

**MEMOIRE**  
**POUR LE DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES**  
**DE**  
**PHARMACIEN HOSPITALIER ET DES COLLECTIVITES**

**Soutenu publiquement le 28 Septembre 2018**  
**Par MME.ROCHE Marine**

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

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

---

**Mise en œuvre et contrôle qualité d'une solution de fructose et de**  
**glycérol destinée à l'endoscopie digestive**

---

**Membres du jury :**

**Président :**

**Odou Pascal**, Pharmacien, Professeur des Universités – Praticien Hospitalier,  
Faculté des sciences pharmaceutiques et biologiques, Université Lille 2 – Pharmacie  
CHU de Lille

**Assesseur(s) :**

**Lannoy Damien**, Pharmacien, Maître de Conférences des Universités-Praticien  
Hospitalier, Faculté des sciences pharmaceutiques et biologiques, Université Lille 2 –  
Pharmacie CHU de Lille

**Chillon Jean-Marc**, Pharmacien, Professeur des Universités-Praticien Hospitalier,  
UFR de pharmacie, Université de Picardie Jules Verne - CHU Amiens Picardie

**Branche Julien**, Gastro-entérologue, Praticien Hospitalier, Service Maladies de  
l'Appareil Digestif Hôpital Huriez - CHU 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 de Lille

Président :	Jean-Christophe CAMART
Premier Vice-président :	Damien CUNY
Vice-présidente Formation :	Lynne FRANJIÉ
Vice-président Recherche :	Lionel MONTAGNE
Vice-président Relations Internationales :	François-Olivier SEYS
Directeur Général des Services :	Pierre-Marie ROBERT
Directrice Générale des Services Adjointe :	Marie-Dominique SAVINA

### Faculté de Pharmacie

Doyen :	Bertrand DÉCAUDIN
Vice-Doyen et Assesseur à la Recherche :	Patricia MELNYK
Assesseur aux Relations Internationales :	Philippe CHAVATTE
Assesseur à la Vie de la Faculté et aux Relations avec le Monde Professionnel :	Thomas MORGENROTH
Assesseur à la Pédagogie :	Benjamin BERTIN
Assesseur à la Scolarité :	Christophe BOCHU
Responsable des Services :	Cyrille PORTA

### Liste des Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	ALLORGE	Delphine	Toxicologie
M.	BROUSSEAU	Thierry	Biochimie
M.	DÉCAUDIN	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
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	Lab. de Médicaments et Molécules
Mme	DEPREZ	Rebecca	Lab. 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.	WILLAND	Nicolas	Lab. 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	Lab. de Médicaments et Molécules
M.	BRIAND	Olivier	Biochimie
M.	CARNOY	Christophe	Immunologie
Mme	CARON	Sandrine	Biologie cellulaire
Mme	CHABÉ	Magali	Parasitologie
Mme	CHARTON	Julie	Lab. 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
M.	DHIFLI	Wajdi	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	Lab. de Médicaments et Molécules
Mme	FOULON	Catherine	Chimie Analytique
M.	FURMAN	Christophe	ICPAL
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
M.	MORGENROTH	Thomas	Législation
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	Lab. de Médicaments et Molécules
M.	WELTI	Stéphane	Sciences végétales et fongiques
M.	YOUS	Saïd	Onco et Neurochimie
M.	ZITOUNI	Djamel	Biomathématiques

### 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.	DAO PHAN	Hai Pascal	Lab. Médicaments et Molécules
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	DEMARET	Julie	Immunologie
Mme	HENRY	Héloïse	Biopharmacie
Mme	MASSE	Morgane	Biopharmacie

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

## REMERCIEMENTS

Professeur Pascal Odou, merci pour tout ce que vous m'avez apporté tout au long de ma formation, de m'avoir permis de suivre les cours de votre Master 2 et m'avoir donné l'envie de continuer dans la recherche, le secteur des préparations et de leur contrôle. Merci également pour vos conseils et votre disponibilité. Vous me faites aujourd'hui l'honneur de présider le jury de thèse. Soyez assuré de ma reconnaissance.

Docteur Damien Lannoy, merci infiniment de m'avoir proposé ce sujet de thèse passionnant et de m'avoir permis de découvrir les possibilités de recherche associées aux préparations pharmaceutiques. C'est toujours un plaisir de travailler avec vous, en tant qu'étudiant de M2, interne au préparatoire, étudiant en thèse...Et ce n'est pas fini !

Professeur Jean-Marc Chillon, vous me faites l'honneur de juger ce travail, soyez assuré de ma reconnaissance.

Docteur Julien Branche, merci de votre gentillesse, de vos réponses et de votre disponibilité. Surtout merci de solliciter la pharmacie pour des demandes de préparations et de nous proposer de nouveaux défis à relever, sans vous cette thèse n'aurait pas pu exister.

Docteur Christophe Berneron, merci tout d'abord pour tout ce que j'ai appris à vos côtés au cours de ces quatre années d'internat, pour votre gentillesse, vos conseils et votre bonne humeur ainsi que le plaisir de venir travailler avec vous. Merci de la confiance que vous m'accordez. J'espère avoir la chance de travailler encore longtemps avec vous.

Florence, Je n'ai pas de mots assez justes pour t'exprimer ma reconnaissance. Tu m'as tout appris sur l'analytique, tu as été d'une aide inestimable pour mon master, ma thèse, le stage au laboratoire de contrôle. Je suis heureuse d'avoir pu travailler avec toi et j'espère que nous continuerons à nous voir de temps en temps !

Merci à l'équipe des docteurs Anne-Frédérique Dessein et Farid Zerimech, pour leur gentillesse et leur aide précieuse dans le dosage du fructose et du glycérol et en particulier à Jordan et Emilie pour la réalisation des dosages et leur accueil.

Carole, Merci pour les six mois de stage en ta compagnie, j'ai beaucoup appris avec toi. Merci pour ton écoute et tes conseils autant dans le domaine professionnel que privé ! Merci de m'avoir rassurée, d'avoir été ma référence « rédaction de thèse express », de m'avoir fait rêver avec tes voyages et pour ta bonne humeur ! J'espère pouvoir travailler encore longtemps avec toi !

Merci à l'équipe du préparatoire pour cette année passée à vos côtés, tout ce que j'ai appris grâce à vous, l'aide et le soutien pour ma thèse : Myriam, Vanessa, Valérie, Noémie, Marine, Maïté, Justine, Lisa, Guillaume, Pascal. Merci pour tout et merci pour les pauses « médicament » !

Loïc, merci pour tout ce que j'apprends à tes côtés depuis que je suis arrivée au laboratoire de contrôle, merci d'être ce collègue avec qui j'ai plaisir à travailler ! Et merci pour ton aide lors de la validation de méthode !

Christine, merci de m'avoir tout appris de l'Ultimate 3000 lors de mon stage de master, et merci pour ces agréables discussions ! J'espère te voir de temps en temps au laboratoire de contrôle !

Merci à tous mes maîtres de stage qui m'ont apporté leurs connaissances et sans qui je ne serais pas la même aujourd'hui :

**Stéphanie Belaiche**, merci de m'avoir fait découvrir la pharmacie clinique, les spécificités de l'hospitalisation à domicile et pour la rigueur que tu m'as enseignée. Tu m'as transmis le goût de l'échange interprofessionnel.

**Monsieur Mazaud**, merci pour votre bienveillance et de m'avoir fait découvrir le circuit des achats et approvisionnements hospitaliers. Les ruptures n'ont plus de secret pour moi maintenant !

**Clarisse, Lydie**, merci pour les réponses à mes questions sur les marchés, les pauses dans votre bureau et votre gentillesse !

**Monsieur Simon**, merci de votre aide et votre encadrement lors de mon master, je me réjouis de travailler de nouveau avec vous prochainement.

**Julien Boyer, Jérôme Aubert**, merci de m'avoir accueilli au sein de ce secteur si dynamique ! J'ai passé six mois riches en découvertes et pleins de projets intéressants à vos côtés.

**Perrine Drancourt**, merci pour ces six mois de stages en ta compagnie, de m'avoir fait découvrir la « pharmacie clinique des DM », mon stage n'aurait pas été le même sans toi et j'ai gagné une amie en or !

**Jean Giraud, Céline Pingaud**, merci de votre accueil chaleureux, de m'avoir transmis vos connaissances, et découvrir les chimiothérapies. Merci aussi pour votre humanité et votre gentillesse.

**Anne-Judith Waligora-Dupriet**, pour m'avoir ouvert les portes de son laboratoire et m'avoir offert le premier contact avec la recherche.

**Amélie Lansiaux, Abigaël Gros, Samuel Meignan**, pour m'avoir fait tomber amoureuse de la recherche lors de mon stage de master 1.

**Heather Jørgensen, Tessa Holyoake** pour votre accueil bienveillant dans votre laboratoire à Glasgow en tant qu'externe.

**Monsieur et Madame Ulrich, Alexandra**, pour tous ces stages dans votre officine, pour la transmission de votre passion pour votre métier et pour tout le reste !

Merci à tous ceux avec qui j'ai pu échanger, travailler, discuter pendant toutes ces années : Merci à l'équipe de l'appro (Carole, Isabelle, Gaëtan, Patricia, Sophie), à l'équipe des DM de Valenciennes, L'équipe de la pharmacie de Saint Vincent de Paul (Sylvie, Valérie, Céline, Mylène, et tous les autres !) et du service d'hémato oncologie, l'équipe de la pharmacie du CHU, celle de bactériologie environnementale du CBP (Alex, Lou), vous avez été ma deuxième famille.

Merci à mes co-internes avec qui j'ai tout vécu, partagé les petites galères et les grands bonheurs, merci pour ces moments d'amitié et de bonne humeur !  
Merci à **Héloïse**, tu es une amie en or et un modèle pour moi.  
**Marion**, un de mes piliers depuis le début de l'internat, **Perrine, Lucie, Valentine**, pour les soirées, les séminaires, les parties de tarot...  
**Adeline, France, Agathe**, de superbes vacances et sorties avec vous, j'espère qu'il y en aura d'autres !  
Mes compères de master et amis **Elodie, Matthieu, Terry**.  
Merci à **Marie** d'avoir été ma complice de manips (mais pas que !) cette année et ton aide précieuse !  
Et tous mes amis internes dont je ne peux citer que quelques noms **Hélène, Marie, Elodie, Basile, Benjamin, Myriam, Victoria, Julie, Quentin, Edouard, Alexandre**...

Merci à mes amis :

**Amaury**, parce que tu es mon plus vieil ami, parce que tu es toujours là pour moi et que tu fais du bien à ma vie ! Merci d'avoir relu ma thèse aussi ! **Aurélié**, ma carissima amica toujours auprès de moi après tout ce temps, tellement de souvenirs inoubliables partagés avec toi, j'espère qu'il y en aura encore beaucoup d'autres. **Charlotte** parce qu'on a vécu tellement de choses ensemble qu'on se connaît par cœur, et on se ressemble tellement, mon double ! **Estelle**, parce que depuis le collège on ne s'est pas lâchées, et même si on se voit moins souvent on s'aime toujours pareil. **Franck, Matthieu**, mes médecins généralistes préférés pour ces moments passés avec vous. **Hélène, Lucie**, parce que vous êtes toujours partantes pour un restau, un verre ou une soirée sushis ! **Marina** parce que tu es ma belle rencontre de ces études de pharma !

Merci à ma famille :

Papa, Maman, vous avez été d'un soutien sans faille dans tous les domaines de ma vie. Sans vous je ne serais pas là aujourd'hui ni celle que je suis. Merci de m'aimer et de m'aider à être meilleure.  
Merci à mes sœurs extraordinaires : Alice, Clémence, vous êtes mes amours et mes complices de toujours, mes meilleures supportrices aussi ! Et merci à Pierre, mon super beau-frère !  
Merci à mes cousins : Pauline, Nicolas, Matthieu pour ces vacances magiques passées avec vous à chaque fois, à Aurélien et Alexis pour les jeux partagés.  
Merci à mes oncles et tantes, Alain, Christine, Marion.  
Merci à mes grands-parents en or grâce à qui j'ai grandi entourée de tant d'amour :  
Mamie, tu m'as fait découvrir et aimer les peintres, le théâtre, la lecture et tant d'autres choses !  
Grand mie merci de ta joie de vivre, pour ces moments passés ensemble à Paris ou Antibes.  
Bon papa, de m'avoir appris depuis mon plus jeune âge que l'épistémologie est la connaissance critique de la connaissance.  
Grand père, tu n'es plus là aujourd'hui mais tu es toujours à mes côtés, mon ange gardien.

# SOMMAIRE

<b>SOMMAIRE</b> .....	<b>10</b>
<b>LISTE DES ABBREVIATIONS</b> .....	<b>12</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>14</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	<b>15</b>
<b>LISTE DES ANNEXES</b> .....	<b>16</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>17</b>
<b>FAISABILITE</b> .....	<b>19</b>
I.    ASPECTS CLINIQUES .....	19
A. <i>Anatomie de la paroi digestive et classifications des tumeurs digestives précoces</i> .....	19
B. <i>Technique opératoire</i> .....	21
1.    Mucosectomie endoscopique (EMR) <sup>[20,27-34]</sup> .....	21
2.    Dissection sous muqueuse (ESD) <sup>[6,8,15-18,34,36-40]</sup> .....	23
3.    Indications: .....	24
4.    Besoins .....	26
5.    Solutions disponibles .....	27
II.   ASPECTS TECHNIQUES .....	30
A. <i>Mode de préparation</i> .....	30
B. <i>Modalités de production</i> .....	30
<b>CONTRÔLE QUALITE DE LA PREPARATION</b> .....	<b>32</b>
I.    ELEMENTS GENERAUX .....	32
I.    MATERIEL ET METHODES .....	32
A. <i>Produits chimiques et réactifs</i> .....	32
B. <i>Dosage du fructose et du glycérol</i> .....	33
C. <i>Développement de la méthode analytique de dosage du 5HMF et 2FA</i> .....	34
1.    Système chromatographique .....	34
2.    Conditions chromatographiques .....	35
3.    Effet matrice .....	35
4.    Solutions mères .....	36
5.    Préparation des échantillons pour analyse .....	37
D. <i>Validation de méthode-LOD/LOQ</i> .....	38
E. <i>Etude de stabilité a minima</i> : .....	39
1.    Essai de stérilité : .....	40
2.    Endotoxines : .....	40
3.    Caractères organoleptiques : .....	41
4.    pH : .....	41
5.    Osmolalité : .....	41
6.    Comptage des particules non visibles : .....	41
F. <i>Expression des résultats et analyse des données</i> .....	41
<b>RESULTATS</b> .....	<b>43</b>
I.    EFFET MATRICE .....	43
II.   VALIDATION DE LA METHODE ANALYTIQUE .....	44
III.  ETUDE DE STABILITE .....	46
A. <i>Dosage fructose et glycérol</i> .....	46
B. <i>Dosage 5HMF et 2FA</i> .....	47
C. <i>Essai de stérilité</i> .....	48
D. <i>Essai des endotoxines bactériennes</i> .....	48
E. <i>Caractères organoleptiques</i> .....	48
F. <i>pH</i> .....	48
G. <i>Osmolalité</i> .....	48
H. <i>Particules non visibles</i> : .....	49
<b>DISCUSSION</b> .....	<b>50</b>
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</b> .....	<b>55</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>56</b>

