

**MEMOIRE
POUR LE DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
DE PHARMACIE**

Soutenu publiquement le 22 Septembre 2017
Par Mme Julie HAYBRARD

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

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

**Impact du mode de stérilisation sur la formation des produits
de dégradation du glucose dans les solutions glucosées
injectables.**

Membres du jury :

Directeur de thèse : **M. le Professeur Pascal ODOU**
Pharmacien, Professeur des Universités – Praticien Hospitalier
Faculté de Pharmacie, Université de Lille 2
Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille

Président : **M. le Professeur Bertrand DÉCAUDIN**
Pharmacien, Professeur des Universités – Praticien Hospitalier
Faculté de Pharmacie, Université de Lille 2
Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille

Assesseurs : **M. le Docteur Frédéric MARÇON**
Pharmacien, Maîtres de Conférences – Praticien Hospitalier
Faculté de Pharmacie, Université de Picardie Jules Verne
Centre hospitalier Universitaire d'Amiens

M. le Docteur Sébastien NEUVILLE
Pharmacien, Praticien Hospitalier
Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille

**MEMOIRE
POUR LE DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
DE PHARMACIE**

Soutenu publiquement le 22 Septembre 2017
Par Mme Julie HAYBRARD

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

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

**Impact du mode de stérilisation sur la formation des produits de
dégradation du glucose dans les solutions glucosées injectables.**

Membres du jury :

Directeur de thèse : **M. le Professeur Pascal ODOU**
Pharmacien, Professeur des Universités – Praticien Hospitalier
Faculté de Pharmacie, Université de Lille 2
Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille

Président : **M. le Professeur Bertrand DÉCAUDIN**
Pharmacien, Professeur des Universités – Praticien Hospitalier
Faculté de Pharmacie, Université de Lille 2
Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille

Assesseurs : **M. le Docteur Frédéric MARÇON**
Pharmacien, Maître de Conférences – Praticien Hospitalier
Faculté de Pharmacie, Université de Picardie Jules Verne
Centre hospitalier Universitaire d'Amiens

M. le Docteur Sébastien NEUVILLE
Pharmacien, Praticien Hospitalier
Centre Hospitalier Régional Universitaire 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 BOULANGER
Professeur Frédéric LOBEZ
Professeur Murielle GARCIN
Professeur Annabelle DERAM
Professeur Muriel UBEDA SAILLARD
Monsieur Ghislain CORNILLON
Monsieur Pierre RAVAUX
Monsieur Larbi AIT-HENNANI
Madame Nathalie ETHUIN
Madame Ilona LEMAITRE

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 |
| M. | DECAUDIN | Bertrand | Pharmacie Galénique |
| M. | DEPREUX | Patrick | ICPAL |
| M. | DINE | Thierry | Pharmacie clinique |
| Mme | DUPONT-PRADO | Annabelle | Hématologie |
| M. | GRESSIER | Bernard | Pharmacologie |
| M. | LUYCKX | Michel | Pharmacie clinique |
| M. | ODOU | Pascal | Pharmacie Galénique |
| Mme | RENNEVILLE | Aline | Hématologie |
| M. | STAELS | Bart | Biologie Cellulaire |

Liste des Professeurs des Universités

| Civ. | NOM | Prénom | Laboratoire |
|------|--------------------|-----------------|---|
| M. | ALIOUAT | EI Moukhtar | Parasitologie |
| Mme | AZAROUAL | Nathalie | Physique |
| M. | BERTHELOT | Pascal | Onco et Neurochimie |
| M. | CAZIN | Jean-Louis | Pharmacologie – Pharmacie clinique |
| M. | CHAVATTE | Philippe | ICPAL |
| M. | COURTECUISSÉ | Régis | Sciences végétales et fongiques |
| M. | CUNY | Damien | Sciences végétales et fongiques |
| Mme | DELBAERE | Stéphanie | Physique |
| M. | DEPREZ | Benoît | Laboratoire de Médicaments et Molécules |
| Mme | DEPREZ | Rebecca | Laboratoire de Médicaments et Molécules |
| M. | DUPONT | Frédéric | Sciences végétales et fongiques |
| M. | DURIEZ | Patrick | Physiologie |
| M. | FOLIGNE | Benoît | Bactériologie |
| M. | GARÇON | Guillaume | Toxicologie |
| Mme | GAYOT | Anne | Pharmacotechnie Industrielle |
| M. | GOOSSENS | Jean François | Chimie Analytique |
| M. | HENNEBELLE | Thierry | Pharmacognosie |
| M. | LEMDANI | Mohamed | Biomathématiques |
| Mme | LESTAVEL | Sophie | Biologie Cellulaire |
| M. | LUC | Gerald | Physiologie |
| Mme | MELNYK | Patricia | Onco et Neurochimie |
| M. | MILLET | Régis | ICPAL |
| Mme | MUHR – TAILLEUX | Anne | Biochimie |
| Mme | PAUMELLE-LESTRELIN | Réjane | Biologie Cellulaire |
| Mme | PERROY | Anne Catherine | Législation |
| Mme | ROMOND | Marie Bénédicte | Bactériologie |
| Mme | SAHPAZ | Sevser | Pharmacognosie |
| M. | SERGHÉRAERT | Eric | Législation |
| Mme | SIEPMANN | Florence | Pharmacotechnie Industrielle |
| M. | SIEPMANN | Juergen | Pharmacotechnie Industrielle |
| M | TARTAR | André | Laboratoire de Médicaments et Molécules |
| M. | WILLAND | Nicolas | Laboratoire de Médicaments et Molécules |

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 | ALIOUAT | Cécile Marie | Parasitologie |
| 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. | BOSC | Damien | Laboratoire de Médicaments et Molécules |
| M. | BRIAND | Olivier | Biochimie |
| Mme | CACHERA | Claude | Biochimie |
| M. | CARNOY | Christophe | Immunologie |
| Mme | CARON | Sandrine | Biologie cellulaire |
| Mme | CHABÉ | Magali | Parasitologie |
| Mme | CHARTON | Julie | Laboratoire de Médicaments et Molécules |
| M | CHEVALIER | Dany | Toxicologie |
| M. | COCHELARD | Dominique | Biomathématiques |
| Mme | DANEL | Cécile | Chimie Analytique |
| Mme | DEMANCHE | Christine | Parasitologie |
| Mme | DEMARQUILLY | Catherine | Biomathématiques |
| Mme | DUMONT | Julie | Biologie cellulaire |
| Mme | DUTOUT-AGOURIDAS | Laurence | Onco et Neurochimie |
| M. | EL BAKALI | Jamal | Onco et Neurochimie |
| M. | FARCE | Amaury | ICPAL |
| Mme | FLIPO | Marion | Laboratoire de Médicaments et Molécules |
| Mme | FOULON | Catherine | Chimie Analytique |
| M. | FURMAN | Christophe | ICPAL |
| M. | GELEZ | Philippe | Biomathématiques |
| Mme | GENAY | Stéphanie | Pharmacie Galénique |
| M. | GERVOIS | Philippe | Biochimie |
| Mme | GOOSSENS | Laurence | ICPAL |
| Mme | GRAVE | Béatrice | Toxicologie |
| Mme | GROSS | Barbara | Biochimie |
| M. | HAMONIER | Julien | Biomathématiques |
| 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 | Onco et Neurochimie |
| Mme | LECOEUR | Marie | Chimie Analytique |
| Mme | LEHMANN | Hélène | Législation |
| Mme | LELEU-CHAVAIN | Natascha | ICPAL |
| Mme | LIPKA | Emmanuelle | Chimie Analytique |
| Mme | MARTIN | Françoise | Physiologie |

| | | | |
|-----|-------------|---------------|---|
| M. | MOREAU | Pierre Arthur | Sciences végétales et fongiques |
| Mme | MUSCHERT | Susanne | Pharmacotechnie industrielle |
| Mme | NIKASINOVIC | Lydia | Toxicologie |
| Mme | PINÇON | Claire | Biomathématiques |
| M. | PIVA | Frank | Biochimie |
| Mme | PLATEL | Anne | Toxicologie |
| M. | POURCET | Benoît | Biochimie |
| M. | RAVAUX | Pierre | Biomathématiques |
| Mme | RAVEZ | Séverine | Onco et Neurochimie |
| Mme | RIVIERE | Céline | Pharmacognosie |
| Mme | ROGER | Nadine | Immunologie |
| M. | ROUMY | Vincent | Pharmacognosie |
| Mme | SEBTI | Yasmine | Biochimie |
| Mme | SINGER | Elisabeth | Bactériologie |
| Mme | STANDAERT | Annie | Parasitologie |
| M. | TAGZIRT | Madjid | Hématologie |
| M. | VILLEMAGNE | Baptiste | Laboratoire de Médicaments et Molécules |
| M. | WELTI | Stéphane | Sciences végétales et fongiques |
| M. | YOUS | Saïd | Onco et Neurochimie |
| M. | ZITOUNI | Djamel | Biomathématiques |

Professeurs Agrégés

| Civ. | NOM | Prénom | Laboratoire |
|------|------------|---------|-------------|
| Mme | MAYES | Martine | Anglais |
| M. | MORGENROTH | Thomas | Législation |

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 |
|------|-----------|------------|----------------------------------|
| M. | BRICOTEAU | Didier | Biomathématiques |
| Mme | CUCCHI | Malgorzata | Biomathématiques |
| M. | FRIMAT | Bruno | Pharmacie Clinique |
| M. | GILLOT | François | Droit et Economie pharmaceutique |
| M. | MASCAUT | Daniel | Pharmacie Clinique |
| M. | ZANETTI | Sébastien | Biomathématiques |
| M. | BRICOTEAU | Didier | Biomathématiques |

AHU

| Civ. | NOM | Prénom | Laboratoire |
|------|---------|-----------|---------------------|
| Mme | DEKYNDT | Bérengère | Pharmacie Galénique |
| M. | PEREZ | Maxime | Pharmacie Galénique |

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>

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

REMERCIEMENTS

Monsieur le Professeur Bertrand Décaudin,

Je vous remercie de me faire l'honneur de présider ce jury de thèse.

Soyez assuré de ma reconnaissance et de mon profond respect.

Je vous remercie pour tous vos conseils et votre aide tout au long de mon internat, tant sur mon côté hospitalier que sur mon côté universitaire.

Monsieur le Docteur Frédéric Marçon,

Je vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail.

Soyez assuré de ma considération la plus grande.

Monsieur le Docteur Sébastien Neuville,

Vous me faites l'honneur d'accepter de juger ce travail.

Soyez assuré de ma reconnaissance et de mes sincères remerciements.

Monsieur le Professeur Pascal Odou,

Je vous remercie de m'avoir encadrée pour cette thèse. J'ai énormément appris à vos côtés et je vous en suis extrêmement reconnaissante. Je vous remercie aussi pour votre patience, pour les longues explications, pour votre écoute et votre soutien à mon égard tout au long de ma formation. Un jour la cinétique n'aura plus de secret pour moi.

Madame le Docteur Christine Barthélémy,

Je vous remercie d'avoir été un vrai soutien et une source de conseils. Un immense merci pour votre disponibilité, votre compréhension et vos relectures. Je vous remercie d'avoir toujours gardé votre porte ouverte pour nous.

Monsieur le Docteur Nicolas Simon,

Je vous remercie pour l'encadrement que vous m'avez apporté et pour les nombreuses relectures effectuées sur mes différents travaux. With so much support, I will certainly speak fluently english on day...

A Morgane et Maxime,

Mes très chers acolytes de laboratoire !! Je vous remercie pour tous les moments passés ensemble, les nombreuses conversations, votre soutien et surtout pour votre souci de mon bien-être permanent.

Au laboratoire de Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière

Stéphanie et Héloïse : Un immense merci pour les moments partagés ensemble, les nombreux cafés et surtout pour les fou-rires. Un grand merci pour le soutien que vous m'avez apporté pendant cet internat.

Nicole : Merci beaucoup de ta présence, de l'écoute et des conseils que tu as su m'apporter durant ces dernières années. Je pense que nous avons bien refait le monde ensemble.

Damien : Un immense merci d'avoir été mon Supporter !! C'est un réel plaisir de travailler avec vous.

Pauline : C'est l'aide que tu as pu m'apporter qui m'a permis de finir mes heures de manips !! Un grand merci.

Natacha : Un très grand merci pour ta bonne humeur, ton sourire et ta joie de vivre.

A mes co-internes, je vous remercie de m'avoir fait passer de supers moments à l'hôpital, votre soutien et votre bonne humeur.

A Chloé,

Je tenais à te remercier pour le semestre passé ensemble. Merci pour les conseils, les debriefs matinaux qui me manqueront. Merci du soutien que tu as su m'apporter. Tu as su me cerner et m'aider à surmonter les nombreuses les épreuves de cette dernière année.

A mes amis du Nord,

A Caroline, un immense merci pour tout, pour tous les moments passés, pour les concerts, le ski, les mojitos, les longues discussions. Merci de m'avoir épaulée pendant tout mon internat.

Anthony (à moitié), Elodie, Samy, Arnaud, Tiff, Julien, Emilie, Aurélien, Lois, Marion... Je ne vous remercierai jamais assez pour l'accueil chaleureux, pour les moments partagés, pour les soirées, pour les bières partagées. Le départ ne sera que plus difficile. Mais comme dit le dicton « quand on vient dans le Nord, on braie deux fois : quand on arrive et quand on repart ». Je pense que je ne ferai pas exception.

A mes amis du Rac,

Pauline, Luc, Roxanne, Mathieu, Anne-Laure, Anne-So, Alexis, Wolf.

Merci de m'avoir si chaleureusement accueillie et surtout, je vous remercie pour les belles amitiés qui sont nées de ses rencontres. Quand vous voulez pour une petite soirée de Noël. Je vous adore.

A mes amis de Lyon,

A Nicolas, Manu, Constance, Natha, Maud, Fiona, Fanny. Merci pour tout ce que nous avons partagé depuis plus de 20 ans. Merci d'être venus partagés pour quelques weekends, ma vie lilloise.

A mes parents,

Merci de votre soutien, de votre écoute, pour tout ce que vous faites pour moi. Je suis extrêmement fière d'être votre fille. Je vous remercie d'avoir toujours cru en moi. Je vous aime.

A ma famille

Bon Papa, Janine François et Valérie, Yves et Célia, et tous mes cousins. Merci pour le soutien, pour les discussions, les repas de famille de folie. Bref, vous êtes une famille en or. Je vous adore.

A ma sœur Aude, Louis et Théophile,

Merci pour les longues discussions, les fou-rires, le soutien (à n'importe quel moment de la journée), merci pour le coaching pré-partiels/concours. Merci de m'avoir accompagnée tout au long de mes études et de ma vie personnelle. Je vous remercie de la confiance que vous m'avez accordé.

A Marc-Antoine,

Je te remercie de tout l'amour que tu m'apportes au quotidien. Merci de ton soutien, de ta patience et de ta disponibilité. Merci de me faire vivre une si belle aventure.

Ce travail a fait l'objet :

- d'une publication internationale

« *Factors generating glucose degradation products in sterile glucose solutions for infusion: statistical relevance determination of their impacts* »

J. Haybrard, N. Simon, C. Danel, C. Pinçon, C. Barthélémy, F.J. Tessier, B. Décaudin, E. Boulanger, P. Odou

Scientific Reports – Référence SREP-17-12527B – Acceptée le 6 Septembre 2017

- d'une communication orale internationale

« *Degradation products in glucose infusion fluids: what factors influence?* »

J. Haybrard, N. Simon, C. Danel, F.J. Tessier, C. Barthélémy, B. Décaudin, E. Boulanger, P. Odou

International Symposium on Infusion Technologies – Lille – Novembre 2016

- d'une communication affichée

« *Stérilisation par la chaleur humide : impact sur la dégradation des solutions glucosées injectables* »

J. Haybrard, N. Simon, C. Danel, F.J. Tessier, C. Barthélémy, B. Décaudin, E. Boulanger, P. Odou

Hopipharm – Nancy – Mai 2017

TABLE DES MATIERES

| | |
|--|-----------|
| Liste des figures | 12 |
| Liste des tableaux..... | 14 |
| Liste des abréviations | 15 |
| I. Introduction générale | 16 |
| II. Les solutions glucosées en milieu hospitalier..... | 17 |
| 1. Utilisations thérapeutiques par voie intraveineuse | 18 |
| a. Hydratation..... | 18 |
| b. Véhicule d'administration | 18 |
| c. Source énergétique pour la nutrition parentérale..... | 19 |
| 2. Modes de stérilisation des médicaments injectables | 19 |
| a. Cadre règlementaire | 19 |
| b. Description de la technique couramment utilisée dans l'industrie | 20 |
| c. Conséquences de la stérilisation par la chaleur humide sur les solutions de glucose stérilisées | 23 |
| 3. Les produits de dégradations du glucose : revue de la littérature..... | 23 |
| a. Description des produits de dégradation du glucose | 23 |
| b. Facteurs connus pour influencer la formation des produits de dégradation | 25 |
| c. Toxicité des produits de dégradation du glucose..... | 25 |
| III. Objectifs du travail..... | 28 |
| IV. Matériels et méthodes | 29 |
| 1. Produits chimiques et consommables..... | 29 |
| a. Réactifs | 29 |
| b. Solvants | 30 |
| c. Matériels..... | 30 |
| 2. Méthode de dosage..... | 30 |
| a. Description de la méthode d'analyse par CLHP-UV | 30 |
| b. Préparation des solutions mères et filles | 31 |

| | | |
|-------------|---|-----------|
| c. | Validation de la méthode analytique | 32 |
| 3. | Méthodes de stérilisation..... | 34 |
| a. | Méthodologie de l'étude | 34 |
| b. | Matériels | 35 |
| i. | Filtration stérilisante..... | 35 |
| ii. | Autoclavage | 35 |
| c. | Préparation des solutions de glucose à 5, 10, 30 et 50% | 36 |
| d. | Analyse de l'impact des paramètres de la stérilisation sur la formation des PDG | 37 |
| V. | Résultats..... | 38 |
| 1. | Méthode de dosage..... | 38 |
| a. | Description des résultats..... | 38 |
| b. | Paramètres de validation | 38 |
| 2. | Etude de l'effet de la stérilisation..... | 41 |
| a. | Description des résultats..... | 41 |
| b. | Analyse des résultats : détermination des paramètres influençant la formation des produits de dégradation du glucose..... | 46 |
| c. | Détermination du modèle mathématique de la stérilisation | 50 |
| VI. | Discussion..... | 54 |
| VII. | Conclusions et perspectives | 59 |
| | BIBLIOGRAPHIE | 60 |

