de chaque dilution à étudier (pure, 1/10, 1/50 et 1/100). Enfin, 100 µL des suspensions obtenues (10²/mL et 10³/mL) sont étalés sur des géloses de milieu différent selon le micro-organisme (2 boîtes/ échantillon):

- Sabouraud pour *C. albicans* et *A. brasiliensis* (incubation à 30°C)
- BCP pour *E. coli* (incubation à 37°C)
- Au sang pour *S. aureus* (incubation à 37°C)

Des témoins négatifs (tampon phosphate, solution de clonidine) et positifs (suspensions microbiennes) sont également préparés.

La lecture des boîtes est réalisée à 24h pour les bactéries et à 7 jours pour les levures et moisissures.

- **Choix de la méthode d'ensemencement et validation de l'applicabilité de la méthode**

Trois méthodes d'ensemencement sont décrites à la PE :

- la filtration sur membrane,
- le dénombrement sur plaques,
- et la méthode du nombre le plus probable. La dernière méthode présente une fidélité et une exactitude inférieures et n'est utilisée que dans certains contextes (32).

Un protocole a été mis en place afin de choisir parmi ces 2 méthodes la plus sensible et de valider son applicabilité.

Les jours précédents la réalisation du protocole, les souches de référence utilisées (Tableau VII) sont mises en culture. Le jour même, des suspensions sont préparées à partir de ces souches afin d'obtenir des suspensions de 10^3 et 10^4 micro-organismes/mL.

En parallèle, la solution de clonidine à 10 $\mu\text{g/mL}$ est diluée au 1/10 avec du tampon phosphate pH 7,2 (pour neutraliser le conservateur).

Pour chaque micro-organisme, respectivement 5 mL de suspension à $10^3/\text{mL}$ et 5 mL de suspension à $10^4/\text{mL}$ sont ajoutés à 45 mL de chaque dilution à étudier (pure, 1/10).

Pour chaque échantillon préparé, 10 mL sont filtrés sur une membrane 0,45 μm (4 membranes/échantillon). Deux des membranes sont rincées par 5 mL de tampon phosphate pH 7,2. Ces membranes sont ensuite déposées sur des géloses :

- Sabouraud pour *C. albicans* et *A. brasiliensis* (incubation à 30°C)
- BCP pour *E. coli* (incubation à 35°C)
- Chapman pour *S. aureus* (incubation à 35°C)

Un ensemencement en profondeur est également fait pour chaque échantillon préparé : 1 mL de l'échantillon est déposé dans une boîte de Pétri puis 15-20 mL de milieu gélosé sont introduits. Après solidification du milieu, les géloses sont incubées à 37°C (bactéries) et 30°C (levures et moisissures).

Des témoins négatifs et positifs sont également préparés.

La lecture des boîtes est réalisée à 24h pour les bactéries et à 7 jours pour les levures et moisissures.

- **Recherche d'*Escherichia coli* : validation de l'applicabilité de la méthode**

Le milieu de culture utilisé est différent de celui recommandé par la PE. En effet, la PE recommande d'utiliser un milieu de MacConkey pour la recherche d'*E. coli* et nous avons employé le milieu tergitol (Annexe 2).

Dans des tubes, 2 mL de solution de clonidine à étudier (pure et au 1/10) sont mélangés à 10 mL de bouillon de Mueller-Hinton (2 tubes par solutions). Pour chaque solution, une colonie d'*E. coli* est repiquée dans un des tubes. L'ensemble est incubé 24h à 37°C.

Le jour suivant, environ 250 µL des solutions sont transférés sur des géloses Tergitol. Ces géloses sont ensuite incubées à 37°C pendant 24h avant lecture.

II.8 ÉTUDE LA CONTAMINATION MICROBIOLOGIQUE DE LA PRÉPARATION

La présence de contamination a été évaluée à 75 jours pour les solutions stockées à température ambiante et entre +2°C et +8°C.

Pour chaque solution, 10 mL sont dilués au 1/10 avec du tampon phosphate pH=7,2.

La solution diluée (10 mL) est ensuite filtrée sur membrane puis celle-ci est rincée avec 5 mL de tampon phosphate. Les membranes sont déposées sur les milieux suivants (2 membranes/milieu):

- Chapman
- BCP
- PCA
- Sabouraud

La recherche d'*E.coli* se fait à partir de la solution diluée.

La PE demande pour les préparations aqueuses par voie orale qu'elles répondent aux exigences présentées dans le tableau V (31).

TABLEAU V: EXIGENCES DE LA PHARMACOPEE EUROPEENNE CONCERNANT LA QUALITE MICROBIOLOGIQUE DES PREPARATIONS ORALES AQUEUSES

DGAT : Dénombrement des germes aérobies totaux, DMLT : Dénombrement des moisissures et levures totales

Voie d'administration	DGAT (UFC/g ou UFC/mL)	DMLT (UFC/g ou UFC/mL)	Microorganismes spécifiés
Voie orale : préparation aqueuse	10 ²	10 ¹	Absence d' <i>E. coli</i> (1g ou 1mL)

III RÉSULTATS

PARTIE 1 : DÉVELOPPEMENT D'UNE FORME GALÉNIQUE ADAPTÉE DE CLONIDINE CHEZ L'ENFANT

III.1 FAISABILITÉ ET FORMULATION

III.1.1 FAISABILITÉ DE LA PRÉPARATION AU REGARD DE L'INDICATION ET DES EFFETS INDÉSIRABLES

III.1.1.1 MÉCANISME D'ACTION ET PHARMACOCINÉTIQUE

La clonidine est un agoniste partiel des récepteurs α_2 adrénergiques. Elle agit au niveau central sur le centre bulbaire. Elle diminue le tonus sympathique en activant les neurones parasympathiques inhibiteurs (14,35).

Chez l'adulte, la clonidine présente une bonne biodisponibilité par voie orale variant de 75 à 90% (36). Le taux de liaison aux protéines plasmatiques est de 30-40%. La clonidine étant lipophile, elle se distribue largement et passe la barrière hémato-encéphalique (37). La demi-vie plasmatique est d'environ 13 heures. Elle est principalement éliminée sous forme inchangée (40 – 60% de la dose) et son excrétion est majoritairement rénale (37,38).

Chez l'enfant, la biodisponibilité varie selon la voie d'administration. Par voie orale, elle a été estimée dans une étude à 55%, plus faible que chez l'adulte (36). Celle-ci est estimée à 100% par voie nasale et à 95% par voie rectale chez l'enfant (39,40). Lors de l'administration par ces voies, le temps nécessaire pour obtenir la concentration plasmatique maximale est en moyenne de 1 heure par voies orale et rectale, et de 2 à 3 heures par voie nasale (36,40,41). La clairance rénale de la clonidine varie selon l'âge des enfants. Elle est plus faible chez le nouveau-né et atteint, selon les études, 80-90% de la clairance chez l'adulte vers 2 à 3 ans (37,39).

III.1.1.2 EFFETS INDÉSIRABLES

La clonidine présente comme principaux effets indésirables chez l'enfant : une sécheresse de la bouche, une constipation, des nausées et vomissements, une hypotension orthostatique, une bradycardie, des palpitations et arythmies, des syncopes, un phénomène de Raynaud, une somnolence, des changements du comportement, une irritabilité, des céphalées et vertiges ainsi que des états dépressifs (42,43).

III.1.1.3 UTILISATION EN PRÉMÉDICATION ANESTHÉSIQUE CHEZ L'ENFANT

En raison de ses propriétés sédatives, la clonidine est une molécule d'étude de choix dans la prémédication anesthésique. Plusieurs voies d'administrations ont ainsi été étudiées. Une revue de la littérature, présentée en annexe 3 a été réalisée, pour comparer l'efficacité, la sécurité d'emploi et l'acceptabilité.

Concernant l'efficacité (Annexe 3A), la molécule a été comparée en prémédication anesthésique, par voie orale dans plusieurs études en double aveugle ou en ouvert, au midazolam, une benzodiazépine régulièrement considérée comme molécule de référence dans cette indication. Ces deux molécules ont été étudiées chez des enfants âgés de 2 à 12 ans opérés dans le cadre de chirurgies mineures. La méthode d'anesthésie principalement utilisée est l'anesthésie par le sevoflurane. Les posologies utilisées y sont respectivement de 4 µg/kg pour la clonidine et 0,5 mg/kg pour le midazolam. Dans la majorité des études, le niveau de sédation observé est meilleur avec la clonidine (44–47), excepté dans une étude, où le midazolam se révèle supérieur (48). Cependant, plusieurs études notent que l'anxiolyse est plus importante dans le bras « midazolam » (47–49).

Il est aussi observé une action plus rapide du midazolam que de la clonidine (47). Il semble donc nécessaire d'administrer la clonidine au moins une heure avant l'induction anesthésique alors que 30 minutes sont suffisantes pour le midazolam. La qualité de l'induction au masque est variable selon les études. Quelques études ont comparé des doses de clonidine (2 µg/kg et 4 µg/kg). Bien qu'un effet soit observé avec une dose de 2 µg/kg, l'action de la clonidine est dose dépendante et est optimale pour une dose de 4 µg/kg (44,46,50).

Par voie nasale, Mitra *et al.* ne retrouve pas de différence significative de niveau de sédation et d'anxiolyse entre la clonidine et le midazolam (51). Comme par voie orale, le délai d'action du midazolam est légèrement inférieur à celui de la clonidine. Deux essais comparent également l'administration de clonidine *per os* et par voie nasale, avec des résultats divergents (52,53).

Une étude a également été réalisée employant la voie rectale afin de comparer la clonidine (5 µg/kg) au midazolam (300 µg/kg), avec des résultats équivalents entre les deux molécules (54).

L'anesthésie par le sévoflurane est connue pour induire chez les enfants une agitation, notamment au réveil. En comparaison avec le midazolam, la clonidine permet un réveil plus facile ainsi que de moindres agitations au réveil (49–51,54). Ces résultats sont confirmés sur l'agitation post-opératoire, quand la clonidine est employée en IV, avec diminution de la fréquence et de l'intensité des épisodes d'agitation (55,56) et par voie orale, avec diminution de l'incidence de ces épisodes d'agitation (50,57).

La clonidine permettrait également une meilleure analgésie post-opératoire comparativement au midazolam (45,46,48,58). Une revue de la littérature réalisée par Cochrane confirme l'hypothèse d'un effet bénéfique de la clonidine en prémédication sur la douleur post-opératoire (59).

Concernant la sécurité d'emploi (Annexe 3B), dans les études où les paramètres hémodynamiques ont été analysés, les enfants des groupes « *clonidine* » présentent une pression artérielle et une fréquence cardiaque plus faibles que dans les groupes « *midazolam* » (45,46,49,50,53,58,60). Ces effets sont inhérents au mécanisme d'action de la clonidine. Cependant, les épisodes de bradycardie et d'hypotension sont très rares. Le profil de sécurité de la clonidine est donc acceptable.

Chez l'enfant, il n'a pas été retrouvé d'effets indésirables majeurs pour des posologies inférieures à 10 µg/kg (19). Mikawa *et al.* ont observé dans une étude pilote chez l'enfant une hypotension et une bradycardie pour des doses de clonidine de 5 µg/kg (44). Dans cette même étude, ces effets n'ont pas été répertoriés pour des posologies de 4 µg/kg. Dans une étude observationnelle, l'incidence de la bradycardie chez les enfants recevant une dose de 3 à 6 µg/kg *per os* en prémédication anesthésique a été étudiée et qualifiée de très faible, n'imposant pas une remise en cause de la molécule dans cette indication (60). Plusieurs études ont également étudié l'impact de la clonidine en IV sur la pression artérielle en anesthésie pédiatrique. Une diminution de la pression artérielle modérée de 15 à 26% selon les études est observée (61,62).

Concernant l'acceptabilité et la réalisation des formulations orales employées (Annexe 3C), la préparation est généralement extemporanée et vise à masquer un potentiel goût désagréable lors de l'administration (miel, sirop...). Les préparations

pédiatriques sont fabriquées à partir de la solution injectable (52,53) ou à partir de comprimés (45). Aucune étude n'a analysé la dose administrée, les paramètres biopharmaceutiques ou pharmacocinétiques, ou encore la stabilité dans le temps et vis-à-vis des excipients avec ces préparations.

Des études ont également évalué l'acceptabilité et le goût des deux molécules lors de l'administration par voie orale et nasale (48,51–53). Par voie orale, l'administration de la clonidine est plus aisée que le midazolam. Malgré l'administration du midazolam avec du miel ou du sirop, les enfants décrivent un goût déplaisant. En effet, le midazolam présente un goût amer difficile à masquer. Par voie nasale, la clonidine semble bien acceptée par les enfants. D'après Mitra *et al.*, l'administration de midazolam par voie nasale, provoquent des sensations de brûlure au niveau des narines des enfants (51). L'irritation est possiblement due au pH de la solution administrée (63). La clonidine a donc démontré une meilleure acceptabilité que le midazolam.

III.1.2 FAISABILITÉ ET FORMULATION AU REGARD DES ASPECTS PHARMACEUTIQUES

III.1.2.1 RECHERCHE D'ALTERNATIVES

Comme mentionné précédemment, l'indication visée pour la préparation de clonidine est l'utilisation en prémédication anesthésique chez l'enfant de 1 à 3 ans. Sur le marché français, la clonidine est disponible sous plusieurs formes :

- comprimés dosés à 0,15 mg
- solution injectable dosée à 0,15 mg/mL
- dispositif transdermique, dosé à 0,1 et 0,2 mg/24h, disponible avec une autorisation temporaire d'utilisation.

Aucune de ces formes n'est adaptée à une administration orale chez les enfants inclus dans l'étude pilote.

Avant l'âge de 6 ans, il est souvent déconseillé d'administrer aux enfants des formes galéniques solides tels que des comprimés car le réflexe de déglutition n'est pas encore acquis chez tous les enfants (64,65). De plus, le comprimé ne permet pas de grande flexibilité dans la dose administrée (64). L'Agence européenne du médicament recommande chez les enfants de moins de 8 ans, de favoriser les

formulations liquides (66). De plus l'AMM ne prévoit pas l'utilisation de ce médicament avant 18 ans, compte tenu de l'insuffisance de données de sécurité et d'efficacité. Le broyage du médicament n'est pas prévu dans le cadre de l'AMM.

Quant aux autres formes, celles-ci ne sont pas adaptées à l'administration *per os*. La forme injectable est trop concentrée et contient de l'acide chlorhydrique pour obtenir un pH 4, ce qui la rend dangereuse pour une administration par voie orale (67).

La forme patch est prévue chez l'enfant dans les troubles déficitaires de l'attention avec hyperactivité, avec un effet continu recherché.

Il est donc possible de mettre au point et de fabriquer une préparation orale pédiatrique à base de clonidine.

De plus, la dose à administrer dans le cadre de l'essai clinique est de 4 µg/kg en une seule prise avant l'intervention. La solution étant destinée à des enfants de 1 à 3 ans, la posologie devrait varier de 30 µg à 80 µg par administration.