<b>ANNEXE 1 : PLACE DE L'EMR ET L'ESD DANS LA PRISE EN CHARGE DES TUMEURS DE L'ŒSOPHAGE (1/2).....</b>	<b>63</b>
<b>ANNEXE 2 : PLACE DE L'EMR ET L'ESD DANS LA PRISE EN CHARGE DES TUMEURS DE L'ŒSOPHAGE (2/2).....</b>	<b>64</b>
<b>ANNEXE 3 : PLACE DE L'EMR ET L'ESD DANS LA PRISE EN CHARGE DES TUMEURS GASTRIQUES .....</b>	<b>65</b>
<b>ANNEXE 4 : PLACE DE L'EMR ET L'ESD DANS LA PRISE EN CHARGE DES TUMEURS COLIQUES.....</b>	<b>66</b>
<b>ANNEXE 5 : PLACE DE L'EMR ET L'ESD DANS LA PRISE EN CHARGE DES TUMEURS RECTALES .....</b>	<b>67</b>
<b>ANNEXE 6 : RESUME DES ETUDES EX VIVO ET IN VIVO CHEZ L'ANIMAL (1/3) .....</b>	<b>68</b>
<b>ANNEXE 7 : RESUME DES ETUDES EX VIVO ET IN VIVO CHEZ L'ANIMAL (2/3) .....</b>	<b>69</b>
<b>ANNEXE 8 : RESUME DES ETUDES EX VIVO ET IN VIVO CHEZ L'ANIMAL (3/3) .....</b>	<b>70</b>
<b>ANNEXE 9 : RESUME DES ETUDES MULTICENTRIQUES (1/2).....</b>	<b>71</b>
<b>ANNEXE 10 : RESUME DES ETUDES MULTICENTRIQUES (2/2).....</b>	<b>72</b>
<b>ANNEXE 11 : RESUME DES ETUDES MONOCENTRIQUES (1/2) .....</b>	<b>73</b>
<b>ANNEXE 12 : RESUME DES ETUDES MONOCENTRIQUES (2/2) .....</b>	<b>74</b>
<b>ANNEXE 13 : RESUME DES META-ANALYSES .....</b>	<b>75</b>
<b>ANNEXE 14 : AIDE A L'INTERPRETATION DE L'ESSAI DES ENDOTOXINES BACTERIENNES (MANUEL CHARLES RIVER) .....</b>	<b>76</b>
<b>ANNEXE 15 : RESULTATS DES ESSAIS DES ENDOTOXINES BACTERIENNES (SOLUTIONS PURES) .....</b>	<b>77</b>
<b>ANNEXE 16 : RESULTATS DES ESSAIS DES ENDOTOXINES BACTERIENNES (SOLUTIONS DILUEES 1/50<sup>E</sup>) .....</b>	<b>78</b>
<b>ANNEXE 17 : FICHE DE FABRICATION DES SOLUTIONS DE FRUCTOSE 5% ET GLYCEROL 10% (HOPITAL E. HERRIOT, LYON) .....</b>	<b>79</b>

## LISTE DES ABBREVIATIONS

2FA : 2- furaldéhyde

5HMF : 5-hydroxyméthylfurfural

a : pente de la fonction de réponse validée

$\sigma^2$  : Variance

ACSB : n-(4-Antipyril)-3-Chloro-5-Sulphonate-p-Benzoquinoneimine

ADP : Adénosine DiPhosphate

AGE : *Advanced Glycation End products* (Produits terminaux de la glycation)

ATP : Adénosine TriPhosphate

BPP : Bonnes Pratiques de Préparation

CBP : Centre de Biologie et Pathologie

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

CLHP : Chromatographie liquide haute performance

CMC : Carboxyméthylcellulose

CV : Coefficient de variation

DCHBS : 3,5-DiChloro-2-HydroxyBenzène Sulphonate acide

EMR: *Endoscopic Mucosal Resection*, mucosectomie endoscopique

EMR-C: *Cap assisted EMR*

EMR-L : *EMR with Ligation*

ep. : Epithélium

EPPI : Eau pour Préparation Injectable

ESD: *Endoscopic Submucosal Dissection*

ESGE: *European Society of Gastrointestinal Endoscopy*

EUS : Ultrasons par endoscopie (*Endoscopic Ultrasound*)

EVA : copolymère d'Éthylène et d'Acétate de Vinyle

G6P-DH : Glucose-6-phosphate Déshydrogénase

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

GK : Glycérol Kinase

GPO : Glycérol Phosphate Oxydase

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : Peroxyde d'hydrogène

HFAL : Hotte à flux d'air laminaire

HK : HexoKinase

HPMC: Hydroxypropylméthylcellulose

ICH: *International Conference on Harmonization*

INCa : Institut National du Cancer

J0 : Immédiatement après préparation

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : Dihydrogénophosphate de potassium

LOD : *Limit of Detection* (limite de détection)

LOQ : *Limit of quantification* (limite de quantification)

l.p. : Lamina Propria

M5 : 5 mois après préparation

MeOH : Méthanol

m.m : Musculaire Muqueuse

m.p. : Muscularis Propria

NaCl : Chlorure de sodium

NADP : Nicotinamide-Adénine Dinucléotide Phosphate

NADPH : Nicotinamide-Adénine Dinucléotide Phosphate réduit

PE : Pharmacopée Européenne

PGI : Phospho-Glucose-Isomérase

POD : Peroxydase

QC : Contrôle qualité (*Quality control*)

R0 : Résection complète avec marges histologiques suffisantes

Sd : Ecart type (*Standard deviation*)

SFSTP : Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques

SFPC : Société Française de Pharmacie Clinique

s.m. : sous muqueuse

TNM : *Tumor Node Metastasis* (Tumeur, Ganglion lymphatique, Métastase)

UPLC : *Ultra Performance Liquid Chromatography* (Chromatographie liquide ultra haute performance)

U sm+N/+ : résultats des ultrasons suggérant une invasion sous muqueuse ou des ganglions lymphatiques

ZAC : Zone à atmosphère contrôlée

## LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Subdivision des cancers digestifs précoces en fonction du degré d'envahissement de la paroi du tube digestif .....	19
Figure 2 : Stade TNM en fonction du degré d'envahissement des tumeurs digestives .....	20
Figure 3 : Classification de Paris des lésions superficielles du tube digestif .....	20
Figure 4 : Différentes techniques utilisées pour l'EMR.....	22
Figure 5 : Différentes étapes de la dissection sous muqueuse.....	23
Figure 6 : Arbre décisionnel concernant la prise en charge des tumeurs digestives superficielles proposé par <i>l'European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE)</i> .....	24
Figure 7 : Profil d'exactitude à 95% - 5HMF.....	45
Figure 8 : Profil d'exactitude à 95% - 2FA.....	45
Figure 9 : Concentrations en fructose et glycérol des préparations immédiatement après leur production et après 5 mois de conservation.....	46
Figure 10 : Chromatogrammes des solutions de fructose 5% et glycérol 10% dans NaCl 0,9% dilués au 1/50 <sup>e</sup> dans la phase mobile.....	47
Figure 11 : Dégradation du Fructose en 5HMF.....	52
Figure 12 : Dégradation du 5HMF en 2FA d'après.....	52

## **LISTE DES TABLEAUX**

Tableau I : Conditions chromatographiques de l'analyse.....	37
Tableau II : Préparation de la gamme d'étalonnage sans matrice.....	37
Tableau III : Préparation de la gamme d'étalonnage avec matrice.....	38
Tableau IV : Préparation des QC avec matrice.....	38
Tableau V : Evaluation de l'effet matrice pour le 5HMF.....	43
Tableau VI : Evaluation de l'effet matrice pour le 2FA.....	43
Tableau VII : Résultats des coefficients de variation (CV) : CV Répétabilité et CV Fidélité intermédiaire pour les QC du 5HMF.....	44
Tableau VIII : Résultats des coefficients de variation (CV) : CV Répétabilité et CV Fidélité intermédiaire pour les QC du 2FA.....	44
Tableau IX : Paramètres de la droite de régression et Limite de détection (LOD) et de quantification (LOQ) du 5HMF et du 2FA.....	44
Tableau X : Comparaison du comptage particulaire non visible des solutions de fructose 5% et glycérol 10% dans NaCl 0,9% à J0 et M5.....	49

## LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Place de l'EMR et la ESD dans la prise en charge des tumeurs de l'œsophage (1/2) : Carcinomes épidermoïdes.....	63
Annexe 2 : Place de l'EMR et la ESD dans la prise en charge des tumeurs de l'œsophage (2/2) : Œsophage de Barrett.....	64
Annexe 3 : Place de l'EMR et la ESD dans la prise en charge des tumeurs gastriques.....	65
Annexe 4 : Place de l'EMR et la ESD dans la prise en charge des tumeurs coliques.....	66
Annexe 5 : Place de l'EMR et la ESD dans la prise en charge des tumeurs rectales.....	67
Annexe 6 : Résumé des études ex vivo et in vivo chez l'animal (1/3).....	68
Annexe 7 : Résumé des études ex vivo et in vivo chez l'animal (2/3).....	69
Annexe 8 : Résumé des études ex vivo et in vivo chez l'animal (3/3).....	70
Annexe 9 : Résumé des études multicentriques (1/2).....	71
Annexe 10 : Résumé des études multicentriques (2/2).....	72
Annexe 11 : Résumé des études monocentriques (1/2).....	73
Annexe 12 : Résumé des études monocentriques (2/2).....	74
Annexe 13 : Résumé des méta-analyses.....	75
Annexe 14 : Aide à l'interprétation de l'essai des endotoxines bactériennes (manuel Charles River).....	76
Annexe 15 : Résultats des essais des endotoxines bactériennes (solutions pures).....	77
Annexe 16 : Résultats des essais des endotoxines bactériennes (solutions diluées 1/50 <sup>e</sup> ).....	78
Annexe 17 : Fiche de fabrication des solutions de fructose 5% et glycérol 10% (Hôpital E. Herriot,Lyon).....	79

# INTRODUCTION

Les cancers de la sphère digestive sont fréquents et représentent une cause importante de mortalité dans le monde et en France.

A l'échelle mondiale, en 2012 l'organisation mondiale de la santé a estimé à 456000 nouveaux cas (3% des cancers) de cancer de l'œsophage (8<sup>e</sup> rang des cancers au niveau mondial) et 400 000 décès (5% des cancers), 952000 nouveaux cas (7%) de cancer de l'estomac (5<sup>e</sup>) et 723000 décès (9%), et 1 360 600 nouveaux cas (10%) de cancer colorectal (3<sup>e</sup> rang des cancers chez l'homme et 2<sup>e</sup> chez la femme) et 694 000 décès (4<sup>e</sup> cause de décès par cancer).<sup>[1]</sup> Les cancers de l'œsophage et de l'estomac surviennent très majoritairement dans les pays d'Asie tandis que le cancer colorectal concerne principalement les pays industrialisés d'Europe centrale<sup>[1]</sup>.

En 2017, l'Institut national du cancer (INCa) a estimé à 4840 nouveaux cas de cancer de l'œsophage (15<sup>e</sup> rang des cancers en terme d'incidence) et 3225 décès (10<sup>e</sup> position en terme de mortalité par cancer), 6620 nouveaux cas de cancer de l'estomac (13<sup>e</sup>) et 4440 décès (8<sup>e</sup>), et 44870 nouveaux cas de cancer colorectal (4<sup>e</sup>) et 17680 décès (2<sup>e</sup>)<sup>[2]</sup>.

La mise en œuvre d'une surveillance endoscopique des lésions néoplasiques permet de détecter les tumeurs à un stade précoce puisque la plupart de ces lésions apparaissent au niveau de la lumière digestive<sup>[3]</sup>. Les lésions néoplasiques superficielles du tube digestif (lésions T1 selon la classification *Tumor Node Metastasis* ou TNM<sup>[4-6]</sup>) sont celles limitées à la muqueuse ou à la sous-muqueuse. Elles sont généralement de meilleur pronostic et peuvent être traitées grâce à des méthodes non chirurgicales.

Depuis les années 1980, deux techniques endoscopiques de résection des tumeurs superficielles du tube digestif ont été développées, d'abord au Japon puis en Europe. Il s'agit de la mucosectomie (*Endoscopic Mucosal Resection* ou EMR) et de la dissection sous muqueuse (*Endoscopic Submucosal Dissection* ou ESD). Ces deux techniques requièrent l'injection sous-muqueuse d'un liquide. Ce liquide permet de créer un « coussin » entre la sous-muqueuse et la paroi musculieuse ; ainsi cela limite le risque de perforation et d'hémorragie tout en facilitant la résection de la lésion. Ces techniques présentent l'avantage par rapport aux précédentes techniques endoscopiques de permettre une résection monobloc (soit en une seule pièce opératoire) de lésions digestives de taille plus importante ou non polypoïdes.

Si l'EMR et l'ESD sont de plus en plus utilisées et intégrées au sein des recommandations de prise en charge émises par les sociétés savantes<sup>[7-14]</sup> et les autorités de santé<sup>[15-18]</sup>, il n'existe pas de recommandation concernant le liquide à utiliser pour surélever la lésion et aucune spécialité n'est actuellement disponible en France dans cette indication.

Le liquide de référence injectées en sous-muqueux doit permettre la conduction du courant. Il doit permettre de maintenir une surélévation satisfaisante pendant toute la durée de l'intervention tout en limitant le nombre d'injections nécessaire à ce maintien. Il doit donc présenter une légère viscosité, afin de ne pas diffuser trop rapidement dans les tissus<sup>[7,19,20]</sup>. Le liquide injecté doit également être conforme à la monographie des formes à usage parentéral<sup>[21]</sup>.

En l'absence de spécialité disponible dans cette indication, les endoscopistes ont recours soit à des spécialités disponibles pour d'autres indications, par exemple le chlorure de sodium (NaCl) ou l'hydroxyéthylamidon (Voluven® soluté de remplissage colloïde). Certaines spécialités qui sont citées telles que le Glyceol® (mélange de fructose et de glycérol dans du chlorure de sodium isotonique) ne sont disponibles qu'au Japon pour traiter les œdèmes intracrâniens ou réduire la pression intraoculaire. Dans ces situations, le recours à une préparation hospitalière réalisée au sein de l'établissement est possible<sup>[6,19]</sup>.

Le Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Lille prend en charge un à deux patients chaque semaine pour résection endoscopique de tumeur de l'ensemble du tractus digestif (90% EMR et 10% ESD). Devant l'absence de spécialité adéquate disponible et en vue d'optimiser la prise en charge de ces patients, les équipes du préparatoire et du laboratoire de contrôle des préparations de la pharmacie centrale ont été sollicitées pour développer une préparation stérile dédiée, avec les contrôles nécessaires pour assurer sa qualité et garantir sa sécurité d'emploi.

L'objectif de ce travail, articulé en deux parties, est de développer une solution de fructose à 5% et de glycérol à 10% dans le chlorure de sodium isotonique.

La première partie s'intéressera à l'étude de faisabilité de la préparation, qui repose sur une étude de la faisabilité clinique et technique de la préparation. La seconde partie concernera les contrôles de qualité mis en œuvre sur la préparation.