LISTE DES FIGURES

| | |
|---|----|
| Figure 1 : Autoclave de paillasse, VAPOUR-Line® (VWR, Radnor, Pennsylvanie, Etats-Unis)..... | 22 |
| Figure 2 : Description des différentes phases se déroulant lors d'un cycle de stérilisation par la chaleur humide ^[7] | 23 |
| Figure 3 : Schéma de la dégradation du glucose dans des conditions de stockage à hautes températures ^[11,20] ou de stérilisation ^[16] | 24 |
| Figure 4 : Réaction de Maillard conduisant à la formation des AGE (<i>Advanced Glycation End product</i>) après fixation d'un sucre, comme le glucose, sur une fonction amine libre -NH ₂ , d'après Wautier <i>et al.</i> ^[23] | 26 |
| Figure 5 : Protocole de validation de la gamme de dosage sur trois jours. | 32 |
| Figure 6 : Description des conditions opératoires de l'étude de stérilisation | 35 |
| Figure 7 : Chromatogramme d'une solution d'un mélange de 5-HMF à 9 912 nM et de 2-FA à 1 301 nM dans les conditions d'élution de la méthode de dosage. | 38 |
| Figure 8 : Représentation graphique de la justesse de la méthode de validation pour le 5-HMF (A) et pour le 2-FA (B). La courbe en pointillé rouge représente la droite de régression linéaire de référence. | 40 |
| Figure 9 : Diagramme de recouvrement pour le 5-HMF (A) et pour le 2-FA (B). Les limites des biais sont fixées à ± 10% (droites en orange)..... | 41 |
| Figure 10 : Impact de la filtration stérilisante sur la formation du 5-HMF..... | 42 |
| Figure 11 : Impact de la durée du cycle de stérilisation C ₁ : 111°C – 30 min (F ₀ = 3), C ₂ : 111°C – 90 min (F ₀ = 9) et C ₃ : 111°C – 200 min (F ₀ = 20) en fonction des concentrations initiales en glucose sur la formation du 5-HMF (A) et du 2-FA (B). | 43 |
| Figure 12 : Impact de la température du cycle de stérilisation C ₁ : 111°C – 30 min (F ₀ = 3), C ₄ : 116°C – 30 min (F ₀ = 9,5) et C ₇ : 121°C – 30 min (F ₀ = 30) en fonction des concentrations initiales en glucose sur la formation du 5-HMF (A) et du 2-FA (B). | 44 |
| Figure 13 : Comparaison des cycles de stérilisation à F ₀ = 20 (C ₃ : 111°C – 200 min et C ₆ : 121°C – 20 min) et à F ₀ = 9 (C ₂ : 111°C – 90 min et C ₅ : 121°C – 9 min) en fonction des concentrations initiales en glucose sur la formation du 5-HMF (A) et du 2-FA (B). | 45 |

| | |
|--|----|
| Figure 14 : Impact du F_0 par comparaison des cycles C_1 : 111°C – 30 min ($F_0 = 3$), C_6 : 121°C – 20 min ($F_0 = 20$) et C_8 : 134°C – 3 min ($F_0 = 60$) en fonction des concentrations initiales en glucose sur la formation du 5-HMF (A) et du 2-FA (B).... | 46 |
| Figure 15 : Modèle de prédiction pour la formation du 5-HMF (A) et du 2-FA (B). Relation linéaire entre $\ln(\text{vitesse de formation du PDG})$ et la prédiction du $\ln(\text{vitesse de formation du PDG})$. Les droites encadrant les dosages sont les intervalles de confiance à 95%. | 47 |
| Figure 16 : Schéma de la formation des PDG | 51 |
| Figure 17 : Schéma expliquant la cinétique de dégradation du glucose. G, H et FA sont respectivement le glucose, le 5-HMF et le 2-FA. $[G_0]$, $[H_0]$ et $[FA_0]$ sont les concentrations initiales en glucose, 5-HMF et 2-FA. k_H et k_{FA} sont les constantes de vitesse de formation de 5-HMF et du 2-FA respectivement. | 51 |

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|--|----|
| Tableau 1 : Résumés des caractéristiques du glucose et des PDG. MM : masse molaire. | 29 |
| Tableau 2 : Concentrations des PDG dans les solutions filles utilisées lors de la validation de la méthode de dosage (en nmol/L)..... | 32 |
| Tableau 3 : Préparation des solutions glucosées | 36 |
| Tableau 4 : Paramètre β_2 de chaque série pour le 5-HMF et le 2-FA ainsi que la moyenne de ce paramètre (moyenne \pm écart-type). Résultats du test de Student ($\alpha = 0,05$; 5 DDL). Différence : entre la moyenne des β_2 et 0. | 39 |
| Tableau 5 : Paramètres de régression de la méthode de validation pour le 5-HMF et le 2-FA. Les paramètres donnés sont : β_1 (la pente de la droite), α (l'ordonnée à l'origine) et r^2 (le coefficient de détermination). Les limites de détection (LDD) et de quantification (LDQ) sont exprimées en nM. | 40 |
| Tableau 6 : Descriptifs des paramètres influençant la stérilisation. (t : valeur réelle de Student) pour le 5-HMF. | 47 |
| Tableau 7 : Descriptifs des paramètres influençant la stérilisation. (t : valeur réelle de Student) pour le 2-FA. | 48 |
| Tableau 8 : Constantes de vitesse de stérilisation en min^{-1} pour le 5-HMF (k_H) et pour le 2-FA (k_{FA}). T_s , la température du cycle de stérilisation ; F_0 , l'effet stérilisant. | 49 |

LISTE DES ANNEXES

| | |
|--|----|
| Annexe 1 : Résultats de l'impact de la stérilisation sur les concentrations initiales en 5-HMF (H_0) et en 2-FA (FA_0). G_0 , concentration initiale en glucose, H concentration en 5-HMF et V_H , la vitesse de formation du 5-HMF. FA, concentration en 2-FA et V_{FA} , la vitesse de formation du 2-FA. Les concentrations sont exprimées en μM pour le glucose et en nM pour le 5-HMF et le 2-FA et les vitesses en nM/min..... | 64 |
| Annexe 2a : Représentation graphique de l'impact de la stérilisation sur les concentrations initiales en 5-HMF (H_0) en fonction des conditions de stérilisation. Les concentrations sont exprimées en nmol/L. | 66 |
| Annexe 2b : Représentation graphique de l'impact de la stérilisation sur les concentrations initiales en 2-FA (FA_0) en fonction des conditions de stérilisation. Les concentrations sont exprimées en nmol/L. | 67 |

LISTE DES ABREVIATIONS

2-FA : 2-furaldéhyde

3-DG : 3-déoxyglucosone

3,4-DGE : 3,4-didéoxyglucosone-3-ène

5-HMF : 5-hydroxymethylfurfural

AGE : Advanced Glycation End product

BPF : Bonnes Pratiques de Fabrication

CLHP : Chromatographie Liquide Haute performance

DP : Dialyse Péritonéale

F_0 : Effet stérilisant

F_{cal} : Valeur statistique calculée du test de Fischer

$F_{\text{théo}}$: Valeur statistique théorique du test de Fischer

ICH : Conférence Internationale d'Harmonisation des exigences techniques pour l'enregistrement des médicaments à usage humain

IV : Intraveineuse

LDD : Limite de Détection

LDQ : Limite de Quantification

NAS : Niveau d'Assurance de Stérilité

PDG : Produit de Dégradation du Glucose

PP : polypropylène

PUI : Pharmacie à Usage Intérieur

PVC : Polychlorure de Vinyle

SF : Solution Fille

SFSTP : Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques

SGI : Solution Glucosée Injectable

SM : Solution Mère

UV : Ultraviolet

I. INTRODUCTION GENERALE

Les solutions glucosées injectables sont couramment utilisées à l'hôpital et sont considérées comme des solutions sûres, peu onéreuses et exemptes de danger. Elles sont donc utilisées comme solution d'hydratation, comme diluant pour les médicaments injectables ou comme agent osmotique dans les solutions de dialyse péritonéale (DP). Elles entrent aussi dans la composition de la nutrition entérale et parentale. En fonction de leurs indications, différentes concentrations de glucose, variant de 2,5 à 70 g/100mL sont commercialisées.

Toutes ces solutions sont destinées à être injectées par voie intraveineuse, ce qui impose une stérilité des solutions. La méthode de stérilisation recommandée par la Pharmacopée Européenne est la stérilisation par la chaleur humide en autoclave^[1]. Cette technique est une combinaison de hautes températures, pressions et temps. Les hautes températures, notamment utilisées lors de la stérilisation, sont connues pour être promotrices de produits de dégradation du glucose (PDG). De nombreux PDG ont été identifiés dans les solutions de DP, tels que le 3-déoxyglucosone (3-DG), le 3,4-didéoxyglucosone-3-ène (3,4-DGE), le glyoxal, le méthylglyoxal, 5-hydroxyméthylfurfural (5-HMF), 2-furaldéhyde (2-FA), formaldéhyde et le acétaldéhyde. Il a été précédemment démontré que ces PDG avaient un impact notamment sur l'homéostasie cellulaire, l'inflammation, sur le système cardiovasculaire et rénal.

Peu de données sont aujourd'hui disponibles sur les quantités en PDG dans les solutions glucosées injectables, mais il semble nécessaire d'en connaître les quantités puisque ces solutions sont utilisées massivement au sein des hôpitaux.

L'objectif de ce travail est, dans un premier temps, de mettre au point une méthode de dosage de deux PDG, choisis pour leurs propriétés chromophores, le 5-HMF et le 2-FA. Le 5-HMF est considéré comme un bon marqueur de la dégradation et le 2-FA, le produit final d'une seconde voie de dégradation. Dans un deuxième temps, l'impact des conditions de stérilisation sur la formation des PDG sera analysé ; puis dans un troisième temps, un modèle cinétique de la formation des PDG en fonction des conditions de stérilisation sera proposé. Au regard de la toxicité démontrée de ces produits dans les solutions de dialyse péritonéale, il semble important d'inclure, lors des achats hospitaliers des solutions glucosées injectables, le critère de stérilisation des contenants afin de minimiser au maximum l'administration de PDG aux patients.

II. LES SOLUTIONS GLUCOSEES EN MILIEU HOSPITALIER

L'utilisation des solutions glucosées injectables (SGI) dans le milieu hospitalier est très répandue, notamment pour ses larges indications et son faible coût d'utilisation. Ces SGI sont commercialisées à des concentrations variant de 2,5 à 70g/100mL d'eau, communément écrit en %.

La Pharmacopée Européenne définit une préparation parentérale de la manière suivante : « *Les préparations parentérales sont des préparations stériles destinées à être injectées, perfusées ou implantées dans le corps humain ou animal. Les préparations parentérales peuvent nécessiter l'emploi d'excipients, par exemple pour assurer l'isotonie au sang, ajuster le pH, augmenter la solubilité, permettre la conservation de la (ou des) substance(s) active(s), assurer une action antimicrobienne* »^[2].

Lorsque l'administration s'effectue par voie intraveineuse (IV), il est donc important que la solution soit isotonique (pression osmotique identique) au plasma afin d'éviter :

- une plasmolyse, définie comme une sortie d'eau des cellules sanguines lorsque la solution est hypertonique, entraînant une rétractation des cellules,
- une hémolyse, définie comme une entrée d'eau dans les cellules sanguines lorsque la solution est hypotonique, entraînant la lyse des cellules.

La surveillance de constantes biologiques pendant le traitement devra être mise en place, par le biais notamment d'un ionogramme plasmatique, de la mesure de la glycémie, de la glycosurie, de la kaliémie...

La Pharmacopée Européenne définit plusieurs catégories de préparations parentérales, dont notamment ^[2] :

- « *les préparations injectables,*
- *les préparations pour perfusion,*
- *les préparations à diluer pour injection ou pour perfusions,*
- *les poudres pour injection ou pour perfusion. »*

Pour toute utilisation IV, et ce, quelle que soit la substance injectée, les solutions doivent être stériles, exemptes de pyrogènes et de particules visibles.

1. Utilisations thérapeutiques par voie intraveineuse

a. Hydratation

L'une des principales indications de ces SGI est l'utilisation comme solution d'hydratation^[3]. La déshydratation aiguë est dans 90% des cas due à des pertes d'eau d'origine digestive (diarrhée, vomissement).

L'objectif de l'hydratation est de restaurer une volémie normale. Elle se fait de façon progressive tout en surveillant le pouls, la diurèse et le poids (diagnostic d'œdème). Les SGI de basses concentrations trouvent leurs places dans la prise en charge de tous les types de déshydratations (intracellulaire et extracellulaire, peu sévère à sévère et en cas de choc) en association avec d'autres solutés (ex : Chlorure de sodium à 0,9%).

Les SGI sont aussi utilisées dans la prévention des déshydratations. Elles possèdent de nombreux avantages, notamment d'être isotoniques au sang (278 mosm/l) contrairement à l'eau pour préparation injectable. Elles permettent en plus un apport calorique rapide (1g = 4 Kcal), car le glucose est rapidement métabolisable, pour des patients nécessitant des restrictions sodiques (insuffisants rénaux, insuffisants cardiaques, hypoglycémie...). La posologie sera donc à adapter en fonction de l'indication, de l'état clinique du patient, de ses pathologies associées, de son poids et de son alimentation.

b. Véhicule d'administration

En fonction de la concentration nécessaire pour l'administration de la bonne dose d'un médicament injectable, des dilutions pourront être réalisées. Pour cela, les SGI peuvent être utilisées comme solvant de reconstitution ou de dilution^[4]. Après vérification de la compatibilité et de la stabilité entre le principe actif utilisé et la SGI, la reconstitution et/ou la dilution pourront être réalisées. Nous retrouvons par exemple dans la catégorie des médicaments injectables, des médicaments couramment utilisés en pratique clinique tels que des antihypertenseurs, des antalgiques mais également des

chimiothérapies anticancéreuses, des anti-infectieux ou encore des biothérapies (anticorps, biosimilaires).

c. Source énergétique pour la nutrition parentérale

Le glucose est un sucre simple, de formule chimique $C_6H_{12}O_6$ et de formule développée $CH_2OH-(CHOH)_4-COH$. Il est présent dans toutes les cellules vivantes et est indispensable au fonctionnement cellulaire (nutriment le plus important du catabolisme cellulaire). La glycémie qui est le taux de glucose dans le sang, est comprise entre 0,80 et 1,20 g/L.

Lorsque les apports alimentaires ne sont pas suffisants pour couvrir les besoins journaliers (ex : insuffisance intestinale), la mise en place d'une nutrition parentérale peut s'avérer nécessaire. Elle se compose d'une part de macronutriments, tels que les acides aminés et le glucose, seule source de glucides, et d'autre part de micronutriments tels que des minéraux et des vitamines.

2. Modes de stérilisation des médicaments injectables

a. Cadre réglementaire

Les SGI sont donc préparées selon des méthodes devant assurer une limpidité, une stérilité, une apyrogénicité, une isotonicité et un pH proche de la neutralité. Ces caractéristiques devront être maintenues sur l'ensemble de la période de conservation.

La stérilité est définie par la Pharmacopée Européenne^[1] comme « *l'absence de microorganismes viables* ». Afin d'assurer cette stérilité, la Pharmacopée Européenne spécifie une stérilisation terminale, chaque fois que cela est possible. La stérilisation terminale est une stérilisation du produit dans son conditionnement primaire. Il existe différentes méthodes de stérilisation terminale décrite dans Pharmacopée Européenne :

- La chaleur humide,
- La chaleur sèche,
- L'irradiation ionisante,
- Les gaz.

La stérilisation la plus couramment utilisée dans le milieu hospitalier est la stérilisation par la chaleur humide. La stérilisation par la chaleur sèche, dite Poupinel, n'est plus utilisée car elle n'empêche pas la sporulation bactérienne et détériore le matériel à cause de sa haute température (entre 160 et 180°C). Les stérilisations par irradiation ionisante et par les gaz sont réservées pour la stérilisation des dispositifs médicaux et ne sont pas appliquées à celle des médicaments.

Si la stérilisation terminale n'est pas utilisable, notamment pour des raisons de stabilité du médicament, la filtration stérilisante (filtre antibactérien de 0,22 µm) ou la réalisation d'une préparation aseptique est possible.

La stérilité est définie comme une probabilité d'avoir zéro micro-organisme viable dans la préparation. Pour quantifier cette probabilité, la Pharmacopée Européenne^[5] définit un seuil : le niveau d'assurance de la stérilité (NAS). « *Le NAS d'un procédé de stérilisation indique le degré d'assurance avec lequel une population d'articles est rendue stérile par le procédé considéré. Le NAS pour un procédé donné est exprimé comme la probabilité d'occurrence d'un article non stérile dans cette population. Un NAS de 10^{-6} , par exemple, correspond à une probabilité d'au plus 1 microorganisme viable pour 1×10^6 unités stérilisées du produit final* ». Le NAS attendu par ces procédés de stérilisation est d'au moins 10^{-6} .

b. Description de la technique couramment utilisée dans l'industrie

La technique la plus couramment utilisée dans l'industrie pour les SGI est la stérilisation par la chaleur humide sous pression, répondant aux recommandations de la Pharmacopée Européenne (stérilisation terminale)^[1]. Afin de minimiser la charge microbienne, il est important d'utiliser des composés avec un niveau faible de contamination microbienne et de suivre les Bonnes Pratiques de Fabrication – BPF

(système d'assurance qualité, personnel qualifié, locaux adaptés, équipements de production adéquats, surveillance de l'environnement, contrôle lors de la production...).

La stérilisation par la chaleur humide s'appuie sur trois paramètres à prendre en compte lors d'un cycle de stérilisation : la température du plateau (T), la durée du cycle (t) et la pression = vapeur saturée.

L'effet stérilisant est jugé par le F_0 , exprimant la létalité d'un procédé de stérilisation (en unité de temps). Elle permet de mesurer l'efficacité du procédé de stérilisation. La valeur stérilisatrice F_0 est définie comme la somme des effets stérilisants par unité de temps sur toute la durée de la phase déclarée comme stérilisante dans un cycle de stérilisation^[5,6]. La valeur du F_0 permet donc de comparer l'efficacité thermique de traitements différents en rapportant tout aux conditions de référence ($T = 121,1^\circ\text{C}$). Mais pour un même F_0 , plusieurs combinaisons de température, pression et temps sont possibles. Le F_0 se calcule comme suit :

$$F_0 = t * 10^{\frac{T-121}{10}}$$

Où t est la durée du cycle de stérilisation (en min) et T, la température de stérilisation (en °C).

Le principe de la stérilisation par la chaleur humide se base sur le fait que la plupart des micro-organismes se reproduisent entre -5°C et $+80^\circ\text{C}$, à l'état végétatif. La vapeur saturée entraîne des modifications de la perméabilité des membranes, l'hydrolyse partielle des chaînes peptidiques des micro-organismes. Elle se réalise à l'aide d'autoclaves (**figure 1**).



Figure 1 : Autoclave de paillasse, VAPOUR-Line® (VWR, Radnor, Pennsylvanie, Etats-Unis)

La **figure 2** décrit un cycle de stérilisation par la chaleur humide qui se déroule en 3 phases :

- Prétraitement : alternance de dépressions et d'injections de vapeur pour chasser l'air résiduel. Il se termine par une phase de vide.
- Plateau de stérilisation : injection de la vapeur pour obtenir la température et la pression désirées et maintien de la température et de la pression pendant la durée définie.
- Séchage et vide avant un retour à la pression atmosphérique : évacuation de la vapeur saturée et retour à la pression atmosphérique.

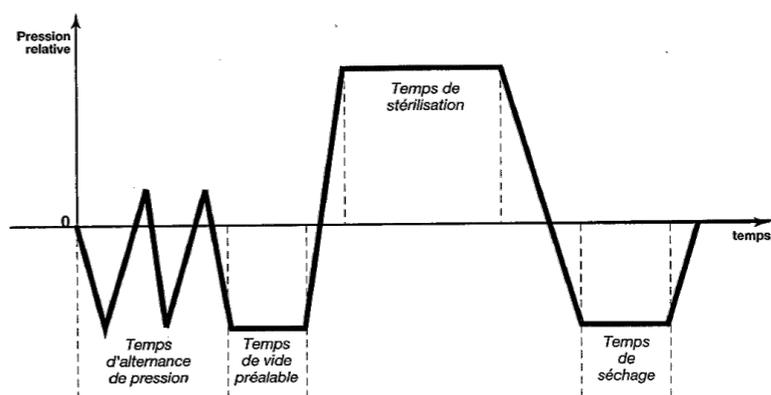


Figure 2 : Description des différentes phases se déroulant lors d'un cycle de stérilisation par la chaleur humide^[7]

Cette technique de stérilisation est une technique économique, rapide, simple, non polluante, non toxique, applicable à de nombreux produits et facile à contrôler.

c. Conséquences de la stérilisation par la chaleur humide sur les solutions de glucose stérilisées

La stérilisation par la chaleur est connue pour avoir un impact sur la dégradation du glucose^[3,8,9]. Effectivement, un grand nombre de produits de dégradation et/ou d'oxydation du glucose (PDG) est généré après exposition des solutions glucosées à la chaleur. Une étude ancienne portant sur l'impact de la température menée par Postaire *et al.* semble montrer que plus la température est importante et plus la génération des produits de dégradation est conséquente^[10].

3. Les produits de dégradations du glucose : revue de la littérature

a. Description des produits de dégradation du glucose

De nombreux PDG ont été précédemment identifiés dans les fluides de dialyse péritonéale (DP)^[11-13] et dans les SGI^[3,14]. Ceux identifiés actuellement sont le 3-déoxyglucosone (3-DG), le 3,4-didéoxyglucosone-3-ène (3,4-DGE), glyoxal (GO), le méthylglyoxal (MGO), le formaldéhyde (FO), le 5-hydroxyméthylfurfural (5-HMF), le 2-

furaldéhyde (2-FA) et l'acétaldéhyde. Ces PDG cités sont ceux connus à l'heure actuelle, cependant le nombre théorique de PDG serait très importants, comme le cite Linden *et al.*^[11].