Au vu de ces éléments, il a été décidé de réaliser une formulation liquide orale à la concentration de 10 µg/mL.

III.1.2.2 CHOIX DU PRINCIPE ACTIF ET DES EXCIPIENTS

La clonidine est une molécule dont la monographie est disponible à la Pharmacopée Européenne (68). Elle est disponible sous forme de sel de chlorhydrate. Son nom chimique est le chlorhydrate de 2,6-dichloro-N-(imidazolidin-2-ylidène)aniline (figure 1). Sa masse molaire est de 266,6 g/mol (68).

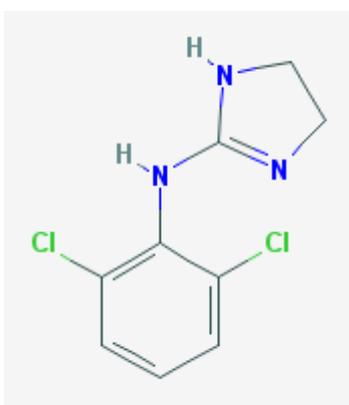


FIGURE 1: STRUCTURE CHIMIQUE DU CHLORHYDRATE DE CLONIDINE

Le chlorhydrate de clonidine est une poudre cristalline blanche soluble dans l'eau et l'éthanol anhydre.

La clonidine étant une molécule soluble dans l'eau, il a été décidé de mettre au point une solution aqueuse de clonidine.

Une revue de la littérature présentée en annexe 4 répertorie les publications de formulations pédiatriques de clonidine. La grande majorité de celles-ci utilisent comme source de clonidine, les comprimés disponibles sur le marché (69–71). Seule une publication utilise la matière première en poudre (72). L'utilisation de comprimés rend plus complexe le développement de la préparation. En effet, la teneur en clonidine n'est pas précisément maîtrisée. Certains excipients des comprimés ne sont pas solubles et peuvent potentiellement interagir avec les autres excipients de la solution. L'homogénéité de la préparation et sa stabilité ne sont pas garanties. De plus, les BPP recommandent comme mode d'approvisionnement à privilégier la matière première à usage pharmaceutique (MPUP) provenant d'établissements pharmaceutiques autorisés (23).

Le chlorhydrate de clonidine étant disponible chez l'un de nos fournisseurs de MPUP, il a été décidé d'utiliser la matière première en poudre pour mettre au point la préparation.

Comme Ensom et al.(Oral Mix[®]) et Ma et al. (Orablend[®]), nous avons envisagé d'utiliser des excipients complexes pour formuler la solution de clonidine (70,71). Ces excipients permettent de réaliser des préparations dites « prête à l'emploi » où il est seulement nécessaire d'ajouter la poudre de principe actif. Ils contiennent généralement un conservateur antimicrobien, un stabilisateur de pH, des agents de suspension, un édulcorant et parfois des aromatisants (73). Plusieurs sont disponibles sur le marché français :

- La gamme Ora[®], la plus ancienne sur le marché. Cependant, les conservateurs utilisés sont des parabens, classés par l'ANSM comme excipient à effet notoire.
- Inorpha[®]
- Syrspend[®]

L'emploi de deux gammes d'excipients complexes (Inorpha[®] et Syrspend[®]) a été testé, puis abandonné suite à des difficultés dans la mise au point d'une méthode de contrôle permettant de quantifier la clonidine et d'évaluer la stabilité de la préparation. Une formulation à base d'excipients simples a donc été mise au point.

Afin de permettre le stockage de la préparation et d'assurer la stabilité microbiologique de la solution dans le temps, il a été nécessaire d'adjoindre un conservateur antimicrobien. Plusieurs sont disponibles dont:

- Les parahydroxybenzoates et leurs esters, aussi appelés parabènes
- Le benzoate de sodium
- Le sorbate de potassium
- L'acide sorbique
- Le propylène glycol
- Le glycérol

Les parabènes, le glycérol, le propylène glycol et le benzoate de sodium n'ont pas été choisis car ils appartiennent à la liste des excipients à effet notoire de l'ANSM (74). Les premiers sont susceptibles de provoquer des réactions allergiques. Ils seraient également perturbateurs endocriniens (75). L'ANSM a procédé à une analyse de risque sur l'ensemble des spécialités disponibles sur le marché (76). Le glycérol peut provoquer des troubles digestifs. Le propylène glycol peut entraîner des symptômes semblables à ceux provoqués par l'alcool (77). Le benzoate de sodium, quant à lui est susceptible chez le nouveau-né de provoquer des ictères nucléaires (74,78).

Le choix final s'est porté sur le sorbate de potassium car celui-ci est plus soluble dans l'eau que l'acide sorbique. Il est également plus stable en solution que l'acide (34,79).

Le sorbate de potassium présente des propriétés antimicrobiennes à un pH inférieur à 6. En effet, celle-ci est assurée par l'acide sorbique, notamment sur *Aspergillus niger* (80). Son efficacité augmente également avec sa concentration. Le pH d'une solution de clonidine à 10 µg/mL étant supérieur à 6, un tampon à base de citrate de potassium et d'acide citrique a été ajouté à la formulation (81). Le citrate de potassium et l'acide citrique sont des excipients faisant partie de la liste des

« *inactive ingredients* » de la FDA ainsi que celle des « *GRAS substances* » (82,83). Afin d'obtenir une efficacité optimale du sorbate de potassium, la solution a donc été tamponnée à un pH de 5. Un tamponnage à des valeurs inférieures est susceptible de troubler la solution.

Enfin, comme la solution de clonidine associée aux excipients présente une légère amertume, un édulcorant a été ajouté. Plusieurs ont été envisagés :

- Le saccharose : il n'a pas été retenu car à faible concentration, celui-ci favorise la prolifération microbienne dans la solution. De plus, il est cariogène.
- Le steviol : il n'existe pas de monographie à la Pharmacopée Européenne. De plus, aucun fournisseur ne distribue cette matière première.
- Le sucralose : Aucune monographie n'est disponible à la Pharmacopée Européenne et celui-ci n'est disponible chez aucun des fournisseurs.
- La saccharine sodique : plus soluble que la saccharine, elle présente un pouvoir sucrant 300 à 500 fois plus fort que le saccharose (84). Il s'agit de l'édulcorant choisi pour entrer dans la formulation de la solution de clonidine.

III.1.2.3 CHOIX DE LA CONCENTRATION EN SACCHARINE

Afin de déterminer la concentration la plus appropriée en saccharine, 4 solutions de la formulation pressentie, sans clonidine, mais constituées des excipients dont la saccharine sodique à différentes concentrations ont été goûtées par des volontaires adultes (Tableau VI). Chaque volontaire devait remplir un questionnaire et renseigner une note sur le goût et l'arrière-goût de chaque solution (1= mauvais goût, 5= très bon goût).

TABLEAU VI: CONCENTRATION EN SACCHARINE DES DIFFERENTES SOLUTIONS TESTEES

Solution	Concentration en saccharine (%)
N°1	0%
N°2	0,025%
N°3	0,050%
N°4	0,075%

Les résultats de l'étude sur le choix de la concentration en saccharine sont présentés dans le tableau VII.

TABLEAU VII: APPRECIATION DU GOUT D'UNE SOLUTION DE SACCHARINE A DIFFERENTES CONCENTRATIONS

	Evaluation du goût (score moyen ± écart-type)	Evaluation de l'arrière-goût (score moyen ± écart-type)
Solution 1	2,3 ± 0,9	1,9 ± 0,8
Solution 2	3,4 ± 0,7	3,1 ± 0,6
Solution 3	3,0 ± 1,2	2,8 ± 1,0
Solution 4	2,0 ± 1,2	1,6 ± 0,7

Parmi toutes les solutions testées, la solution n°2 avec une concentration en saccharine de 0,025% est celle ayant la meilleure acceptabilité.

La formulation finale de la solution de clonidine à 10 µg/mL est, pour 100 mL de solution :

- **1 mL de solution de clonidine à 1 mg/mL (obtenue par pesée de 50 mg de clonidine en poudre mise en solution dans 50 mL d'EPPI)**
- **300 mg de sorbate de potassium**
- **346 mg de citrate de potassium**
- **200 mg d'acide citrique monohydraté**
- **26 mg de saccharine sodique**
- **Eau PPI qsp 100 mL**

La fiche d'instruction de la procédure de fabrication ainsi que la fiche de fabrication sont présentées en annexes 5 et 6.

PARTIE 2 : MISE AU POINT D'UNE MÉTHODE ANALYTIQUE ET ÉTUDE DE STABILITÉ PHYSICO-CHIMIQUE DE LA SOLUTION

III.2 MISE AU POINT DES CONDITIONS CHROMATOGRAPHIQUES ET SPÉCIFICITÉ

La spécificité vis-à-vis des excipients est réalisée par la comparaison entre un blanc matrice comportant tous les excipients et une solution pure de clonidine à 10 µg/mL. La figure 2 montre la superposition des chromatogrammes de la solution de clonidine avec et sans excipients.

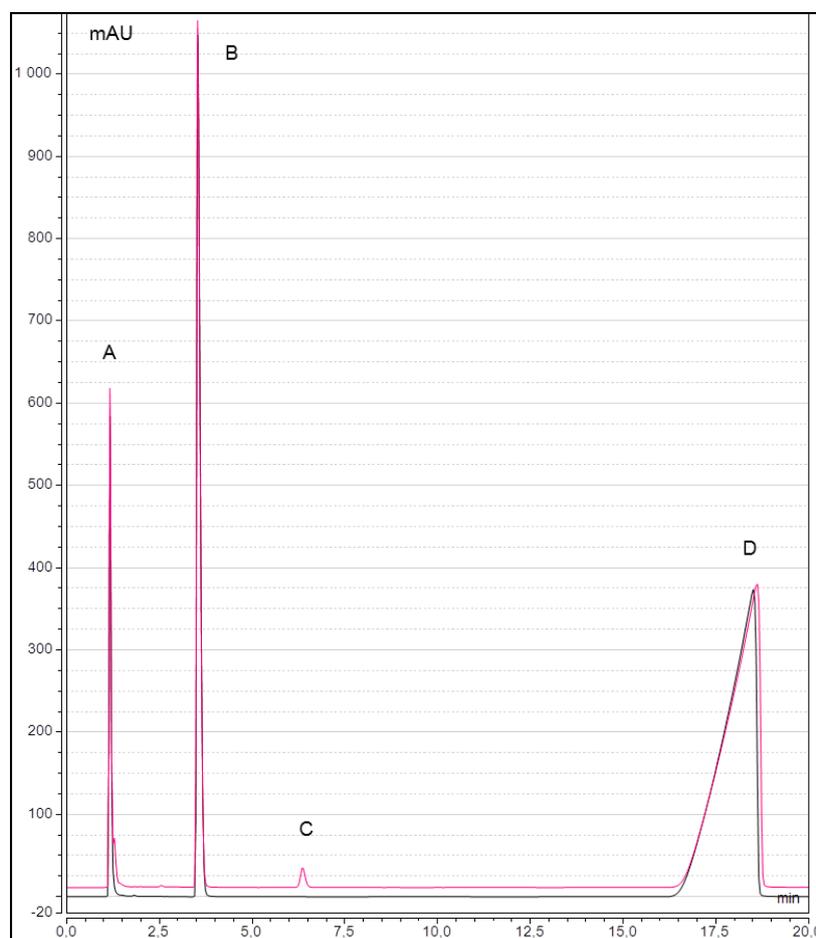


FIGURE 2 : ANALYSE DE LA SOLUTION DE CLONIDINE A 10 µG/ML SELON LES CONDITIONS ANALYTIQUES AVEC ACN/TAMPON PHOSPHATE 5/95 V/V

A : acide citrique/citrate de potassium, B : saccharine sodique, C : clonidine, D : sorbate de potassium

Ce chromatogramme montre l'absence de réponse au temps de rétention de la clonidine ($t_r = 6$ min).

L'ensemble des pics observés sur le chromatogramme du blanc matrice ont également été identifiés. Les pics correspondent respectivement au citrate de

potassium et l'acide citrique ($t_r = 1,1$ min), à la saccharine sodique ($t_r = 3,7$ min) et au sorbate de potassium ($t_r = 18$ min).

III.3 DÉGRADATION FORCÉE

Les résultats des différents protocoles de dégradation forcée sont présentés sur la figure 3.

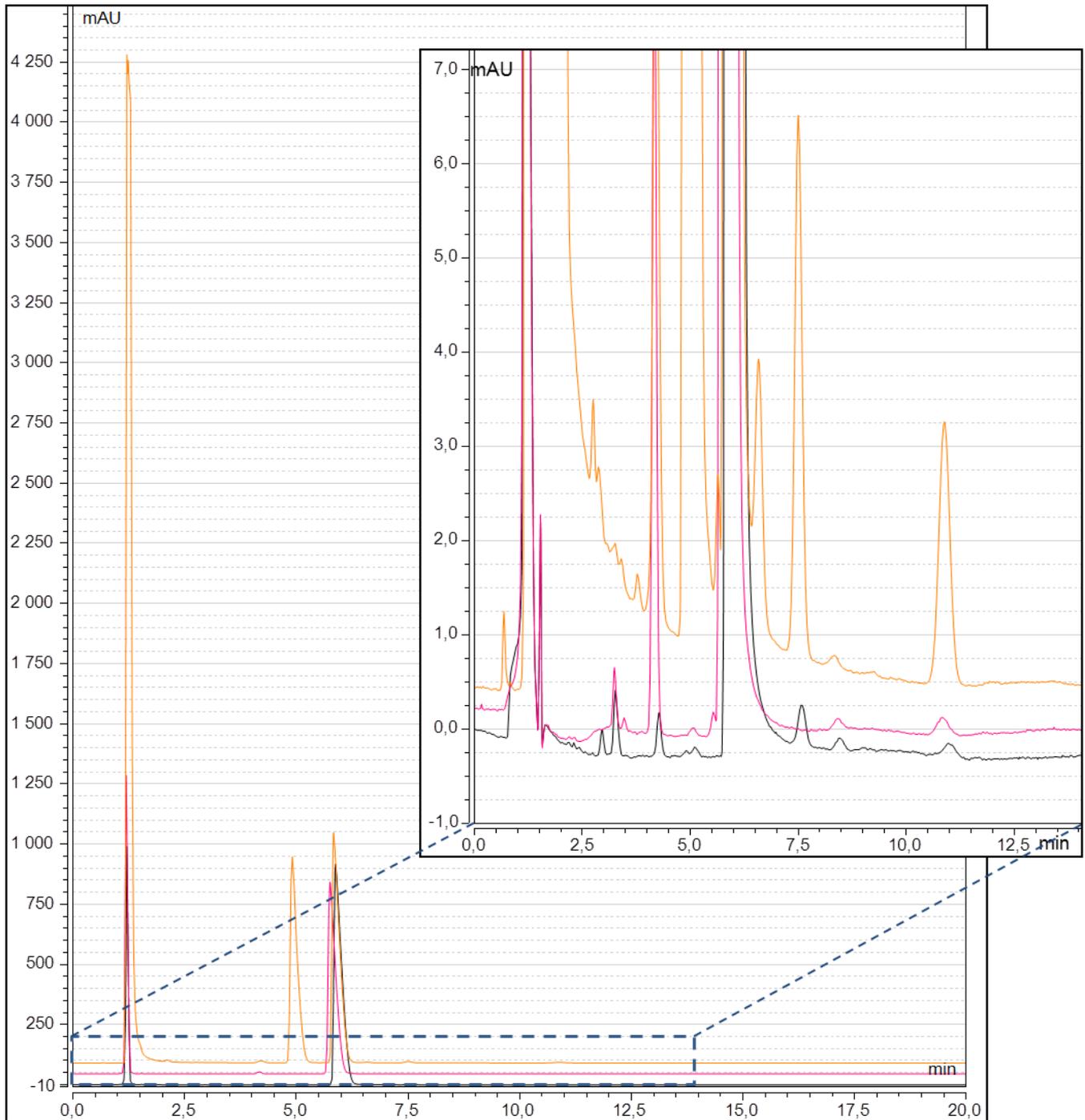


FIGURE 3 CHROMATOGRAMMES A J3 DES PROTOCOLES DE DEGRADATION FORCEE DANS LES CONDITIONS ANALYTIQUES ACN/TAMPON PHOSPHATE 5/95 V/V
Hydrolyse à 100 °C par HCl 5N (Noir), Dégradation par NaOH 5N à 100°C (Rose), Oxydation par H₂O₂ 30% à 100°C (Orange)

Sur les chromatogrammes, on observe des pics correspondant à d'éventuels produits de dégradation, aux temps de rétention $t_r = 2,9$ min, $t_r = 3,4$ min, $t_r = 4,2$ min, $t_r = 6,5$ min, $t_r = 7,6$ min et 10,9 min.