# FAISABILITE

## I. Aspects cliniques

### A. Anatomie de la paroi digestive et classifications des tumeurs digestives précoces

La paroi du tube digestif est composée de cinq couches successives (Figure 1). Au contact de la lumière digestive on trouve l'épithélium (e.p.), puis la lamina propria (l.p.). Viennent ensuite la musculaire muqueuse (m.m.), la sous muqueuse (s.m.) et la muscularis propria (m.p.). Les tumeurs digestives sont catégorisées en fonction du degré d'envahissement de la paroi digestive, de m1 (envahissement limité à l'épithélium) à sm3 (envahissement jusqu'à la muscularis propria)<sup>[22]</sup>.

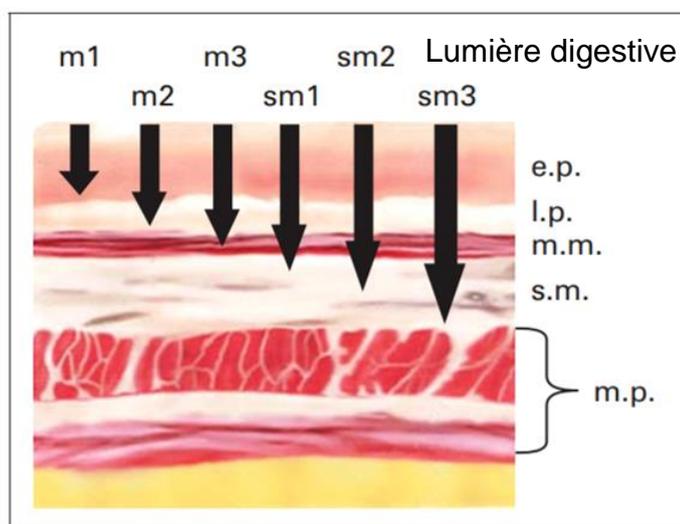


Figure 1 : Subdivision des cancers digestifs précoces en fonction du degré d'envahissement de la paroi du tube digestif d'après [22]

La majorité des tumeurs digestives prennent naissance au niveau de la lumière digestive, sous la forme de dysplasie, puis progressent en envahissant les couches successives de la paroi du tube digestif. Cela peut être mis en relation avec la classification TNM des tumeurs digestives : les tumeurs T0 ou Tis (*in situ*) sont limitées à l'épithélium et la muqueuse, les tumeurs T1 atteignent la sous-muqueuse, les tumeurs T2 la musculaire, T3 la couche séreuse et le stade T4 correspond à un essaimage à distance<sup>[6]</sup> (Figure 2).

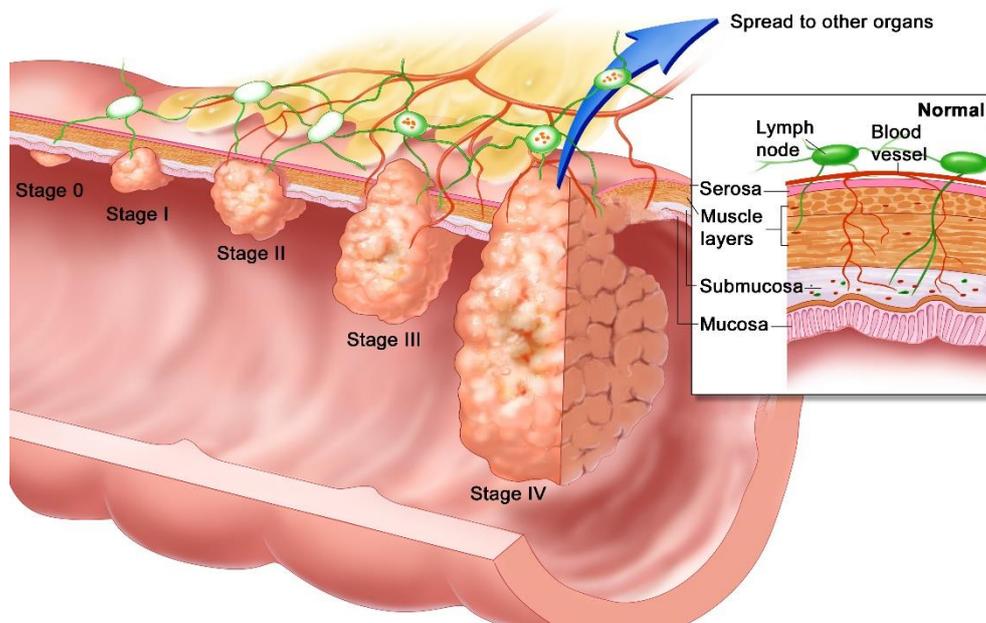


Figure 2 : Stade TNM<sup>[4,5,23]</sup> en fonction du degré d’envahissement des tumeurs digestives (d’après [6])

La classification de Paris des tumeurs superficielles du tube digestif se base sur des critères morphologiques de la lésion tumorale et associe un risque d’envahissement sous-muqueux à chaque sous-type<sup>[6,24]</sup>. (Figure 3) Selon le classement de la lésion, une prise en charge endoscopique pourra être envisagée ou directement écartée. Cette classification fait référence au niveau mondial. Elle a fait l’objet d’un consensus entre les endoscopistes européens, japonais et américains<sup>[25,26]</sup>.

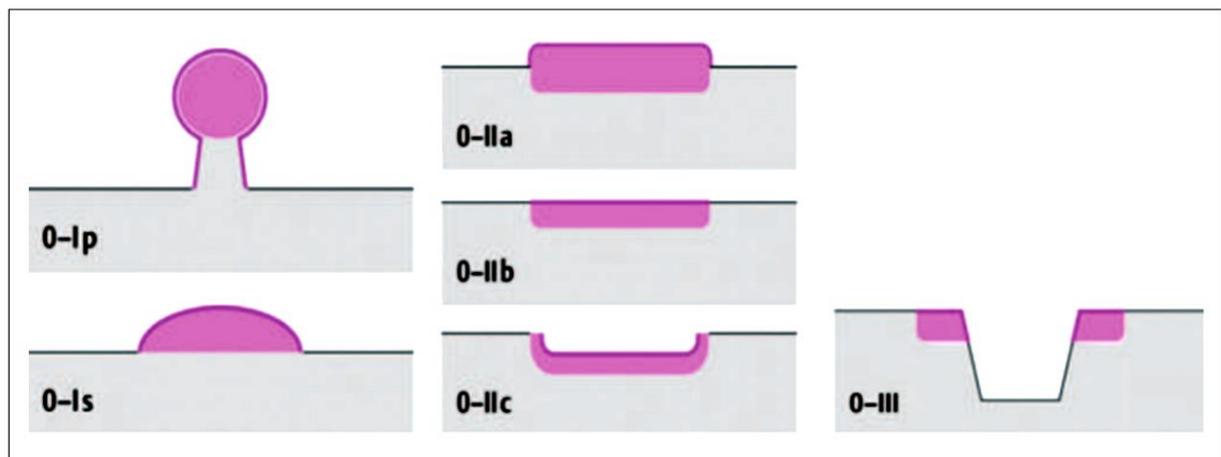


Figure 3 : Classification de Paris des lésions superficielles du tube digestif d’après [25,26]. Nous ne détaillerons que la partie concernant les lésions superficielles (stade 0), les autres classes n’étant pas concernées par une prise en charge par endoscopie. Sous-groupe Ip (Polypoïde), Is (Sessile), IIa (légèrement surélevé, <2,5mm), IIb (plane), IIc (déprimée), III (ulcérée).

Si la morphologie de la lésion est associée à un faible risque d'envahissement sous muqueux, une résection de la tumeur par endoscopie peut être envisagée.

Deux techniques de résection endoscopique sont apparues au cours des dernières décennies et sont actuellement employées dans notre établissement. Il s'agit de la mucosectomie (EMR) et de la dissection sous muqueuse (ESD).

Les principes de ces deux méthodes endoscopiques sont expliqués ci-dessous.

## B. Technique opératoire

### 1. Mucosectomie endoscopique (EMR)<sup>[20,27-34]</sup>

La mucosectomie endoscopique, aussi appelée résection muqueuse endoscopique ou *strip biopsy* est une technique de résection des tumeurs digestives par endoscopie, apparue aux Etats Unis d'Amérique en 1955<sup>[35]</sup> et développée au Japon à partir des années 80<sup>[27]</sup>. La technique initiale a depuis été améliorée afin d'en optimiser les résultats et limiter les complications<sup>[28]</sup>.

La mucosectomie permet la résection « en bloc », c'est-à-dire en une seule pièce opératoire des lésions. Elle est moins invasive que la chirurgie et présente une morbi-mortalité plus faible avec des résultats similaires en terme d'efficacité et de survie<sup>[8]</sup>. Par rapport à la polypectomie endoscopique, elle présente l'avantage de permettre une résection complète de la tumeur avec des marges histologiques suffisantes (R0), facilitant l'évaluation histopathologique de la tumeur et limitant les récurrences<sup>[20,32]</sup>.

La procédure de résection se déroule en quatre étapes :

- La première étape consiste à marquer la lésion par trois ou quatre incisions superficielles au bistouri électrique en périphérie de la tumeur,
- La seconde étape consiste en l'injection d'un liquide en sous muqueux afin de séparer la lésion à réséquer de la paroi, limitant ainsi le risque de perforation et d'hémorragie au cours de l'opération,

- La troisième étape consiste en la capture de la lésion à l'aide d'une anse (A). Différentes techniques sont apparues pour améliorer l'efficacité de cette étape (Figure 4),

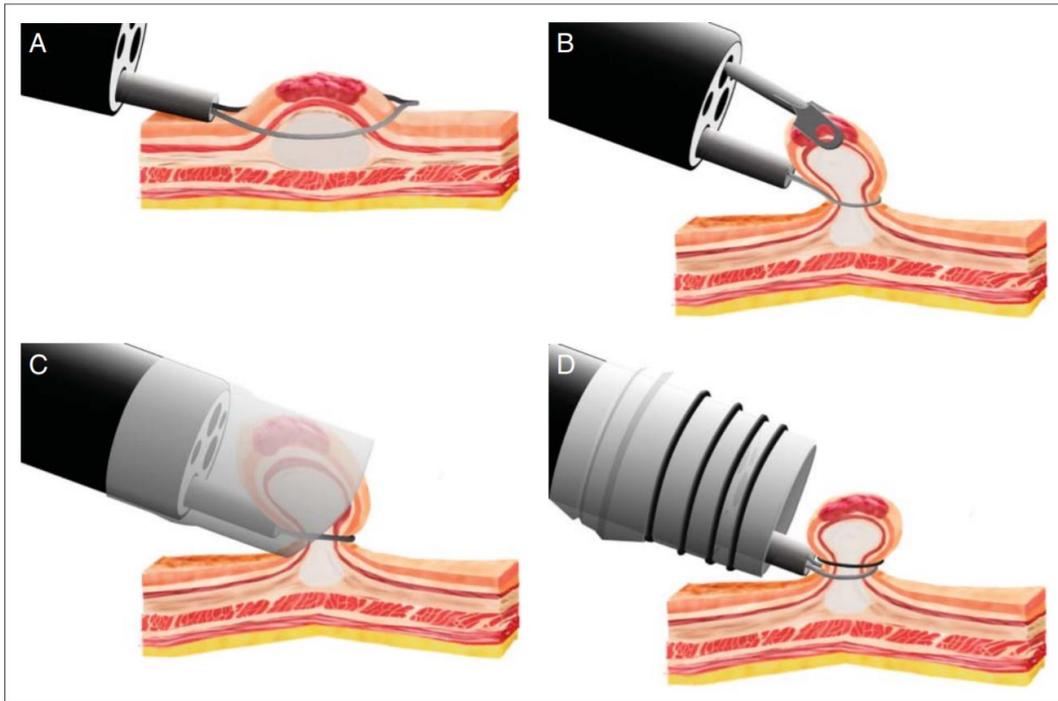


Figure 4 : Différentes techniques utilisées pour l'EMR d'après [22]

- EMR-C : Utilisation d'un capuchon transparent (*cap*) à l'extrémité de l'endoscope pour aspirer la lésion et la pédicule (C)<sup>[22,31]</sup>.
  - EMR-L : Technique EMR-C suivie de la mise en place d'un élastique (*ligation band*) permettant de maintenir la pédiculation de la lésion (D)<sup>[22]</sup>.
  - EMR *with a grasping method* (EMR avec méthode d'accroche) : utilisation d'endoscope à double canal opérateur, permettant le passage d'une pince pour attraper la lésion à résecter (B)<sup>[22]</sup>.
  - EMR *with tissue incision* : consiste à inciser la périphérie de la lésion puis à loger l'anse de résection dans le sillon créé.
  - EMR *Piece-meal* : résection en fragments<sup>[34]</sup>.
- La procédure de mucosectomie se termine par la résection de la lésion à l'aide d'une anse diathermique à la base de la tumeur.

Cette technique est efficace pour les lésions de petite taille, limitée à 15 mm de diamètre. Au-delà de ce diamètre le risque de résection incomplète est conséquent et entraîne un fort taux de récives. La résection fragmentée (*piece-meal*) permet de réséquer des tumeurs de taille plus importante mais est associée à un risque de récive plus élevé que la résection en bloc. De plus, l'évaluation histologique de la tumeur s'en trouve compliquée, puisque l'anatomie de celle-ci est modifiée par la résection fragmentée.<sup>[34]</sup>

## 2. Dissection sous muqueuse (ESD)<sup>[6,8,15-18,34,36-40]</sup>

La technique de dissection sous muqueuse, plus récente et plus complexe est associée à un risque de complications et de perforations accru, qui semble toutefois se réduire avec l'expérience de l'opérateur<sup>[28,36,37]</sup>.

Elle présente les mêmes avantages que la mucosectomie par rapport à la chirurgie et à la polypectomie mais permet de traiter des lésions de plus grande taille ou avec envahissement sous muqueux superficiel. L'ESD permet une résection complète de la tumeur avec des marges histologiques suffisantes (R0) « en bloc » de ces lésions, ce qui entraîne une diminution du risque de récive locale et permet une bonne évaluation histologique de la pièce réséquée.

Elle se découpe en 4 étapes<sup>[15,16]</sup> (Figure 5) :

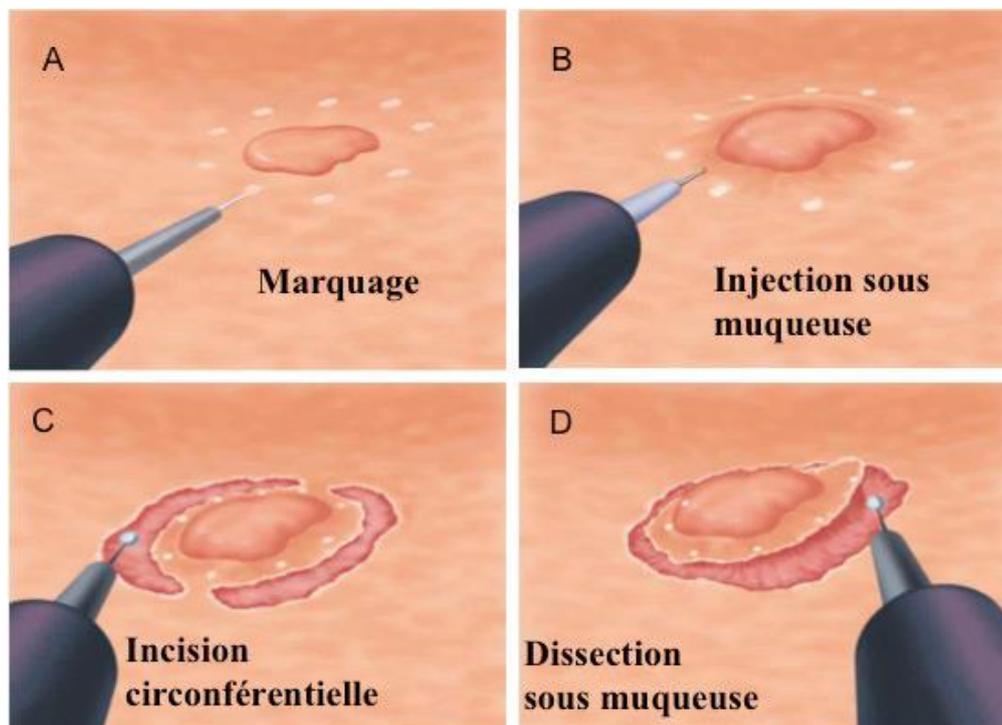


Figure 5 : Différentes étapes de la dissection sous muqueuse d'après [15,16]

La première étape (A) consiste en un marquage diathermique en plusieurs points à la périphérie de la tumeur.