Parmi les PDG cités précédemment, le 5-HMF et le 2-FA sont considérés comme des indicateurs importants de la dégradation du glucose^[11,14,15]. Ces deux PDG peuvent apparaître dans le processus de dégradation du glucose dans des conditions de stockage à haute température et selon Ulbricht *et al.*^[16] lors de la stérilisation. La **figure 3** décrit le schéma de la formation des PDG.

Les concentrations de ces produits de dégradation dans ces solutions glucosées varient entre 0,1 et 1000 µmol/L selon les PDG incriminés^[3,12,13,17]. Il a été également démontré que le PDG le plus bio-réactif était le 3,4-DGE, limitant de ce fait la biocompatibilité^[3,11,18,19] des solutions de DP et des SGI.

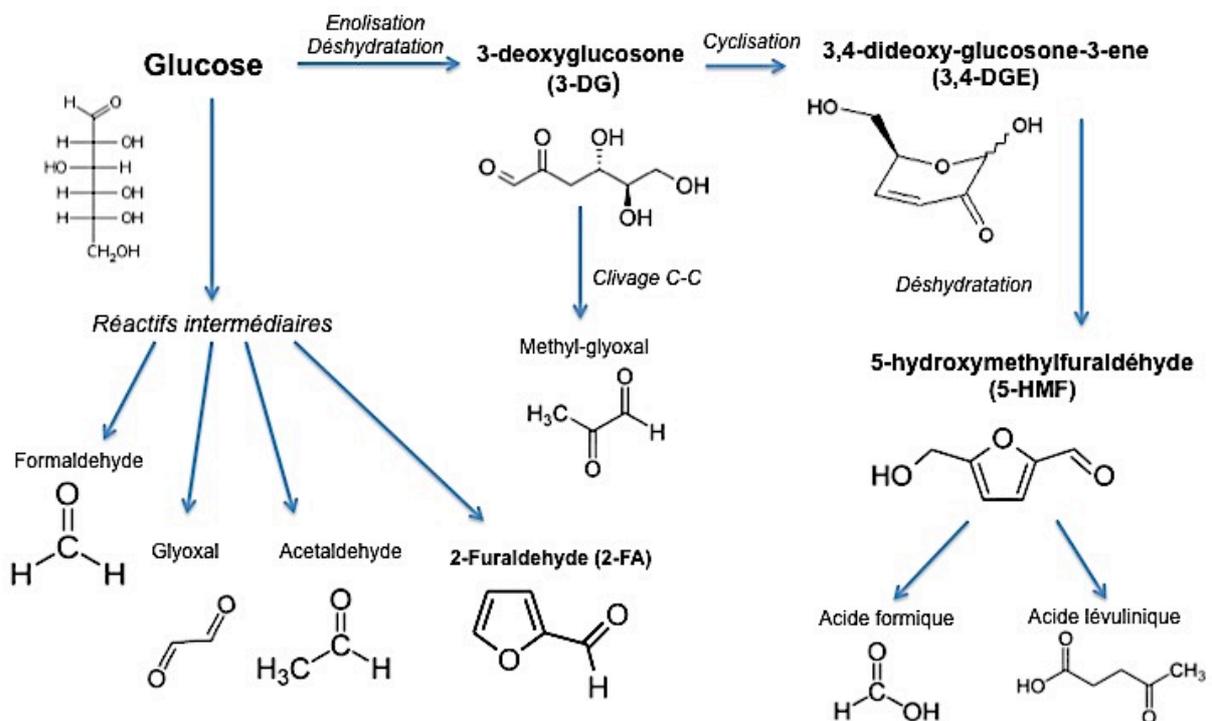


Figure 3 : Schéma de la dégradation du glucose dans des conditions de stockage à hautes températures^[11,20] ou de stérilisation^[16].

b. Facteurs connus pour influencer la formation des produits de dégradation

Certains facteurs ont été précédemment identifiés comme étant des facteurs influençant la dégradation du glucose dans les solutions glucosées : le processus de stérilisation^[6,10], les conditions de stockages^[9,11,20], la concentration initiale en glucose^[10] ou encore le pH de la solution^[13,21].

Des travaux effectués au sein du Laboratoire de Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière à la Faculté des Sciences Pharmaceutiques de Lille, ont démontré l'influence d'autres paramètres à l'aide d'une analyse de la covariance (travaux en cours de publication). A partir des solutions glucosées disponibles sur le marché français, différents facteurs ont été étudiés, tels que le laboratoire associé au processus de stérilisation, la quantité initiale en glucose, le temps écoulé depuis la fabrication, le type de matériaux des contenants (polychlorure de vinyle (PVC), polypropylène (PP), multicouches, verre...) ainsi que le coefficient de perméabilité à l'oxygène.

Cette étude met en évidence une relation linéaire entre le logarithme de la vitesse de la formation des PDG et le temps écoulé depuis la fabrication : plus le temps écoulé depuis la fabrication est long et plus la quantité des PDG présents dans la SGI est conséquente. Les autres facteurs influençant la formation de ces PDG sont, notamment la quantité initiale en glucose : plus la quantité est importante et plus la formation de PDG est importante. Les conditions de stérilisation ont un impact majeur sur la dégradation du glucose. En comparant les différents contenants, ceux limitant le plus la formation de PDG sont le verre et le PP et celui favorisant le plus la formation de PDG est le multicouches, composé d'une superposition de trois couches successives de matériaux plastiques : polypropylène/polyamide/polyéthylène.

c. Toxicité des produits de dégradation du glucose

Le glucose est connu pour être une substance promotrice de protéines glyquées. La glycation des protéines résulte de la fixation de la fonction aldéhyde d'un sucre réducteur sur des protéines, par leur fonction amine libre $-NH_2$, tels que des acides aminés (lysine ou arginine). C'est une réaction non-enzymatique, dite « réaction de

Maillard » et fut découverte par Louis Camille Maillard en 1912^[22]. Les produits issus de cette réaction, après un réarrangement moléculaire appelé « réarrangement d'Amadori » sont appelés AGE, pour *Advanced Glycation End product* (produits de glycation avancée). La **figure 4** décrit la réaction de Maillard à l'origine des AGE^[23].

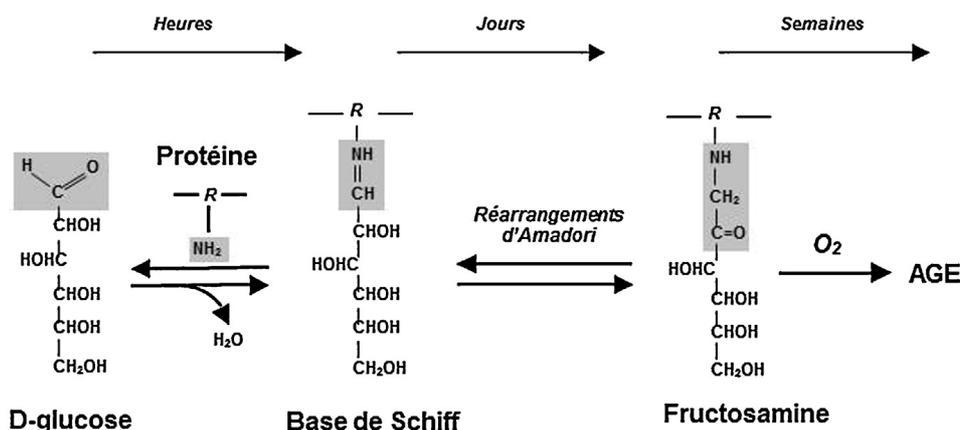


Figure 4 : Réaction de Maillard conduisant à la formation des AGE (*Advanced Glycation End product*) après fixation d'un sucre, comme le glucose, sur une fonction amine libre -NH₂, d'après Wautier *et al.*^[23].

Cette réaction, sensible à l'oxygène, se produit de manière spontanée dans la nature, *in vitro* ou dans l'organisme (i.e. l'hémoglobine glyquée). Elle se produit aussi dans l'alimentation, ce qui a pour conséquence, par exemple, la couleur brune de certains aliments tels que le pain^[24] après la cuisson.

Les PDG sont connus pour être des précurseurs d'AGE^[19,25]. Bien que l'on ne connaisse pas encore précisément les seuils de toxicité de ces produits, il a été montré que de hautes concentrations en PDG et en AGE avaient un impact sur l'homéostasie cellulaire^[3,18,26]. Effectivement, les AGE s'accumulent dans les organes, les tissus et interagissent, notamment avec le récepteur spécifique aux AGE (RAGE), entraînant de nombreuses réactions cellulaires de type pro-inflammatoire, pro-coagulante et pro-fibrosante qui sont néfastes pour les fonctions cellulaires^[27] entraînant un vieillissement cellulaire précoce.

Les AGE :

- sont notamment impliqués dans le stress oxydatif ^[3,28],
- ont un impact sur le système cardio-vasculaire ^[3,29] et sont associés à une augmentation de la morbidité cardiovasculaire ^[30],
- causent la dégradation de cellules mésothéliales et des caractéristiques de la membrane péritonéale ^[31,32],
- entraînent une altération de la fonction rénale ^[33] et notamment par des lésions rénales ^[3,12,34],
- ralentissent la cicatrisation des plaies ^[3],
- induisent l'apoptose des leucocytes et des cellules épithéliales rénales ^[35].

III. OBJECTIFS DU TRAVAIL

Peu de données sont disponibles sur l'impact des PDG présents dans les SGI^[3,10,14,15], notamment sur la toxicité intrinsèque lors d'une administration chronique^[16] et sur leur impact sur les médicaments dilués par des SGI (oxydation et glycosylation du principe actif)^[36,37].

Les travaux précédemment menés démontrent une hétérogénéité de l'exposition des patients aux PDG selon la SGI utilisées. Il semble nécessaire de limiter la formation de ces PDG à la vue de leur toxicité. La stérilisation est une étape importante dans le processus de fabrication des SGI, elle a un impact important sur la génération des PDG. Parmi les PDG cités précédemment, le 5-HMF et le 2-FA sont considérés comme des indicateurs importants de la dégradation du glucose^[14,15].

Ce travail a pour objectif de définir les conditions de stérilisation optimales afin de limiter la formation de PDG potentiellement toxiques pour les patients et d'inclure, lors des achats hospitaliers des solutions glucosées injectables par les pharmacies à usage intérieur (PUI), le critère des conditions de stérilisation des contenants afin de limiter au maximum l'administration de PDG aux patients.

Dans un premier temps, le travail porte sur l'identification et la quantification du 5-HMF et du 2-FA par une méthode de chromatographie liquide haute performance (CLHP) couplée à une détection dans l'ultraviolet (UV) et sur la validation de la méthode de dosage.

Puis, dans second temps, les paramètres influençant la dégradation du glucose lors de la stérilisation, facteur jouant un rôle important dans la formation des PDG, seront déterminés et l'étape de stérilisation lors de la fabrication des SGI sera optimisée. Un modèle cinétique sera proposé tenant compte de l'ensemble des paramètres influents.

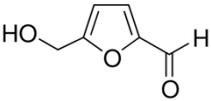
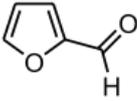
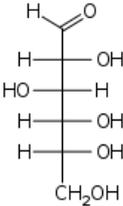
IV. MATERIELS ET METHODES

1. Produits chimiques et consommables

a. Réactifs

Les deux PDG étudiés, le 5-HMF, de pureté à 97% et le 2-FA, de pureté à 98% ainsi que le potassium dihydrogénophosphate proviennent tous trois de VWR International S.A.S (Fontenay-sous-Bois, France) et sont de qualité pour analyses. Le glucose utilisé pour la réalisation des solutions est un glucose anhydre obtenu chez Inresa (Bartenheim, France). Leurs caractéristiques sont résumées dans le **tableau 1**.

Tableau 1 : Résumés des caractéristiques du glucose et des PDG. MM : masse molaire.

| Nom | Identifiants | Formules moléculaires | |
|--|--------------------------|-----------------------|---|
| 5-HydroxyMethyl-2-Furaldehyde (5-HMF) | CAS : 67-47-0 | $C_6H_6O_3$ |  |
| | Lot : 10189124 | | |
| | Réf : 12475.06 | | |
| | MM : 126,11 g/mol | | |
| 2-Furaldehyde (2-FA) | CAS : 98-01-1 | $C_5H_4O_2$ |  |
| | Lot : N17B034 | | |
| | Réf : 16167.30 | | |
| | MM : 96,09 g/mol | | |
| Glucose | CAS : 50-99-7 | $C_6H_{12}O_6$ |  |
| | Lot : 15329001 | | |
| | Réf : 50997-1 | | |
| | MM : 180,16 g/mol | | |

b. Solvants

Le méthanol (HiPerSolv Chromanorm[®] gradient grade, VWR International S.A.S, Fontenay-sous-bois, France) est de qualité CLHP utilisé pour les analyses chromatographiques. L'acide acétique glacial 100% provient de VWR International S.A.S (Fontenay-sous-bois, France). De l'eau ultra-pure, utilisée pour la méthode et la réalisation des échantillons, a été obtenue chaque jour grâce au système UHQ pure water system (Elga, Wasquehal, France).

c. Matériels

La verrerie est de classe A (VWR International S.A.S, Fontenay-sous-Bois, France). Les pointes de micropipette (Eppendorf[®] lorention) et les microtubes de centrifugation proviennent d'Eppendorf[®] France S.A.S (Montesson, France). Les flacons en verre de 100 ml utilisés pour la stérilisation des solutions proviennent de chez VWR International S.A.S (Fontenay-sous-Bois, France). Ce sont des flacons verres autoclavables. Les couvercles sont des bouchons à vis, ND40 avec septums en polytétrafluoroéthylène obtenus chez VWR International S.A.S (Fontenay-sous-Bois, France).

2. Méthode de dosage

a. Description de la méthode d'analyse par CLHP-UV

Un système de chromatographie liquide haute performance (CLHP) couplé à une détection UV (Shimadzu[®], Japon) a été utilisé pour le dosage de PDG. Le système est composé d'une double pompe à solvant (SIL-20AD XR), d'un passeur automatique d'échantillons (SIL-20AC XR) équipé d'une boucle d'injection de 100 µL, d'un four (CTO-20AC) et d'un détecteur à barrette de diodes DAD (SPD-M20A). Le système est piloté par le logiciel Labsolution[®] de Shimadzu[®]. Le four a été utilisé à 25°C pour thermostatier la phase stationnaire qui est une colonne Alltech Apollo[™] C₁₈, 5µm, 150 x 4,6 mm I.D (Fisher Scientific, Illkirch, France).

La phase mobile est composée d'un mélange (10%/90% - v/v) de méthanol et de solution aqueuse de dihydrogénophosphate de potassium (0,011 mmol/L, soit 1,95 g pour 1 litre) ajustée à pH 2,95 par de l'acide acétique glacial. Le débit de la phase mobile est fixé à 2mL/min, en mode isocratique avec une durée d'analyse de 7 min. La longueur d'onde de détection et d'analyse des deux PDG a été fixée à 284 nm, conformément à la littérature^[17].

Des solutions pures de 5-HMF et de 2-FA ont été injectées seules afin de déterminer leur temps de rétention (T_R) respectif. La séparation chromatographique de ces deux composés se démontre par le facteur de résolution (R_s). Il se calcule automatiquement, en accord avec **l'équation (1)** par le logiciel LabSolution[®], utilisant la méthode des demi-hauteurs selon les standards de la Conférence Internationale d'Harmonisation des exigences techniques pour l'enregistrement des médicaments à usage humain (ICH)^[38]:

$$R_s = \frac{2 \times (t_{2-FA} - t_{5-HMF})}{1,7 \times (W_{0,5, 5-HMF} + W_{0,5, 2-FA})} \quad (\text{eq 1})$$

Où t_{5-HMF} et t_{2-FA} sont les T_R du 5-HMF et du 2-FA, respectivement et $W_{0,5, 5-HMF}$ et $W_{0,5, 2-FA}$ sont les largeurs maximales à mi-hauteur des pics respectifs.

Le R_s doit être supérieur à 1,5 pour considérer les deux produits correctement séparés.

b. Préparation des solutions mères et filles

Les gammes d'étalonnage des PDG ont été choisies en s'appuyant sur les données de la littérature et de tests préliminaires^[3,13]. Ces gammes ont été réalisées à partir de solutions mères (SM) de concentration 1 000 mg/L, soit 8 mmol/L (nM) et 10 000 mg/L, soit 104 mmol/L (nM) pour le 5-HMF et 2-FA, respectivement.

Des dilutions variables, solutions filles (SF) (**tableau 2**), ont été réalisées afin de constituer les points de gammes. Les gammes ont été réalisées six fois, à partir de trois SM différentes de chacun des PDG, sur trois jours selon les recommandations de la Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques (SFSTP)^[39,40] (**figure 5**). Chaque solution fille est analysée trois fois.

Tableau 2 : Concentrations des PDG dans les solutions filles utilisées lors de la validation de la méthode de dosage (en nmol/L).

| | SF1 | SF2 | SF3 | SF4 | SF5 | SF6 | SF7 | SF8 | SF9 | SF10 | SF11 | SF12 |
|--------|-----|-----|-----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
| 5- HMF | 198 | 396 | 793 | 1 189 | 1 586 | 3 965 | 4 956 | 5 947 | 6 938 | 7 930 | 9 912 | 15 859 |
| 2-FA | 52 | 104 | 520 | 650 | 781 | 911 | 1 041 | 1 301 | 2081 | 2 602 | X | X |

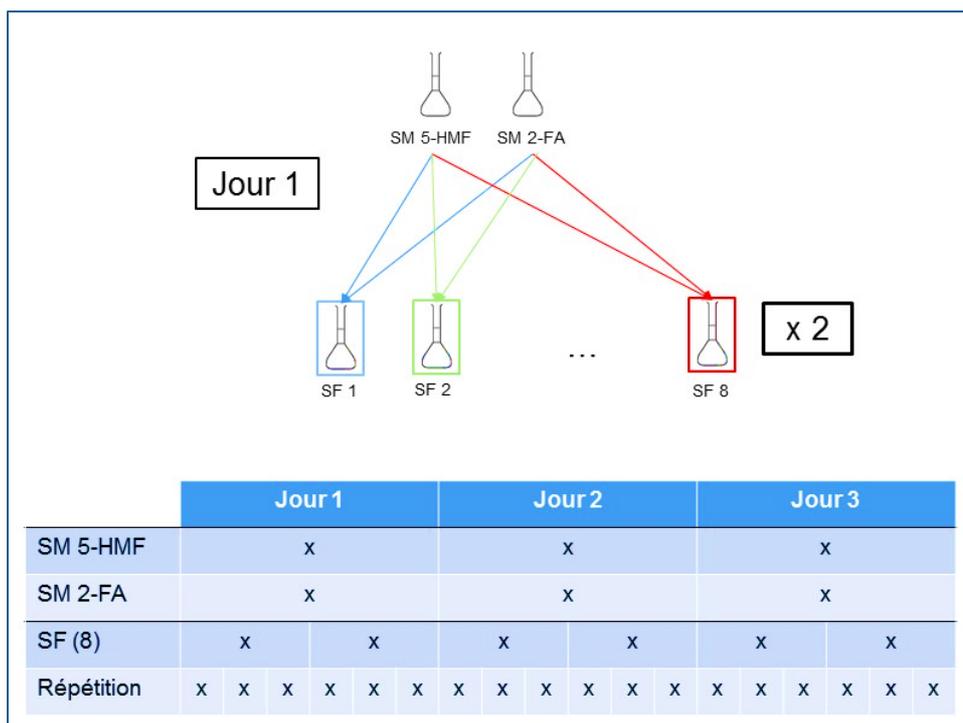


Figure 5 : Protocole de validation de la gamme de dosage sur trois jours.

c. Validation de la méthode analytique

La méthode est validée selon les paramètres suivants : spécificité, linéarité, précision, limites de détection (LDD) et limites de quantification (LDQ). Pour valider statistiquement la méthode de dosage, une ANOVA sera réalisée. Pour cela, la méthode statistique de validation débute par un test de Cochran permettant de vérifier l'homogénéité des variances. Puis la régression linéaire sera déterminée. Si le modèle linéaire n'apparaît pas adapté par l'ANOVA alors que les données expérimentales semblent attester du contraire, alors un test d'ajustement du polynôme d'ordre 2 de type : $Y = \alpha + \beta_1x + \beta_2x^2$ sera appliqué aux données expérimentales. Les

paramètres α , β_1 et β_2 sont calculés pour chaque série et pour chaque PDG. Le but étant de montrer que le paramètre β_2 est non significativement différent de 0 à l'aide d'un test de Student (5 ddl, $\alpha = 5\%$). Les paramètres de la régression seront ensuite calculés : β_1 , la pente et α , l'ordonnée à l'origine.