III.4 EFFET MATRICE

Les résultats statistiques de la comparaison des pentes et ordonnées à l'origine sont présentés dans le tableau VIII ($\alpha = 5\%$, 6 ddl).

TABLEAU VIII: RECHERCHE DE L'EFFET MATRICE: RESULTATS STATISTIQUES DE LA COMPARAISON DES DROITES D'ETALONNAGE

	Comparaison des pentes		Comparaison des ordonnées à l'origine	
	Moyenne	Variance	Moyenne	Variance
Sans excipients	1,86811	0,00065	0,04390	0,00097
Avec excipients	1,91481	0,01470	0,10753	0,01382
$T_{\text{expérimental}}$	0,377		0,523	
$T_{\text{théorique}}$	2,447		2,447	

Les pentes et les ordonnées à l'origine des deux droites d'étalonnage ne sont pas différentes statistiquement. Il n'y a donc pas d'effet matrice. Afin de simplifier la validation de la méthode chromatographique, il est donc possible de préparer des gammes avec une solution de clonidine sans excipient.

III.5 VALIDATION DE LA MÉTHODE CHROMATOGRAPHIQUE

III.5.1 FONCTION DE RÉPONSE ET LINÉARITÉ

Pendant 3 jours consécutifs, 5 standards de validation de clonidine de concentrations 1,5 ; 2 ; 2,5 ; 3 et 3,5 $\mu\text{g/mL}$ sont préparés selon le protocole décrit précédemment.

L'équation de la droite de régression obtenue est $y = 1,8762x + 0,0406$. Le coefficient de corrélation r^2 est de 0,999 (Figure 4).

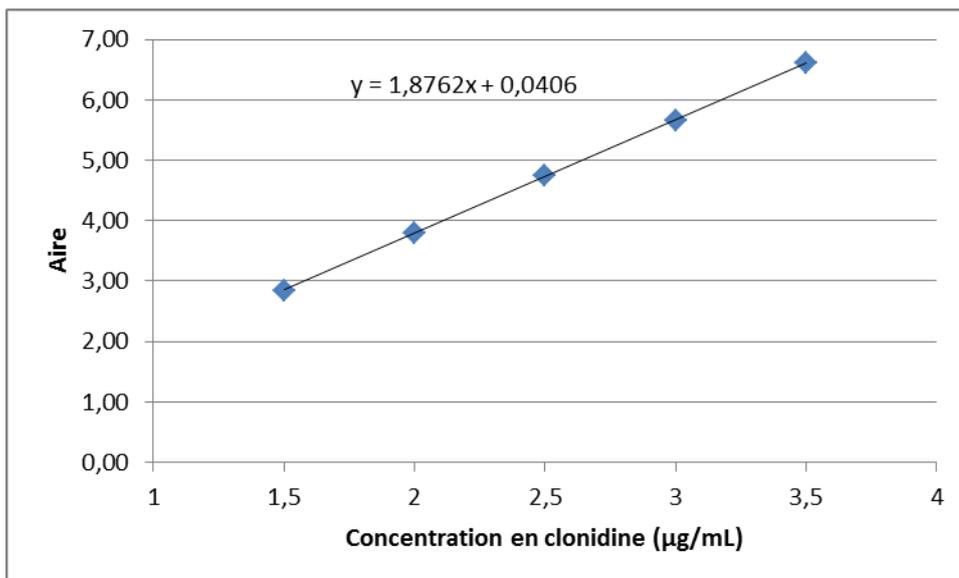


FIGURE 4 : FONCTION DE REPOSE

III.5.2 FIDÉLITÉ ET JUSTESSE

Les coefficients de variation pour l'étude de répétabilité sont inférieurs à 1,54% et les coefficients de variation pour l'étude de la fidélité intermédiaire sont inférieurs à 1,82%. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau IX.

TABLEAU IX: FIDELITE ET JUSTESSE DU DOSAGE DE LA CLONIDINE

Clonidine (µg/mL)	CV Répétabilité (%)	CV Fidélité intermédiaire (%)
1,75	1,25	1,82
2,25	1,54	1,66
2,75	1,22	1,55
3,25	0,56	0,92

Les biais relatifs sont compris entre -0,11% et 0,62%. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau X.

TABLEAU X: BIAIS RELATIFS CALCULES

Clonidine (µg/mL)	Biais relatifs (%)
1,75	-0,11
2,25	0,06
2,75	0,62
3,25	0,26

III.5.3 PROFIL D'EXACTITUDE

Pour cette méthode de dosage de la clonidine, l'intervalle de confiance de l'erreur totale est compris dans les limites pour chaque niveau de concentration (Figure 5). La gamme est validée de 1,5 à 3,5 $\mu\text{g/mL}$.

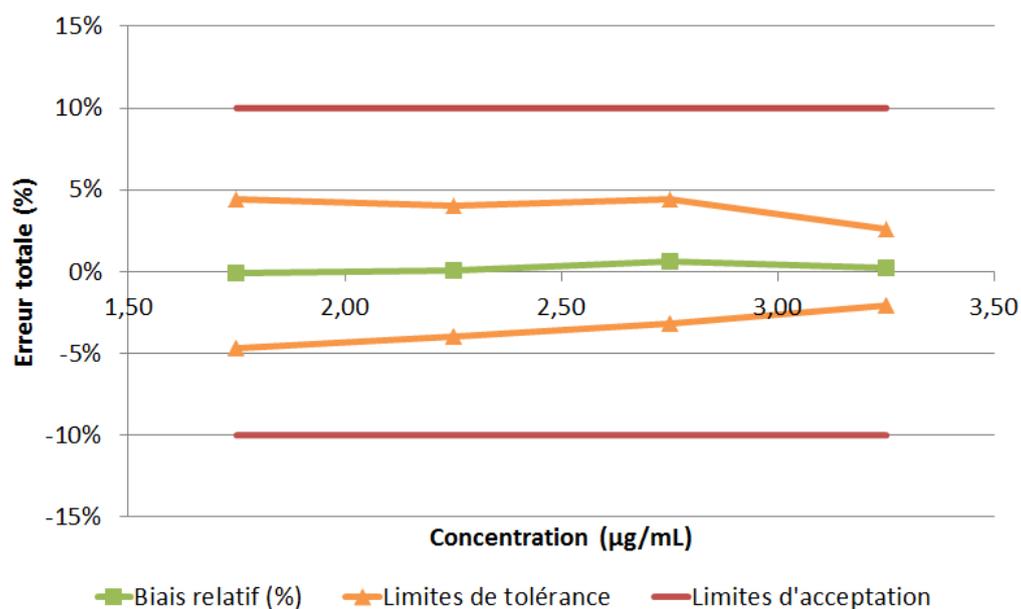


FIGURE 5 : PROFIL D'EXACTITUDE

III.5.4 LIMITES BASSES DE DÉTECTION ET DE QUANTIFICATION

Les limites basses de détection et de quantification sont respectivement de 69,6 ng/mL et de 211,0 ng/mL .

Le chlorhydrate de clonidine utilisé pour la validation de la méthode de dosage n'étant pas une substance de référence, la droite d'étalonnage a été comparée avec celle établie avec de la clonidine SCR. Aucune différence significative n'a été retrouvée avec la substance de référence.

III.6 ETUDE DE STABILITÉ

Les résultats présentés correspondent aux 3 premiers mois de l'étude.

III.6.1 EVOLUTION DE LA TENEUR AU COURS DU TEMPS

L'évolution de la concentration par rapport à la concentration initiale (%) au cours du temps est présentée dans la figure 6.

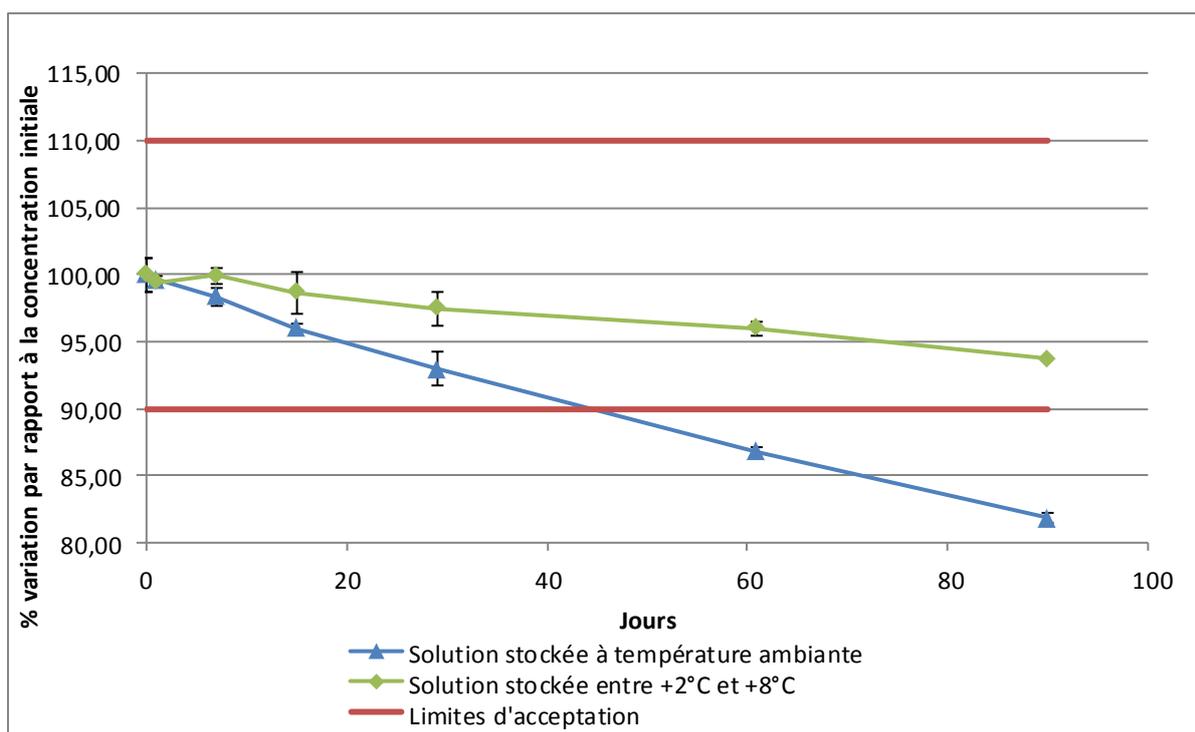


FIGURE 6 : EVOLUTION AU COURS DU TEMPS DE LA VARIATION DE LA CONCENTRATION EN CLONIDINE DES SOLUTIONS STOCKEES A TEMPERATURE AMBIANTE ET ENTRE +2°C ET +8°C

A deux mois, aucun des produits de dégradation identifiés lors de la dégradation forcée n'a été retrouvé. On observe cependant l'augmentation de l'aire d'un pic présent à $T_r = 2,9$ minutes, ne correspondant à aucun excipient. La figure 7 présente la comparaison entre les chromatogrammes de la solution stockée à température ambiante à J0 et à J61.

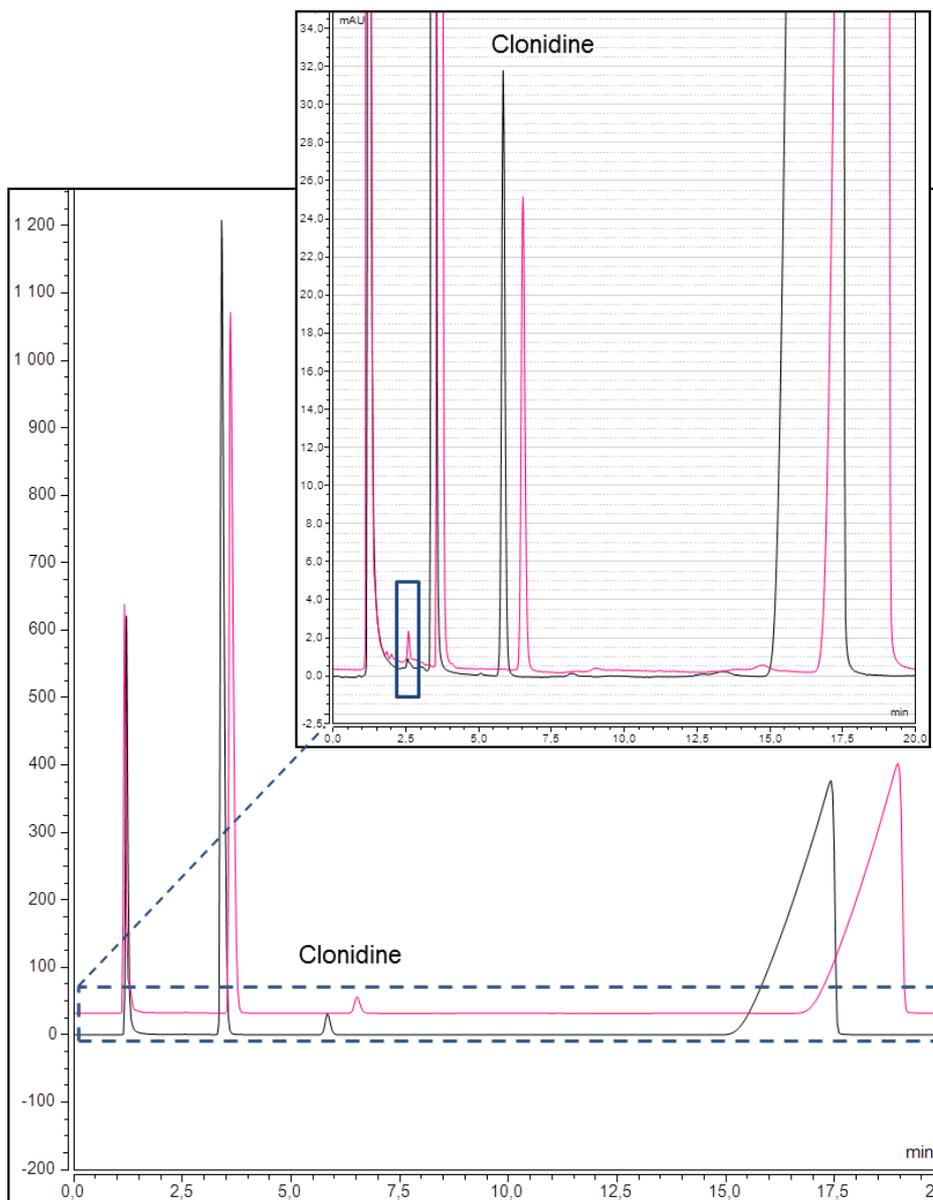


FIGURE 7: COMPARAISON DES CHROMATOGRAMMES DE LA SOLUTION DE CLONIDINE STOCKEE A TEMPERATURE AMBIANTE A J0 ET J61

Noir : solution de clonidine à J0 ; Rose : solution de clonidine à J61 ; cadre bleu : augmentation de l'aire d'un pic à $T_r = 2,9$ minutes

III.6.2 EVOLUTION DES AUTRES PARAMÈTRES AU COURS DU TEMPS

L'évolution au cours du temps des valeurs de pH est présentée dans la figure 8. Le pH des solutions stockées à température ambiante et entre $+2^{\circ}\text{C}$ et $+8^{\circ}\text{C}$ n'évoluent pas au cours du temps.