La seconde étape (B) comprend l'injection sous muqueuse d'un liquide afin de séparer la lésion de la paroi et limiter le risque de complications. La muqueuse est ensuite incisée en sillon (C), à distance de la lésion, à partir duquel la dissection sera effectuée de la périphérie vers le centre (D).

Cette technique a été optimisée par l'équipe de l'Hôpital Edouard Herriot de Lyon<sup>[34,39]</sup> qui a mis au point la technique « du tunnel », qui remplace l'incision circonférentielle par une incision distale et proximale, permettant ainsi de maintenir une traction sur la lésion et faciliter sa résection. Cette technique est principalement utilisée pour prendre en charge les lésions de l'œsophage.

### 3. Indications:

Les techniques d'EMR et ESD ayant initialement été développées au Japon, les recommandations de prise en charge des tumeurs digestives par ces techniques en Europe<sup>[7-9]</sup> et en particulier en France<sup>[10,12-18,41]</sup> se sont basées sur celles émises par les experts japonais. Elles sont indiquées pour la prise en charge des tumeurs digestives superficielles à faible risque d'envahissement ganglionnaire. (figure 6)

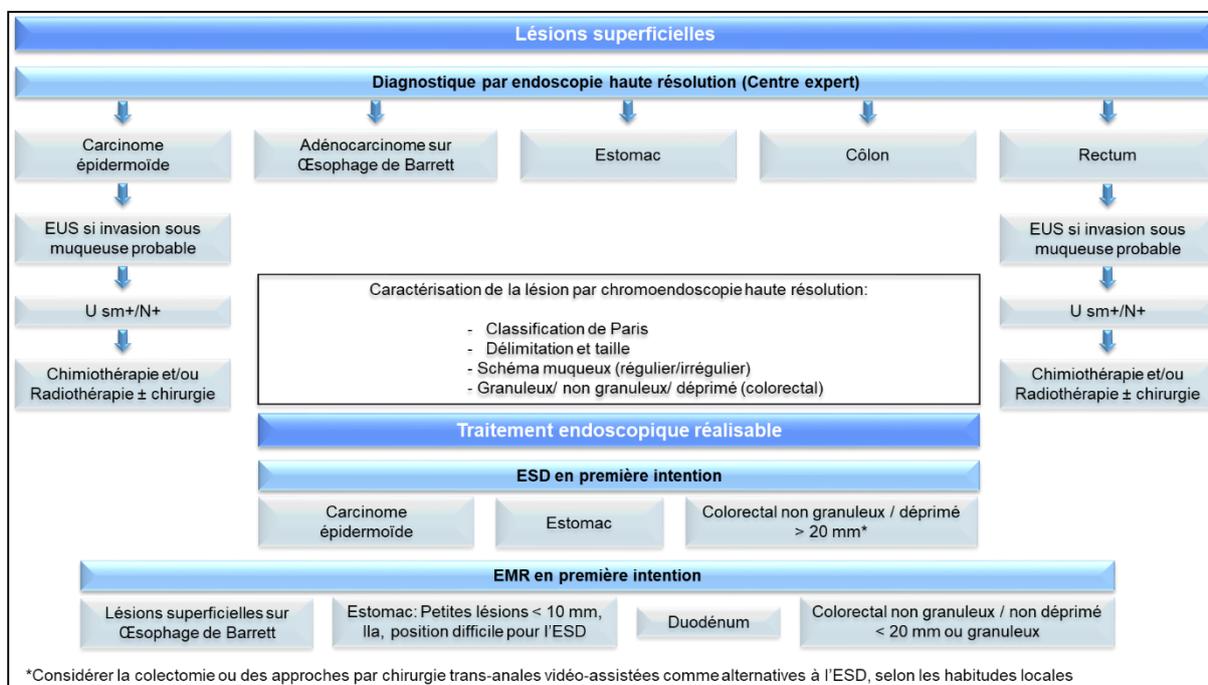


Figure 6 : Arbre décisionnel concernant la prise en charge des tumeurs digestives superficielles proposé par l'European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE)  
 EUS : Ultrasons endoscopiques ; U sm+N/+ résultats des ultrasons suggérant une invasion sous muqueuse ou des ganglions lymphatiques.

## Œsophage : (Annexe 1 et 2)

*Carcinome épidermoïde*<sup>[8,12,16,17]</sup> : EMR recommandée pour les néoplasies superficielles ou à faible risque ganglionnaire de taille inférieure à 10 mm ; cependant l'ESD reste l'option thérapeutique recommandée en première intention pour les néoplasies superficielles ou à faible risque ganglionnaire de taille supérieure à 10 mm. Les lésions sont considérées comme sm1 (résection R0 « en bloc » possible par ESD) pour une invasion en profondeur inférieure à 200 µm. Les traitements endoscopiques des lésions supérieures aux 2/3 de la circonférence de l'œsophage ne sont pas recommandées, en raison du risque de sténose.

*Œsophage de Barrett*<sup>[8,9,12,16,17]</sup> : Il est recommandé de réséquer les lésions visibles de l'œsophage de Barrett. En cas de cancer superficiel sur muqueuse de Barrett, cette opération peut être associée à un traitement par radiofréquence ou une coagulation au plasma argon, voire une nouvelle intervention pour prévenir les récurrences locales.

L'EMR est recommandée en première intention dans cette indication, elle est conseillée pour les néoplasies superficielles à faible risque ganglionnaire de taille inférieure à 15 mm. L'ESD est quant à elle recommandée pour le traitement des lésions de taille supérieure à 15 mm, difficiles à soulever et/ou à risque d'invasion sous muqueuse. Les lésions sont considérées sm1 si l'invasion en profondeur est inférieure à 500 µm.

## Estomac<sup>[8,15,18,41]</sup> : (Annexe 3)

L'EMR et l'ESD ont d'abord été développées au Japon en vue de traiter les tumeurs superficielles de l'estomac (plus fréquemment rencontrées qu'en Europe). Ces techniques endoscopiques sont recommandées pour la prise en charge des tumeurs superficielles à faible risque d'invasion ganglionnaire. L'EMR est recommandée pour traiter les tumeurs de taille inférieure à 10 mm. L'ESD est recommandée en première intention pour traiter les adénocarcinomes de type intestinal bien ou moyennement différenciés, de stade 0.I ou 0.II de la classification de Paris, et de taille inférieure à 30 mm ou sans limite de taille si absence d'ulcération, bien différenciés et limités à la muqueuse digestive. Les lésions gastriques sont classées sm1 si l'invasion tumorale est inférieure à 500 µm en profondeur.

### Duodénum<sup>[8,13]</sup> :

La dissection sous muqueuse n'est pas recommandée en routine en raison du très haut risque de perforation. Pour le traitement des lésions superficielles la polypectomie standard et la mucosectomie peuvent être utilisées, mais la chirurgie classique reste largement employée.

### Côlon<sup>[8,11,14,30,37]</sup> : (Annexe 4)

La plupart des lésions superficielles du côlon peuvent être traitées efficacement par polypectomie ou mucosectomie. La dissection sous muqueuse est envisageable en cas de lésion à haute suspicion d'invasion limitée de la sous muqueuse ( $\leq 1000 \mu\text{m}$ ), en particulier si cette lésion est de taille supérieure à 20 mm ou qu'elle ne peut pas être retirée de manière optimale par les autres techniques.

### Rectum<sup>[7,8,10,30,32,37]</sup> : (Annexe 5)

La majorité des lésions superficielles du rectum sont efficacement retirées par polypectomie et/ou mucosectomie. La dissection sous muqueuse est une alternative pour les lésions de grande taille ( $\geq 20 \text{ mm}$ ) ou à haut risque d'invasion limitée de la sous muqueuse ( $\leq 1000 \mu\text{m}$ ). L'EMR ou l'ESD peuvent être utilisées pour les adénocarcinomes à faible risque d'invasion ganglionnaire, c'est-à-dire les cancers *in situ* bien ou moyennement différenciés, sans invasion lympho-vasculaire, sans *budding* (petits amas de cellules tumorales, mal limités, dissociant le stroma au niveau du front d'invasion tumorale), et/ou sans contingentement mucineux ou à cellules indépendantes.

## 4. Besoins

Le liquide idéal pour l'injection sous muqueuse doit permettre le bon décollement de la muqueuse et rester dans l'espace sous muqueux suffisamment longtemps pour permettre la résection « en bloc »<sup>[7,19,20]</sup>. Il doit également permettre la conduction du courant de section, tout en formant une couche protectrice pour les tissus autour de la lésion. Comme tout liquide destiné à être injecté, il doit être stérile et apyrogène<sup>[42]</sup>. En outre, il ne doit pas être toxique pour les tissus, ne pas gêner la cicatrisation et permettre une classification précise de la maladie en n'altérant pas la structure tissulaire<sup>[7,19,20]</sup>. Le coût et la facilité d'accès à ce produit sont également des facteurs importants à prendre en compte<sup>[7,34]</sup>.

## 5. Solutions disponibles

Le premier liquide utilisé lors du développement de l'EMR et l'ESD a été le chlorure de sodium isotonique (NaCl 0,9%)<sup>[27]</sup>, qui reste la solution de référence en EMR<sup>[28]</sup>. Cette solution est peu coûteuse et très facilement accessible dans le monde. Elle ne présente aucune toxicité tissulaire<sup>[43]</sup>. Cependant elle diffuse très rapidement en dehors de la sous muqueuse et nécessite de fréquentes réinjections pour maintenir la surélévation<sup>[7,15–20,22,29,30,34,37,39,44–54]</sup>.

Une des premières variations a été d'utiliser du sérum adrénaliné au 1/10 000<sup>e</sup> ce qui ralentit la diffusion hors de l'espace sous muqueux et prévient les hémorragies<sup>[22,28–30,37,45,54]</sup>. Cependant ces effets n'ont jamais été démontrés par des études comparatives avec le chlorure de sodium isotonique.

Un colorant bleu tel que l'indigo carmin peut être ajouté afin de faciliter le repérage de la sous muqueuse.

D'autres solutions peu onéreuses et faciles d'accès ont été testées telles que le chlorure de sodium hypertonique (NaCl 3,75%), le glucose hypertonique (15%, 20%, 30%,40%,50%)<sup>[7,19,28–30,45,46,48,51–53]</sup>. Cependant ces solutions entraînent des dommages tissulaires pouvant persister plus d'une semaine après l'intervention<sup>[43,52,53]</sup>.

Afin de retarder la diffusion de la solution hors de l'espace sous muqueux, d'autres solutions plus visqueuses peuvent être utilisées.

L'hydroxyéthylamidon (Voluven®)<sup>[6,7,37,49,51]</sup> est une solution macromoléculaire de grande sécurité d'emploi, peu onéreuse et facile d'accès qui est actuellement utilisée au CHU de Lille dans les procédures d'ESD ; cependant cette alternative n'est pas optimale puisque sa viscosité trop importante a déjà entraîné l'obstruction d'un endoscope. De plus, elle est susceptible d'entraîner une déshydratation tissulaire.

D'autres solutions visqueuses sont actuellement testées comme alternative et citées dans la littérature :

- La gélatine succinylée, commercialisée sous le nom de Gelofusine® <sup>[7,19,51]</sup> (peu facile d'accès, avec un risque allergique lié aux protéines bovines),

- L'hydroxypropylméthylcellulose (HPMC) ou la carboxyméthylcellulose (CMC) dont la toxicité reste à étudier plus en détail [7,19,30,52,53],
- Les poloxamers qui présentent l'avantage d'être fluides à 20°C et se solidifier à 37°C [6,49,55],
- Le fibrinogène (à risque de transmission virale) [19,52,53], dont le coût est également élevé.
- Le sang autologue<sup>[19]</sup>,
- l'alginate de sodium<sup>[19,56]</sup>,
- Le chitosan qui posséderait en plus des propriétés hémostatiques, antibactériennes et pro-cicatrisantes, mais dont la biocompatibilité doit encore être évaluée<sup>[19,52,53,57]</sup>.

Parmi toutes ces solutions, seules celles à base d'acide hyaluronique ont démontré une durée de soulèvement plus longue de la muqueuse par rapport à du NaCl 0,9% ou des solutions hypertoniques ou visqueuses dans des modèles animaux (organe isolé ou animal vivant)<sup>[43,45,46,49,53,56,58,59,59,60]</sup>. (Annexes 6 à 8)

Nous disposons de très peu de données comparatives concernant l'efficacité et la sécurité d'emploi de toutes ces solutions pour injection sous muqueuse : 4 études multicentriques<sup>[61-64]</sup>, 4 monocentriques<sup>[38,65-67]</sup> (Annexes 9 à 12).

Par ailleurs, une étude multicentrique randomisée contrôlée coréenne en ouvert (non publiée) a démontré un temps d'élévation de la muqueuse plus important avec l'acide hyaluronique comparativement au NaCl 0,9% avec un taux de complications similaires dans la prise en charge de cancers gastriques chez l'Homme<sup>[53]</sup>.

Globalement, selon trois méta-analyses<sup>[19,51,68]</sup> qui ont comparé différentes solutions, l'acide hyaluronique n'a pas amélioré significativement les résultats de la résection<sup>[53]</sup>. (Annexe 13) L'impact clinique sur les résections avec acide hyaluronique est rarement étudié<sup>[19,51,52,61-63,65-69]</sup>.

Il existe deux produits de santé commercialisés, contenant de l'acide hyaluronique : MucoUp® (Japon)<sup>[65]</sup> et Endo-Ease® (Corée)<sup>[61]</sup>. Ces solutions ne déshydratent pas les tissus et présentent des propriétés pro-cicatrisantes.

Cependant elles sont moins facilement disponibles, stimuleraient potentiellement la prolifération de cellules cancéreuses résiduelles (sur des modèles animaux) [70,71] et ont des coûts prohibitifs (\$550,6/g d'acide Hyaluronique soit 473,8€/g<sup>[56]</sup>. MucoUP<sup>®</sup> coûte environ 60€ pour 20mL)<sup>[60]</sup>.

Certains auteurs ont tenté de diminuer ces coûts en mélangeant les solutions d'acide hyaluronique avec d'autres solvants (glucose hypertonique, mélange de fructose à 5% et glycérol à 10% dans du NaCl 0,9%) en vue de limiter la quantité d'acide hyaluronique nécessaire à l'obtention d'un effet similaire<sup>[38,43,72]</sup>.