Dans un deuxième temps, afin de vérifier que cette méthode est bien adaptée à la mesure de nos concentrations, une droite de justesse sera réalisée pour démontrer la justesse de la méthode d'étalonnage.

Enfin, dans un troisième temps, l'exactitude de la méthode sera validée par le diagramme de recouvrement. Les biais relatifs ne devront pas être supérieurs à 10% pour conclure à l'exactitude de la méthode.

La limite de détection (LDD) est la plus petite concentration que l'on peut distinguer du blanc. Pour la calculer, la méthode utilisée est basée sur l'écart-type de l'ordonnée à zéro (**équation 2**) :

$$Y_{LDD} = \alpha + 3\sigma_\alpha \quad (\text{eq 2})$$

où σ_α est l'écart-type de l'ordonnée à l'origine du modèle et Y_{LDD} le signal minimal détectable. On en déduit **l'équation 3**, d'après **l'équation 2** et à l'aide des paramètres de régression (β_1 , la pente et α , l'ordonnée à l'origine), qui nous permet de trouver X_{LDD} , concentration minimale détectable :

$$X_{LDD} = (\alpha + 3\sigma_\alpha)/\beta_1 \quad (\text{eq 3})$$

La limite de quantification (LDQ) est la plus petite concentration que l'on peut quantifier du blanc. Pour la calculer, la méthode utilisée est également basée sur l'écart-type de l'ordonnée à zéro (**équation 4**) :

$$Y_{LDQ} = \alpha + 10\sigma_\alpha \quad (\text{eq 4})$$

où σ_α est l'écart-type de l'ordonnée à l'origine du modèle et Y_{LDQ} , le signal minimal quantifiable. On en déduit, comme précédemment, **l'équation 5** qui nous permet de trouver X_{LDQ} , concentration minimale quantifiable :

$$X_{LDQ} = (\alpha + 10\sigma_\alpha)/\beta_1 \quad (\text{eq 5})$$

La dernière étape consiste à démontrer que sur la plage de linéarité, la méthode est fidèle. Le profil de fidélité s'obtient par la somme de la fidélité de répétabilité et la fidélité intra-série. Il est exprimé par le coefficient de variation sur la gamme des points supérieurs à la limite de quantification.

3. Méthodes de stérilisation

a. Méthodologie de l'étude

Cette étude est fondée sur la réglementation applicable aux solutions ainsi qu'aux techniques utilisées dans l'industrie. Suite à notre demande, cinq laboratoires présents sur le marché français nous ont confirmé utiliser la technique de stérilisation par la chaleur humide comme le recommande la Pharmacopée Européenne^[1]. Cependant, le détail des conditions de stérilisation ne nous a toujours pas été communiqué. Comme défini précédemment, on juge l'effet stérilisant par le F_0 , combinaison de temps (t), de température (T) et de pression. En nous basant sur les données de la littérature et sur les informations communiquées par les laboratoires, cette étude porte sur l'évaluation de différentes méthodes de stérilisation. Une méthode de stérilisation à froid, par filtration stérilisante et une méthode de stérilisation à chaud, par autoclave (chaleur humide), avec 8 conditions différentes ont été étudiées :

- Filtration (filtre 0,22 μm)
- Autoclave : 8 cycles
 - o C₁ : 111°C, 30 min ($F_0 = 3$)
 - o C₂ : 111°C, 90 min ($F_0 = 9$)
 - o C₃ : 111°C, 200 min ($F_0 = 20$)
 - o C₄ : 116°C, 30 min ($F_0 = 9,5$)
 - o C₅ : 121°C, 9 min ($F_0 = 9$)
 - o C₆ : 121°C, 20 min ($F_0 = 20$)
 - o C₇ : 121°C, 30 min ($F_0 = 30$)
 - o C₈ : 134°C, 3 min ($F_0 = 60$)

Le protocole de l'étude de l'impact de la stérilisation sur la formation des PDG est résumé dans la **figure 6**.

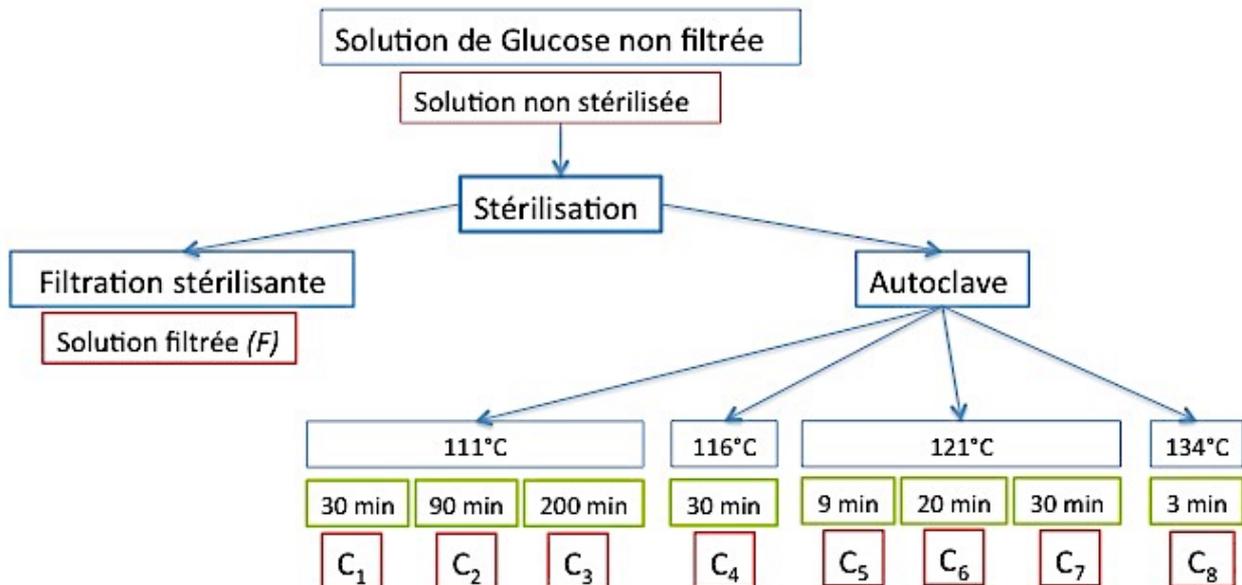


Figure 6 : Description des conditions opératoires de l'étude de stérilisation

Pour chaque condition de stérilisation, une quantification des PDG est réalisée avant et après la stérilisation (filtration ou autoclave). Les échantillons étudiés avant une stérilisation sont étiquetés non stériles (NS).

b. Matériels

i. Filtration stérilisante

La filtration stérilisante a été réalisée à l'aide d'une seringue de 50 ml Plastipak™ (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France) et d'un filtre-seringue stérile de 0,22 µm de porosité et de 25 mm de diamètre en acétate de cellulose (VWR International S.A.S, Fontenay-sous-Bois, France).

ii. Autoclavage

Les cycles de stérilisation C_1 et C_4 à C_8 ont été réalisés au sein du Laboratoire de Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière, de la Faculté des Sciences

Pharmaceutiques de Lille, à l'aide d'un autoclave de paillasse VAPOUR-Line® (VWR, Radnor, Pennsylvanie, Etats-Unis). Cet autoclave est limité à une durée de stérilisation maximale de 30 min par cycle. Les cycles C₂ et C₃ ayant une durée de stérilisation de 90 et 200 min respectivement, ont été réalisés au Laboratoire de Bactériologie, à la Faculté des Sciences Pharmaceutiques de Lille, par un autoclave Lequeux® (Getinge, Courtaboeuf – Les Ulis, France).

c. Préparation des solutions de glucose à 5, 10, 30 et 50%

Le travail porte sur 4 solutions de glucose, représentatives du marché français : 5%, 10%, 30% et 50%. En partant de glucose anhydre en poudre de qualité Pharmacopée Européenne et d'eau ultra-pure, les solutions de glucose ont été réalisées dans des fioles jaugées de 500 mL afin d'assurer une quantité suffisante pour l'ensemble des manipulations effectuées (**tableau 3**). Ces solutions, une fois réalisées ont été réparties de manière équitable dans les flacons en verre de 100 mL autoclavables (8 flacons par solution, dont 1 pour la filtration stérilisante). Le volume fixé à 100mL, le flacon en verre et les bouchons en PP ont été choisis en lien avec les travaux précédemment menés et qui démontrent qu'un faible volume et qu'un conditionnement en verre ou en PP limitent la formation des PDG, et permettent donc d'observer l'impact de la stérilisation sur la dégradation du glucose en limitant l'impact des autres facteurs.

Tableau 3 : Préparation des solutions glucosées

| Concentration (g/100ml – %) | Quantité de glucose (g) | Volume du flacon (ml) |
|-----------------------------|-------------------------|-----------------------|
| 5 | 25 | 500 |
| 10 | 50 | 500 |
| 30 | 150 | 500 |
| 50 | 250 | 500 |

Les solutions glucosées ont été analysées par la méthode analytique décrite précédemment et les dosages ont été répétés trois fois (n = 3). Lorsque cela était nécessaire, des dilutions ont été effectuées à l'aide d'eau ultra-pure afin que les concentrations finales en PDG entrent dans les gammes de dosage validées.

d. Analyse de l'impact des paramètres de la stérilisation sur la formation des PDG

Pour l'analyse des paramètres de la stérilisation influençant la formation du 5-HMF et du 2-FA, une analyse par régression multiple a été réalisée. Cette régression permet de modéliser l'influence des paramètres. Les paramètres étudiés dans ce travail sont la concentration en glucose ($[G_0]$), la température du cycle (T) et l'effet stérilisant (F_0). Le modèle de régression réclamant une distribution normale, une transformation logarithmique a été réalisée. L'équation étudiée est :

$$\text{Ln}\left(\frac{dPDG}{dt}\right) = a.T + b.F_0 + c.\ln[G_0] + e \quad (\text{eq 6})$$

où a, b, c et e sont les paramètres de la régression.

Lorsque les échantillons sont petits, sans possibilité de test de normalité, un test non paramétrique de type Wilcoxon sera utilisé afin de mettre en évidence ou non une différence entre les conditions de stérilisation. Dans les autres situations, un test de Student sera utilisé, notamment lors de la comparaison des paramètres de régression.

Pour l'ensemble des tests statistiques réalisés, un test bilatéral avec un $p < 0,05$ est considéré comme statistiquement significatif. Ces analyses ont été conduites avec l'utilisation de XLSTAT® software (XLSTAT v2014.5.02, Addinsoft, Paris, France).

A partir des données obtenues, en concentration molaire, la vitesse de formation des PDG sera calculée à partir de la formule suivante (**équation 6**) :

$$\frac{d[PDG]}{dt} = \frac{[PDG] - [PDG_0]}{t_s} (\text{eq 7})$$

où t_s est la durée du cycle de stérilisation, $[PDG_0]$ la concentration initiale en PDG et $[PDG]$ la concentration de PDG après la stérilisation. Les masses molaires sont décrites dans le **tableau 1**.

V. RESULTATS

1. Méthode de dosage

a. Description des résultats

Les conditions analytiques précédemment décrites donnent le chromatogramme en **figure 7**. Les T_R sont de 3,4 min et de 4,8 min pour le 5-HMF et le 2-FA, respectivement. Le R_S calculé est de 6,5. Un R_S supérieur à 1,5 indique une bonne séparation des produits. Le temps d'analyse est de 7 min.

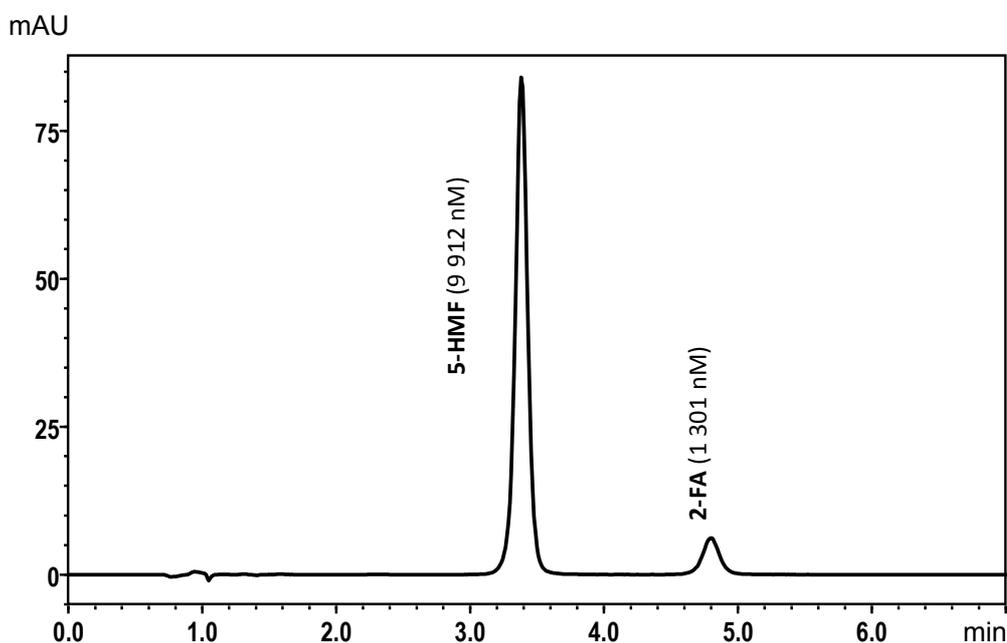


Figure 7 : Chromatogramme d'une solution d'un mélange de 5-HMF à 9 912 nM et de 2-FA à 1 301 nM dans les conditions d'élution de la méthode de dosage.

b. Paramètres de validation

L'homogénéité des variances est vérifiée par le test de Cochran avec un rapport de Cochran de 0,17 pour le 5-HMF et de 0,24 pour le 2-FA. Le modèle linéaire n'apparaît pas adapté par l'ANOVA avec des F_{cal} supérieurs au $F_{théo}$. Ceci s'explique par le fait que la variance de répétabilité est très faible par rapport à celle de l'ajustement du

modèle (non linéaire). Cela entraîne donc l'obtention d'un F_{cal} très élevé. Ce phénomène se produit lorsque la méthode d'ajustement est très fidèle.

Dans ce cas, l'alternative à ce test est le test d'ajustement du polynôme d'ordre 2, vérifié à l'aide d'un test de Student, qui permet de démontrer que le paramètre β_2 est non significativement différent de 0 pour les deux PDG (**tableau 4**).

Tableau 4 : Paramètre β_2 de chaque série pour le 5-HMF et le 2-FA ainsi que la moyenne de ce paramètre (moyenne \pm écart-type). Résultats du test de Student ($\alpha = 0,05$; 5 DDL). Différence : entre la moyenne des β_2 et 0.

| | | β_2 du 5-HMF | β_2 du 2-FA |
|-----------|------------------------------|--|--|
| Résultats | Série 1 | $-8,429 \times 10^{-5} \pm 1,173 \times 10^{-4}$ | $5,846 \times 10^{-5} \pm 0,001$ |
| | Série 2 | $-5,395 \times 10^{-5} \pm 1,246 \times 10^{-4}$ | $-4,675 \times 10^{-5} \pm 0,001$ |
| | Série 3 | $-8,101 \times 10^{-5} \pm 1,111 \times 10^{-4}$ | $5,085 \times 10^{-5} \pm 0,001$ |
| | Série 4 | $-8,134 \times 10^{-5} \pm 1,100 \times 10^{-4}$ | $1,036 \times 10^{-5} \pm 0,001$ |
| | Série 5 | $-3,122 \times 10^{-3} \pm 6,456 \times 10^{-3}$ | $-3,542 \times 10^{-5} \pm 0,001$ |
| | Série 6 | $-6,596 \times 10^{-5} \pm 1,107 \times 10^{-4}$ | $1,669 \times 10^{-4} \pm 0,001$ |
| | Moyenne | $-5,814 \times 10^{-4} \pm 1,172 \times 10^{-3}$ | $4,962 \times 10^{-5} \pm 0,001$ |
| Student | Différence ($\beta_2 - 0$) | $-5,814 \times 10^{-4}$ | $4,962 \times 10^{-5}$ |
| | t (Valeur observée) | -1,144 | 1,490 |
| | t (Valeur critique) | 2,571 | 2,571 |
| | p-value (bilatérale) | 0,304 | 0,196 |

Ceci permet de simplifier l'équation $Y = \alpha + \beta_1 x + \beta_2 x^2$ en $Y = \alpha + \beta_1 x$. Les paramètres de régression sont résumés dans le **tableau 5**.

Tableau 5 : Paramètres de régression de la méthode de validation pour le 5-HMF et le 2-FA. Les paramètres donnés sont : β_1 (la pente de la droite), α (l'ordonnée à l'origine) et r^2 (le coefficient de détermination). Les limites de détection (LDD) et de quantification (LDQ) sont exprimées en nM.

| PDG | r^2 | β_1 | α | LDD | LDQ |
|-------|-------------------|------------------|----------------------|-------|--------|
| 5-HMF | $0,999 \pm 0,001$ | $55,28 \pm 0,22$ | $-1552,1 \pm 1476,1$ | 52,02 | 238,92 |
| 2-FA | $0,999 \pm 0,001$ | $41,75 \pm 2,05$ | $570,8 \pm 237,9$ | 17,10 | 57,00 |

La **figure 8** représente la justesse de la méthode. Elle permet de vérifier que la méthode appliquée est bien adaptée à la mesure des concentrations et présente une grande justesse sur l'ensemble des points de gamme testés.

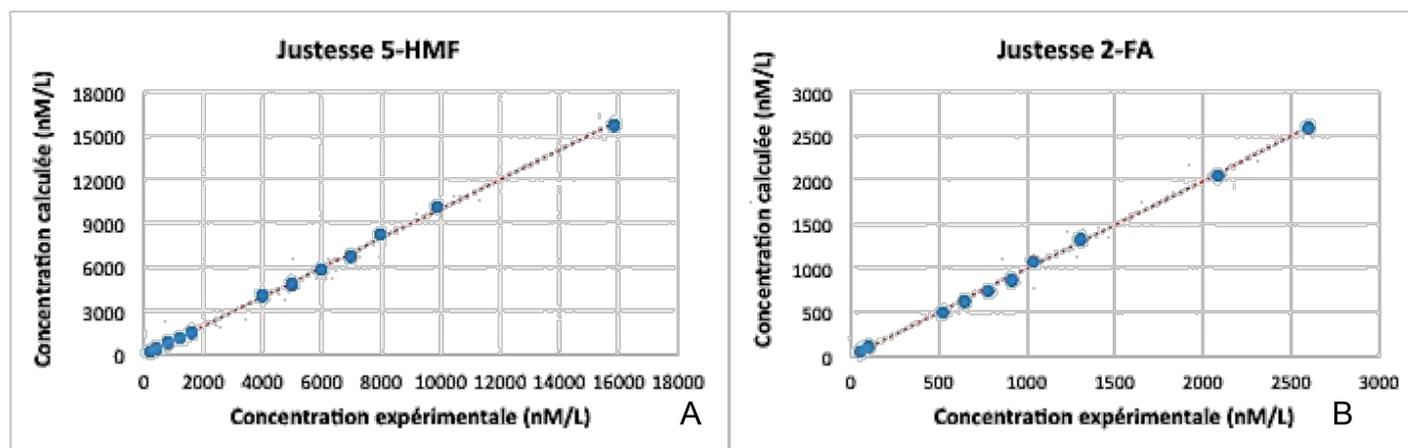


Figure 8 : Représentation graphique de la justesse de la méthode de validation pour le 5-HMF (A) et pour le 2-FA (B). La courbe en pointillé rouge représente la droite de régression linéaire de référence.