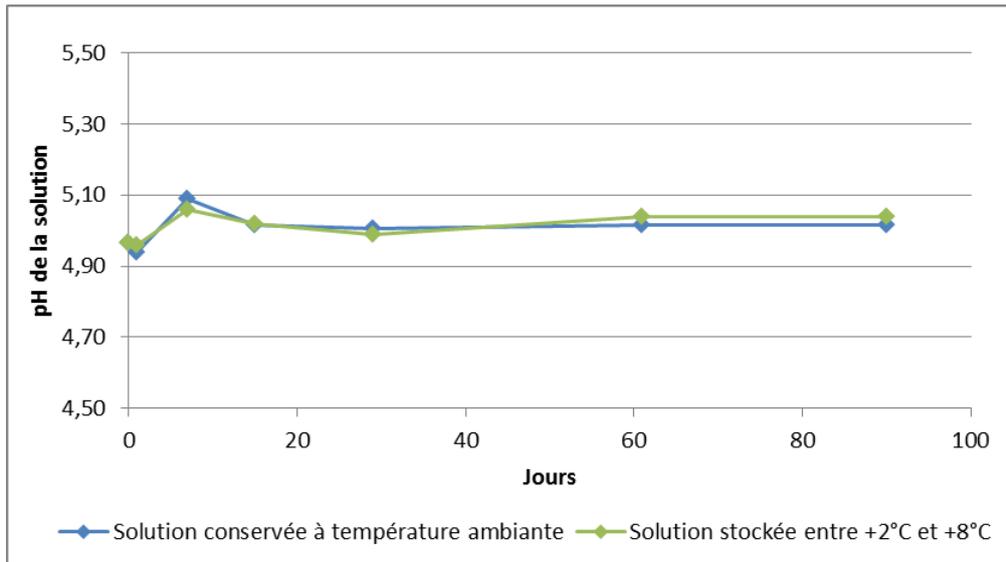


FIGURE 8 : EVOLUTION AU COURS DU TEMPS DU PH DES SOLUTIONS STOCKEES A TEMPERATURE AMBIANTE ET ENTRE +2°C ET +8°C

L'évolution des valeurs de l'osmolalité est présentée dans la figure 9. Au cours du temps, aucune modification de l'osmolalité n'est observée, quelle que soit la température de conservation de la solution. La valeur moyenne de l'osmolalité est de 85,4 mOsm/kg, ce qui ne présage pas d'une mauvaise tolérance digestive.

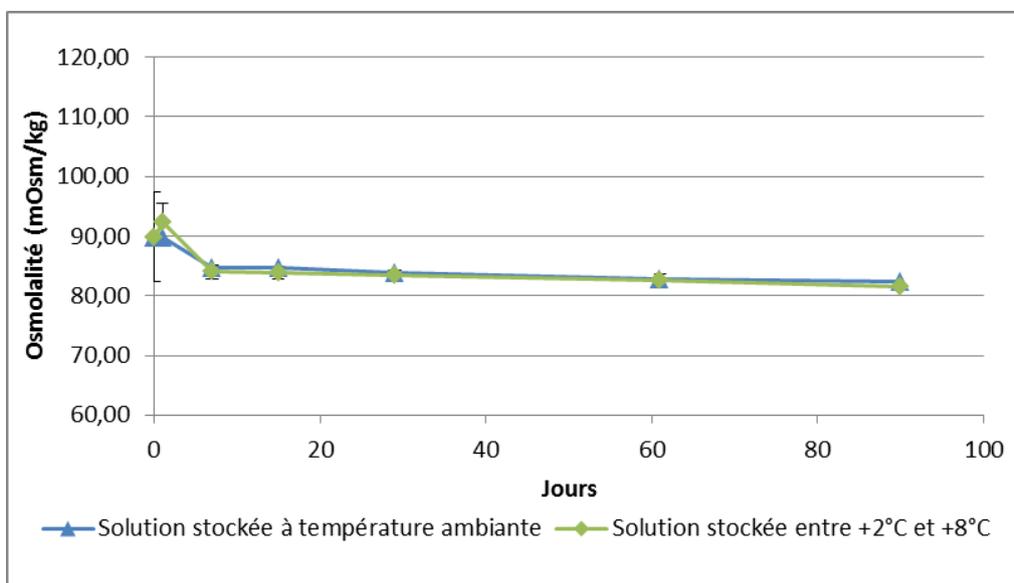


FIGURE 9 : EVOLUTION AU COURS DU TEMPS DE L'OSMOLALITE DES SOLUTIONS STOCKEES A TEMPERATURE AMBIANTE ET ENTRE +2°C ET +8°C

PARTIE 3 : ETUDE DE LA CONTAMINATION MICROBIOLOGIQUE DE LA SOLUTION DE CLONIDINE

III.7 CONTAMINATION MICROBIOLOGIQUE

III.7.1 NEUTRALISATION DE L'EFFET ANTIMICROBIEN DU SORBATE DE POTASSIUM

Les résultats bactériologiques et mycologiques sont présentés dans les tableaux XI et XII.

Lors de la réalisation des protocoles, le rendement des cultures est d'environ 50% quel que soit le micro-organisme étudié. Ce rendement est en fait dû aux erreurs inhérentes aux faibles dilutions, aux modalités de pipetage utilisées ainsi qu'à la remise en suspension et à la viabilité des micro-organismes. Le rendement étant identique pour tous les micro-organismes, l'analyse des résultats est possible.

Aucune pousse de micro-organismes n'a été observée avec les témoins négatifs.

Quel que soit le micro-organisme étudié, le rapport du recouvrement microbien de l'échantillon préparé sur le recouvrement de la solution témoin est généralement inférieur à 2, aux erreurs expérimentales près, ne présageant pas d'une action immédiate du conservateur. Aucune différence n'est observée entre les différentes dilutions de la solution. Il n'y a donc pas d'inhibition de la pousse des micro-organismes quand ceux-ci sont mis en contact avec le sorbate de potassium au moment du contrôle microbiologique.

Une dilution de la solution de clonidine au 1/10 avec du tampon phosphate est donc suffisante pour s'assurer de la neutralisation de l'effet antimicrobien du sorbate de potassium en culture. De plus, le pH mesuré de la solution de clonidine diluée au 1/10 est de 6,8, ce qui participe à la neutralisation de l'effet du conservateur.

Au vu de ces résultats, il a été décidé de diluer l'échantillon de solution étudiée au 1/10 comme recommandé par la PE.

TABLEAU XI: ETUDE DE L'EFFET ANTIMICROBIEN DU SORBATE DE POTASSIUM SUR *E. COLI* ET *S.AUREUS*

Microorganismes		<i>E. coli</i> ATCC 25922					<i>S. aureus</i> ATCC 29213				
Solutions de clonidine		Pure	Au 1/10	Au 1/50	Au 1/100	Témoin positif	Pure	Au 1/10	Au 1/50	Au 1/100	Témoin positif
Concentration théorique en micro-organismes: 10^3 /mL	Gélose A (UFC)	31	33	29	30	19	32	21	32	17	50
	Gélose B (UFC)	28	31	42	36	35	29	18	25	contamination	31
	Moyenne (UFC)	29,5	32	35,5	33	27	30,5	19,5	28,5	17	40,5
	Estimation de la concentration en micro-organismes dans la solution (UFC/mL)	295	320	355	330	270	305	195	285	170	405
Concentration théorique en micro-organismes: 10^2 /mL	Gélose A (UFC)	2	4	3	5	5	2	3	10	3	3
	Gélose B (UFC)	6	1	4	1	2	2	1	4	5	4
	Moyenne (UFC)	4	2,5	3,5	3	3,5	2	2	7	4	3,5
	Estimation de la concentration en micro-organismes dans la solution (UFC/mL)	40	25	35	30	35	20	20	70	40	35

TABLEAU XII: ETUDE DE L'EFFET ANTIMICROBIEN DU SORBATE DE POTASSIUM SUR *A. BRASILIENSIS* ET *C. ALBICANS*

Microorganismes		<i>A. brasiliensis</i> ATCC 16404					<i>C. albicans</i> ATCC 10231				
Solutions de clonidine		Pure	Au 1/10	Au 1/50	Au 1/100	Témoin positif	Pure	Au 1/10	Au 1/50	Au 1/100	Témoin positif
Concentration théorique en micro-organismes: 10^3 /mL	Gélose A (UFC)	44	50	35	53	46	25	40	33	32	49
	Gélose B (UFC)	49	44	43	42	76	42	36	43	38	38
	Moyenne (UFC)	46,5	47	39	47,5	61	33,5	38	38	35	43,5
	Estimation de la concentration en micro-organismes dans la solution (UFC/mL)	465	470	390	475	610	335	380	380	350	435
Concentration théorique en micro-organismes: 10^2 /mL	Gélose A (UFC)	4	5	5	7	5	1	7	5	3	10
	Gélose B (UFC)	5	6	6	4	4	6	7	3	7	3
	Moyenne (UFC)	4,5	5,5	5,5	5,5	4,5	3,5	7	4	5	6,5
	Estimation de la concentration en micro-organismes dans la solution (UFC/mL)	45	55	55	55	45	35	70	40	50	65

III.7.2 CHOIX DE LA MÉTHODE D'ENSEMENCEMENT ET VALIDATION DE L'APPLICABILITÉ DE LA MÉTHODE

Les résultats bactériologiques et mycologiques sont présentés dans les tableaux XIII et XIV.

Les résultats de l'étude de la méthode de l'étalement de surface utilisés correspondent à ceux obtenus lors de l'étude de la neutralisation de l'activité antimicrobienne du sorbate de potassium.

Les témoins positifs et négatifs correspondent aux valeurs attendues.

Pour une concentration de 10^2 micro-organismes/mL, le nombre de colonies comptées est plus important par la méthode de filtration mais une sous-estimation de la concentration en micro-organismes est constatée par rapport à l'inclusion et au témoin positif. A l'inverse, pour une concentration de 10^3 /mL, la filtration sur membrane entraîne une surestimation de la concentration par rapport à l'inclusion. Pour *A. brasiliensis*, au vu des concentrations testées, les colonies ont été rapidement confluentes et n'ont pu être dénombrées.

Quelles que soit les méthodes d'ensemencement employées, les micro-organismes sont en capacité de se développer. Les différentes méthodes permettent toutes de rechercher des micro-organismes présents; la plus sensible est la filtration sur membrane.

La méthode choisie pour analyser les échantillons est celle de la filtration sur membrane.

Les rendements obtenus lors de la filtration sur membrane sont équivalents que la membrane soit rincée avec du tampon phosphate ou non. Il a donc été choisi de rincer la membrane avec une faible quantité de tampon afin d'éliminer le plus possible de conservateur sans perdre de potentiels micro-organismes présents dans la solution.

TABLEAU XIII : RESULTATS DES METHODES D'ENSEMENCEMENT TESTEES POUR *E. COLI* ET *S. AUREUS*

Microorganismes		<i>E. coli</i> ATCC 25922						<i>S. aureus</i> ATCC 29213					
Méthodes d'ensemencement		Filtration sur membrane				Inclusion		Filtration sur membrane				Inclusion	
Solutions de clonidine		Pure	Pure rincée	Au 1/10	Au 1/10 rincée	Pure	Au 1/10	Pure	Pure rincée	Au 1/10	Au 1/10 rincée	Pure	Au 1/10
Concentration théorique en micro-organismes: 10 ² /mL	Gélose A (UFC)	308	286	298	298	46	43	290	316	310	304	34	34
	Gélose B (UFC)	324	250	270	224	/	/	294	302	326	266	/	/
	Moyenne (UFC)	316	268	284	261	46	43	292	309	318	285	34	34
	Estimation de la concentration en microorganismes dans la solution (UFC/mL)	31,6	26,8	28,4	26,1	46	43	29,2	30,9	31,8	28,5	34	34
Concentration théorique en micro-organismes: 10 ³ /mL	Gélose A (UFC)	>500	>500	>500	>500	384	371	>500	>500	>500	>500	306	325
	Gélose B (UFC)	>500	>500	>500	>500	/	/	>500	>500	>500	>500	/	/
	Moyenne (UFC)	>500	>500	>500	>500	384	371	>500	>500	>500	>500	306	325
	Estimation de la concentration en microorganismes dans la solution (UFC/mL)	>500	>500	>500	>500	384	371	>500	>500	>500	>500	306	325

TABLEAU XIV : RESULTATS DES METHODES D'ENSEMENCEMENT TESTEES POUR *A. BRASILIENSIS* ET *C. ALBICANS*

NQ : Non quantifiable

Microorganismes		<i>A. brasiliensis</i> ATCC 16404					<i>C. albicans</i> ATCC 10231				
Méthodes d'ensemencement		Filtration sur membrane				Inclusion	Filtration sur membrane				Inclusion
Solutions de clonidine		Pure	Pure rincée	Au 1/10	Au 1/10 rincée	Au 1/10	Pure	Pure rincée	Au 1/10	Au 1/10 rincée	Au 1/10
Concentration théorique en micro-organismes: 10 ² /mL	Gélose A (UFC)	NQ	NQ	NQ	NQ	48	298	314	364	350	84
	Gélose B (UFC)	NQ	NQ	NQ	NQ	/	376	396	370	334	/
	Moyenne (UFC)					48	337	355	367	342	84
	Estimation de la concentration en microorganismes dans la solution (UFC/mL)	NQ	NQ	NQ	NQ	48	33,7	35,5	36,7	34,2	84
Concentration théorique en micro-organismes: 10 ³ /mL	Gélose A (UFC)	NQ	NQ	NQ	NQ	103	>500	>500	>500	>500	270
	Gélose B (UFC)	NQ	NQ	NQ	NQ	/	>500	>500	>500	>500	/
	Moyenne (UFC)					103	>500	>500	>500	>500	270
	Estimation de la concentration en microorganismes dans la solution (UFC/mL)	NQ	NQ	NQ	NQ	103	>500	>500	>500	>500	270

III.7.3 RECHERCHE D'*E.COLI* : VALIDITÉ DE LA MÉTHODE

Les résultats pour valider la méthode de recherche d'*E.coli* sont présentés dans le tableau XV.