Il s'agit de solutions à base d'acide hyaluronique à 800 KDa (Artz<sup>®</sup>, Kaken Pharma) ou 1900 KDa (Suvenyl<sup>®</sup>, Chugai pharmaceuticals)<sup>[6,7,19,28-30,34,45-47,49-54]</sup>.

Une alternative à l'acide hyaluronique bien décrite dans la littérature est le Glycéo<sup>®</sup> (fructose à 5% et glycérol à 10% dans le NaCl 0,9%)<sup>[6,7,20,28,29,34,37,38,43-45,45-49,52,53,55,58,64,73-77]</sup>. Cette solution peu onéreuse est disponible au Japon. Une seule étude multicentrique et quelques cas rapportés ont démontré sa supériorité par rapport au NaCl 0,9% en terme d'efficacité clinique<sup>[64,75]</sup>. Les solutions à base de glycérol 10% plus ou moins associé à 5% de fructose ont été étudiées au cours d'une étude multicentrique prospective contrôlée en ouvert<sup>[64]</sup>, d'une étude monocentrique prospective non contrôlée<sup>[38]</sup>, et huit études sur modèle animal in ou ex vivo<sup>[43,45,46,49,55,56,74,75]</sup>. Ces études ont démontré une efficacité inférieure à celle de l'acide hyaluronique pour maintenir la surélévation muqueuse, mais supérieure ou égale à celle des autres solutions disponibles<sup>[43,45,46,55,56,74,75]</sup> tout en présentant une faible toxicité<sup>[38,43,56]</sup>. En effet, le glycérol pouvant librement passer au travers des membranes cellulaires, la différence de pression osmotique entre le milieu intra et extracellulaire est seulement due au fructose qui ne cause pas de dommage cellulaire, le chlorure de sodium permet quant à lui la conduction du courant de section<sup>[43,78]</sup>.

En accord avec le service d'endoscopie digestive, nous avons choisi de développer une solution de fructose à 5% et glycérol à 10% dans le NaCl 0,9%, comme cela a déjà été fait aux Hospices Civils de Lyon<sup>[78]</sup> et à Limoges. Le seul protocole de préparation décrit en France est celui de l'équipe de Lyon. La préparation y est réalisée sous azote (filtration stérilisante sous pression positive d'azote en amont du filtre), nécessitant des équipements et des compétences dédiés, non disponibles dans tous les établissements. Pour cette raison nous avons développé une méthode de production aseptique simple, donc en présence d'oxygène.

## II. Aspects techniques

### A. Mode de préparation

L'hôpital de Lyon est équipé de cuves en acier inoxydable permettant la préparation de poches de nutrition parentérale sous azote. L'équipe du secteur des fabrications a réutilisé cet équipement pour la production de la solution de fructose et glycérol.

Après avoir réalisé les étapes de pesée, et de dissolution sous hotte à flux d'air laminaire (HFAL) vertical, la solution était placée dans les cuves pour un barbotage à l'azote et filtrée par pression positive d'azote au travers de filtres de porosité maximale de 0,22µm dans une poche souple stérile en copolymère d'éthylène et d'acétate de vinyle (EVA).

Une étude de stabilité a ensuite été réalisée sur la solution préparée et a retrouvé une stabilité physico-chimique et galénique d'un an quand stocké à 25°C<sup>[78]</sup>.

### B. Modalités de production

La pharmacie du CHU de Lille ne disposant pas des équipements de production sous azote de l'hôpital de Lyon, un nouveau mode opératoire a été développé pour la préparation de la solution stérile de fructose à 5% (m/v) et glycérol à 10% (v/v) dans le NaCl 0,9%.

La production a été réalisée au sein de la salle blanche du préparatoire de la pharmacie du CHU de Lille. L'environnement de travail consistait en une HFAL vertical (classe A selon les bonnes pratiques de préparation<sup>[79]</sup> (BPP)) positionnée dans une pièce de la zone à atmosphère contrôlée (ZAC) environnante de classe B selon les BPP<sup>[79]</sup>. La production de lots tests de deux litres de solution stérile de fructose à 5% (m/v) - glycérol à 10% (v/v) pour injection intramucosale a été réalisée conformément aux BPP<sup>[79]</sup>.

A l'aide de la balance (modèle : BP 121 S SARTORIUS / série : 90308445) située dans la zone de travail, 100 grammes de D-fructose (Inresa, Bartenheim, France) ont été pesés dans une coupelle en aluminium et transférés dans une fiole jaugée en verre classe A stérile (Somatherm, Vieux Berquin, France) contenant environ 500 mL de NaCl 0,9% (Viaflo, Baxter, Guyancourt, France). Puis, dans une éprouvette graduée de volume 1000 mL (VWR International, Fontenay-sous-Bois, France), 200 mL de glycérol ont été mesurés.

Le contenu de la fiole jaugée a ensuite été transféré dans la même éprouvette et le volume a été complété à 1000 mL avec le NaCl 0,9%. Le mélange obtenu a été placé dans la fiole sous agitation. Dans la même éprouvette, deux fois 500 mL de NaCl 0,9% ont été mesurés successivement et transvasés dans la fiole jaugée.

Une fois un mélange homogène obtenu, la fiole jaugée a été décontaminée extérieurement à l'alcool 70° et introduite dans la HFAL vertical.

La solution obtenue a ensuite été filtrée de manière stérilisante sur filtre de porosité 0,22 µm (*Rapid-Flow filter unit*, Thermoscientific, Waltham, Massachussetts, USA) directement dans des flacons de 125 mL en verre blanc de type 2<sup>[80,81]</sup> (Gravis Trelaze) à l'aide du système Stericap® (100 mL par flacons). Les flacons ont ensuite été bouchés à l'aide de bouchons en chlorobutyle 32mm (Somatherm). Puis, les flacons ont été sortis de la HFAL pour être sertis avec des capsules aluminium déchirables (Somatherm) de diamètre 32 mm et étiquetés selon les recommandations en vigueur<sup>[82]</sup>.

# CONTRÔLE QUALITE DE LA PREPARATION

## I. Eléments généraux

Pour toute préparation réalisée, il est nécessaire de s'assurer de sa qualité et de la sécurité d'emploi par la mise en place de contrôles adaptés. Dans le cadre de la préparation stérile de fructose 5% et de glycérol 10% dans le NaCl 0,9%, nous avons effectué les contrôles relatifs aux préparations stériles<sup>[42]</sup>. Nous avons vérifié les concentrations en fructose et glycérol de la préparation, afin de contrôler l'homogénéité de la solution préparée. Notre méthode de préparation différant considérablement de celle précédemment décrite, elle est susceptible d'entraîner l'apparition de produits de dégradation. Nous avons développé une méthode de dosage spécifique et sensible pour deux produits de dégradation du fructose, le 5-hydroxyméthylfurfural (5HMF) et le 2-Furaldéhyde (2FA) pouvant présenter une toxicité chez l'Homme. Ces produits de dégradation sont connus pour être des précurseurs de produits terminaux de la glycation (*Advanced Glycation End products* (AGE))<sup>[83,84]</sup>. Ils sont impliqués dans des phénomènes de stress oxydatif<sup>[85]</sup> qui peuvent impacter le système cardiovasculaire<sup>[86-88]</sup>, rénal<sup>[89,90]</sup>, ralentir la cicatrisation<sup>[86]</sup> et induire l'apoptose cellulaire.

## I. Matériel et méthodes

### A. Produits chimiques et réactifs

Le fructose a été obtenu auprès du laboratoire pharmaceutique Inresa (Bartenheim, France). Le glycérol a été fourni par le laboratoire pharmaceutique Cooper (Melun, France). Le 5-Hydroxyméthylfurfural (5HMF) de pureté 99% a été acheté auprès de Sigma-Aldrich (Saint-Louis, Missouri, USA). Le 2-furaldéhyde (2FA) nous a été fourni par le laboratoire Alfa Aesar (Haverhill, Massachusetts, USA).

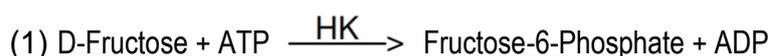
Le méthanol (MeOH) de qualité chromatographique (Hipersolv chromanorm) a été obtenu auprès du laboratoire VWR Chemicals (Mouscron, Belgique). Le dihydrogénophosphate de potassium (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) a été fourni par Merck (Darmstadt, Allemagne). L'acide acétique glacial a été obtenu auprès de VWR Chemicals, et l'eau pour préparations injectables (eppi) Versylène auprès de Fresenius Kabi France (Sèvres, France).

## B. Dosage du fructose et du glycérol

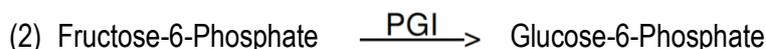
Les dosages ont été réalisés au Centre de Biologie et Pathologie (CBP) du CHU de Lille, au sein du laboratoire de biochimie et de biologie moléculaire, sur un automate Konelab Prime 60i (Thermoscientific, série N3421197). Les dosages ont été réalisés sur des échantillons dilués au 1/1000<sup>e</sup>, au 1/2000<sup>e</sup> et au 1/4000<sup>e</sup> dans du NaCl 0,9% (VERSYLENE, Fresenius) pour le glycérol et dilués du 1/60<sup>e</sup> au 1/100<sup>e</sup> pour le fructose. La méthode a été préalablement validée dans la préparation, à la fois pour le fructose et le glycérol.<sup>[78]</sup>

Le dosage du fructose a été réalisé par une méthode enzymatique colorimétrique à l'aide d'un coffret (Boehringer Mannheim/ R-Biopharm<sup>®</sup>, Darmstadt, Allemagne, linéarité : 0,27-3,6 g/L). La réaction de dosage se déroule en trois étapes :

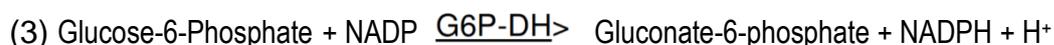
La première étape consiste en la phosphorylation du fructose par l'hexokinase HK en présence d'adénosine triphosphate ATP et libère de l'adénosine diphosphate ADP.



La seconde étape de la réaction consiste en la transformation du Fructose-6-Phosphate en Glucose-6-phosphate par la Phospho-Glucose-Isomérase (PGI).



La troisième étape s'effectue en présence de la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6P-DH). Le Glucose-6-Phosphate est oxydé par le nicotinamide-adénine-dinucléotide phosphate (NADP) en gluconate-6-phosphate et libère du nicotinamide-adénine-dinucléotide phosphate réduit (NADPH).



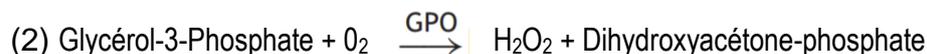
Le dosage du fructose est calculé à partir de la mesure d'absorbance du NADPH formé à 340 nm.

Le dosage du glycérol a été réalisé par une méthode enzymatique colorimétrique utilisant un réactif Randox<sup>®</sup> (Glycérol GPO-PAP, référence GY105, linéarité : 0-100mg/L). La réaction se déroule également en 3 étapes.

La première étape consiste en la phosphorylation du glycérol par la glycérol kinase GK en présence d'adénosine triphosphate ATP et libère de l'adénosine diphosphate (ADP)



La seconde étape consiste en l'oxydation du glycérol-3-Phosphate par la glycérol phosphate oxydase (GPO) et libère du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).



Le peroxyde d'hydrogène formé est transformé par la peroxydase (POD) en présence de 4-aminophénazone et 3,5-dichloro-2-hydroxybenzène sulfonate acide (DCHBS) en n-(4-antipryl)-3-chloro-5-sulfonate-p-benzoquinone imine (ACSB) qui absorbe à 500nm.



Le dosage du glycérol est calculé à partir de la mesure d'absorbance du ACSB formé à 500 nm.

## C. Développement de la méthode analytique de dosage du 5HMF et 2FA

### 1. Système chromatographique

Les solutions stériles de fructose 5% et glycérol 10% dans le NaCl 0,9% ont été analysées sur un système chromatographique Ultimate 3000® Thermo Scientific (Villebon-sur-Yvette, France) composé d'une pompe quaternaire (LPG 3400SD série 8086502), d'un passeur d'échantillons automatique à 20°C (WPS 3000TSL série 8090784), d'un four à effet Peltier (TCC 3000 série 6001884) et d'un détecteur à barette de diodes (DAD3000 série 8091713). Les analyses ont été réalisées sur 6 minutes. Les chromatogrammes ont été analysés grâce au logiciel Chroméléon 7 (version 7.2.2.6394) et aux algorithmes Cobra Wizard et Component Table Wizard.

## 2. Conditions chromatographiques

Après une analyse des données disponibles dans la littérature concernant les méthodes d'analyse du 5HMF et 2FA, une séparation efficace de ces deux composants peut être obtenue par chromatographie liquide (ultra) haute performance (CLHP/UPLC), l'utilisation de phases stationnaires hydrophobes et d'une phase mobile constituée d'un mélange d'acétonitrile ou méthanol avec de l'eau acidifiée ou un tampon à pH acide<sup>[91-96]</sup>. Nous avons choisi d'adapter la méthode développée par J.Haybrard *et al.*<sup>[95,96]</sup> en raison de la faible solubilité du glycérol dans l'acétonitrile<sup>[97]</sup>.

Le dosage simultané du 5HMF et du 2FA a été réalisé à l'aide d'une phase stationnaire hydrophobe Hypersil gold C18, 100 x 3mm ; 2,6µm (Thermoscientific, lot 13736, SN 10318425) munie d'une précolonne et d'une phase mobile constituée d'un mélange (10%/90% - v/v) de méthanol et de solution aqueuse de dihydrogénophosphate de potassium (0,014 mmol/L, soit 1,95 g pour 1 litre) ajustée à pH 2,95 par de l'acide acétique glacial (Tableau I).

Tableau I : Conditions chromatographiques de l'analyse

<b>Système chromatographique</b>	UPLC Ultimate 3000 Thermofisher
<b>Colonne</b>	C18 Hypersil gold® 100 x 3 mm ; 2.6 µm + Précolonne
<b>Phase mobile</b>	Isocratique (MeOH 10% – 90% Solution KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,014mM pH = 2,95)
<b>Débit</b>	0,5 mL.min <sup>-1</sup>
<b>Volume d'injection</b>	10 µL
<b>Température colonne</b>	25°C
<b>Température passeur</b>	20°C
<b>Durée analyse</b>	6 min
<b>λ Détection</b>	284 nm DAD
<b>Logiciel d'acquisition des données:</b>	Chromeleon

## 3. Effet matrice

La solution de fructose à 5% et glycérol à 10% dans le NaCl 0,9% peut présenter un effet matrice pour le dosage du 5HMF et du 2FA. Afin d'évaluer la présence d'un tel effet, nous avons réalisé en accord avec le protocole de pré-validation PV3 de la Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques (SFSTP)<sup>[98-101]</sup> : Cinq gammes d'étalonnage en présence de la matrice (Glycérol 10% et NaCl 0,9%) et 5 gammes d'étalonnage en l'absence de matrice. L'analyse des échantillons préparés a permis de définir l'équation de la droite de régression pour le 5HMF et pour le 2FA dans chaque condition.