Les diagrammes de recouvrement, décrits par la **figure 9 (A)** pour le 5-HMF et **(B)** pour le 2-FA, confirment l'exactitude des méthodes de dosage. Pour le 5-HMF, la **figure 9 (A)** confirme l'exactitude de la méthode uniquement sur la plage de 396 à 15 859 nM ; le 198 nM étant hors gamme de validation. Ce résultat est cohérent avec une LDQ calculée de 238,92 nM. Pour le 2-FA, l'exactitude est confirmée pour la plage entière allant de 52 à 2602 nM (**figure 9 B**).

Les biais relatifs maximum sont de 4,40% pour le 5-HMF et de 5,33% pour le 2-FA, bien inférieurs à la limite fixée (10%).

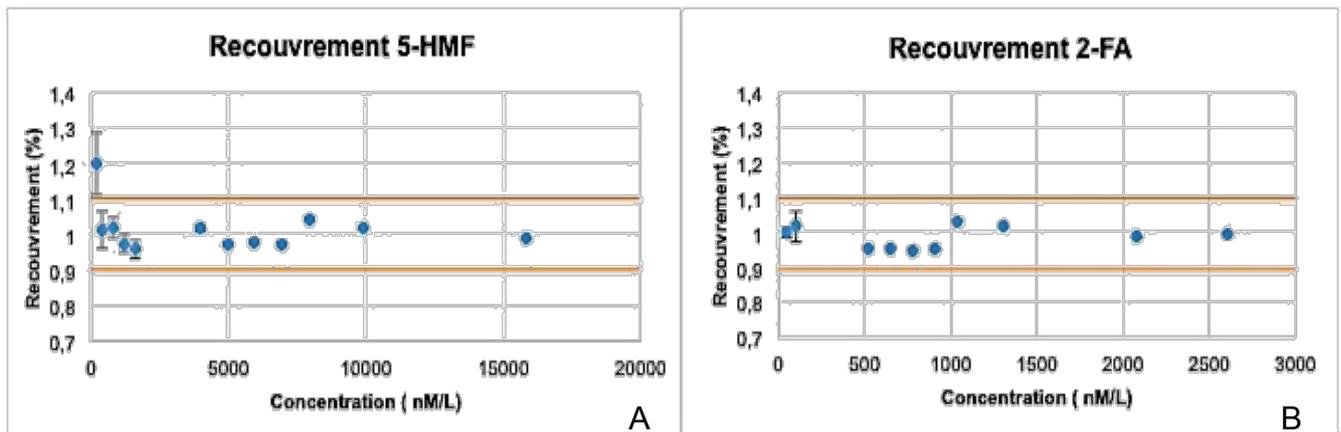


Figure 9 : Diagramme de recouvrement pour le 5-HMF (A) et pour le 2-FA (B). Les limites des biais sont fixées à $\pm 10\%$ (droites en orange).

Ce test d'ajustement permet de valider les dosages lorsque les concentrations sont comprises entre 396 et 15 859 nM pour le 5-HMF et entre 52 à 2 602 nM pour le 2-FA. Les résultats obtenus en dehors de ces gammes ne sont pas valides.

2. Etude de l'effet de la stérilisation

a. Description des résultats

Afin d'optimiser l'analyse de l'effet de la stérilisation, le travail a été mené dans les conditions minimisant l'effet d'autres paramètres en se basant sur les résultats de l'étude menée au sein du laboratoire en cours de publication, soit :

- Volume faible : 100 mL
- Flacon en verre et bouchon en PP
- Différentes concentrations en glucose

L'impact de la stérilisation s'étudie par comparaison avec les dosages à J0 pour chaque type de stérilisation, permettant de mettre en évidence la formation de PDG supplémentaires. Les annexes 1 et 2 résument les résultats des dosages.

En ce qui concerne les solutions non stérilisées, le 5-HMF est présent dans l'ensemble de ces solutions et les concentrations sont plus importantes pour les hautes concentrations en glucose (**figure 10**). Les concentrations en 5-HMF sont inférieures à

la LDQ, sauf pour celle quantifiée dans la solution de G50. A l'inverse, le 2-FA n'est pas détecté par notre méthode de dosage, quelle que soit la concentration en glucose.

En ce qui concerne les solutions stérilisées par filtration (réalisée à l'aide d'un filtre de 0,22 μm), on constate que les concentrations en 5-HMF retrouvées sont très faibles et sont similaires à celles observées dans les solutions non stérilisées (**figure 10**). Les concentrations en 5-HMF retrouvées pour les solutions de G5, G10 et G30, sont inférieures à la LDQ, avant et après filtration stérilisante. Pour la solution de G50, le test statistique de Wilcoxon ne retrouve pas de différences significatives entre les concentrations avant et après filtration stérilisante ($p = 0,25$). Les concentrations en 5-HMF sont comprises entre $79,04 \pm 0,25$ nmol/L et $451,35 \pm 0,72$ nmol/L pour le G5% et G50%, respectivement. Elles sont toutes inférieures à 500 nmol/L. Le 2-FA n'est toujours pas détectable dans ces solutions, malgré une LDD très faible. La formation de 2-FA, si elle existe, est négligeable. La stérilisation par filtration semble donc ne pas générer une formation significative de PDG.

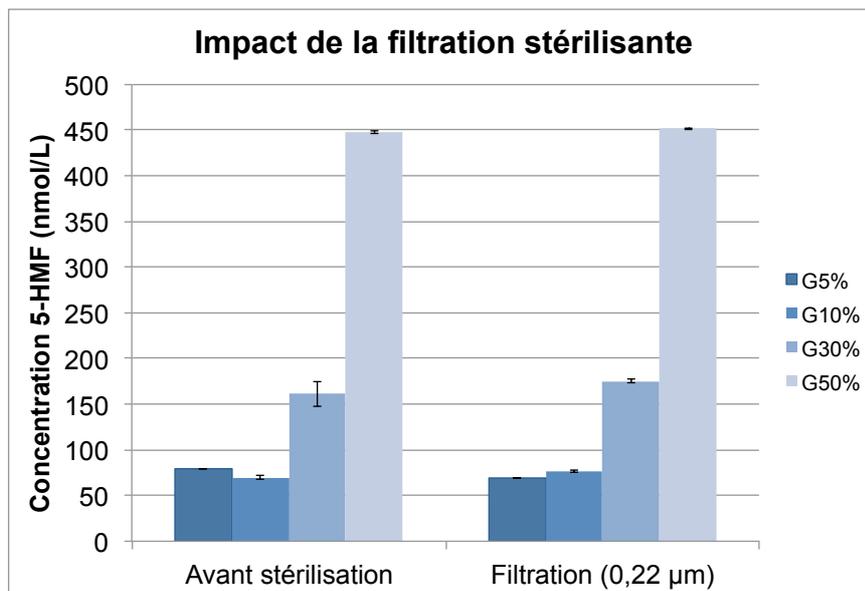


Figure 10 : Impact de la filtration stérilisante sur la formation du 5-HMF

En ce qui concerne la stérilisation par la chaleur humide par autoclave, les différentes conditions de stérilisation à chaud (C_1 à C_8), ont un impact sur la formation des deux PDG. Le 2-FA est détecté seulement après la stérilisation par la chaleur, quelles que soient les conditions. En reprenant chacun des paramètres de la stérilisation à chaud, on constate l'impact de chacun d'entre eux.

Les résultats montrent l'impact de la durée du cycle de stérilisation. En comparant les cycles C_1 , C_2 et C_3 , on observe une augmentation très importante des concentrations en PDG (**figure 11**). La température du cycle a été fixée à 111°C , et seule la durée varie de 30 à 200 minutes.

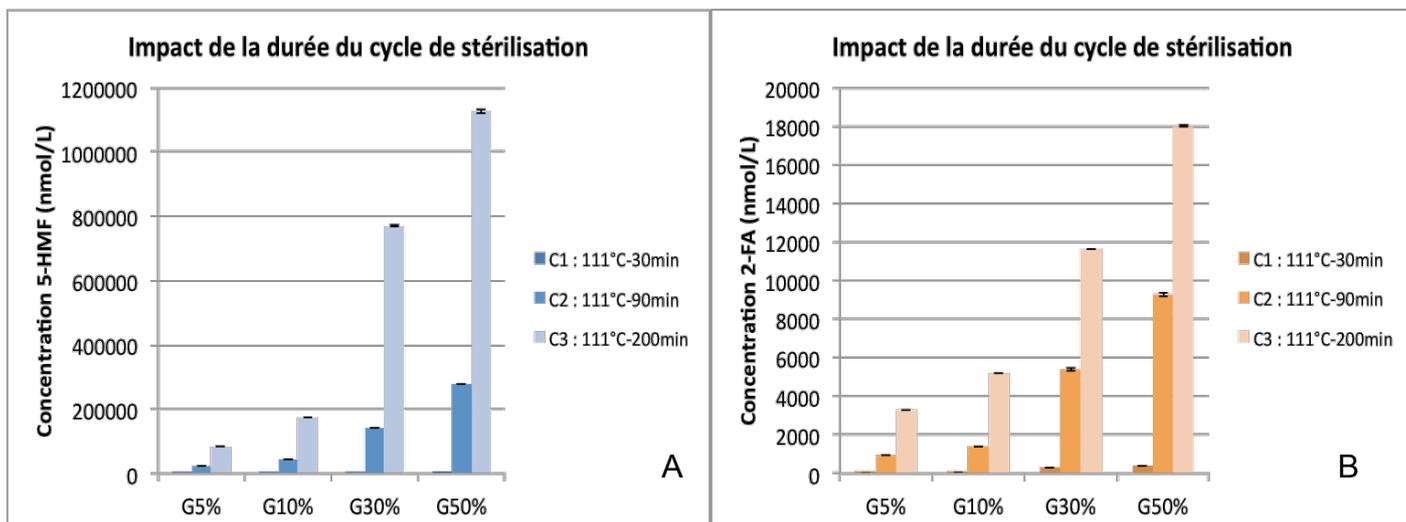


Figure 11 : Impact de la durée du cycle de stérilisation C_1 : 111°C – 30 min ($F_0 = 3$), C_2 : 111°C – 90 min ($F_0 = 9$) et C_3 : 111°C – 200 min ($F_0 = 20$) en fonction des concentrations initiales en glucose sur la formation du 5-HMF (A) et du 2-FA (B).

La comparaison des cycles C_1 , C_2 et C_3 montre une augmentation de la formation des PDG en fonction de la durée du cycle. On peut observer une variation des concentrations de $617,32 \pm 2,20$ à $83\,993,74 \pm 71,79$ nmol/L pour le 5-HMF et de $23,39 \pm 0,94$ à $3\,254,66 \pm 6,12$ nmol/L pour le 2-FA dans la solution de G5% pour une durée de cycle de 30 et 200 minutes respectivement. La **figure 11** montre aussi l'impact de la concentration initiale en glucose sur la formation des PDG. Plus la concentration en glucose est importante et plus la concentration en PDG est conséquente.

Les résultats montrent aussi l'impact de la température et sont décrits dans la **figure 12**. La durée du cycle a été fixée à 30 min. En comparant les cycles C_1 , C_4 et C_7 , ayant une température de stérilisation de 111°C , 116°C et 121°C respectivement, on observe une augmentation des concentrations en PDG entre $1\,418,29 \pm 1,44$ à $21\,896,49 \pm 0,18$ nmol/L pour le 5-HMF et de $57,49 \pm 3,66$ à $792,83 \pm 4,97$ nmol/L pour le 2-FA dans la solution de G10%, passant de 111°C à 121°C respectivement. On observe tout comme

dans la **figure 11**, que la concentration en glucose influence la concentration formée en PDG.

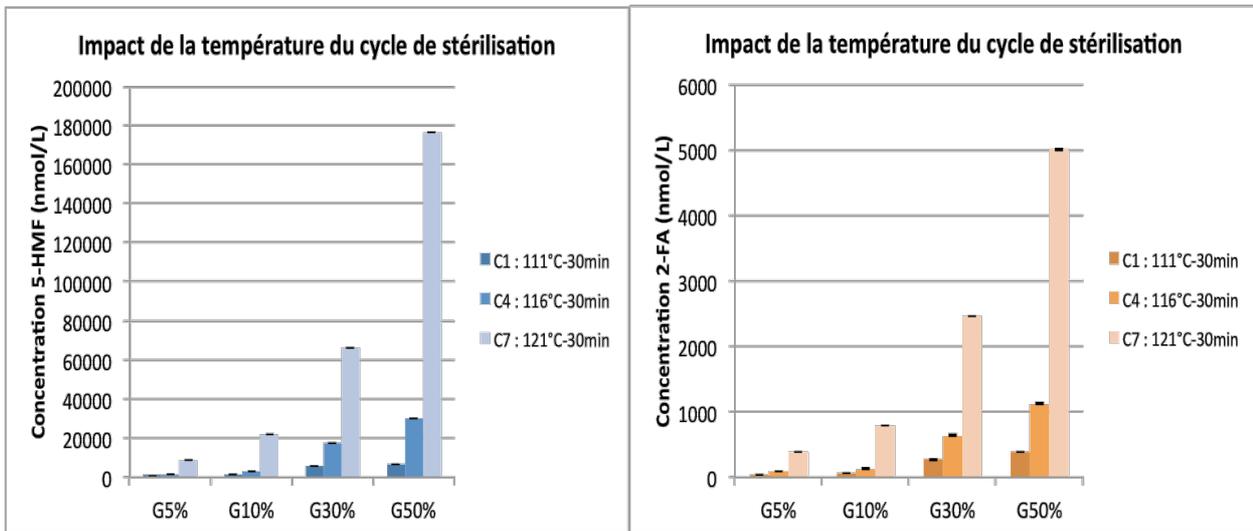


Figure 12 : Impact de la température du cycle de stérilisation C_1 : 111°C – 30 min ($F_0 = 3$), C_4 : 116°C – 30 min ($F_0 = 9,5$) et C_7 : 121°C – 30 min ($F_0 = 30$) en fonction des concentrations initiales en glucose sur la formation du 5-HMF (A) et du 2-FA (B).

Comme expliqué précédemment, la stérilité se définit par le F_0 . La comparaison de la formation des PDG à valeur stérilisante équivalente $F_0 = 9$ et $F_0 = 20$ est décrite dans la **figure 13**. Cette comparaison s'effectue entre le cycle C_2 et C_5 pour un $F_0 = 9$ et entre le cycle C_3 et C_6 pour un $F_0 = 20$. On observe que pour un même F_0 , la durée du cycle a plus d'impact que la température du cycle. L'impact de la durée est d'environ 20 fois plus important que celui de la température. Il semble donc préférable de travailler à température plus la haute sur une durée courte.

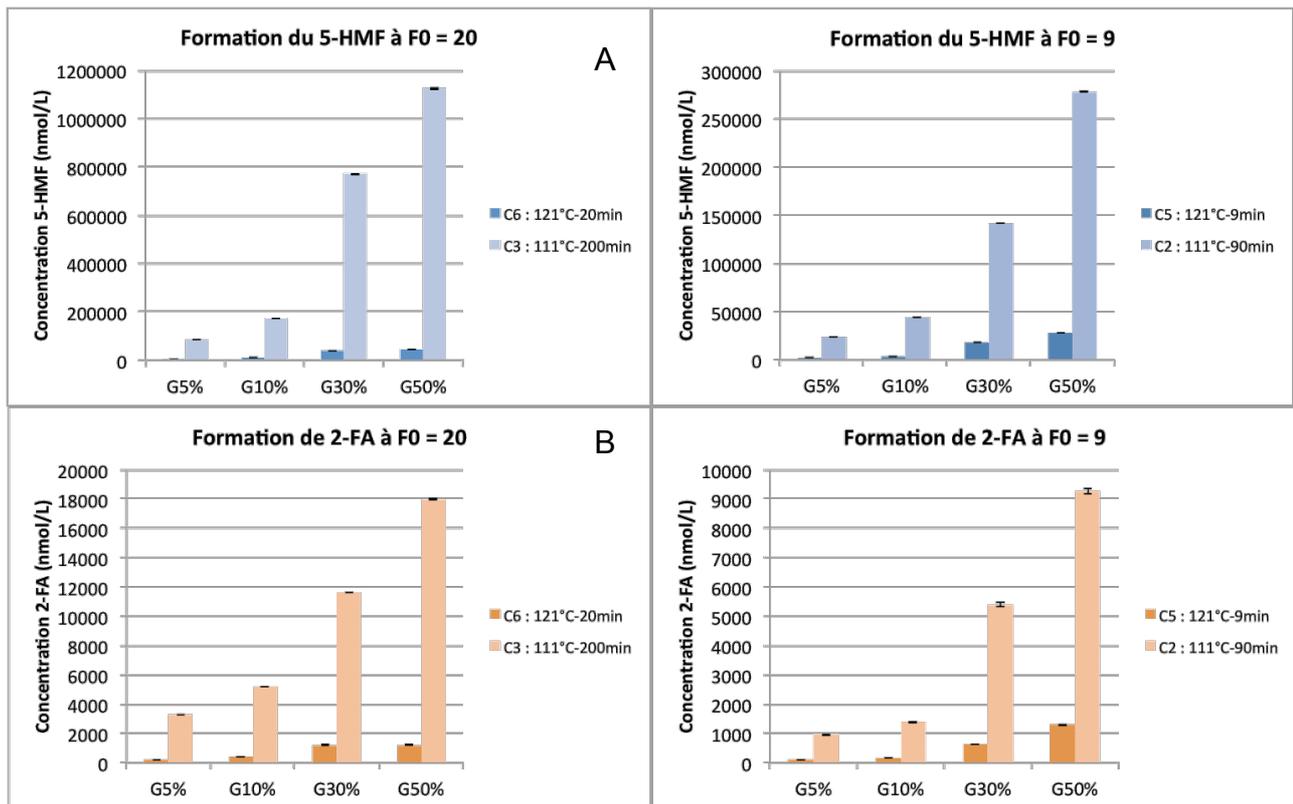


Figure 13 : Comparaison des cycles de stérilisation à $F_0 = 20$ (C_3 : $111^\circ\text{C} - 200$ min et C_6 : $121^\circ\text{C} - 20$ min) et à $F_0 = 9$ (C_2 : $111^\circ\text{C} - 90$ min et C_5 : $121^\circ\text{C} - 9$ min) en fonction des concentrations initiales en glucose sur la formation du 5-HMF (A) et du 2-FA (B).

La comparaison des cycles C_1 , C_6 et C_8 montre une augmentation de la formation des PDG en fonction du F_0 . Plus le F_0 est grand et plus la concentration en PDG est conséquente. Les concentrations en PDG varient de $617,32 \pm 2,20$ à $38\,021,86 \pm 36867,91$ nmol/L pour le 5-HMF et de $23,39 \pm 0,94$ à $928,84 \pm 606,49$ nmol/L pour le 2-FA dans la solution de G5%, pour les températures de 111°C et 134°C respectivement. La **figure 14** décrit l'impact du F_0 sur la formation des PDG. On s'aperçoit que le cycle C_8 montre de grandes variations de concentrations en 5-HMF par des écart-types très importants. Ceci s'explique par notre appareillage d'autoclavage qui n'a pas été conçu pour réaliser des cycles de stérilisation de trop courte durée, de type flash. C'est pourquoi, nous n'avons pas inclus les résultats obtenus pour les cycles de stérilisation de 1 min (131°C et 134°C).