TABLEAU XV: RECHERCHE D'*E.COLI*

Solutions	Bouillons à J1	Gélose Tergitol
Pure sans <i>E.coli</i>	Limpide	pas de colonies gélose verte
Pure avec <i>E.coli</i>	Légèrement trouble	Présence de colonies orange gélose jaune
Au 1/10 sans <i>E.coli</i>	Limpide	pas de colonies gélose verte
Au 1/10 avec <i>E.coli</i>	Trouble	Présence de colonies orange gélose jaune

Au vu des résultats, la méthode d'ensemencement choisie pour rechercher la présence d'*E.coli* permet le développement de la bactérie.

III.8 ÉTUDE DE LA CONTAMINATION MICROBIOLOGIQUE DE LA SOLUTION

Les résultats de l'étude de la contamination microbiologique de la solution de clonidine à 10 µg/mL après filtration sur membrane sont présentés dans le tableau XVI.

TABLEAU XVI: ETUDE DE LA CONTAMINATION MICROBIOLOGIQUE DE LA SOLUTION DE CLONIDINE A 2,5 MOIS

Milieux		Solution stockée entre +2°C et +8°C		Solution stockée à température ambiante	
		Nombre d'UFC	Concentration estimée (UFC/mL)	Nombre d'UFC	Concentration estimée (UFC/mL)
Sabouraud	Membrane A	0	0	0	0
	Membrane B	0	0	0	0
PCA	Membrane A	3	0,3	2	0,2
	Membrane B	2	0,2	0	0
Chapman	Membrane A	0	0	2	0,2
	Membrane B	0	0	3	0,3
BCP	Membrane A	1	0,1	0	0
	Membrane B	2	0,2	2	0,2
Tergitol		0	0	0	0

Les germes retrouvés ont été identifiés. Les germes, tous environnementaux, sont des genres *Micrococcus*, *Staphylococcus* à coagulase négative, *Methylobacterium* et *Bacillus*.

Aucun *E. coli* n'a été détecté.

IV DISCUSSION

IV.1 FORMULATION

A notre connaissance, il s'agit de la première formulation adaptée à l'enfant et pour laquelle une stabilité de 3 mois a été mise en évidence.

En effet, l'ensemble des autres formulations développées contiennent des excipients à risque de toxicité, notamment les parabènes contenus dans le sirop simple, ou dans les bases Ora[®], susceptibles de jouer un rôle de perturbateur endocrinien, ou la glycérine contenu dans l'Oral Mix[®]. Par ailleurs, le sirop simple est cariogène et susceptible de cristalliser. De plus, les compositions des excipients complexes (Ora[®], Inorpha[®]) ne sont pas connues en détail et la qualité pharmaceutique de chacun des composants ne peut être garantie. L'absence de monographie pharmaceutique pour ces excipients complexes est également un inconvénient à leur utilisation en pharmacie hospitalière.

Afin de déterminer la concentration en saccharine la plus adaptée, les solutions ont été goûtées par des volontaires adultes. La perception gustative des nourrissons et jeunes enfants diffèrent cependant des adultes. Les nourrissons préfèrent le goût sucré et ont tendance à rejeter les saveurs amères et acides (85). Au vu de ces données, l'ajout d'un édulcorant à la solution s'avère utile puisque celle-ci présente une légère amertume. Il sera cependant intéressant de tester l'acceptabilité de la solution auprès de la population cible.

La forme galénique choisie (solution orale) est la forme recommandée chez les enfants par l'agence européenne du médicament (66). De nouvelles formes galéniques innovantes, comme les mini-comprimés, sont prometteuses pour l'utilisation chez l'enfant. Ces formes solides présentent l'avantage d'être plus stables que les formes liquides et pourraient être utilisés chez l'enfant de moins de 6 ans. Cependant, la mise au point et la fabrication de comprimés en milieu hospitalier n'est pas à ce jour réalisable.

IV.2 VALIDATION DE LA MÉTHODE

Devant l'absence de produits de dégradation de la clonidine identifiés dans le PE et la littérature scientifique, il a été nécessaire de procéder à une dégradation forcée de la molécule. Le guide de la SFPC recommande d'étudier une solution dont la concentration correspond au milieu de gamme. Cependant nous n'avons pas réussi à obtenir des pics de produits de dégradation et il a été nécessaire d'utiliser une solution de clonidine de concentration plus importante (100 µg/mL) et d'employer des concentrations élevées en HCl, NaOH et H₂O₂.

Il est retrouvé dans la littérature d'autres méthodes indicatrices de stabilité mises au point (Annexe 1). Toutes utilisent des méthodes HPLC. La plupart utilise comme phase mobile de l'acétate d'ammonium ou du méthanol. Dans ces méthodes, l'échantillon est parfois centrifugé avant analyse pour éliminer certains excipients. De plus, l'échantillon est filtré avant analyse. Lors de la préparation de nos échantillons, nous n'avons pas réalisé de filtration car la clonidine s'adsorbait sur les différents filtres testés. La formulation étant simple, la nécessité de filtration a été abandonnée.

Le temps d'analyse par HPLC de la solution de clonidine mise au point est de 20 minutes, du fait de l'éluion tardive du sorbate de potassium. La clonidine est quant à elle élue à 6 minutes. Dans la littérature, les temps de rétention retrouvés de la clonidine sont du même ordre.

IV.3 STABILITÉ PHYSICOCHIMIQUE

La solution de clonidine mise au point s'avère stable au moins 3 mois à une température entre +2°C et +8°C, mais n'est pas stable après 2 mois à température ambiante. Les durées de stabilité des formulations liquides de clonidine déjà développées varient entre 3 et 9 mois à température ambiante. De plus, la solution injectable de clonidine commercialisée est stable plusieurs années à température ambiante. Au vu de ces données, l'origine de la faible stabilité de la solution mise au point est à étudier. Il est possible que la clonidine interagisse avec les excipients de la solution. Aucun précipité n'a été observé lors de l'étude de stabilité physico-chimique. De plus, aucun produit de dégradation identifié lors de la dégradation forcée n'a été retrouvé. L'influence du pH dans la stabilité est aussi à étudier. En

effet, la solution injectable de clonidine possède un pH de 4 alors que la solution mise au point possède un pH de 5. La clonidine pourrait être plus stable à un pH plus acide.

Le pic d'un produit non identifié au cours de la dégradation forcée a augmenté. Des études supplémentaires seraient donc nécessaires pour déterminer la nature du produit, par exemple par des techniques de RMN ou de spectrométrie de masse.

IV.4 CONTAMINATION MICROBIOLOGIQUE

Concernant la neutralisation du conservateur, la dilution de la solution de clonidine ainsi que la modification de son pH, permet la neutralisation du sorbate de potassium.

Le temps de contact dans les protocoles entre le conservateur et les micro-organismes n'est pas suffisant pour entraîner une inhibition de la croissance microbienne. L'objectif de la neutralisation de l'activité antimicrobienne de la solution n'est pas de vérifier l'efficacité du conservateur mais de s'assurer de l'absence d'inhibition pendant le contrôle. Cependant l'efficacité du sorbate de potassium a déjà été démontrée (34). La concentration choisie dans la formulation est supérieure aux CMI déterminées pour les souches de *E. coli* et *S. aureus* vis-à-vis du sorbate de potassium.

Pour étudier l'efficacité du sorbate de potassium comme conservateur, après ajout de tous les germes à T0 à une solution de clonidine, une étude du dénombrement des micro-organismes dans le temps est à réaliser.

Trois méthodes d'ensemencement ont été testées: ensemencement en surface, ensemencement en profondeur (inclusion) et filtration sur membrane.

La méthode d'ensemencement en surface présente le désavantage d'avoir une prise d'essai très faible (100 µL) comparée à l'inclusion (1 mL) et à la filtration sur membrane (10 mL). Au vu des conditions de fabrication de la solution de clonidine à tester, celle-ci a un faible inoculum de micro-organismes. Un volume de prise d'essai important est donc nécessaire pour s'assurer d'une méthode suffisamment sensible.

La méthode d'ensemencement en profondeur permet de rechercher en particulier la flore anaérobie et micro-aérobie. Les moisissures et levures sont des micro-organismes aérobies. L'inclusion n'est donc pas adaptée pour leur recherche. Au cours de l'ensemencement en profondeur d'*A.brasiliensis* et *C.albicans*, il a d'ailleurs été observé que ces micro-organismes s'étaient développés principalement en surface et non au sein de la gélose. De plus, contrairement à la méthode d'ensemencement de surface et à la filtration sur membrane, elle ne permet pas l'identification des micro-organismes.

Concernant la contamination microbiologique, les solutions de clonidine analysées sont conformes à la PE. Le nombre de germes présents est inférieur aux limites acceptées et aucun n'est pathogène. Le maintien de la contamination microbiologique de la formulation, dans nos conditions opératoires, est démontré au bout de 75 jours. Au vu de ces résultats, les conditions de contamination environnementale et les contaminations des matières premières pour la fabrication de la solution de clonidine sont acceptables. Il est important de noter que selon la PE, la qualité microbiologique des MPUP se doit d'être maîtrisée (31).

V CONCLUSION

Ce travail a permis de développer une solution de clonidine à 10 µg/mL, adaptée à l'usage pédiatrique, et de mettre au point une méthode de dosage indicatrice de stabilité pour le dosage du principe actif dans une préparation pharmaceutique.

Selon les résultats préliminaires, cette solution est stable au moins 3 mois, stockée entre +2°C et +8°C. L'étude de stabilité physico-chimique doit être poursuivie.

Pour la première fois au CHRU de Lille, l'étude de la contamination microbiologique d'une préparation non stérile a été réalisée. Les données microbiologiques de la solution sont satisfaisantes au regard des recommandations actuelles.

Dorénavant, l'intérêt clinique de cette solution se doit maintenant d'être évalué en prémédication anesthésique chez l'enfant. Pour cela il est nécessaire de mettre en place un essai clinique de phase II, de manière à obtenir des données pharmacocinétiques, de tolérance et d'acceptabilité, à poursuivre par un essai clinique de phase III, de manière à établir l'efficacité.

La place de la clonidine orale se doit alors d'être comparée à un ou plusieurs bras, en prenant en compte d'autres stratégies de référence (placebo ou midazolam) et/ou d'autres voies d'administration (voie nasale).

VI BIBLIOGRAPHIE

1. Pandolfini C, Bonati M. A literature review on off-label drug use in children. *Eur J Pediatr.* 24 mai 2005;164(9):552-8.
2. Joret-Descout P, Bataille J, Brion F, Bourdon O, Hartmann J-F, Prot-Labarthe S. Attitudes et expériences des médecins face à la prescription hors autorisation de mise sur le marché dans un hôpital pédiatrique français. *Ann Pharm Fr.* mai 2016;74(3):222-31.
3. Parlement Européen. REGLEMENT (CE) N° 1901/2006 DU PARLEMENT EUROPÉEN ET DU CONSEIL du 12 décembre 2006 relatif aux médicaments à usage pédiatrique, modifiant le règlement (CEE) n° 1768/92, les directives 2001/20/CE et 2001/83/CE ainsi que le règlement (CE) n° 726/2004. 2006.
4. Aulois-Griot M. La mise sur le marché des médicaments à usage pédiatrique dans l'Union européenne et en France : entre incitations et obligations pour l'industrie pharmaceutique. *Médecine Droit.* juill 2008;2008(91):114-20.
5. Carvalho M, Taylor K, Tuleu C. Why do we need hospital pharmacy preparation? *Eur J Hosp Pharm.* 2012;19(5):467-8.
6. May DE, Kratochvil PCJ. Attention-Deficit Hyperactivity Disorder. *Drugs.* 17 sept 2012;70(1):15-40.
7. Kollins SH, Jain R, Brams M, Segal S, Findling RL, Wigal SB, et al. Clonidine Extended-Release Tablets as Add-on Therapy to Psychostimulants in Children and Adolescents With ADHD. *Pediatrics.* 1 juin 2011;127(6):e1406-13.
8. Briars L, Todd T. A Review of Pharmacological Management of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *J Pediatr Pharmacol Ther JPPT.* 2016;21(3):192-206.
9. The ESSTS Guidelines Group, Roessner V, Plessen KJ, Rothenberger A, Ludolph AG, Rizzo R, et al. European clinical guidelines for Tourette syndrome and other tic disorders. Part II: pharmacological treatment. *Eur Child Adolesc Psychiatry.* avr 2011;20(4):173-96.
10. Rickards H, Cavanna AE, Worrall R. Treatment practices in Tourette syndrome: The European perspective. *Eur J Paediatr Neurol.* juill 2012;16(4):361-4.
11. Blackmer AB, Feinstein JA. Management of Sleep Disorders in Children With Neurodevelopmental Disorders: A Review. *Pharmacother J Hum Pharmacol Drug Ther.* 1 janv 2016;36(1):84-98.
12. Ming X, Gordon E, Kang N, Wagner GC. Use of clonidine in children with autism spectrum disorders. *Brain Dev.* août 2008;30(7):454-60.
13. Nguyen M, Tharani S, Rahmani M, Shapiro M. A Review of the Use of Clonidine as a Sleep Aid in the Child and Adolescent Population. *Clin Pediatr (Phila).* 1 mars 2014;53(3):211-6.
14. Streetz VN, Gildon BL, Thompson DF. Role of Clonidine in Neonatal Abstinence Syndrome: A Systematic Review. *Ann Pharmacother.* 1 avr 2016;50(4):301-10.