Nous avons vérifié l'homogénéité des variances des hauteurs retrouvées dans chaque milieu (phase mobile et matrice) pour le 5HMF et le 2FA à l'aide d'un test de Cochran (seuil de significativité à 5%). Nous avons ensuite comparé les valeurs des pentes et des ordonnées à l'origine des droites de régression retrouvées en présence et en l'absence de matrice, à l'aide d'un test de Student ( $\alpha=5\%$ , 46 ddl).

$$t = \frac{a_1 - a_2}{\sqrt{\sigma_1^2 + \sigma_2^2}}$$

Avec  $a$  = pente/ordonnée à l'origine de la droite,  $\sigma^2$  = variance de  $a$

Les résultats ont également été confirmés à l'aide d'une analyse par modèle de régression linéaire multivariée menée sur le logiciel JMP Pro (version 9.02, SAS Institute, USA).

#### 4. Solutions mères

##### i. 5HMF

La solution mère de 5HMF a été réalisée en dissolvant 10 mg précisément pesés dans 100 mL d'eppi (Concentration en 5HMF = 0,1 mg/mL). Cette solution a ensuite été diluée afin d'obtenir une concentration de 0,4  $\mu\text{g/mL}$  de 5HMF dans la phase mobile. Pour cela 200  $\mu\text{L}$  de la solution à 0,1 mg/mL et 20  $\mu\text{L}$  de méthanol ont été placés dans une fiole jaugée 50 mL et le volume a été complété avec un mélange (10-90%) méthanol-solution de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,014 mM pH = 2,95 (phase mobile).

##### ii. 2FA

La solution mère de 2FA a été préparée à partir d'une solution de 2FA de pureté 98% et de densité égale à 1,159. Pour préparer la solution à 800  $\mu\text{g/mL}$  de 2FA, 70,5  $\mu\text{L}$  de la solution à 98% (équivalent à 800  $\mu\text{g}$  de 2FA) ont été placés dans une fiole jaugée de 100 mL complétée avec de l'eppi. Deux dilutions successives ont ensuite été nécessaires pour obtenir une solution à 0,8  $\mu\text{g/mL}$  de 2FA. Dans un premier temps, 5 mL de la solution à 800  $\mu\text{g/mL}$  ont été prélevés à l'aide d'une pipette jaugée et placés dans une fiole jaugée de volume 100 mL, après ajout de 500  $\mu\text{L}$  de MeOH, le volume a été complété avec la phase mobile (Concentration en 2FA = 16  $\mu\text{g/mL}$ ). Puis, 1 mL de la solution à 16  $\mu\text{g/mL}$  a été placé dans une fiole jaugée de 20 mL et le volume a été complété par de la phase mobile (Concentration en 2FA = 0,8  $\mu\text{g/mL}$ ).

### iii. Glycérol

La matrice a été définie par du glycérol à 10% dans du NaCl 0,9%. Nous n'avons pas intégré de fructose dans la matrice car la matière première contient une faible quantité de 5HMF<sup>[91,94,102,103]</sup>.

A l'aide d'une seringue de 5 mL (référence IVL05, Medicina, Bolton, United Kingdom), 2 mL de glycérol ont été prélevés et placés dans une fiole jaugée de 20 mL. Avec la même seringue et une aiguille BD microlance 1,2 x 40mm 18G (référence 304622 Becton Dickinson, Louth, Irlande), le volume a été complété avec du NaCl 0,9% (Chlorure de sodium Proamp® 0,9%-20 mL, Aguettant, Lyon, France), afin d'obtenir une solution à 10% (v/v) de glycérol. Cette solution a ensuite été diluée pour obtenir une concentration de glycérol de 2% (v/v) dans la phase mobile : 5 mL de la solution à 10% ont été prélevés à l'aide d'une pipette jaugée et placés dans une fiole jaugée de 25 mL et le volume a été complété avec la phase mobile.

## 5. Préparation des échantillons pour analyse

Tous les échantillons préparés ont été filtrés avant analyse à l'aide d'un filtre seringue à membrane en acétate de cellulose régénérée, de porosité maximale 0,2 µm (Fisherbrand) et une seringue 2 mL luer BD Discardit II (référence 300928, Becton Dickinson).

### i. Blancs

Un blanc sans matrice a été réalisé en filtrant 800 µL de phase mobile dans un flacon de CLHP. Un blanc avec matrice a été réalisé en mélangeant 720 µL de phase mobile et 80 µL de la solution de glycérol à 2%.

### ii. Gamme d'étalonnage

Les gammes d'étalonnage avec et sans matrice ont été réalisées comme décrit dans les tableaux II et III.

Tableau II : Préparation de la gamme d'étalonnage sans matrice :

C5HMF (µg/mL)	0,0125	0,025	0,05	0,1	0,2
C2FA (µg/mL)	0,02	0,03	0,04	0,06	0,08
V5HMF (µL) 0,4µg/mL	25	50	100	200	400
V2FA (µL) 0,8µg/mL	20	30	40	60	80
VSOLVANT (µL)	755	720	660	540	320

Tableau III : Préparation de la gamme d'étalonnage avec matrice :

C5HMF (µg/mL)	0,0125	0,025	0,05	0,1	0,2
C2FA (µg/mL)	0,02	0,03	0,04	0,06	0,08
V5HMF (µL) 0,4µg/mL	25	50	100	200	400
V2FA (µL) 0,8µg/mL	20	30	40	60	80
VMATRICE (µL)	80	80	80	80	80
VSOLVANT (µL)	675	640	580	460	240

### iii. Contrôles qualité (QC)

Les contrôles qualité ont été préparés avec la matrice comme décrit dans le tableau IV.

Tableau IV : Préparation des QC avec matrice :

	QC1	QC2	QC3	QC4
C5HMF (µg/mL)	0,019	0,038	0,075	0,15
C2FA (µg/mL)	0,0250	0,035	0,05	0,07
V5HMF (µL) 0,4µg/mL	38	76	150	300
V2FA (µL) 0,8µg/mL	25	35	50	70
VMATRICE (µL)	80	80	80	80
VSOLVANT (µL)	657	609	520	350

Vf = 800µL

**SOLVANT**= Mélange 90/10% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Méthanol

**MATRICE**= Solution de Glycérol à 2%

### iv. Solution de fructose 5% et glycérol 10% dans NaCl 0,9%

Un millilitre de solution était placé dans une fiole jaugée 50 mL avec 100 µL de méthanol et le volume était complété avec de la phase mobile (dilution au cinquantième).

### D. Validation de méthode-LOD/LOQ

La validation a été menée selon la méthodologie V5 recommandée par la Société des Sciences et Techniques Pharmaceutiques (SFSTP)<sup>[98-101]</sup>, par 2 opérateurs différents, sur trois jours différents et avec des solutions mères de 5HMF, 2FA et Glycérol différentes pour la gamme d'étalonnage et les points de standards de calibration (*Quality control QC*). Les solutions mères ont été réalisées à partir de pesées distinctes.

Chaque jour, une gamme d'étalonnage en présence de matrice ainsi que trois séries de QC réalisées en présence de matrice ont été analysées.

La méthode de la SFSTP (méthode du profil d'exactitude) est une méthode basée sur l'addition des erreurs : somme de l'erreur de répétabilité et de fidélité intermédiaire. L'objectif est de construire le profil d'exactitude de la méthode par détermination des limites de tolérance maximales et minimales (intervalle de confiance à 95% calculé grâce à la table de Student), et l'erreur relative totale à chaque niveau de concentration.

Pour être validée, la méthode doit avoir un profil d'exactitude compris entre les limites d'acceptation maximales et minimales, que nous avons fixées à  $\pm 10\%$  (erreur maximale tolérée).

Les limites de détection (LOD) et quantification (LOQ) de la méthode analytique ont été calculées selon la méthode de l'*International Conference on Harmonization* (ICH)<sup>[104]</sup> grâce à l'écart-type de l'amplitude du signal de 10 blancs, analysée entre 4,5 et 5,5 minutes selon les formules suivantes :

$$\text{LOQ} = \frac{10 \times s_d}{a} \qquad \text{LOD} = \frac{3,3 \times s_d}{a}$$

Avec  $S_d$ , l'écart-type de l'amplitude du signal du blanc, et  $a$ , la pente de la fonction de réponse validée.

#### E. Etude de stabilité *a minima* :

Afin d'évaluer la stabilité de la solution de fructose 5% et de glycérol 10% préparés en condition aérobie, une étude de stabilité *a minima* a été réalisée sur deux lots préparés à 5 mois d'intervalle, le premier lot étant analysé immédiatement après sa production, le second lot étant analysé après 5 mois de conservation à l'abri de la lumière dans un local climatisé à moins de 25°C. Trois flacons de chaque lot (début, milieu et fin de production) ont été analysés, conformément aux recommandations du Guide méthodologique des études de stabilité des préparations émis par le Groupe d'Evaluation et de Recherche sur la Protection en Atmosphère Contrôlée (GERPAC) et la Société Française de Pharmacie Clinique (SFPC)<sup>[105]</sup>. Le dosage du fructose et du glycérol ainsi que celui du 5HMF et 2FA ont été réalisés comme décrit ci-dessus.

### 1. Essai de stérilité :

L'essai a été réalisé au sein du laboratoire de microbiologie environnementale du CBP du CHU de Lille dans les 24 heures suivant la production de chaque lot et après 5 mois de conservation. L'essai a été réalisé avant toute autre analyse, selon une méthodologie *a minima* de la Pharmacopée Européenne (PE)<sup>[106,107]</sup>.

L'ensemencement a été réalisé avec 3 flacons de chaque lot sous HFAL vertical, le manipulateur étant muni de gants stériles. Le flacon a été décontaminé extérieurement avec de l'alcool à 90°, puis couvert avec une compresse stérile (ref : 22106KL1, TETRA Medical, Annonay, France). Ensuite, 5 mL de solution ont été prélevés à l'aide d'une seringue de 5 mL Luer lock (Medicina) munie d'une aiguille BD microlance 1,2 x 40 mm 18G (Becton Dickinson) et 2,5 mL ont été injectés dans chacun des deux tubes de bouillon de culture (bouillon cœur-cerveille avec indicateur coloré, préparé au CBP du CHU de Lille). L'un des bouillons de culture était incubé à 35°C, l'autre à 22°C. La lecture des tubes a été effectuée à 4 et à 14 jours d'incubation.

### 2. Endotoxines :

La recherche d'endotoxines a été effectuée au sein du laboratoire de contrôle de la pharmacie centrale par la méthode de colorimétrie cinétique à l'aide de cartouches EndoSafe®- Portable Test System (Charles River, Charleston, USA) et de l'appareil de lecture correspondant Charles River (Série 6930).

Ce test est basé sur l'activation d'une cascade de sérine-protéases dans le lysat d'amœbocytes de limules par les endotoxines bactériennes. Cette cascade d'activation aboutit au clivage du coagulogène (greffé d'un chromophore, la p-nitroanilline, pour les besoins du test). La libération du chromophore est suivie par spectrophotométrie à 385-410 nm.

Les échantillons ont été préparés sur un champ stérile et après friction hydro-alcoolique des mains de l'opérateur : 25 µL d'échantillons purs et dilués au 1/50<sup>e</sup> dans l'eppi ont été injectés dans chacune des 4 cupules pour analyse. Le test était considéré conforme si la différence des temps de réaction entre les canaux 1 et 3 (échantillons) et entre les canaux 2 et 4 (ajout d'une quantité connue d'endotoxines) est inférieure à 25% et si le pourcentage de recouvrement des canaux 2 et 4 est compris entre 50 et 200% (Annexe 14).

Pour la Pharmacopée Européenne, la valeur seuil est calculée à 1,75 UI d'endotoxines/mL<sup>[108,109]</sup> (5 U/kg avec un poids moyen de 70 kg et 200 mL de solution injectés au maximum par procédure). D'après la monographie de la solution injectable de fructose dans NaCl 0,9% de la pharmacopée américaine le nombre d'endotoxines retrouvé doit être inférieur à 0,5 unités d'endotoxines USP/mL<sup>[102]</sup>.

### *3. Caractères organoleptiques :*

Les flacons ont été inspectés visuellement par le même opérateur. L'inspection des flacons visait à rechercher l'apparition d'une coloration ou d'un trouble, de particules, d'un dégagement gazeux ou d'un précipité par rapport à un témoin constitué de NaCl 0,9%.

### *4. pH :*

La mesure du pH des solutions a été effectuée à l'aide d'un pH mètre HI 5222 HANNA Instruments (Tanneries, France), préalablement calibré.

### *5. Osmolalité :*

L'osmolalité des solutions a été mesurée au CBP par abaissement du point de congélation grâce à un osmomètre « Advanced Instruments® » modèle 3320 (Advanced Instruments, Norwood, USA). L'osmolalité était mesurée à trois reprises pour chaque flacon.

### *6. Comptage des particules non visibles :*

Le comptage des particules non visible a été réalisé à la faculté de pharmacie, au sein du laboratoire de biopharmacie galénique et hospitalière (Pr Pascal Odou) selon la méthodologie 1.A décrite par la Pharmacopée Européenne<sup>[110]</sup> reposant sur le principe de blocage de la lumière, grâce à un compteur à particules APSS-2000 (Série 65329, Particle Measuring Systems, Boulder, USA), relié au logiciel SamplerSight Pharma.

## F. Expression des résultats et analyse des données

La stabilité des solutions de fructose 5% et glycérol 10% dans NaCl 0,9% était appréciée grâce au calcul du pourcentage de la concentration théorique en fructose et glycérol immédiatement après préparation et après 5 mois de conservation, à l'abri de la lumière, à une température n'excédant pas 25°C, ainsi que par le suivi de l'apparition des produits de dégradation (5HMF et 2FA).

La valeur limite du 5-HMF a été définie d'après la monographie de la Pharmacopée Européenne du fructose qui fixe une valeur d'absorbance maximale à 284 nm de 0,32 soit 2,5 mg/L<sup>[103]</sup>. Pour le 2FA, aucune valeur limite n'a été définie, nous utiliserons donc la méthode dite des « six sigmas », basée sur le calcul d'un écart type des concentrations retrouvées immédiatement après la préparation, et à multiplier cette valeur par six, afin d'obtenir la valeur maximale tolérée.

La préparation était considérée comme stable à 5 mois si la valeur moyenne plus ou moins écart type était entre 90 et 110% de la valeur cible (valeur théorique) pour le dosage du fructose et du glycérol et en l'absence de variation significative des paramètres étudiés (caractères organoleptiques, pH, osmolalité, ...).

Concernant le comptage des particules non visibles, la monographie de la PE fixe une limite maximale de 25 particules de taille supérieure à 10 µm/mL et 3 particules de taille supérieure à 25 µm/mL par récipient pour les solutions injectables de volume nominal supérieur à 100 mL.

## Résultats

### I. Effet matrice

Les résultats des tests de l'effet matrice montrent un effet matrice pour le 5HMF (Tableau V) et pour le 2FA (Tableau VI) avec une différence significative de l'ordonnée à l'origine.