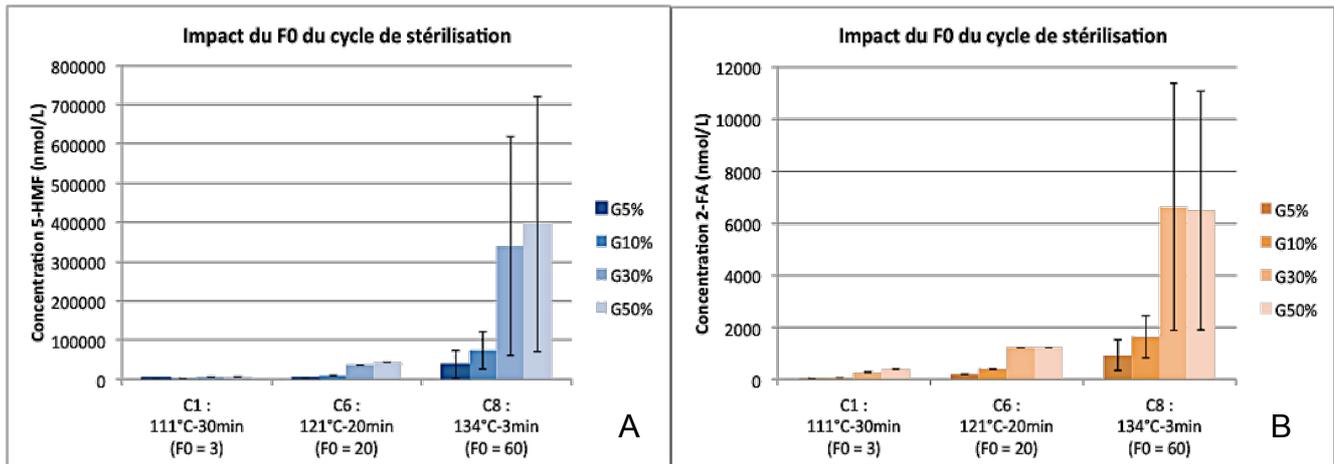


Figure 14 : Impact du F_0 par comparaison des cycles C_1 : $111^\circ\text{C} - 30 \text{ min}$ ($F_0 = 3$), C_6 : $121^\circ\text{C} - 20 \text{ min}$ ($F_0 = 20$) et C_8 : $134^\circ\text{C} - 3 \text{ min}$ ($F_0 = 60$) en fonction des concentrations initiales en glucose sur la formation du 5-HMF (A) et du 2-FA (B).

En règle générale, lors de toutes les comparaisons, on observe que plus la concentration initiale en glucose est importante, plus la formation en PDG est conséquente.

Effectivement, les concentrations en 5-HMF augmentent d'un facteur 10 à 20 en fonction du mode stérilisation entre les solutions à 5% et 50%. Il en est de même pour le 2-FA avec un facteur 5 à 10. La concentration en 5-HMF est en moyenne 100 fois plus importante que celle du 2-FA. Cependant, on constate que pour le 2-FA, les concentrations sont quasiment les mêmes dans le G30% et le G50% pour les cycles C_6 et C_8 . Il en est de même pour le 5-HMF, mais ce résultat est moins marqué (**figure 14**).

b. Analyse des résultats : détermination des paramètres influençant la formation des produits de dégradation du glucose

Pour rappel : à partir des données obtenues et décrites dans l'**annexe 1**, la vitesse de formation des PDG a été calculée pour chaque PDG à partir de l'**équation 7**.

Les résultats sont décrits dans l'**annexe 1** (concentrations molaires en glucose et en PDG). Pour analyser l'impact des différents paramètres sur la formation du 5-HMF et du 2-FA lors de la stérilisation, une analyse de variance est réalisée selon l'**équation 6**. Les

données obtenues sont les suivantes : $r^2=0,761$ ($p<0.0001$) pour le 5-HMF et $r^2=0,782$ ($p<0.0001$) pour le 2-FA. La régression linéaire multiple montre que le modèle proposé est bon. Le modèle de prédiction pour la formation du 5-HMF et pour le 2-FA est décrit par la **figure 15**.

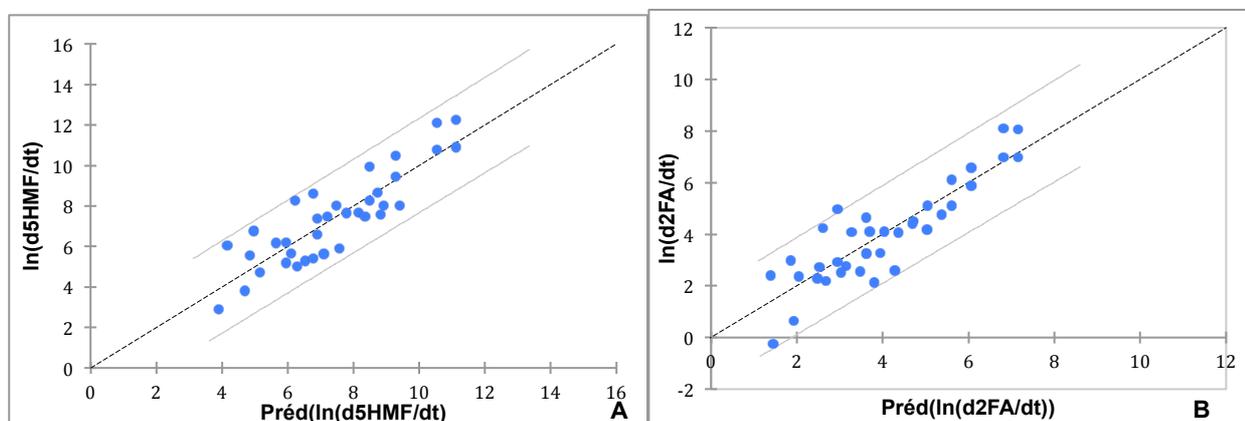


Figure 15 : Modèle de prédiction pour la formation du 5-HMF (A) et du 2-FA (B).

Relation linéaire entre $\ln(\text{vitesse de formation du PDG})$ et la prédiction du $\ln(\text{vitesse de formation du PDG})$. Les droites encadrant les dosages sont les intervalles de confiance à 95%.

Les **tableaux 6** et **7** décrivent les paramètres significatifs, influençant la formation des PDG lors de la stérilisation par l'analyse de la régression linéaire multiple pour le 5-HMF et le 2-FA.

Tableau 6 : Descriptifs des paramètres influençant la stérilisation. (t : valeur réelle de Student) pour le 5-HMF.

| Source | Valeur | Erreur standard | t | Pr > t | Borne inférieure (95%) | Borne supérieure (95%) |
|----------------------|--------|-----------------|--------|----------|------------------------|------------------------|
| Température | -0,094 | 0,023 | -4,187 | 0,000 | -0,140 | -0,049 |
| F ₀ | 0,114 | 0,013 | 8,649 | < 0,0001 | 0,087 | 0,141 |
| ln [G ₀] | 1,141 | 0,180 | 6,350 | < 0,0001 | 0,776 | 1,507 |

Tableau 7 : Descriptifs des paramètres influençant la stérilisation. (t : valeur réelle de Student) pour le 2-FA.

| Source | Valeur | Erreur standard | t | Pr > t | Borne inférieure (95%) | Borne supérieure (95%) |
|----------------------|--------|-----------------|--------|----------|------------------------|------------------------|
| Température | -0,067 | 0,019 | -3,590 | 0,001 | -0,104 | -0,029 |
| F ₀ | 0,100 | 0,011 | 9,181 | < 0,0001 | 0,078 | 0,122 |
| ln [G ₀] | 0,682 | 0,148 | 4,610 | < 0,0001 | 0,381 | 0,982 |

Ces résultats montrent que la température du cycle, l'effet stérilisant F₀ et la concentration en glucose ont un impact significatif sur la formation des PDG avec des p<0,0001.

En repartant de l'équation de vitesse et des résultats de la régression linéaire multiple, nous obtenons l'équation 6 :

$$\ln\left(\frac{d[PDG]}{dt}\right) = a.T + b.F_0 + c.\ln[G_0] \quad (\text{eq 6})$$

avec T la température, F₀ l'effet stérilisant et [G₀] la concentration initiale en glucose.

Soit par transformation exponentielle, on obtient :

$$\frac{d[PDG]}{dt} = e^{(a.T+b.F_0+c.\ln[G_0])} \quad (\text{eq 8})$$

Soit encore :

$$\frac{d[PDG]}{dt} = [G_0]^c e^{(a.T+b.F_0)} \quad (\text{eq 9})$$

Si on pose : $k = e^{(a.T+b.F_0)}$

On obtient l'équation suivante :

$$\frac{d[PDG]}{dt} = k.[G_0]^c \quad (\text{eq 10})$$

Dans le cas de cette analyse, c n'est pas significativement différent de 1 pour le 5-HMF au seuil de 5% puisque le test de Student réalisé à partir des données de la régression

donne un t expérimental de 0,783, soit nettement inférieur au t de comparaison à 5% ($t_{5\%,table}=2,026$).

L'équation 10 peut donc être assimilée pour le 5-HMF à :

$$\frac{d[5HMF]}{dt} = k. [G_0] \quad (\text{eq 11})$$

En ce qui concerne le 2FA, c n'est pas significativement différent de 0,5 au seuil de 5% puisque le test de student réalisé à partir des données de la régression donne un t expérimental de 1,23, soit nettement inférieur au t de comparaison à 5% ($t_{5\%,table}=2,026$).

L'équation 10 peut donc être assimilée pour le 2-FA à :

$$\frac{d[2FA]}{dt} = k. [G_0]^{0,5} \quad (\text{eq 12})$$

Avec les données de la régression multiple, on observe que les constantes de vitesse de formation de 5-HMF et de 2-FA sont dépendantes de la température et de la valeur F_0 . En fonction des 8 conditions testées en autoclave, les valeurs de constantes de vitesse de formation k (min^{-1}), calculées à partir de l'équation 9, sont décrites dans le **tableau 8**.

Tableau 8 : Constantes de vitesse de stérilisation en min^{-1} pour le 5-HMF (k_H) et pour le 2-FA (k_{FA}). T_s , la température du cycle de stérilisation ; F_0 , l'effet stérilisant.

| | | F_0 | | | | | |
|---|--------|-------|-------|-------------------|--------|--------|---------|
| | | T_s | 3 | 9 | 20 | 30 | 60 |
| $k_H \times 10^5$ (min^{-1}) | 111 °C | | 3,94 | 7,80 | 27,37 | | |
| | 116°C | | | 5,15 ¹ | | | |
| | 121 °C | | | 3,03 | 10,64 | 33,31 | |
| | 134 °C | | | | | | 298,96 |
| $K_{FA} \times 10^5$ (min^{-1}) | 111 °C | | 82,91 | 150,73 | 450,94 | | |
| | 116°C | | | 113,55 | | | |
| | 121 °C | | | 77,43 | 231,64 | 627,30 | |
| | 134 °C | | | | | | 5240,24 |

¹ Le F_0 du cycle C_4 (116°C – 30 min) a été placée dans la colonne $F_0=9$ pour une meilleure visibilité mais a bien été pris en compte dans l'analyse statistique pour une valeur de 9,5.

On peut ainsi remarquer que :

- Plus la durée du cycle est importante (à température identique) et plus la formation des PDG est conséquente.
- Plus la température est élevée (à durée identique) et plus la formation des PDG est importante.
- Pour un même F_0 , plus la température est forte (durée du cycle plus courte) et moins la formation des PDG est importante. Pour un F_0 de 9, on observe des constantes K_H et K_{FA} plus faibles pour le cycle C_5 (121°C – 9 min) que pour les cycles C_4 (116°C – 30 min) et C_2 (111°C – 90 min).
- Plus la concentration en glucose est importante, plus la vitesse de formation des PDG est importante.

Les deux PDG ont un comportement similaire constaté par le classement des modes de stérilisation observé dans le **tableau 8**. L'étude des paramètres permet de définir les conditions optimales de stérilisation par la chaleur qui sont de se placer à température la plus élevée pour un F_0 donné, afin d'avoir la durée de stérilisation la plus courte possible. Il faut cependant trouver un compromis entre le F_0 , la température et la durée du cycle afin de travailler à une température correcte puisqu'une forte température génère également des PDG.

c. Détermination du modèle mathématique de la stérilisation

En repartant du schéma général de la dégradation du glucose (**figure 3**), la dégradation du glucose en 5-HMF et 2-FA peut être considérée comme deux réactions parallèles (**figure 16**). Les autres voies n'ont pas encore été étudiées.

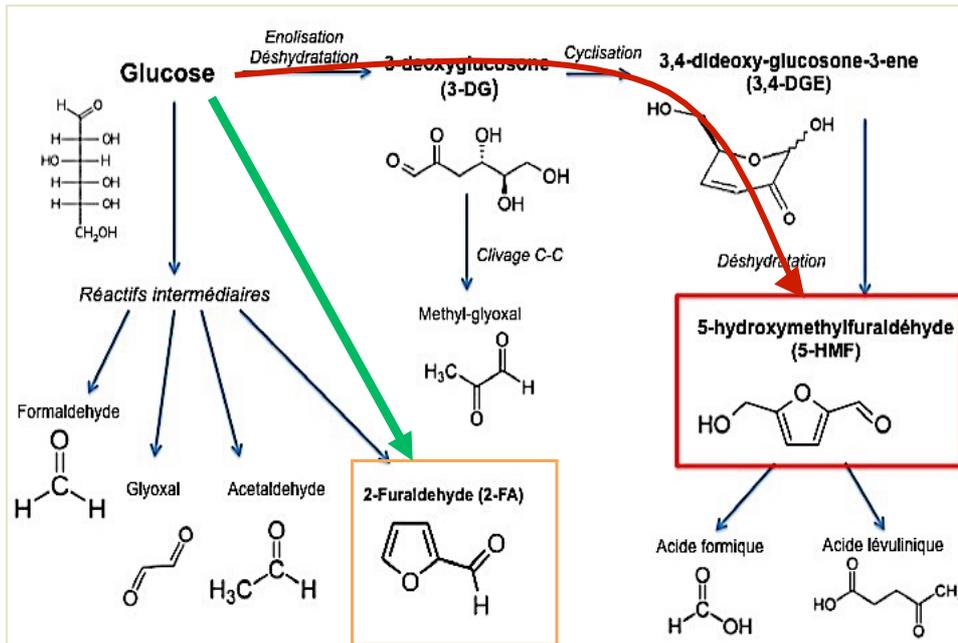


Figure 16 : Schéma de la formation des PDG

En repartant de la **figure 16** et de l'**équation 11** qui est une équation différentielle, nous pouvons expliquer la cinétique de la dégradation du glucose (**figure 16**) par le schéma suivant (**figure 17**) :

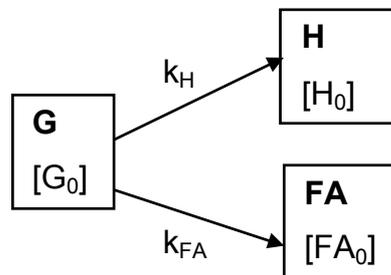


Figure 17 : Schéma expliquant la cinétique de dégradation du glucose. G, H et FA sont respectivement le glucose, le 5-HMF et le 2-FA. [G₀], [H₀] et [FA₀] sont les concentrations initiales en glucose, 5-HMF et 2-FA. k_H et k_{FA} sont les constantes de vitesse de formation de 5-HMF et du 2-FA respectivement.

Pour la modélisation, l'étude se place dans les conditions où le volume de la solution de glucose est constant (100mL) et tous les paramètres sont connus.

En tenant compte des résultats de l'analyse statistique précédente, les équations différentielles qui permettent de décrire les vitesses de transformation sont :

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{d[G]}{dt} = -(k_H[G] + k_{FA}[G]) = -k[G] \quad \text{où } k = k_H + k_{FA} \quad (\text{eq 13}) \\ \frac{d[H]}{dt} = k_H[G] \quad (\text{eq 14}) \\ \frac{d[FA]}{dt} = k_{FA}[G]^{1/2} \quad (\text{eq 15}) \end{array} \right.$$

- Par intégration, on obtient pour l'équation 13 :

$$\int_0^G \frac{d[G]}{[G]} = -k \cdot \int_0^t dt \quad (\text{eq 16})$$

Soit encore

$$\ln([G]) - \ln([G_0]) = -k \cdot t \quad (\text{eq 17})$$

Qui par réarrangement de l'équation précédente donne

$$[G] = [G_0]e^{-k \cdot t} \quad (\text{eq 18})$$

- En intégrant dans l'équation 14, l'équation 18, nous obtenons :

$$\frac{d[H]}{dt} = k_H[G_0]e^{-k \cdot t} \quad (\text{eq 19})$$

Soit par réarrangement et intégration :

$$\int_0^H d[H] = k_H[G_0] \int_0^t e^{-kt} dt \quad (\text{eq 20})$$

D'où

$$[H] = [H_0] + \frac{k_H}{k}[G_0](1 - e^{-k \cdot t}) \quad (\text{eq 21})$$

- En intégrant dans l'équation 15, l'équation 18, nous obtenons :

$$\frac{d[FA]}{dt} = k_{FA}[G_0]e^{-k \cdot t} = k_{FA}[G_0]^{1/2}e^{-\frac{kt}{2}} \quad (\text{eq 22})$$

Soit par réarrangement et intégration

$$\int_0^{FA} d[FA] = k_{FA}[G_0]^{1/2} \int_0^t e^{-\frac{kt}{2}} dt \quad (\text{eq 23})$$

D'où

$$[FA] = [FA_0] + \frac{2k_{FA}}{k}[G_0]^{1/2} \left(1 - e^{-\frac{k \cdot t}{2}} \right) \quad (\text{eq 24})$$

Le modèle de la dégradation du glucose au cours la stérilisation en 5-HMF et 2-FA est ainsi défini par les **équations 18, 21, 24** soit :

$$\left\{ \begin{array}{l} [G] = [G_0]e^{-k.t} \\ [H] = [H_0] + \frac{k_H}{k} [G_0](1 - e^{-k.t}) \\ [FA] = [FA_0] + \frac{2k_{FA}}{k} [G_0]^{1/2} \left(1 - e^{-\frac{k.t}{2}}\right) \end{array} \right.$$

Ce modèle fait intervenir les concentrations initiales du glucose, du 5-HMF et du 2-FA ainsi que les constantes k_H et k_{FA} . On observe un ordre 1 pour la cinétique de formation du 5-HMF et un ordre 0,5 pour le 2-FA.

VI. DISCUSSION

Les SGI sont utilisées, comme diluant de médicaments ou comme solution d'hydratation, quotidiennement dans les établissements de santé et sont considérées comme des solutions sûres. Des facteurs ont été précédemment identifiés comme étant des facteurs favorisant la dégradation du glucose tels que la concentration en glucose^[10], le pH^[11,41], la présence de tampon dans les solutions de DP^[19] ou encore le stockage^[9]. Les PDG formés sont connus pour entraîner des effets délétères sur l'homéostasie cellulaire^[3,18,26], sur le système cardiovasculaire^[29,42] et rénal^[3,12,34] et pour avoir un impact sur l'inflammation^[27] ainsi que sur les nouvelles molécules à structures protéiques tels que les anticorps, les biosimilaires par glycation, avant leur administration^[36]. Limiter la formation des PDG dans les SGI est donc un enjeu important, comme l'explique Bryland *et al.* qui démontre le bénéfice obtenu lors de l'utilisation de solutions pour la DP dépourvues de PDG^[3]. A la vue de ces données, le travail a été orienté sur l'analyse d'un des facteurs les plus impactant de la dégradation du glucose : la stérilisation.

Les PDG étudiés ont été choisis en raison de leurs propriétés chromophores, leur conférant une détection aisée en UV. De plus, le 5-HMF est considéré comme un bon marqueur de la dégradation du glucose et le 2-FA comme produit final d'une des autres voies^[14,15]. La caractérisation des autres PDG a été précédemment décrite, en particulier dans les solutions de DP. Différentes méthodes analytiques telles que la CLHP-UV^[3,8,12,17,43,44] ou la spectrométrie de masse^[12,45-48] ont été utilisées. Cependant, il est souvent nécessaire de dériver les PDG afin de leur conférer des propriétés chromophores^[3,12,44] ou afin d'augmenter leur poids moléculaire. La méthode analytique de cette étude a été choisie car c'est une méthode simple, rapide, reproductible et facilement transposable et mettant en évidence la dégradation générale du glucose.