15. Osborn DA, Jeffery HE, Cole MJ. Sedatives for opiate withdrawal in newborn infants. In: The Cochrane Collaboration, Cochrane Database of Systematic Reviews [Internet]. 2010 [cité 11 août 2016]. Disponible sur: <http://doi.wiley.com/10.1002/14651858.CD002053.pub3>
16. Osborn DA, Jeffery HE, Cole MJ. Opiate treatment for opiate withdrawal in newborn infants. In: The Cochrane Collaboration, Cochrane Database of Systematic Reviews [Internet]. 2010 [cité 11 août 2016]. Disponible sur: <http://doi.wiley.com/10.1002/14651858.CD002059.pub3>
17. Bio LL, Siu A, Poon CY. Update on the pharmacologic management of neonatal abstinence syndrome. *J Perinatol.* nov 2011;31(11):692-701.
18. Kraft WK, Stover MW, Davis JM. Neonatal abstinence syndrome: Pharmacologic strategies for the mother and infant. *Semin Perinatol.* avr 2016;40(3):203-12.
19. Bergendahl H, Lönnqvist P-A, Eksborg S. Clonidine in paediatric anaesthesia: review of the literature and comparison with benzodiazepines for premedication. *Acta Anaesthesiol Scand.* 1 févr 2006;50(2):135-43.
20. Basker S, Singh G, Jacob R. Clonidine In Paediatrics – A Review. *Indian J Anaesth.* juin 2009;53(3):270-80.
21. Drummond-Lewis J, McIlvaine WB. The experiences of epidural administration of clonidine in pediatric postoperative pain management. *Semin Anesth Perioper Med Pain.* sept 2007;26(3):149-52.
22. SFAR. Anesthésie loco-régionale en pédiatrie. 2010.
23. AFSSAPS. Bonnes pratiques de préparation. 2007;
24. SFPC, GERPAC. Guide méthodologique des Etudes de Stabilité des Préparations. 2013
25. ICH. Stability testing of new drug substances and products Q1A(R2). 2003 févr
26. ICH. Evaluation for stability data Q1E. 2003 févr.
27. ICH. Validation of analytical procedures : text and methodology Q2(R1). 2005 nov.
28. Hubert P, Nguyen-Huu J-J, Boulanger B, Chapuzet E, Chiap P, Cohen N, et al. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures: A SFSTP proposal – Part II. *J Pharm Biomed Anal.* 21 sept 2007;45(1):70-81.
29. Hubert P, Nguyen-Huu J-J, Boulanger B, Chapuzet E, Cohen N, Compagnon P-A, et al. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures: A SFSTP proposal–Part III. *J Pharm Biomed Anal.* 21 sept 2007;45(1):82-96.
30. Polo AF, Poy MC, Bautista SC, Arenas MO, Salinas FC, Albert EH. Osmolality of oral liquid dosage forms to be administered to newborns in a hospital. *Farm Hosp.* 2007;31(5):311.
31. Pharmacopée Européenne 8.0. 5.1.4. Qualité microbiologique des préparations pharmaceutiques et des substances pour usage pharmaceutique non stériles.
32. Pharmacopée Européenne 8.0. 2.6.12. Contrôle microbiologique des produits non stériles: essais de dénombrement microbien.

33. Pharmacopée Européenne 8.0. 2.6.13. Contrôle microbiologique des produits non stériles: recherche de microorganismes spécifiés.
34. Rowe, Sheskey, Cook, Fenton. Potassium sorbate. In: Handbook of Pharmaceuticals excipients, 7th edition.
35. Naguy A. Clonidine Use in Psychiatry: Panacea or Panache. *Pharmacology*. 10 mai 2016;98(1-2):87-92.
36. Larsson P, Nordlinder A, Bergendahl HTG, Lönnqvist P-A, Eksborg S, Almenrader N, et al. Oral bioavailability of clonidine in children. *Pediatr Anesth*. 1 mars 2011;21(3):335-40.
37. Potts AL, Larsson P, Eksborg S, Warman G, Lönnqvist P-A, Anderson BJ. Clonidine disposition in children; a population analysis. *Pediatr Anesth*. oct 2007;17(10):924-33.
38. Arndts D, Doevendans J, Kirsten R, Heintz B. New aspects of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of clonidine in man. *Eur J Clin Pharmacol*. 1983;24(1):21-30.
39. Blackburn L, Almenrader N, Larsson P, Anderson BJ. Intranasal clonidine pharmacokinetics. *Pediatr Anesth*. 1 mars 2014;24(3):340-2.
40. Lönnqvist PA, Bergendahl HTG, Eksborg S. Pharmacokinetics of Clonidine after Rectal Administration in Children. *J Am Soc Anesthesiol*. 1 nov 1994;81(5):1097-101.
41. Almenrader N, Larsson P, Passariello M, Haiberger R, Pietropaoli P, Lönnqvist P-A, et al. Absorption pharmacokinetics of clonidine nasal drops in children. *Pediatr Anesth*. 1 mars 2009;19(3):257-61.
42. Clonidina « Pediamécum [Internet]. [cité 5 juill 2016]. Disponible sur: <http://pediamecum.es/clonidina/>
43. Clonidine Hydrochloride [Internet]. BNF for children. 2016 [cité 3 août 2016]. Disponible sur: <http://bnf.vidalhoptimal.fr/BNFc/PHP11564.html>
44. Mikawa K, Maekawa N, Nishina K, Takao Y, Yaku H, Obara H. Efficacy of Oral Clonidine Premedication in Children. *J Am Soc Anesthesiol*. 1 nov 1993;79(5):926-31.
45. Trevor S, Upadya M, Sinha C, Kaur M. A comparison of midazolam and clonidine as an oral premedication in pediatric patients. *Saudi J Anaesth*. 2012;6(1):8-11.
46. Jianping C, Shi X, Miao X, Xu J. Effects of premedication of midazolam or clonidine on perioperative anxiety and pain in children. *Biosci Trends*. 2009;3(3):115-8.
47. Almenrader N, Passariello M, Coccetti B, Haiberger R, Pietropaoli P. Premedication in children: a comparison of oral midazolam and oral clonidine. *Pediatr Anesth*. 1 déc 2007;17(12):1143-9.
48. Sahoo S, Kaur M, Tripathy HK, Kumar A, Kohli S, Nanda S. Comparative evaluation of midazolam and clonidine as pediatric oral premedication. *Anesth Essays Res*. 2013;7(2):221-7.
49. Fazi L, Jantzen EC, Rose JB, Kurth CD, Watcha MF. A comparison of oral clonidine and oral midazolam as preanesthetic medications in the pediatric tonsillectomy patient. *Anesth Analg*. 2001;92(1):56-61.

50. Tazeroualti N, Groote FD, Hert SD, Villé AD, Dierick A, Linden PV der. Oral clonidine vs midazolam in the prevention of sevoflurane-induced agitation in children. A prospective, randomized, controlled trial†. *Br J Anaesth.* 5 janv 2007;98(5):667-71.
51. Mitra S, Kazal S, Anand LK. Intranasal clonidine vs. midazolam as premedication in children: a randomized controlled trial. *Indian Pediatr.* 2014;51(2):113–118.
52. Almenrader N, Passariello M, Coccetti B, Haiberger R, Pietropaoli P. Steal-induction after clonidine premedication: a comparison of the oral and nasal route. *Pediatr Anesth.* 1 mars 2007;17(3):230-4.
53. Mukherjee S, Ray M, Ray A, Khanra M, Mandal PK, Pal R. Clonidine premedication for paediatric patients: a comparison of the oral and nasal route. *J Anaesth Clin Pharmacol.* 2010;26(3):319-22.
54. Bergendahl HTG, Lönnqvist PA, Eksborg S, Ruthström E, Nordenberg L, Zetterqvist H, et al. Clonidine vs. midazolam as premedication in children undergoing adenotonsillectomy: A prospective, randomized, controlled clinical trial. *Acta Anaesthesiol Scand.* 1 nov 2004;48(10):1292-300.
55. Pickard A, Davies P, Birnie K, Beringer R. Systematic review and meta-analysis of the effect of intraoperative α 2-adrenergic agonists on postoperative behaviour in children. *Br J Anaesth.* 6 janv 2014;112(6):982-90.
56. Dahmani S, Stany I, Brasher C, Lejeune C, Bruneau B, Wood C, et al. Pharmacological prevention of sevoflurane- and desflurane-related emergence agitation in children: a meta-analysis of published studies. *Br J Anaesth.* 1 févr 2010;104(2):216-23.
57. Constant I. Agitation and changes of Bispectral Index™ and electroencephalographic-derived variables during sevoflurane induction in children: clonidine premedication reduces agitation compared with midazolam. *Br J Anaesth.* 1 avr 2004;92(4):504-11.
58. Schmidt AP, Valinetti EA, Bandeira D, Bertacchi MF, Simões CM, Auler JOC. Effects of preanesthetic administration of midazolam, clonidine, or dexmedetomidine on postoperative pain and anxiety in children. *Pediatr Anesth.* 1 juill 2007;17(7):667-74.
59. Lambert P, Cyna AM, Knight N, Middleton P. Clonidine premedication for postoperative analgesia in children. In: *Cochrane Database of Systematic Reviews* [Internet]. 2014 [cité 8 nov 2015]. Disponible sur: <http://onlinelibrary.wiley.com/doc-distant.univ-lille2.fr/doi/10.1002/14651858.CD009633.pub2/abstract>
60. Larsson PG, Eksborg S, Lönnqvist P-A. Incidence of bradycardia at arrival to the operating room after oral or intravenous premedication with clonidine in children. Anderson B, éditeur. *Pediatr Anesth.* sept 2015;25(9):956-62.
61. Lönnqvist PA., Bergendahl H. Pharmacokinetics and haemodynamic response after an intravenous bolus injection of clonidine in children. *Pediatr Anesth.* 1 nov 1993;3(6):359-64.
62. Bergendahl HTG, Eksborg S, Lönnqvist PA. Low-dose intravenous clonidine in children: plasma concentrations and haemodynamic response. *Acta Anaesthesiol Scand.* 1 mars 1997;41(3):381-4.
63. Le Corre P. Administration intranasale des médicaments pour une action systémique. *Lett Pharmacol.* nov 2001;15(9):167-74.

64. Sam T, Ernest TB, Walsh J, Williams JL. A benefit/risk approach towards selecting appropriate pharmaceutical dosage forms – An application for paediatric dosage form selection. *Int J Pharm.* 5 oct 2012;435(2):115-23.
65. Development of paediatric medicines: points to consider in formulation. World Health organisation; 2012. (WHO Technical Report Series). Report No.: 970.
66. EMA: Committee for medicinal products for human use (CHMP). Reflection paper: formulations of choice for the paediatric population. 28 juill 2006;
67. White R, Bradnam V. Handbook of drug administration via enteral feeding tubes. 2015.
68. Pharmacopée Européenne 8.0. Clonidine (Chlorhydrate de) monographie.
69. Levinson ML, Johnson CE. Stability of an extemporaneously compounded clonidine hydrochloride oral liquid. *Am J Hosp Pharm.* janv 1992;49(1):122-5.
70. Ensom MHH, Décarie D. Stability of Extemporaneously Compounded Clonidine in Glass and Plastic Bottles and Plastic Syringes. *Can J Hosp Pharm.* 2014;67(4):308-10.
71. Ma C, Decarie D, Ensom MHH. Stability of clonidine suspension in oral plastic syringes. *Am J Health Syst Pharm.* 15 avr 2014;71(8):657-61.
72. de Goede AL, Boedhram RR, Eckhardt M, Hanff LM, Koch BCP, Vermaat CH, et al. Development and validation of a paediatric oral formulation of clonidine hydrochloride. *Int J Pharm.* 20 août 2012;433(1–2):119-20.
73. Bay M, Saint-Laurent C, Dupuis A. Les préparations buvables en pédiatrie. *Actual Pharm Hosp.* 1 mai 2011;7(26):20-4.
74. ANSM. Liste des excipients à effet notoire. 2009.
75. EMA: Committee for medicinal products for human use (CHMP). Draft reflection paper on the use of methyl- and propylparaben as excipients in human medicinal products for oral use for public consultation. 2013 avr
76. Médicaments et Parabènes - Point d'information - ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé [Internet]. [cité 16 sept 2016]. Disponible sur: <http://ansm.sante.fr/S-informer/Points-d-information-Points-d-information/Medicaments-et-Parabenes-Point-d-information>
77. EMA: Committee for medicinal products for human use (CHMP). Background review for the excipient propylene glycol.; 2014 nov
78. EMA: Committee for medicinal products for human use (CHMP). Questions and Answers on Benzoic acid and Benzoates in the context of the revision of the guideline on 'Excipients in the label and package leaflet of medicinal products for human use' (CPMP/463/00).; 2014 janv
79. Rowe, Sheskey, Cook, Fenton. Sorbic Acid. In: Handbook of Pharmaceuticals Excipients, 7th Edition.
80. Scheler S, Saupe S, Herre A, Fahr A. Preservation of liquid drug preparations for oral administration. *J Pharm Sci.* janv 2010;99(1):357-67.

81. Strickley RG, Iwata Q, Wu S, Dahl TC. Pediatric Drugs-A Review of Commercially Available Oral Formulations. *J Pharm Sci.* mai 2008;97(5):1731-74.
82. FDA. Inactive Ingredient Search for Approved Drug Products [Internet]. [cité 15 sept 2016]. Disponible sur: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/iig/getiigWEB.cfm>
83. Select Committee on GRAS Substances (SCOGS). GRAS Substances (SCOGS) Database - Opinion: Citric acid, Citrates [Internet]. [cité 15 sept 2016]. Disponible sur: <http://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/SCOGS/ucm260861.htm>
84. Walsh J, Cram A, Woertz K, Breikreutz J, Winzenburg G, Turner R, et al. Playing hide and seek with poorly tasting paediatric medicines: Do not forget the excipients. *Adv Drug Deliv Rev.* 30 juin 2014;73:14-33.
85. Nicklaus S, Boggio V, Issanchou S. Les perceptions gustatives chez l'enfant. *Arch Pédiatrie.* mai 2005;12(5):579-84.
86. Trissel L, Quanyin X, Hassenbusch S. Development of Clonidine Hydrochloride Injections for Epidural and Intrathecal Administration. *Int J Pharm Compd.* août 1997;1(4):274-7.
87. Quanyun X, Lien P, Trissel L. Physical and Chemical Stability of Low and High Concentrations of Morphine Sulfate with Clonidine Hydrochloride Packaged in Plastic Syringes. *Int J Pharm Compd.* févr 2002;6(1):66-9.
88. Satyanarayana PVV, Adilakshmi GV. Stability indicating isocratic RP-HPLC method development and validation for the simultaneous analysis of clonidine and chlorthalidone in pharmaceutical formulation. *Indo Am J Pharm Res.* 2015;5(10):3226-36.
89. Clonidine Hydrochloride 0.1mg/ml oral liquid. *Int J Pharm Compd.* 2007;11(1):71.