Tableau V : Evaluation de l'effet matrice pour le 5HMF

5HMF	Pente (a)		Ordonnée à l'origine (b)	
	Avec matrice	Sans matrice	Avec matrice	Sans matrice
Condition du test	Avec matrice	Sans matrice	Avec matrice	Sans matrice
Valeur (µg/mL)	26,278	26,137	0,289	0,126
Ecart-type (µg/mL)	0,102	0,078	0,011	0,008
Nombre d'échantillons	25	25	25	25
T calculé	1,0998		12,3346	
T théorique	2,013 ( $\alpha=0,5$ ; 46ddl)			

Tableau VI : Evaluation de l'effet matrice pour le 2FA

2FA	Pente (a)		Ordonnée à l'origine (b)	
	Avec matrice	Sans matrice	Avec matrice	Sans matrice
Condition du test	Avec matrice	Sans matrice	Avec matrice	Sans matrice
Valeur (µg/mL)	54,812	55,167	0,118	0,087
Ecart-type (µg/mL)	0,203	0,216	0,010	0,011
Nombre d'échantillons	25	25	25	25
T calculé	1,1976		2,0671	
T théorique	2,013 ( $\alpha=0,5$ ; 46ddl)			

## II. Validation de la méthode analytique

La validation de méthode selon la méthodologie de l'ICH et de la SFSTP<sup>[98–101,104]</sup> donne des profils d'exactitude à 95% (Figures 7 et 8) compris entre les limites d'acceptabilité, fixées à  $\pm 10\%$ . Les résultats de la précision intra-journalière (erreur aléatoire) et inter-journalière (fidélité intermédiaire) sont inférieurs à 5% et présentés dans les tableaux VII et VIII. Les paramètres des droites de régression sont résumés dans le Tableau IX.

Tableau VII : Résultats des coefficients de variation (CV) : CV Répétabilité et CV Fidélité intermédiaire pour les QC du 5HMF

Composé	Concentration (µg/mL)	CV Répétabilité	CV fidélité intermédiaire
5HMF	0,019	0,61%	0,61%
	0,038	0,75%	2,97%
	0,075	0,76%	2,42%
	0,15	0,41%	3,22%

Tableau VIII : Résultats des coefficients de variation (CV) : CV Répétabilité et CV Fidélité intermédiaire pour les QC du 2FA

Composé	Concentration (µg/mL)	CV Répétabilité	CV fidélité intermédiaire
2FA	0,025	1,31%	1,41%
	0,035	0,89%	2,19%
	0,05	1,28%	1,61%
	0,07	0,47%	0,66%

Tableau IX : Paramètres de la droite de régression et Limite de détection (LOD) et de quantification (LOQ) du 5HMF et du 2FA

Composé	Gamme (µg/mL)	R <sup>2</sup>	Pente	Ordonnée à l'origine (µg/mL)	LOD (µg/mL)	LOQ (µg/mL)
5HMF	0,0125-0,2	0,999	28,228	0,249	0,00112	0,00339
2FA	0,02-0,08	0,999	56,601	0,124	0,00056	0,00169

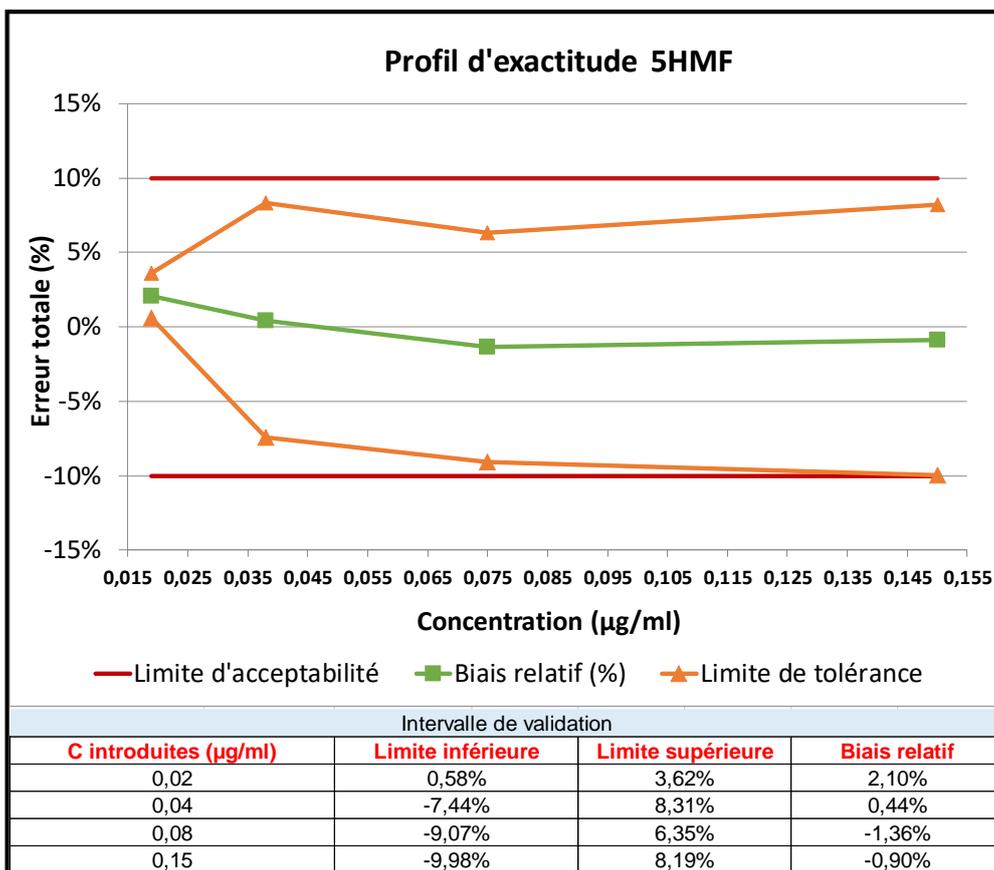


Figure 7 : Profil d'exactitude à 95% - 5HMF

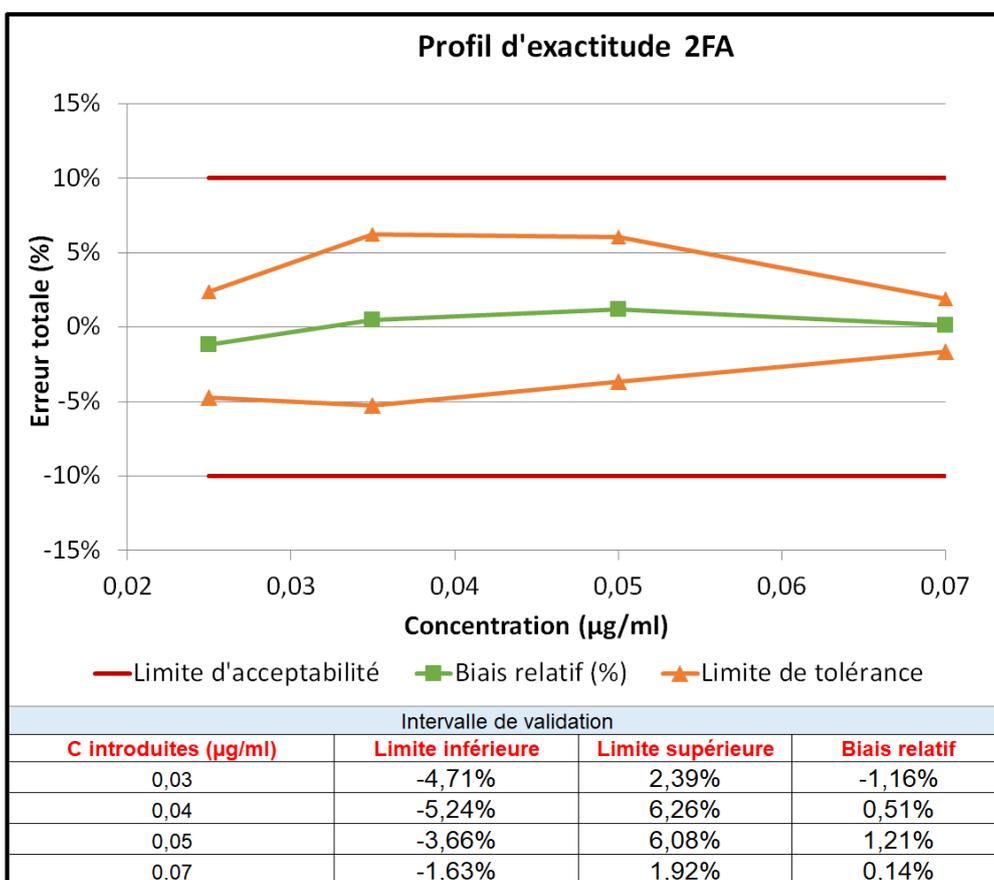


Figure 8 : Profil d'exactitude à 95% - 2FA

### III. Etude de stabilité

#### A. Dosage fructose et glycérol

La valeur cible de la concentration du fructose est de 5g/100 mL soit 50g/L.

La concentration en fructose (moyenne  $\pm$  écart type) était de  $48,99 \pm 1,74$  g/L immédiatement après production (J0) et de  $47,94 \pm 1,90$  g/L après 5 mois de conservation (M5).

La valeur cible de la concentration en glycérol est de 10% (v/v) ce qui correspond à 12,6g/100 mL ou 126g/L à 20°C (densité du glycérol =1,26).

La concentration en glycérol était de  $127,4 \pm 3,4$ g/L et  $130,6 \pm 2,9$ g/L respectivement à J0 et M5.

Ces résultats sont compris dans l'intervalle d'acceptation fixé à  $\pm 10\%$  de la valeur cible, soit 0,45-0,55g/L pour le fructose et 113,4-138,6g/L pour le glycérol. (Figure 9)

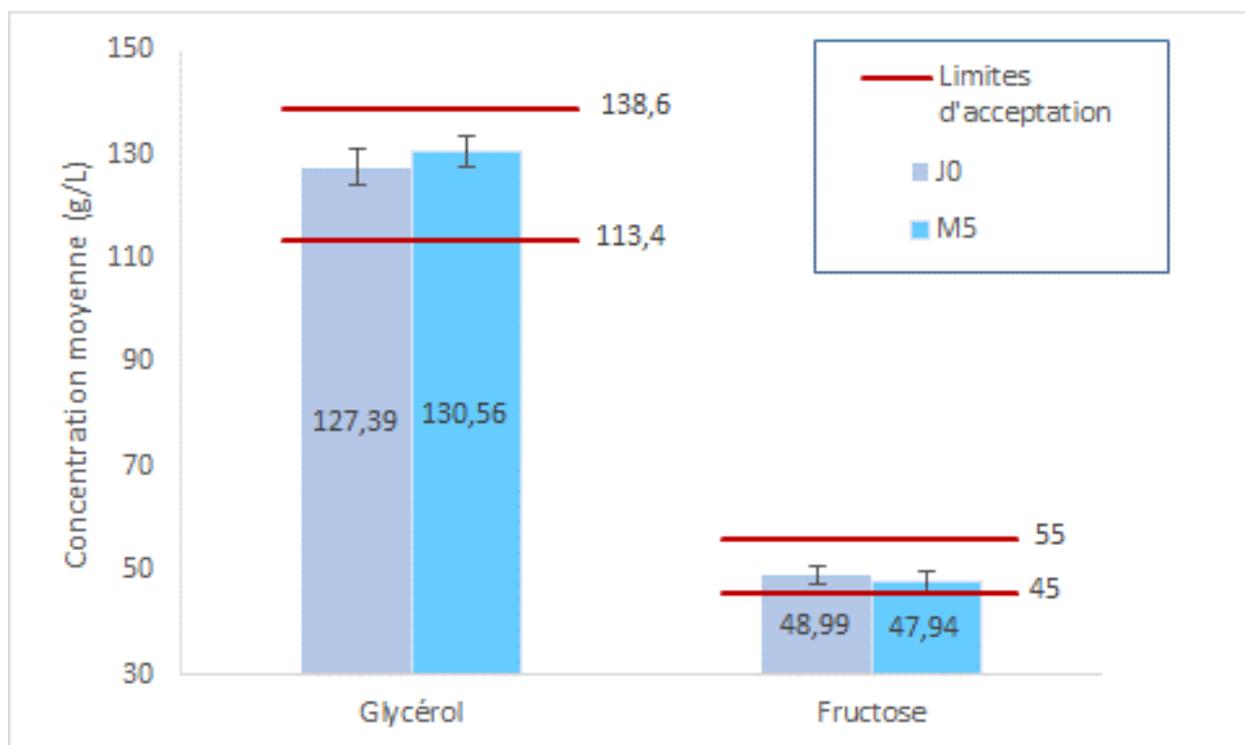


Figure 9 : Concentrations en fructose et glycérol des préparations immédiatement après leur production et après 5 mois de conservation

## B. Dosage 5HMF et 2FA

Le 2FA était indétectable et non quantifiable pour les échantillons analysés après préparation et après 5 mois de conservation (Figure 10).

La concentration retrouvée en 5HMF (moyenne  $\pm$  écart type) est inférieure à la limite de quantification à J0 et égale à  $0,043 \pm 0,054$ mg/L après 5 mois de conservation (Figure 10).

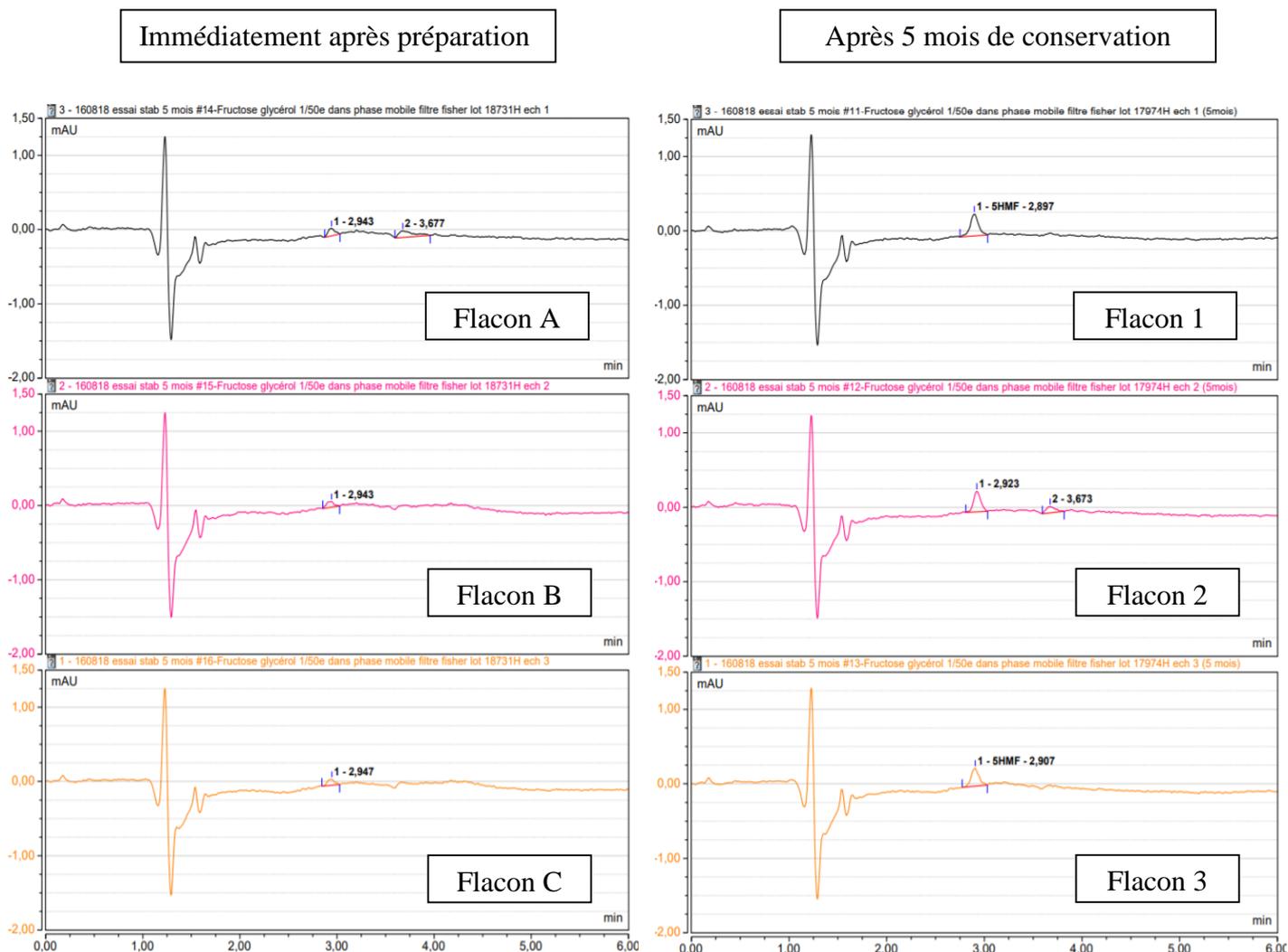


Figure 10 : Chromatogrammes des solutions de fructose 5% et glycérol 10% dans NaCl 0,9% dilués au 1/50<sup>e</sup> dans la phase mobile

Les chromatogrammes présentés à gauche sont ceux des trois flacons du premier lot, dosés immédiatement après leur préparation. Les chromatogrammes de droite correspondent aux flacons du lot conservé pendant 5 mois avant analyse.