La méthode de dosage a été validée par un test d'ajustement du polynôme d'ordre 2. Les variances sont statistiquement homogènes, cependant lors d'une analyse par l'ANOVA, le modèle de validation n'apparaît pas adapté. Ce résultat, au premier abord mauvais, s'explique par une variance de répétabilité très faible par rapport à celle de

l'ajustement du modèle (non linéarité). Cela entraîne l'obtention d'un F calculé d'ajustement très élevé. Ce phénomène se produit quand la méthode d'ajustement est très fidèle. Effectivement, les gammes de validation testées sont très étendues. Une alternative à ce test a été réalisée : le test d'ajustement du polynôme d'ordre 2. Ce test a permis de valider les gammes de la plage de 396 à 15 859 nM pour le 5-HMF de 52 à 2 602 nM pour le 2-FA. La concentration de 192 nM pour le 5-HMF a été considérée comme hors gamme de validation. ce résultat est cohérent avec la LDQ_{5-HMF} calculée.

Les travaux menés sur l'analyse des paramètres généraux sur la formation des PDG mettant en évidence l'impact du fabricant, de la quantité initiale en glucose, du coefficient de perméabilité à l'oxygène, du matériau du contenant et du temps écoulé depuis la fabrication, a permis d'optimiser les conditions de travail afin de limiter l'impact de ces facteurs sur la formation des PDG et ainsi de ne considérer que l'influence de la stérilisation sur la formation de PDG : un volume faible de 100 mL et un conditionnement dans des flacons en verre, avec des bouchons en PP autoclavables. Les concentrations des solutions de glucose ont été choisies en se basant sur les données de la littérature^[6,10] permettant de simuler les conditions d'utilisation des SGI en milieu hospitalier.

Dans les solutions non stérilisées, le 5-HMF est quantifié à faible concentration. Une hypothèse peut être émise concernant l'origine de la présence de 5-HMF : la matière première utilisée - la méthode d'obtention de la poudre (température, séchage, pression) - le conditionnement - le transport et le stockage (température et durée). En revanche, le 2-FA n'est pas détecté par notre méthode de dosage, et ce, dans aucune des solutions non stérilisées. Lorsque les solutions glucosées sont stérilisées par filtration (filtre 0,22 μ m), aucune génération n'est constatée pour les 2 PDG : les concentrations en 5-HMF sont similaires aux concentrations retrouvées dans les solutions non stériles et le 2-FA n'est détecté dans aucune des solutions, en accord avec les résultats de Kjellstrand *et al.*^[49] et ceux de Bryland *et al.*^[3]. La filtration stérilisante pourrait être un moyen de maîtriser la formation des PDG. Cependant, la mise en place de la filtration stérilisante à l'échelle industrielle demanderait une réorganisation coûteuse et impacterait le prix des SGI. De plus, la filtration stérilisante

est une technique de stérilisation à haut risque puisque il existe un risque de rupture du filtre, risque encore plus important lorsque la solution a une viscosité élevée.

En revanche, dès l'utilisation d'une méthode de stérilisation par la chaleur humide, la formation de PDG est systématique. L'analyse statistique utilisée (régression linéaire multiple) montre l'influence significative de la température du cycle et de F_0 . Cette étude permet de démontrer l'importance de la durée d'un cycle de stérilisation : plus le cycle est long et plus la formation en PDG est importante à température égale (par comparaison des cycles C_1 (111°C – 30 min), C_2 (111°C – 90 min) et C_3 (111°C – 200 min)).

Elle démontre aussi l'impact de la température sur la formation de PDG par l'étude des cycles dont la durée a été fixée à 30 min (C_1 , C_4 et C_7) : plus la température est élevée et plus la génération de PDG est conséquente. Ces deux derniers points sont en accord avec les travaux menés par Postaire *et al.*^[9] et ceux de Cook *et al.*^[6]. L'analyse des cycles C_1 , C_6 et C_8 montre des résultats similaires aux travaux de Postaire *et al.* qui montrent une dégradation du glucose de 3,4% pour une température de cycle à 110°C jusqu'à 8,62% à 134°C^[10].

Cependant, l'étude des concentrations de PDG à F_0 équivalent montre que l'impact de la durée du cycle de stérilisation est plus important que celui de la température. Ceci est appuyé par notre modèle cinétique qui montre des constantes de vitesse de stérilisation plus importantes pour des F_0 plus grands à une température plus faible. Ces résultats sont en accord avec les travaux réalisés par Mannermaa *et al.*^[50] démontrant qu'il est préférable de travailler à plus forte température pour un même F_0 ainsi que les travaux de Kjellstrand *et al.*^[49] étudiant cinq F_0 différents. Ces derniers ont travaillé sur un modèle cellulaire afin de mettre en évidence l'inhibition de la croissance cellulaire lors de la stérilisation de solution de DP. L'inhibition cellulaire est moins importante pour une haute température à F_0 équivalent. Une solution glucosée ayant été stérilisée à haute température pour une F_0 faible serait une solution glucosée limitant l'administration de PDG.

La régression linéaire multiple permet également de mettre en évidence l'impact de la concentration en glucose sur la formation des PDG lors de la stérilisation ($p < 0,0001$). Plus la solution glucosée est concentrée et plus la génération des PDG est

conséquente, en accord avec Linden *et al.*^[3] et Postaire *et al.*^[10]. Utiliser une solution glucosée à faible concentration serait celle à administrer préférentiellement aux patients. Cependant, comme expliqué précédemment, les solutions glucosées sont aussi présentes dans la nutrition parentérale à de hautes concentrations (35%). Les conséquences de la présence de ces solutions sont l'administration de PDG aux patients et le risque de glycation des acides aminés présents dans les solutions de nutrition parentérale^[51]. Ceci permet de faire un lien avec les récentes études montrant l'impact des PDG sur les nouvelles molécules à structures protéiques telles que les anticorps, les biosimilaires par glycation avant leur administration^[36]. D'autres travaux menés par Anderson *et al.* ont démontré l'interaction entre le 5-HMF et les héparines entraînant une modification de l'activité anticoagulante^[52]. L'activité anticoagulante est augmentée lorsque les solutions glucosées sont autoclavées. Dans cette étude, l'interaction entre les principes actifs et les PDG entraîne donc des effets différents selon les principes actifs.

Le modèle cinétique proposé, obtenu à partir de la régression linéaire multiple et des équations différentielles, permet de confirmer une réaction d'ordre 1 pour le 5HMF. Jing *et al.*^[53] démontrent dans leur étude une réaction d'ordre 1 pour le 5-HMF. Le 2-FA n'a pas été étudié dans ce travail. D'autres travaux similaires portant sur la dégradation du glucose trouvent des réactions d'ordre 1 pour la réaction de dégradation en 5-HMF, dont les études de Taylor *et al.* qui ont travaillé à 5 températures différentes pendant des durées différentes allant jusqu'à 8 heures^[54]. Nos travaux démontrent que la dégradation du 2-FA est elle, d'ordre 0,5. Ce type d'ordre fractionné a déjà été décrit pour des réactions complexes avec plusieurs étapes, ce qui correspond à notre situation^[55,56].

Dans notre étude, la vitesse de formation des PDG est corrélée à la température du cycle, au F_0 de stérilisation initiale et à la concentration en glucose.

Ce travail démontre finalement l'hétérogénéité de l'exposition des patients aux PDG en fonction des solutions administrées de par la variation des concentrations en glucose et les conditions de stérilisation utilisées par les industriels. Une étude portant sur l'évaluation des SGI du marché français préalablement réalisée au sein du laboratoire, a démontré la présence des deux PDG dans l'ensemble des SGI. Il est donc nécessaire

lors des achats, d'apporter une réflexion sur les conditions de stérilisation utilisées par les industriels et d'en faire un critère de choix. Actuellement, lors des appels d'offre, des critères sont définis en amont et peuvent varier d'un établissement de santé à un autre ou d'un groupement d'achat à un autre. Il est important de définir un maximum de critères puisque les marchés sont obtenus pour 2 ans en général. Les critères de choix peuvent par exemple, porter sur des aspects financiers ou sur des critères qualitatifs répondant aux demandes des services (maniabilités des poches ou des flacons, pélabilité du conditionnement secondaire, volume adapté). Des critères portant sur la prestation des fournisseurs peuvent être aussi inclus tels que des conditions commerciales ou des critères logistiques. Dans les critères qualitatifs, les conditions de stérilisation pourraient être demandées (F_0 , durée du cycle de stérilisation et température au plateau) afin de déterminer les concentrations en 5-HMF et 2-FA présents dans les SGI et ainsi limiter l'administration des PDG aux patients et les interactions avec certains médicaments.

VII. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Ce travail met en évidence les facteurs influençant la production de PDG lors de la stérilisation. En s'appuyant sur les travaux précédemment menés et afin de limiter le risque d'exposition des patients aux PDG, différentes mesures peuvent être appliquées afin de limiter l'administration des PDG : utiliser de faibles concentrations de glucose, dans des contenants en verre de faible volume, ayant été stérilisés par filtration stérilisante ou par un autoclave à haute température durant un cycle court.

Des travaux supplémentaires seront nécessaires afin de définir le F_0 idéal, c'est-à-dire le plus faible possible assurant la même stérilité des SGI que celle obtenue actuellement. A partir de ce F_0 défini, la température du cycle et secondairement la durée du cycle seront déterminées à l'aide du modèle cinétique. Ce modèle cinétique déterminé dans cette étude est applicable aux conditions de stérilisation utilisées par les industriels. Les vitesses de formation des PDG lors de la stérilisation, dans les conditions de chaque industriel, pourraient jouer un rôle dans les critères de choix d'achat des SGI par les PUI pour les hôpitaux.

BIBLIOGRAPHIE

1. Pharmacopée Européenne 9.2 Edition. 5.1.1. Méthodes de préparation des produits stériles. Strasbourg: 2017.
2. Pharmacopée Européenne 9.2 Edition. 7. Formes pharmaceutiques, préparations parentérales. Strasbourg: 2017.
3. Bryland A, Broman M, Erixon M, Klarin B, Lindén T, Friberg H, et al. Infusion fluids contain harmful glucose degradation products. *Intensive Care Med* 2010;36(7):1213–20.
4. Trissel LA. Handbook on Injectable Drugs. 16th Edition. American Society of Health-System Pharmacists; 2011.
5. Pharmacopée Européenne 9.2 Edition. 5.1.5. Application du concept F0 à la stérilisation par la vapeur des préparations aqueuses. Strasbourg: 2017.
6. Cook AP, MacLeod TM, Appleton JD, Fell AF. HPLC studies on the degradation profiles of glucose 5% solutions subjected to heat sterilization in a microprocessor-controlled autoclave. *J Clin Pharm Ther* 1989;14(3):189–95.
7. Chapiro C. Les procédés de stérilisation à l'hôpital. 2012;
8. Linden T, Forsbäck G, Deppisch R, Henle T, Wieslander A. 3-Deoxyglucosone, a promoter of advanced glycation end products in fluids for peritoneal dialysis. *Perit Dial Int* 1998;18(3):290–3.
9. Kjellstrand P, Erixon M, Wieslander A, Lindén T, Martinson E. Temperature: the single most important factor for degradation of glucose fluids during storage. *Perit Dial Int* 2004;24(4):385–91.
10. Postaire E, Pradier F, Postaire M, Pradeau D, Matchoutsky L, Prognon P, et al. Various techniques for the routine evaluation of the degradation of glucose in parenteral solutions — a critical study. *J Pharm Biomed Anal* 1987;5(4):309–18.
11. Linden T, Cohen A, Deppisch R, Kjellstrand P, Wieslander A. 3,4-Dideoxyglucosone-3-ene (3,4-DGE): a cytotoxic glucose degradation product in fluids for peritoneal dialysis. *Kidney Int* 2002;62(2):697–703.
12. Frischmann M, Spitzer J, Fünfroeken M, Mittelmaier S, Deckert M, Fichert T, et al. Development and validation of an HPLC method to quantify 3,4-dideoxyglucosone-3-ene in peritoneal dialysis fluids. *Biomed Chromatogr* 2009;23(8):843–51.
13. Tomo T, Okabe E, Yamamoto T, Namoto S, Iwashita T, Matsuyama K, et al.

Impact of 3,4-dideoxyglucosone-3-ene (3,4-DGE) on cytotoxicity of acidic heat-sterilized peritoneal dialysis fluid. *J Artif Organs* 2007;10(1):47–51.

14. Cook AP, Macleod TM, Appleton JD, Fell AF. Reversed-phase high-performance liquid chromatographic method for the quantification of 5-hydroxymethylfurfural as the major degradation product of glucose in infusion fluids. *J Chromatogr A* 1989;467:395–401.

15. Hung CT, Selkirk AB, Taylor RB. A chromatographic quality control procedure based on HPLC for 5-hydroxymethylfurfural in autoclaved D-glucose infusion fluids. *J Clin Hosp Pharm* 1982;7(1):17–23.

16. Ulbricht RJ, Northup SJ, Thomas JA. A review of 5-hydroxymethylfurfural (HMF) in parenteral solutions. *Fundam Appl Toxicol* 1984;4(5):843–53.

17. Linden T, Musi B, Jarkelid L, Forsback G, Kjellstrand P, Deppisch R, et al. Glucose degradation products in peritoneal dialysis fluids may have both local and systemic effects: a study of residual fluid and mesothelial cells. *Perit Dial Int* 2001;21(6):607–10.

18. Boulanger E, Wautier M-P, Gane P, Mariette C, Devuyst O, Wautier J-L. The triggering of human peritoneal mesothelial cell apoptosis and oncosis by glucose and glycoxydation products. *Nephrol Dial Transplant* 2004;19(9):2208–16.

19. Grossin N, Wautier M-P, Wautier J-L, Gane P, Taamma R, Boulanger E. Improved in vitro biocompatibility of bicarbonate-buffered peritoneal dialysis fluid. *Perit Dial Int J Int Soc Perit Dial* 2006;26(6):664–70.

20. Thornalley PJ, Langborg A, Minhas HS. Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose. *Biochem J* 1999;344 Pt 1:109–16.

21. Kjellstrand P, Martinson E, Wieslander A, Kjellstrand K, Jeppsson E, Svensson E, et al. Degradation in peritoneal dialysis fluids may be avoided by using low pH and high glucose concentration. *Perit Dial Int* 2001;21(4):338–44.

22. Maillard LC. Action des acides aminés sur les sucres; formation des mélanoidines par voie méthodique. 1912

23. Wautier M-P, Tessier FJ, Wautier J-L. Les produits de glycation avancée : un risque pour la santé humaine. *Ann Pharm Fr* 2014;72(6):400–8.

24. Purlis E. Browning development in bakery products – A review. *J Food Eng*

2010;99(3):239-49.

25. Welten AGA, Schalkwijk CG, ter Wee PM, Meijer S, van den Born J, Beelen RJH. Single exposure of mesothelial cells to glucose degradation products (GDPs) yields early advanced glycation end-products (AGEs) and a proinflammatory response. *Perit Dial Int J Int Soc Perit Dial* 2003;23(3):213-21.

26. Sanchez-Niño MD, Poveda J, Sanz AB, Carrasco S, Ruiz-Ortega M, Selgas R, et al. 3,4-DGE is cytotoxic and decreases HSP27/HSPB1 in podocytes. *Arch Toxicol* 2014;88(3):597-608.

27. Boulanger E, Puisieux F, Gaxatte C, Wautier J-L. Vieillessement : rôle et contrôle de la glycation. *Rev Médecine Interne* 2007;28(12):832-40.

28. Kandarakis SA, Piperi C, Topouzis F, Papavassiliou AG. Emerging role of advanced glycation-end products (AGEs) in the pathobiology of eye diseases. *Prog Retin Eye Res* 2014;42C:85-102.

29. Himmele R, Sawin D-A, Diaz-Buxo JA. GDPs and AGEs: impact on cardiovascular toxicity in dialysis patients. *Adv Perit Dial* 2011;27:22-6.

30. Cho Y, Johnson DW, Vesey DA, Hawley CM, Pascoe EM, Clarke M, et al. Baseline serum interleukin-6 predicts cardiovascular events in incident peritoneal dialysis patients. *Perit Dial Int J Int Soc Perit Dial* 2015;35(1):35-42.

31. Cho K-H, Do J-Y, Park J-W, Yoon K-W, Kim Y-L. The Effect of Low-GDP Solution on Ultrafiltration and Solute Transport in Continuous Ambulatory Peritoneal Dialysis Patients. *Perit Dial Int* 2013;33(4):382-90.

32. Park JW, Kang SH, Do JY. Effects of low-glucose degradation product solution on peritoneal membrane characteristics in peritoneal dialysis patients: a 3-year follow-up study. *Iran J Kidney Dis* 2014;8(1):58-64.

33. Müller-Krebs S, Kihm LP, Zeier B, Gross ML, Deppisch R, Wieslander A, et al. Renal toxicity mediated by glucose degradation products in a rat model of advanced renal failure. *Eur J Clin Invest* 2008;38(5):296-305.

34. Sarafidis PA, Whaley-Connell A, Sowers JR, Bakris GL. Cardiometabolic syndrome and chronic kidney disease: what is the link? *J Cardiometab Syndr* 2006;1(1):58-65.

35. Catalan MP, Santamaría B, Reyero A, Ortiz A, Egido J, Ortiz A. 3,4-di-deoxyglucosone-3-ene promotes leukocyte apoptosis. *Kidney Int* 2005;68(3):1303-11.

36. Fischer S, Hoernschemeyer J, Mahler H-C. Glycation during storage and administration of monoclonal antibody formulations. *Eur J Pharm Biopharm Off J Arbeitsgemeinschaft Pharm Verfahrenstechnik EV* 2008;70(1):42–50.
37. Quan C, Alcalá E, Petkovska I, Matthews D, Canova-Davis E, Taticek R, et al. A study in glycation of a therapeutic recombinant humanized monoclonal antibody: where it is, how it got there, and how it affects charge-based behavior. *Anal Biochem* 2008;373(2):179–91.
38. ICH Expert working group. Validation of analytical procedures: Text and Methodology Q2(R1) [Internet]. Available from : http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf
39. 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 I. *J Pharm Biomed Anal* 2004;36(3):579–86.
40. 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* 2007;45(1):82–96.
41. Cho Y, Johnson DW, Badve SV, Craig JC, Strippoli GFM, Wiggins KJ. The impact of neutral-pH peritoneal dialysates with reduced glucose degradation products on clinical outcomes in peritoneal dialysis patients. *Kidney Int* 2013;84(5):969–79.
42. Cho Y, Johnson DW, Vesey DA, Hawley CM, Pascoe EM, Clarke M, et al. Baseline serum interleukin-6 predicts cardiovascular events in incident peritoneal dialysis patients. *Perit Dial Int* 2014;
43. Linden T, Cohen A, Deppisch R, Kjellstrand P, Wieslander A. 3,4-Dideoxyglucosone-3-ene (3,4-DGE): A cytotoxic glucose degradation product in fluids for peritoneal dialysis. *Kidney Int* 2002;62(2):697–703.
44. Erixon M, Wieslander A, Lindén T, Carlsson O, Jönsson JA, Simonsen O, et al. 3,4-dideoxyglucosone-3-ene in peritoneal dialysis fluids infused into the peritoneal cavity cannot be found in plasma. *Perit Dial Int* 2009;29 Suppl 2:S28-31.
45. Min JZ, Yamamoto M, Yu H, Higashi T, Toyo'oka T. Rapid and sensitive determination of the intermediates of advanced glycation end products in the human nail by ultra-performance liquid chromatography with electrospray ionization time-of-

flight mass spectrometry. *Anal Biochem* 2012;424(2):187–94.

46. Mittelmaier S, Pischetsrieder M. Multistep Ultrahigh Performance Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry Analysis for Untargeted Quantification of Glycating Activity and Identification of Most Relevant Glycation Products. *Anal Chem* 2011;83(24):9660–8.

47. Mittelmaier S, Fünfroeken M, Fenn D, Berlich R, Pischetsrieder M. Quantification of the six major α -dicarbonyl contaminants in peritoneal dialysis fluids by UHPLC/DAD/MSMS. *Anal Bioanal Chem* 2011;401(4):1183–93.

48. Mittelmaier S, Fünfroeken M, Fenn D, Fichert T, Pischetsrieder M. Identification and quantification of the glucose degradation product glucosone in peritoneal dialysis fluids by HPLC/DAD/MSMS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2010;878(11–12):877–82.