ANNEXE 1 : MÉTHODES CHROMATOGRAPHIQUES INDICATRICES DE STABILITÉ DE DOSAGE DE LA CLONIDINE : REVUE DE LA LITTÉRATURE

Source	Colonne	Phase stationnaire	Phase mobile	Température de la colonne (°C)	Débit (mL/min)	Longueur d'onde d'analyse (nm)	Volume d'injection (µL)	Gradient ou isocratique	Gamme	Etalon interne
(68)	150 x 3,0 mm	Colonne propylsilice	A: 4g de phosphate monopotassique + eau 1L pH=4 B: A+ ACN 25/75 v/v	40	1,5	210	5	isocratique		/
(69)	250 x 4,6 mm	trimethyl silice	Méthanol/ Tampon phosphate pH=7,9 65/35 v/v		1	254	15	isocratique	3-7 µg/mL	guanabenz acetate
(70)	150 x 4,6 mm pré-colonne : 20 x 3,9 mm	C18	ACN/ Ammonium formate 10 mM pH=10 33-55-33/67-45-67 v/v	25	1	205	75	gradient	1-2,8 µg/mL	Lidocaine
(71)	150 x 4,6 mm pré-colonne : 20 x 3,9 mm	C18	Méthanol/ Ammonium formate 10 mM pH=4,5		1	200	75	isocratique	1-3,5 µg/mL	Naloxone
(72)	150 x 4,6 mm	C18	ACN/ Acetate Ammonium (10mM pH=7,8 1M KOH) 45/55 v/v	40	1	230	10	isocratique	8-12 mg/L	/
(86)	150 x 4,6 mm	C8	500mL eau + 500mL Méthanol + 1,1g Sodium-1-octane sulfonate + 1 mL H ₃ PO ₄ pH=3		1	220	15	isocratique	2,5-150 µg/mL	/
(87)	250 x 4,6 mm	Spherisorb CN	ACN/ Tampon phosphate pH = 5,4 0,02M 50/50 v/v		0,8	216	10	isocratique	0,3-1,8 µg/mL	
(88)		C18	ACN/ Tampon phosphate pH=5,8 50/30/20 v/v		1	248		gradient		

ANNEXE 2 : CARACTÉRISTIQUES DES MILIEUX CITÉS EN MICROBIOLOGIE

- **Gélose au sang de cheval**

Milieu riche peu sélectif

- **Gélose BCP (violet)**

BCP : pourpre de bromocrésol

Milieu différentiel lactosé qui permet l'isolement des entérobactéries

Fermentation positive du lactose : coloration jaune de la bactérie

Fermentation négative du lactose : pas de coloration de la bactérie

- **Gélose Chapman (rouge-rosé)**

Milieu sélectif avec une teneur en chlorure de sodium élevée (sélection des bactéries halophiles) et présence de mannitol

Milieu sélectif des staphylocoques

Fermentation positive du mannitol : présence d'un halo jaune autour de la bactérie

- **Gélose Tergitol**

Recherche et dénombrement des coliformes.

Présence de lactose et de TTC (Triphenyl Tetrazolium Chloride)

Acidification du lactose : présence d'un halo jaune autour de la bactérie

Réduction du TTC :

- Faible : colonie jaune-orange
- Importante : colonie rouge

- **Gélose MacConkey**

Isolement des bacilles Gram négatif

Présence de sels biliaires et cristal violet qui inhibent la pousse des bactéries Gram +

Présence de lactose

Fermentation du lactose : colonie rouge

- **Gélose PCA (Plate Count Agar)**

Milieu non sélectif utilisé pour le dénombrement des bactéries aérobies.

Les substances nutritives (tryptone, extrait de levure, glucose) favorisent la croissance de la plupart des bactéries.

- **Bouillon de Mueller-Hinton**

Milieu liquide, riche, non sélectif permettant la culture et l'enrichissement de très nombreux micro-organismes.

- **Gélose de Sabouraud**

Milieu riche et antibiosé permettant l'isolement des levures et moisissures

ANNEXE 3 : UTILISATION DE LA CLONIDINE EN PRÉMÉDICATION ANESTHÉSIQUE EN PÉDIATRIE : REVUE DE LA LITTÉRATURE

Annexe 3A : Données sur l'efficacité (M= midazolam ; C=clonidine)

	Article	Molécules et voies comparées	Type d'étude	Patients inclus	Age	Type de chirurgie
(45)	Trevor et al 2012 <i>Saudi Journal of Anaesthesia</i>	<i>Per os</i> Midazolam (0,5 mg/kg) Clonidine (4µg/kg)	prospective randomisée double aveugle	60	2-12 ans	Non connu
(46)	Jianping et al 2009 <i>BioScience Trends</i>	<i>Per os</i> Midazolam (0,5mg/kg) Clonidine (4 µg/kg et 2µg/kg)	prospective randomisée double aveugle	45	2-8 ans	Dérivation ventriculoperitonéale
(47)	Almenrader et al 2007 <i>Pediatrics Anesthesia</i>	<i>Per os</i> Midazolam (0,5 mg/kg) Clonidine(4µg/kg)	prospective ouverte randomisée	64	1-6 ans	Chirurgie de l'hydrocèle, orchidopexie, herniorraphie inguinale
(48)	Sahoo et al 2013 <i>Anesthesia Essays and Researches</i>	<i>Per os</i> Midazolam (0,5 mg/kg) Clonidine (5µg/kg)	prospective randomisée observationnelle	60	2-10 ans	herniotomie, appendicectomie, urethroplastie
(49)	Fazi et al 2001 <i>Pediatrics Anesthesia</i>	<i>Per os</i> Midazolam (0,5 mg/kg) Clonidine (4µg/kg)	prospective double aveugle randomisée	134	4-12 ans	Amydalectomie +/- adenoïdectomie
(50)	Tazeroualti et al 2007 <i>British Journal of Anaesthesia</i>	<i>Per os</i> Midazolam (0,5mg/kg) Clonidine (4 µg/kg et 2µg/kg)	prospective randomisée double aveugle	68	1-6 ans	circoncision
(44)	Mikawa et al 1993 <i>Anesthesiology</i>	<i>Per os</i> Diazepam (0,4mg/kg) Clonidine (2 et 4µg/kg)	prospective randomisée double aveugle	105	4-12 ans	Chirurgie des paupières ou strabisme
(51)	Mitra et al 2013 <i>Indian Pediatrics</i>	Voie nasale Midazolam (0,3 mg/kg) Clonidine (4 µg/kg)	prospective double aveugle randomisée	60	1-10 ans	herniorraphie inguinale, chirurgie de l'hydrocèle, circoncision, chirurgie de l'œil
(52)	Almenrader et al 2007 <i>Pediatric Anesthesia</i>	Voies orale/nasale Clonidine 4µg/kg	prospective simple aveugle randomisée	40	1-6 ans	herniorraphie inguinale, chirurgie de l'hydrocèle, circoncision, orchidopexie
(53)	Mukherjee et al 2010 <i>J Anaesth Clin Pharmacol</i>	Clonidine <i>per os</i> (3 et 4µg/kg) Clonidine par voie nasale (3 et 4µg/kg)	prospective randomisée en aveugle	60	1-7 ans	herniotomie, appendicectomie, urethroplastie, orchidopexie
(58)	Schmidt et al 2007 <i>Pediatric Anesthesia</i>	Midazolam <i>per os</i> (0,5 mg/kg) Clonidine <i>per os</i> (4µg/kg) Dexmetomidine par voie nasale (1µg/kg)	prospective randomisée ouverte	60	7-12 ans	Exérèse de lésion cervicale, ganglion lymphatique, kyste pilodinal, herniorraphie, orchidopexie, circoncision, correction de fistule anale
(54)	Bergendahl et al 2004 <i>Acta Anesthesiol Scand</i>	Voie rectale Midazolam (300µg/kg) Clonidine (5µg/kg)	prospective en aveugle randomisée	104	1-11 ans	Adenoïdectomie et amydalectomie

	Molécules et voies comparées	Induction	Type d'anesthésie	Apparition de la sédation	Niveau de sédation	Anxiété pré-opératoire	Qualité de l'induction	Réveil
(45)	<i>Per os</i> Midazolam (0,5 mg/kg) Clonidine (4µg/kg)	Induction au masque	Non connu	/	C: 80% des patients sédatisés lors de la séparation avec les parents M: 30% des patients	Score d'anxiolyse plus élevé dans le groupe M comparé au groupe C (significatif)	/	/
(46)	<i>Per os</i> Midazolam (0,5mg/kg) Clonidine (4 µg/kg et 2µg/kg)	Non connu	Isoflurane	/	Score de sédation significativement plus élevé pour les deux groupes C (4µg/kg > 2µg/kg) par rapport au M	/	Le masque est plus facilement accepté dans les groupes C par rapport au M (significatif)	/
(47)	<i>Per os</i> Midazolam (0,5 mg/kg) Clonidine(4µg/kg)	Induction au masque	Sevoflurane	M: 30 min après administration C: 38,5 min après administration	Niveau de sédation significativement plus important dans le groupe C	/	Induction correcte: 86% des patients (M) et 83% (C)	Différence non significative (7% M vs 0% C) Tendance à l'agitation pour le groupe midazolam
(48)	<i>Per os</i> Midazolam (0,5 mg/kg) Clonidine (5µg/kg)	Non connu	Non connu	/	M: 100% des patients sont sédatisés à l'induction C: 66,67% des patients	C: 80% de patients anxieux M: 23% de patients anxieux	M: masque accepté facilement par 100% des patients C: 66% des patients	/
(49)	<i>Per os</i> Midazolam (0,5 mg/kg) Clonidine (4µg/kg)	Induction au masque	sevoflurane/ desflurane	/	/	Anxiolyse plus importante dans le groupe M	/	Emergence plus rapide dans le groupe C (7,2 min vs 8,7 min)
(50)	<i>Per os</i> Midazolam (0,5mg/kg) Clonidine (4 µg/kg et 2µg/kg)	Induction au masque	sevoflurane	/	/	/	M: Induction qualifiée de bonne dans 70% des cas C: 50% des cas (2µg/kg) et 30% (4µg/kg) (significatif)	C 4µg/kg: 25% de patients agités au réveil M: 60% de patients agités
(44)	<i>Per os</i> Diazepam (0,4mg/kg) Clonidine (2 et 4µg/kg)	Induction intraveineuse	halothane	/	Score de sédation significativement plus élevé pour le groupe Clonidine 4µg/kg comparé au diazepam	/	Pas de différence significative entre les groupes: C 4µg/kg (91%), 2µg/kg (74%) et diazepam (72%)	/
(51)	Voie nasale Midazolam (0,3 mg/kg) Clonidine (4 µg/kg)	Induction intraveineuse	sevoflurane	Délai de sédation (médiane): 10 minutes (M), 15 minutes (C) (significatif)	Score acceptable de sédation à 30 minutes: 100% (C), 83,4% (M), non significatif	Niveau d'anxiolyse acceptable dans les deux groupes (médiane: 10 minutes)	Acceptation du masque satisfaisant: 100% des enfants (C) et 80% (M) (significatif)	Réveil calme: 100% (C), 53,3% (M) (significatif)

(52)	Voies orale/nasale Clonidine 4µg/kg	Induction au masque	sevoflurane	Pas de différence significative entre les deux voies (38,3 min <i>per os</i> , 47,5 min voie nasale)	/	Apparition d'une anxiolyse: 21,8 min (voie orale) et 23,3 min (voie nasale) (non significatif)	Pas de différence significative dans l'acceptation du masque par l'enfant	Emergence excellente dans les deux groupes
(53)	Clonidine <i>per os</i> (3 et 4µg/kg) Clonidine par voie nasale (3 et 4µg/kg)	Induction au masque	sevoflurane	29,8 min et 21,6 min (voie nasale, 3 et 4 µg/kg) 47,1 min et 40,3 min (voie orale, 3 et 4 µg/kg), (significatif)	/	Score d'anxiolyse plus élevé dans les groupes "voie nasale" comparé aux groupes "voie orale" (significatif)	Bonne acceptation du masque (70-75% des enfants) dans tous les groupes à l'exception du groupe C <i>per os</i> 3µg/kg (40% des enfants)	Patients calmes dans tous les groupes
(58)	Midazolam <i>per os</i> (0,5 mg/kg) Clonidine <i>per os</i> (4µg/kg) Dexmetomidine par voie nasale (1µg/kg)	Induction intraveineuse	sevoflurane	/	Pas de différence significative entre les groupes	/	/	/
(54)	Voie rectale Midazolam (300µg/kg) Clonidine (5µg/kg)	Induction au masque	sevoflurane	/	Différence non significative entre les deux groupes	/	/	Patients < 5 ans: score d'agitation plus faible dans le groupe C Patients > 5 ans: pas de différence entre les deux groupes Durée de sédation plus longue pour le groupe C

Annexe 3B : Données sur la sécurité d'emploi

	Molécules et voies comparées	Douleur post-opératoire	Bradycardie, Hypotension	Nausées/ vomissements post-opératoires
(45)	<i>Per os</i> Midazolam (0,5 mg/kg) Clonidine (4µg/kg)	/	Tension artérielle systolique plus faible dans le groupe C (significatif) Pas d'épisodes de bradycardie et d'hypotension dans les deux groupes	/
(46)	<i>Per os</i> Midazolam (0,5mg/kg) Clonidine (4 µg/kg et 2µg/kg)	Taux de recours à un antalgique en post-opératoire plus élevé pour le groupe M (80% vs 20%)	Pas de différence significative entre les groupes	Pas de différence entre les groupes
(47)	<i>Per os</i> Midazolam (0,5 mg/kg) Clonidine(4µg/kg)	/	/	/
(48)	<i>Per os</i> Midazolam (0,5 mg/kg) Clonidine (5µg/kg)	Score significativement plus faible pour le groupe C (3,2 vs 6,13)	/	/
(49)	<i>Per os</i> Midazolam (0,5 mg/kg) Clonidine (4µg/kg)	Antalgique administré plus tôt dans le groupe C (13 min vs 28 min)	Tension artérielle moyenne plus faible dans le groupe clonidine (63 mmHg vs 69 mmHg) Pas d'épisodes de bradycardie et d'hypotension dans les deux groupes	Pas de différence entre les groupes
(50)	<i>Per os</i> Midazolam (0,5mg/kg) Clonidine (4 µg/kg et 2µg/kg)	Score significativement plus faible dans les groupes C 2 et 4µg/kg Le recours aux antalgiques est plus fréquent dans le groupe M	Pas de différence significative entre les groupes	/
(44)	<i>Per os</i> Diazepam (0,4mg/kg) Clonidine (2 et 4µg/kg)	/	Tension artérielle et fréquence cardiaque plus faibles dans les groupes C (aucun épisode d'hypotension ou de bradycardie)	/
(51)	Voie nasale Midazolam (0,3 mg/kg) Clonidine (4 µg/kg)	/	/	/
(52)	Voies orale/nasale Clonidine 4µg/kg	/	/	/
(53)	Clonidine <i>per os</i> (3 et 4µg/kg) Clonidine par voie nasale (3 et 4µg/kg)	/	Un patient a développé un épisode de bradycardie (voie nasale, 4µg/kg)	/
(58)	Midazolam <i>per os</i> (0,5 mg/kg) Clonidine <i>per os</i> (4µg/kg) Dexmedetomidine par voie nasale (1µg/kg)	Scores plus élevés pour le groupe M (significatif)	Tension artérielle moyenne et fréquence cardiaque plus faibles dans les groupes C et dexmedetomidine que dans le groupe M (significatif)	/
(54)	Voie rectale Midazolam (300µg/kg) Clonidine (5µg/kg)	Score significativement plus faible dans le groupe C	/	Pas de différence entre les groupes

Annexe 3C : Données sur la formulation et l'acceptabilité

	Molécules et voies comparées	Satisfaction des parents	Administration	Acceptation de l'administration	Goût
(45)	<i>Per os</i> Midazolam (0,5 mg/kg) Clonidine (4µg/kg)	/	M: 30 min avant induction, associé à de l'atropine (0,04mg/kg); solution injectable mélangée à du miel C: 90 minutes avant induction, associée à de l'atropine; comprimés de 100µg écrasés et mélangés à du miel Préparations faites à la pharmacie; volume fixe	/	/
(46)	<i>Per os</i> Midazolam (0,5mg/kg) Clonidine (4 µg/kg et 2µg/kg)	/	Administré 60 minutes avant induction Mélangé avec 5mL de sirop	/	/
(47)	<i>Per os</i> Midazolam (0,5 mg/kg) Clonidine(4µg/kg)	M : 83% des patients satisfaits C: 100% (significatif)	Mélange avec une solution d'ibuprofène à la posologie de 5mg/kg (Nureflex®)	Refus au moment de l'administration: 14%(M) vs 0% (C)	C présente un meilleur goût
(48)	<i>Per os</i> Midazolam (0,5 mg/kg) Clonidine (5µg/kg)	/	Administré 60 minutes avant induction Dilué dans 5 ml de miel à la pharmacie	C: 100% des enfants acceptent facilement la prise du médicament M: 23% (67% acceptent mais avec aversion).	/
(49)	<i>Per os</i> Midazolam (0,5 mg/kg) Clonidine (4µg/kg)	Prise en charge globale: 23% de parents non satisfaits (C) vs 21% (M) Expérience de l'enfant en pré-opératoire: 28% de parents non satisfaits (C) vs 17% (M)	Groupe A: C (60-90 minutes avant induction) + placebo (30 minutes avant induction) Groupe B: Placebo (60-90 minutes avant induction) + M (30 minutes avant induction) Volumes fixes, préparés à la pharmacie	/	/
(50)	<i>Per os</i> Midazolam (0,5mg/kg) Clonidine (4 µg/kg et 2µg/kg)	/	Administré 30 minutes avant induction Additionné à 3–5 ml de sirop	/	/
(44)	<i>Per os</i> Diazepam (0,4mg/kg) Clonidine (2 et 4µg/kg)	C 4µg/kg : 66% des parents satisfaits Autres groupes : 23%	Administré 105 minutes avant induction dans 0,15ml/kg de jus de pomme Associé à de l'atropine administrée 60 minutes avant induction	/	/
(51)	Voie nasale Midazolam (0,3 mg/kg) Clonidine (4 µg/kg)	/	Administration 30 minutes avant induction avec une seringue sans aiguille Instillation par 0,2mL dans les deux narines C: solution injectable 150µg/ml, associée à de l'atropine (20µg/ml) M: solution injectable Mezolam® 5mg/ml, associée à de l'atropine	C: 93,3% des enfants acceptent sans pleurer M: 13,3% (sensation de brûlure pour 28 enfants)	M: Goût amer retrouvé par 15 enfants

(52)	Voies orale/nasale Clonidine 4µg/kg	100% des parents satisfaits dans les deux groupes	Voie nasale: solution injectable pure (Catapresan® 150µg/ml) Voie orale: additionné à une solution d'ibuprofène (Nureflex® 20mg/ml)	Administrations par voie orale et nasale acceptées de manière similaire	Les enfants ont jugés le sirop meilleure que la solution nasale (65% vs 10%)
(53)	Clonidine <i>per os</i> (3 et 4µg/kg) Clonidine par voie nasale (3 et 4µg/kg)	Parents satisfaits dans tous les groupes	Administration 60 minutes avant induction Voie orale: solution injectable diluée dans 10mL d'eau Voie nasale: solution injectable pure	Administration par voie orale et nasale acceptée de manière similaire dans les 4 groupes	40-50% des enfants ont mentionné un goût déplaisant dans les 4 groupes
(58)	Midazolam <i>per os</i> (0,5 mg/kg) Clonidine <i>per os</i> (4µg/kg) Dexmetomidine par voie nasale (1µg/kg)	/	Administration avant induction: M (30 min), C (90 min), dexmetomidine (45 min)	/	/
(54)	Voie rectale Midazolam (300µg/kg) Clonidine (5µg/kg)	/	M ou C associé à de l'atropine (10µg/kg) Administré à l'aide d'une seringue et d'un cathéter	/	/

ANNEXE 4 : TABLEAU RÉCAPITULATIF DES FORMULATIONS ORALES LIQUIDES DE CLONIDINE

Source	Concentration	Forme	Formulation	Contenant	Stabilité	Goût
(69)	100 µg/mL	Suspension	- 30 comprimés de Clonidine 0,2 mg (Catapres, Boehringer) - 2 mL d'eau - Sirop simple qsp 60 ml	Flacon en verre ambré type 3	28 jours à 4°C	sucré avec un arrière goût
(70)	10 µg/mL	Suspension	- Clonidine 0,1 mg comprimés (Novopharm) - Oral Mix ou Oral Mix SF (Medisca)	- flacons en verre ambré - flacons en PET ambré - seringues orales 5 mL (Medisca, PreciseDose Dispenser System)	91 jours à 4°C ou 25°C	goût "cherry"
(71)	10 µg/mL	Suspension	- Clonidine 0,1 mg comprimés (Boehringer Ingelheim) - Orablend qsp 250 mL	Seringues de 5 mL contenant 3 mL de solution	91 jours à 4°C ou 25°C	/
(72)	50 µg/mL	Solution	- 0.2 g d'acide citrique monohydraté + 18.3 g de phosphate disodique dans 500 mL d'eau - 50 mg de chlorhydrate de clonidine - 200 mL sirop simple (contenant 630 mg de saccharose et 1 mg de methylparaben /g) - 10.6 g d'une solution de methylparaben 15% (m/v) - 500 mg essence de framboise. - Eau qsp 1L pH=5	Flacons PET ambrés 100mL	9 mois à température ambiante	acceptable avec une très légère amertume
(89)	100 µg/mL	Solution/ Suspension	- 10 mg de chlorhydrate de clonidine (poudre ou comprimé) - 2 mL d'eau purifiée - Sirop simple qsp 100 mL	A l'abri de la lumière	28 jours au réfrigérateur	/

ANNEXE 5 : FICHE D'INSTRUCTION : FABRICATION DE LA SOLUTION DE CLONIDINE À 10 µG/ML

Fiche d'instruction : Fabrication de solution de clonidine à 10 µg/mL

I. Formule

- *Solution mère de Clonidine à 1 mg/mL*

Matières premières	Quantité pour 50 mL de solution
Clonidine chlorhydrate	50 mg
Eau PPI	Qsp 50 mL

- *Solution fille de Clonidine à 10 µg/mL*

Matières premières	Quantité pour 1 L de solution
Solution de clonidine à 1 mg/mL	10 mL
Sorbate de potassium	3000 mg
Citrate de potassium	3460 mg
Acide citrique monohydraté	2000 mg
Saccharine sodique	260 mg
Eau PPI	Qsp 1 L

II. Matériel

Balance

Fiole jaugée de 50 mL, Ballon de 2 L, Eprouvette graduée, Bécher

Seringue graduée de 10 mL, filtre papier

Coiffe, masque, champ stérile et gants stériles

III. Fabrication

- ***Solution de Clonidine à 1 mg/mL***

Peser 50mg de chlorhydrate de clonidine.

L'introduire dans une fiole jaugée de 50 mL contenant un peu d'eau stérile et dissoudre par agitation.

Compléter à 50ml avec l'eau stérile et ajuster au trait de jauge.

Mélanger la fiole bouchée par plusieurs retournements.

Verser cette solution dans un bécher.

- ***Solution de Clonidine à 10 µg/mL***

Peser les excipients : acide citrique, citrate de potassium, sorbate de potassium, saccharine sodique.

Tarer un ballon de contenance supérieure à 1 L.

Introduire dans le ballon de 1 L contenant un peu d'eau stérile l'acide citrique et le citrate de potassium et dissoudre par agitation.

Ajouter environ 400 mL d'eau stérile dans le ballon.

Introduire le sorbate de potassium dans le ballon et dissoudre par agitation.

Introduire la saccharine sodique dans le ballon et dissoudre par agitation.

A l'aide d'une seringue, prélever 10 mL de la solution mère et l'introduire dans le ballon de 1 L. Agiter.

Compléter à 1kg avec l'eau stérile.

Agiter dans le ballon.

Filtrer éventuellement avec une compresse de gaze stérile.

Répartir 15 mL de solution dans des flacons ambrés de 30 mL à l'aide d'une éprouvette. Sur chaque flacon, insérer un adaptateur pour seringue orale puis fermer les flacons.

ANNEXE 6 : FICHE DE FABRICATION : SOLUTION DE CLONIDINE 10 µg/ML

Date de fabrication :		jeudi-16-juin-2016			
N° d'Ordonnanceur :		102188H			
PHARMACIE CENTRALE DU CHRU DE LILLE - SECTEUR PHARMACOTECHNIE					
Dénomination et forme :					
SOLUTION DE CLONIDINE					
10 µg/ml					
Quantité Théorique Fabriquée :		1000,00 ml			
Nom et signature Préparateur					
Résultats des contrôles		Heure debut = 15h10			
Date, signature labo contrôle		Heure de fin = 16h15			
Conditionnement : FLACON AMBRE DE 30ml					
Nbre d'unité : 67					
Péremption le 16/06/16					
Date et signature de la personne ayant conditionné :					
N° d'Accep. Contrôle	Per	Composants	Formule unitaire	Coef x	Quantité pour la fabrication
Solution mère de clonidine à 1mg/ml					
6955	4-janv.-19	CLONIDINE CHLORHYDRATE	50 mg	1	0,050 g
13KAP281	28-sept.-18	EAU STERILE QSP	50,00 ml	1	50,00 ml
Solution fille de clonidine à 10µg/ml					
7 193	1-janv.-19	CITRATE DE POTASSIUM	346,00 mg	10	3,46 g
7 100	31-mai-18	ACIDE CITRIQUE MONOHYDRATE	200,00 mg	10	2,00 g
6 927	1-nov.-17	SORBATE DE POTASSIUM	300,00 mg	10	3,00 g
1510096/A	1-avr.-19	SACCHARINE SODIQUE	26,00 mg	10	0,26 g
		SOLUTION MERE A 1 MG/ML	1,00 mL	10	10,00 mL
13KAP281	28-sept.-18	EAU STERILE QSP	100,00 mL	10	1000,00 mL
VISA PHARMACIEN FABRICATION			REMARQUES		

C.H.R.U DE LILLE - Institut de Pharmacie
Rue Philippe Marché 59037 Lille cedex Tel : 03.20.44.60.11

CLONIDINE

Solution orale 10 µg/ml - 15 ml
(Quantité de 150 µg de clonidine dans le volume total)

Lot:102188H Fab le: 16/06/2016

RESPECTER LES DOSES PRESCRITES
Uniquement sur ordonnance

Faculté des sciences pharmaceutiques et biologiques

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 – 59006 LILLE Cedex
Tél. 03.20.96.40.40 – Fax 03.20.95.90.09

DECISION D'AUTORISATION DE SOUTENANCE

Le Doyen de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques
Vu le Décret n° 2012-172 du 03 février 2012 modifié relatif aux études spécialisées du troisième cycle de Pharmacie
Vu la décision du Président de l'Université en date du 14 mai 2012 relative aux délégations de signature :

DECIDE

Article 1er : **Madame Camille VERLHAC**

Est autorisé(e) à soutenir son mémoire en vue de l'obtention du D.E.S. de PHARMACIE option PHARMACIE HOSPITALIERE – PRATIQUE ET RECHERCHE sur le sujet suivant :

DEVELOPPEMENT D'UNE SOLUTION ORALE PEDIATRIQUE DE CLONIDINE POUR LA PREMEDICATION ANESTHESIQUE EN PEDIATRIE

Article 2 : Ce mémoire peut tenir lieu de thèse en vue de l'obtention du Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie.

Article 3 : La soutenance aura lieu le **Vendredi 30 Septembre 2016 à 17h00 Amphi Curie**

Article 4 : Le jury est composé ainsi qu'il suit :

Président :

Monsieur le Professeur Bertrand DECAUDIN
Praticien Hospitalier, CHRU de Lille
Professeur des Universités, Faculté de Pharmacie de Lille

Assesseurs :

Monsieur le Professeur Jean Marc CHILLON
Praticien Hospitalier, CHU d'Amiens
Professeur des Universités, faculté de pharmacie d'Amiens

Monsieur Damien LANNOY
Maître de Conférences Praticien Hospitalier, Faculté de Pharmacie de Lille

Monsieur Pierre RICHART
Praticien Hospitalier, CHRU de Lille

Lille, le 14 juillet 2016
Le Doyen
B. CUNY

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 2015/2016.

Melle VERLHAC Camille

**DEVELOPPEMENT D'UNE SOLUTION ORALE PEDIATRIQUE DE CLONIDINE
POUR LA PREMEDICATION ANESTHESIQUE EN PEDIATRIE**

Mots-clés : clonidine, prémédication anesthésique, pédiatrie, formulation galénique

Résumé :

Le manque de médicaments destinés à l'usage chez l'enfant dans le cadre de l'AMM nécessite la réalisation par les pharmacies à usage intérieur (PUI) de préparations magistrales et hospitalières à visée pédiatrique. Le service d'anesthésie du CHRU de Lille souhaitant mettre en place un essai clinique multicentrique afin de connaître la place de la clonidine par voie orale dans la prémédication anesthésique chez l'enfant, la pharmacie du CHRU de Lille a mis au point une formulation orale de clonidine adaptée à l'enfant. Après réalisation d'une étude de faisabilité de la préparation, une solution orale de clonidine à 10 µg/mL et une méthode de dosage indicatrice de stabilité pour le dosage du principe actif ont été développées. Un lot de flacons a été préparé et ces derniers ont été stockés entre +2°C et +8°C et à une température de 25°C avec 60% d'humidité (conditions ICH). Selon les résultats préliminaires, cette solution est stable au moins 3 mois, stockée entre +2°C et +8°C. L'étude de la contamination microbiologique de cette préparation non stérile a également été réalisée. Les données microbiologiques de la solution sont satisfaisantes au regard de la monographie de la Pharmacopée en vigueur. L'intérêt clinique de cette solution se doit maintenant d'être évalué en prémédication anesthésique chez l'enfant à travers la mise en place d'un essai clinique de manière à obtenir des données pharmacocinétiques, de tolérance, d'acceptabilité et d'efficacité.

Membres du jury :

Président :

Pr Bertrand DECAUDIN, PU-PH, *Faculté de Pharmacie, Université Lille 2*

Assesseur(s) :

Pr Jean-Marc CHILLON, PU-PH, *Faculté de Pharmacie, Université Jules Verne-Picardie*

Damien LANNOY, MCU-PH, *Faculté de Pharmacie, Université Lille 2*

Pierre RICHART, PH, *Service d'anesthésie pédiatrique, Hôpital Jeanne de Flandre, CHRU de Lille*