49. Kjellstrand P, Martinson E, Wieslander A, Holmquist B. Development of toxic degradation products during heat sterilization of glucose-containing fluids for peritoneal dialysis: influence of time and temperature. *Perit Dial Int* 1995;15(1):26–32.

50. Mannermaa JP, Muttonen E, Yliruusi J, Määttänen L. The use of different time/temperature combinations in the optimization of sterilization of Ringers/glucose infusion solution. *J Parenter Sci Technol Publ Parenter Drug Assoc* 1992;46(6):184–91.

51. Tovsen ML, Smistad G, Bjerke TM, Tønnesen HH, Kristensen S. Physicochemical Stability of Emulsions and Admixtures for Parenteral Nutrition during Irradiation by Glass-Filtered Daylight at Standardized Conditions. *PDA J Pharm Sci Technol* 2015;69(3):346–54.

52. Anderson W, Harthill JE. The anticoagulant activity of heparins in dextrose solutions. *J Pharm Pharmacol* 1982;34(2):90–6.

53. Jing Q, Lû X. Kinetics of Non-catalyzed Decomposition of Glucose in High-temperature Liquid Water. *Chin J Chem Eng* 2008;16(6):890–4.

54. Taylor RB, Jappy BM, Neil JM. Kinetics of dextrose degradation under autoclaving conditions. *J Pharm Pharmacol* 1972;24(2):121–9.

55. Laidler KJ. *Chemical Kinetics*. 3rd éd. Harper & Row; 1987.

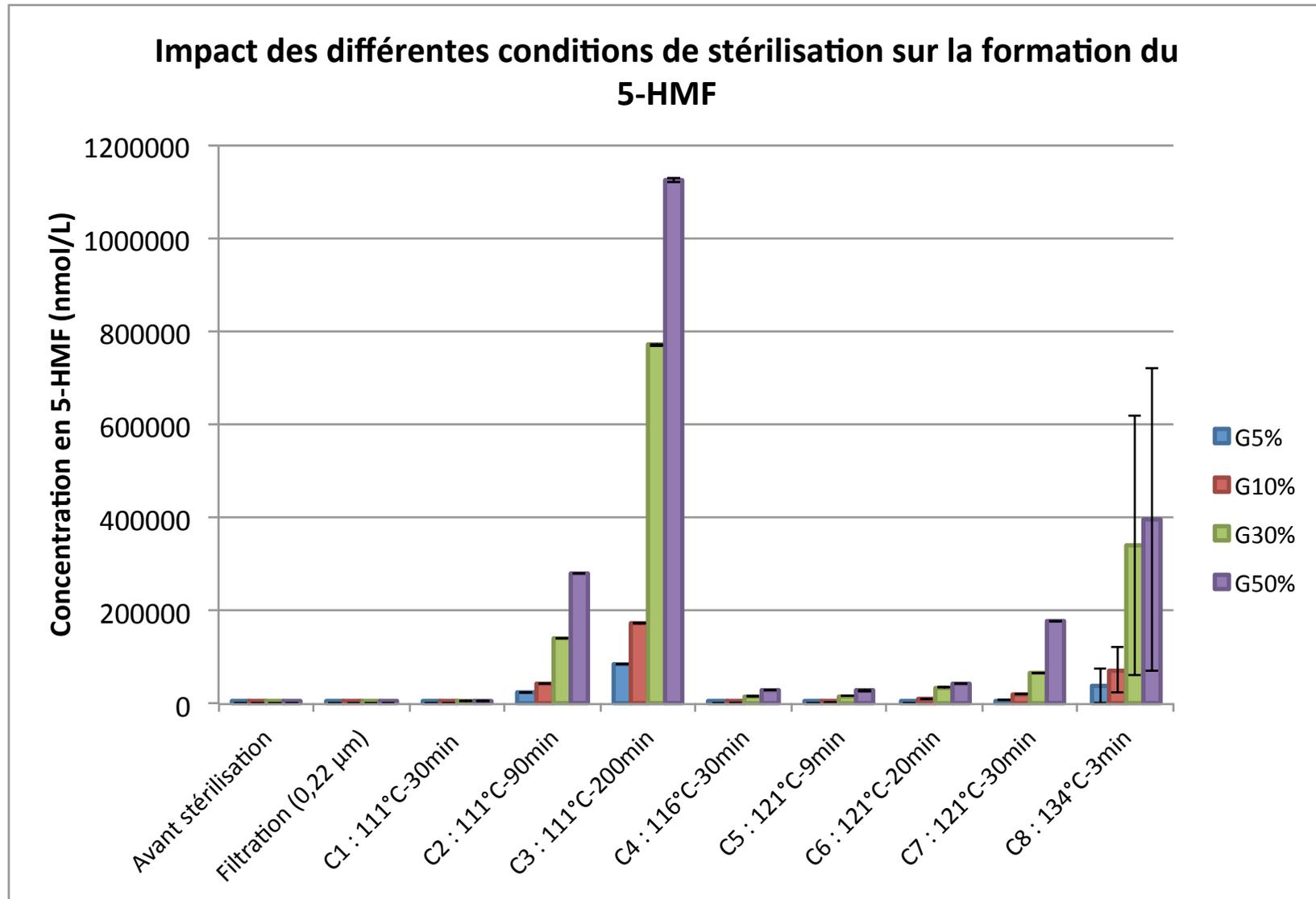
56. Atkins P, de Paula J. *Physical Chemistry*. 8th éd. W.H. Freeman; 2006.

Annexe 1 : Résultats de l'impact de la stérilisation sur les concentrations initiales en 5-HMF (H_0) et en 2-FA (FA_0). G_0 , concentration initiale en glucose, H concentration en 5-HMF et VH, la vitesse de formation du 5-HMF. FA, concentration en 2-FA et VFA, la vitesse de formation du 2-FA. Les concentrations sont exprimées en μM pour le glucose et en nM pour le 5-HMF et le 2-FA et les vitesses en nM/min.

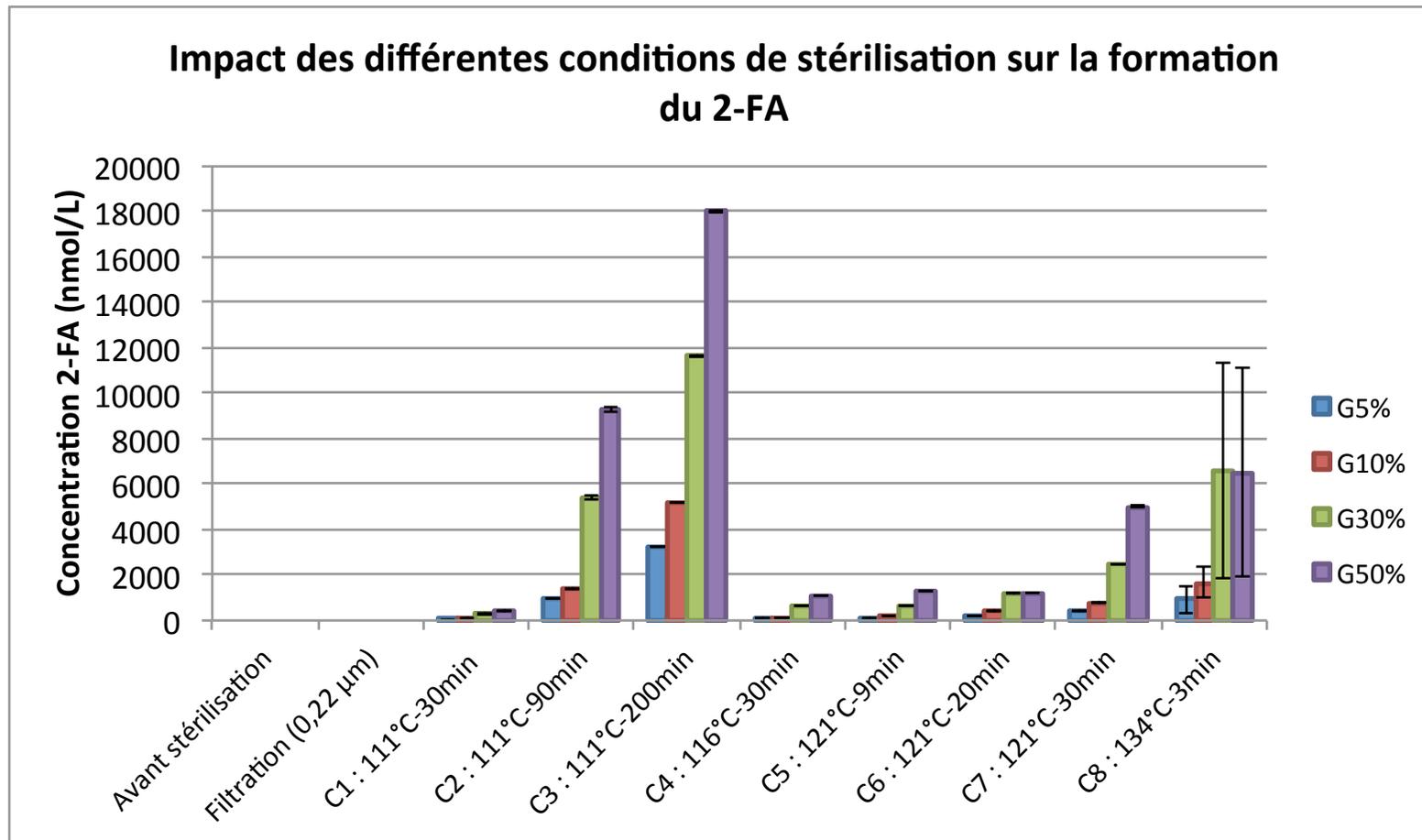
| | Température | F_0 | Durée | G_0 % | G_0 (μM) | H_0 (nM) | H (nM) | VH (nM/min) | FA_0 (nM) | FA (nM) | VFA (nM/min) |
|----------------------|-------------|-------|-------|------------|----------------------------|---------------|-----------|----------------|----------------|------------|-----------------|
| Filtration | 20 | 0 | 1 | 5 | 277531,08 | 79,06 | 68,78 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | - |
| Filtration | 20 | 0 | 1 | 10 | 555062,17 | 69,62 | 76,44 | 6,82 | 0,00 | 0,00 | - |
| Filtration | 20 | 0 | 1 | 30 | 1665186,50 | 161,05 | 175,30 | 14,25 | 0,00 | 0,00 | - |
| Filtration | 20 | 0 | 1 | 50 | 2775310,83 | 399,73 | 451,35 | 51,62 | 0,00 | 0,00 | - |
| C₁ | 111 | 3 | 30 | 5 | 277531,08 | 79,06 | 617,32 | 17,94 | 0,00 | 23,39 | 0,78 |
| C₁ | 111 | 3 | 30 | 10 | 555062,17 | 69,62 | 1418,29 | 44,96 | 0,00 | 57,49 | 1,92 |
| C₁ | 111 | 3 | 30 | 30 | 1665186,50 | 161,05 | 5570,14 | 180,30 | 0,00 | 266,09 | 8,87 |
| C₁ | 111 | 3 | 30 | 50 | 2775310,83 | 399,73 | 6249,15 | 194,98 | 0,00 | 381,52 | 12,72 |
| C₂ | 111 | 9 | 90 | 5 | 277531,08 | 79,06 | 23484,22 | 260,06 | 0,00 | 952,36 | 10,58 |
| C₂ | 111 | 9 | 90 | 10 | 555062,17 | 69,62 | 43301,24 | 480,35 | 0,00 | 1381,11 | 15,35 |
| C₂ | 111 | 9 | 90 | 30 | 1665186,50 | 161,05 | 141078,20 | 1565,75 | 0,00 | 5388,45 | 59,87 |
| C₂ | 111 | 9 | 90 | 50 | 2775310,83 | 399,73 | 278158,22 | 3086,21 | 0,00 | 9269,05 | 102,99 |
| C₃ | 111 | 20 | 200 | 5 | 277531,08 | 79,06 | 83993,74 | 419,57 | 0,00 | 3254,66 | 16,27 |
| C₃ | 111 | 20 | 200 | 10 | 555062,17 | 69,62 | 172517,46 | 862,30 | 0,00 | 5196,00 | 25,02 |

| | | | | | | | | | | | |
|----------------|-----|----|-----|----|------------|--------|-----------|-----------|------|---------|---------|
| C ₄ | 116 | 30 | 9,5 | 5 | 277531,08 | 79,06 | 1519,97 | 151,68 | 0,00 | 80,92 | 8,52 |
| C ₄ | 116 | 30 | 9,5 | 10 | 555062,17 | 69,62 | 2742,59 | 281,36 | 0,00 | 127,74 | 13,45 |
| C ₄ | 116 | 30 | 9,5 | 30 | 1665186,50 | 161,05 | 16981,86 | 1770,61 | 0,00 | 631,42 | 66,47 |
| C ₄ | 116 | 30 | 9,5 | 50 | 2775310,83 | 399,73 | 29945,41 | 3110,07 | 0,00 | 1114,54 | 117,32 |
| C ₅ | 121 | 9 | 9 | 5 | 277531,08 | 79,06 | 2123,28 | 227,14 | 0,00 | 99,40 | 11,04 |
| C ₅ | 121 | 9 | 9 | 10 | 555062,17 | 69,62 | 3283,24 | 357,07 | 0,00 | 174,95 | 19,44 |
| C ₅ | 121 | 9 | 9 | 30 | 1665186,50 | 161,05 | 18099,68 | 1993,18 | 0,00 | 625,94 | 69,55 |
| C ₅ | 121 | 9 | 9 | 50 | 2775310,83 | 399,73 | 27682,25 | 3031,39 | 0,00 | 1305,57 | 145,06 |
| C ₆ | 121 | 20 | 20 | 5 | 277531,08 | 79,06 | 2316,47 | 111,87 | 0,00 | 197,13 | 9,86 |
| C ₆ | 121 | 20 | 20 | 10 | 555062,17 | 69,62 | 10002,06 | 496,62 | 0,00 | 375,51 | 18,78 |
| C ₆ | 121 | 20 | 20 | 30 | 1665186,50 | 161,05 | 36297,04 | 1806,80 | 0,00 | 1215,59 | 60,78 |
| C ₆ | 121 | 20 | 20 | 50 | 2775310,83 | 399,73 | 42979,86 | 2129,01 | 0,00 | 1223,52 | 61,18 |
| C ₇ | 121 | 30 | 30 | 5 | 277531,08 | 79,06 | 8776,49 | 289,91 | 0,00 | 383,96 | 12,80 |
| C ₇ | 121 | 30 | 30 | 10 | 555062,17 | 69,62 | 21896,49 | 727,56 | 0,00 | 792,83 | 26,43 |
| C ₇ | 121 | 30 | 30 | 30 | 1665186,50 | 161,05 | 65890,07 | 2190,97 | 0,00 | 2460,20 | 82,01 |
| C ₇ | 121 | 30 | 30 | 50 | 2775310,83 | 399,73 | 176496,66 | 5869,90 | 0,00 | 5005,78 | 166,86 |
| C ₈ | 134 | 60 | 3 | 5 | 277531,08 | 79,06 | 38021,86 | 12647,60 | 0,00 | 928,84 | 309,61 |
| C ₈ | 134 | 60 | 3 | 10 | 555062,17 | 69,62 | 72671,89 | 24200,76 | 0,00 | 1622,98 | 540,99 |
| C ₈ | 134 | 60 | 3 | 30 | 1665186,50 | 161,05 | 339678,78 | 113172,58 | 0,00 | 6621,67 | 2207,22 |
| C ₈ | 134 | 60 | 3 | 50 | 2775310,83 | 399,73 | 395537,04 | 131712,44 | 0,00 | 6488,07 | 2162,69 |

Annexe 2a : Représentation graphique de l'impact de la stérilisation sur les concentrations initiales en 5-HMF (H0) en fonction des conditions de stérilisation. Les concentrations sont exprimées en nmol/L.



Annexe 2b : Représentation graphique de l'impact de la stérilisation sur les concentrations initiales en 2-FA (FA_0) en fonction des conditions de stérilisation. Les concentrations sont exprimées en nmol/L.





DEMANDE D'AUTORISATION DE SOUTENANCE

Nom et Prénom de l'étudiant : HAYBRARD Julie

Date, heure et lieu de soutenance :

Le 22 03 2017 à 16 .h..... Amphithéâtre ou salle : CURIE
jour mois année

Avis du conseiller (directeur) de thèse

Nom : ODU

Prénom : Pascal

Favorable

Défavorable

Motif de l'avis défavorable :

Date : 20/07/17
Signature:

Avis du Président de Jury

Nom : Ducardin

Prénom : Bertrand

Favorable

Défavorable

Motif de l'avis défavorable :

Date : 13/7/17
Signature:

Décision de Monsieur le Doyen

Favorable

Défavorable

Le Doyen

D. CUNY

NB : La faculté n'entend donner aucune approbation ou improbation aux opinions émises dans les thèses, qui
être regardées comme propres à leurs auteurs.

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 2016/2017

Nom : HAYBRARD

Prénom : Julie

Titre du mémoire / thèse : Impact du mode stérilisation sur la formation des produits de dégradation du glucose dans les solutions glucosées injectables.

Mots-clés : Glucose ; Produits de dégradation du glucose ; 5-hydroxyméthyl-2-furaldéhyde ; 2-furaldéhyde ; CLHP-UV ; Stérilisation ; Modélisation ;

Résumé :

Les solutions glucosées injectables sont employées quotidiennement dans les hôpitaux et dans l'ensemble des services de soins comme solution d'hydratation, diluant et composant de la nutrition parentérale. Ces solutions, à destination intraveineuse, sont stérilisées par la chaleur humide (recommandations de la pharmacopée européenne) qui est connue pour favoriser la formation de produits de dégradation du glucose (PDG) dont l'impact délétère sur l'homéostasie cellulaire, le système cardiovasculaire et rénal a été démontré. Ce travail porte sur l'impact de différents modes de stérilisation sur des solutions glucosées et la mise en évidence des facteurs influençant la formation des PDG.

Après la mise au point et la validation d'une méthode de dosage par CLHP-UV permettant la quantification de deux PDG considérés comme de bons marqueurs de la dégradation du glucose, le 5-hydroxyméthyl-2-furaldéhyde (5-HMF) et le 2-furaldéhyde (2-FA), 8 cycles de stérilisation à chaud ont été réalisés. 3 paramètres de stérilisation ont été étudiés : la température (111°C, 116°C, 121°C et 134°C), la durée (3, 9, 20, 30, 90 et 200 min) et l'effet stérilisant F_0 (3, 9, 9,5, 20, 30 et 60 min). Une 9^{ème} stérilisation, celle-ci à froid, a été réalisée à l'aide d'un filtre 0,22 µm. Une analyse par régression multiple a été effectuée permettant de modéliser l'influence des paramètres de la stérilisation tels que la concentration en glucose, la température du cycle et l'effet stérilisant (F_0).

La stérilisation par filtration ne semble pas générer une formation significative de PDG. La stérilisation à chaud, quant à elle, a un impact sur la formation des deux PDG. L'analyse des paramètres montre que la vitesse de formation des PDG est corrélée à la température du cycle, à l'effet stérilisant F_0 et à la concentration en glucose. Ceci permet de définir les conditions optimales de stérilisation par la chaleur qui sont de se placer à la température la plus élevée pour un F_0 donné, afin d'avoir la durée de stérilisation la plus courte possible.

Au regard de la toxicité démontrée de ces produits et de l'impact de la stérilisation sur la formation des PDG, il semble important d'inclure, lors des achats hospitaliers des solutions glucosées injectables, les conditions de stérilisation utilisées sur les contenants afin de minimiser au maximum l'administration de PDG aux patients.

Directeur du mémoire :

Pr. Pascal ODOU, PU-PH, Faculté de Pharmacie – CHRU, Lille

Membres du jury :

Président :

Pr. Bertrand DÉCAUDIN, PU-PH, Faculté de Pharmacie – CHRU Lille

Assesseur(s) :

Dr. Frédéric MARÇON, MCU-PH, Faculté de Pharmacie – CHU Amiens

Dr. Sébastien NEUVILLE, PH, Institut de Pharmacie – CHRU Lille