### C. Essai de stérilité

Aucune culture n'a été observée après 4 jours et 14 jours d'incubation pour tous les échantillons analysés.

### D. Essai des endotoxines bactériennes

Le résultat de l'essai des endotoxines bactériennes n'était pas interprétable en raison d'une viscosité trop importante des solutions (Annexe 15).

L'essai a donc été réalisé sur les solutions diluées au 1/50<sup>e</sup> dans l'eppi, comme recommandé dans la notice du test. L'absence d'endotoxines bactériennes a été mise en évidence pour l'ensemble des solutions diluées testées (Annexe 16).

### E. Caractères organoleptiques

Il n'a été observé aucune différence entre les deux lots étudiés en terme de coloration (incolore) ni d'odeur (inodore) des solutions de fructose à 5% et glycérol à 10% dans NaCl 0,9%. Il n'a pas été observé d'apparition de trouble, de précipité, ni de gaz. Il n'a pas été observé de particules visibles par comparaison avec du NaCl 0,9%, utilisé comme témoin.

### F. pH

Le pH (moyenne  $\pm$  écart type calculés sur les mesures des 3 flacons de chaque lot) mesuré immédiatement après préparation des solutions était de  $6,31 \pm 0,05$  et de  $6,55 \pm 0,62$  après 5 mois de conservation.

### G. Osmolalité

L'osmolalité (moyenne  $\pm$  écart type calculés sur les mesures des 3 flacons de chaque lot) était respectivement de  $2330 \pm 12$  mOsm/kg et  $2269 \pm 18$  mOsm/kg immédiatement et 5 mois après la production.

#### H. Particules non visibles :

Les résultats du comptage des particules non visibles sont présentés dans le tableau ci-dessous (Tableau X).

Tableau X : Comparaison du comptage particulaire non visible des solutions de fructose 5% et glycérol 10% dans NaCl 0,9% à J0 et M5

Comptage des particules non visibles (particules/mL)	≥ 10µm	≥25µm
Analyse après préparation	9,99	0,37
Analyse après 5 mois de conservation	9,08	0,30
<b>Limites d'acceptation<sup>[111]</sup></b>	<b>25</b>	<b>3</b>

## DISCUSSION

Ce travail a permis de développer un mode de préparation simple à mettre en œuvre en pharmacie hospitalière d'une solution de fructose à 5% et de glycérol à 10% dans le NaCl 0,9%, et de mettre en place les contrôles nécessaires pour s'assurer de la qualité et la sécurité d'emploi de cette préparation selon ce procédé.

Les résultats de l'étude de stabilité des solutions de fructose et glycérol préparés dans nos conditions sont cohérents avec ceux retrouvés pour les solutions préparées sous azote par l'équipe de l'hôpital de Lyon<sup>[78]</sup>.

La mise au point de méthodes de dosage pour les produits de dégradation des oses est complexe. En effet, ces méthodes doivent permettre de quantifier de très faibles quantités de produits de dégradation, souvent proches des limites de quantification. Au cours de la validation de notre méthode analytique, nous avons testé différentes gammes d'étalonnage, afin de trouver celle permettant à la fois le dosage de la plus faible quantité de 5HMF et 2FA et la validation de la méthode selon les recommandations de la SFSTP<sup>[98-101]</sup> avec une erreur totale inférieure à 10%.

La nécessité de travailler avec des concentrations faibles en 5HMF et 2FA, associée aux limites des balances utilisées (pesée minimale de 10 mg) induit la réalisation d'un grand nombre de dilutions pour réaliser les gammes d'étalonnages et QC nécessaires à la validation de méthode. Ces multiples dilutions entraînent une addition d'imprécisions liées à la fois au manipulateur et intrinsèques aux instruments utilisés. Par ailleurs, le 5HMF est disponible sous la forme d'une poudre dont le point de fusion est proche de 25°C, ce qui rend les pesées difficiles et imprécises avec la fusion de la poudre survenant à température ambiante.

Dans le cas de la fabrication de la solution, la mise au point de la méthode de dosage était complexifiée par la présence de glycérol susceptible d'entraîner un effet matrice. Le fructose ne pouvait pas être intégré dans la matrice lors de la validation de la méthode de dosage en raison de la présence de 5HMF dans la matière première, liée au procédé de fabrication de la poudre de D-fructose (le séchage de la poudre entraîne une déshydratation et la formation de 5HMF)<sup>[91,94,102,103]</sup>. L'utilisation de fructose dans la solution matrice pour la validation de la méthode de dosage entraînerait l'ajout d'une quantité inconnue de 5HMF dans la gamme d'étalonnage, rendant la validation de méthode impossible.

La matrice utilisée pour la validation de la méthode analytique a donc été composée exclusivement de glycérol à 10% (v/v) dans le NaCl 0,9%.

Nous avons développé et validé une méthode analytique permettant le dosage simultané de deux produits de dégradation du fructose dans une préparation contenant du glycérol et du NaCl 0,9%.

Si le dosage par CLHP du 5HMF est répandu dans l'industrie agro-alimentaire<sup>[91,94]</sup>, la recherche des produits de dégradation des sucres dans les préparations pharmaceutiques par CLHP n'a, à notre connaissance, jamais été réalisée.

Pour les dosages du fructose et du glycérol nous avons utilisé les mêmes kits que ceux qui avaient été employés lors de l'étude de stabilité lyonnaise, nous avons ainsi pu nous affranchir de l'étape de validation de la méthode de dosage sur la fabrication. Il serait nécessaire de réaliser ces dosages dans le cadre d'une convention, comme prévu par le BPP<sup>[79]</sup>.

Les concentrations en fructose et en glycérol de tous les échantillons analysés étaient comprises dans l'intervalle défini par la valeur théorique  $\pm 10\%$  et leur variation par rapport à la valeur initiale était égale à 2,1% pour le fructose et 2,5% pour le glycérol après 5 mois de conservation. Par ce dosage nous avons vérifié la validité du procédé de fabrication en confirmant l'obtention d'une solution homogène contenant les concentrations attendues de fructose et de glycérol.

La validation du procédé de préparation, notamment par la méthode du test de remplissage aseptique n'a pas été effectuée, mais il serait intéressant de la réaliser. Le nombre d'étapes effectuées et le risque inhérent à la préparation conditionnent le risque de contamination. Le risque de contamination augmente avec le nombre d'étapes nécessaires à la préparation<sup>[112]</sup>, or il reste faible dans notre procédé (8 étapes). Par ailleurs, les prélèvements environnementaux d'air (sédimentation) et par gélose contact (gants du manipulateur) réalisés en cours de fabrication sous la HFAL, ainsi que l'ensemencement des solutions a permis de confirmer la stérilité des solutions préparées par ce mode opératoire.

Concernant les produits de dégradation du fructose (Figures 11 et 12), la méthode de dosage chromatographique développée permettait l'identification formelle du 5HMF et du 2FA, contrairement à la méthodologie non sensible et non spécifique proposée par la Pharmacopée Européenne<sup>[103]</sup> qui avait été utilisée par l'équipe de Lyon.

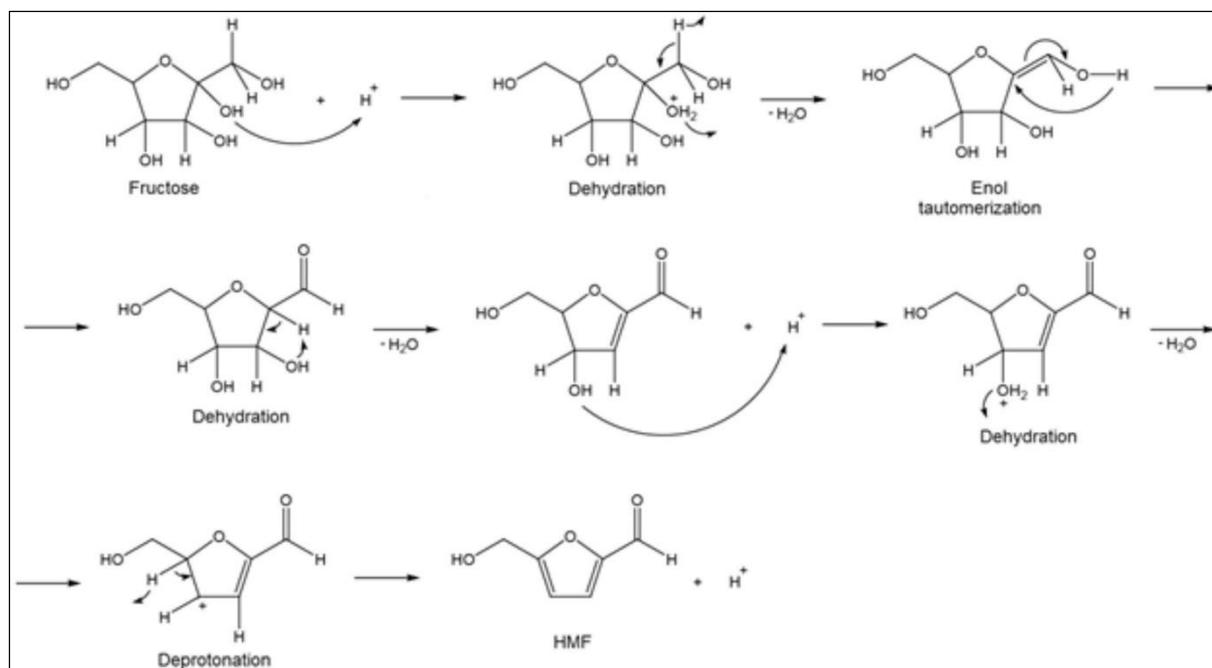


Figure 11 : Dégradation du Fructose en 5HMF d'après [113]

Les dosages de 5HMF ont montré une légère augmentation des concentrations au cours de la conservation avec des valeurs restant très inférieures à la limite de 2,5mg/L fixée par la PE<sup>[103]</sup>.

L'autre produit de dégradation est, quant à lui, demeuré indétectable après 5 mois de conservation des solutions. Ce résultat paraît cohérent puisque le 2FA est produit par décarboxylation du 5HMF et pourrait donc apparaître plus tardivement<sup>[92]</sup> (figure 12).

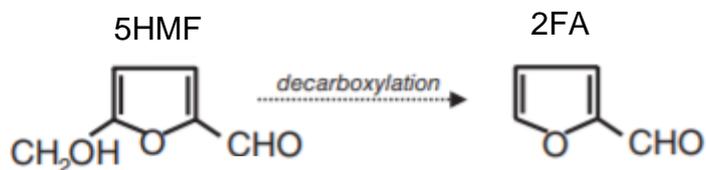


Figure 12 : Dégradation du 5HMF en 2FA d'après [92]

Les valeurs de pH proches de la neutralité sont compatibles avec une utilisation intramucosale et sont restées stables pendant les 5 mois de conservation. La légère acidité des solutions obtenues (pH<7) confirme la possibilité d'employer des récipients en verre de type 2 pour le conditionnement de celles-ci<sup>[80,81]</sup>.

L'osmolalité mesurée confirme l'hyperosmolalité des solutions de fructose et glycérol qui semble cependant ne pas impacter la bonne tolérance tissulaire de ces solutions<sup>[43]</sup>.

Contrairement à l'étude de stabilité de l'équipe de Lyon, nous n'avons pas effectué le dosage du sodium dans notre préparation. En effet, nous avons estimé que le sodium était davantage l'excipient que l'élément actif de la préparation et qu'un dosage correct en fructose et en glycérol, ainsi que l'osmolalité, associés au contrôle des témoins de lot du chlorure de sodium étaient suffisants pour garantir la qualité de la préparation.

Les résultats obtenus pour les différents tests de notre étude de stabilité à T0 et 5 mois après préparation montrent une stabilité maintenue des solutions de fructose et de glycérol conservées pendant 5 mois à l'abri de la lumière et à une température inférieure à 25°C.

Il semble donc que la présence d'oxygène lors de la préparation n'impacte pas sa stabilité.

Les essais de l'étude de stabilité ayant été réalisés sur des lots différents à J0 et M5, contrairement aux recommandations du guide sur les études de stabilité GERPAC-SFPC<sup>[105]</sup>, il est possible que les résultats de l'étude de stabilité soient légèrement biaisés. Il serait intéressant d'effectuer de nouveaux tests sur les lots à 6 mois et un an après leur préparation afin de confirmer ces résultats. Nous pourrions également tester la stabilité en utilisant les poches en EVA multicouches utilisées par l'équipe lyonnaise, et tester un remplissage de ces poches par pompe.

En travaillant à partir de la fiche de fabrication de Lyon (Annexe 17), nous avons développé une préparation à 10% (v/v) de glycérol qui est donc plus concentrée que la spécialité Glycéol<sup>®</sup> qui est formulée avec 10% (m/v) de glycérol. Son coût estimé est de l'ordre de 10 euros par flacon (1 à 2 flacons par intervention).

L'efficacité et la sécurité d'emploi des solutions de fructose et glycérol dans le NaCl isotonique précisent rarement l'unité employée pour la concentration en glycérol<sup>[6,19,20,28,29,37,38,43,44,46,48,52]</sup> et la spécialité japonaise Glycéol<sup>®</sup> est parfois mentionnée sous le nom de Glycerol ou Glycéol<sup>[7,28,45,47,52]</sup>, rendant les résultats difficiles à interpréter.

La mise à disposition de cette solution permet de pouvoir proposer de nouvelles solutions.

Nous pourrions ainsi faire varier la teneur en glycérol afin de modifier la viscosité de la préparation, et potentiellement de l'acide hyaluronique pourrait aussi être ajouté à la préparation. Ainsi une phase d'évaluation clinique pourrait être menée sur ces solutions, puisqu'à ce jour nous ne disposons pas de données comparatives directes.

Nous pourrions comparer l'efficacité en matière de résection complète en bloc, les complications et récurrences lors de l'utilisation de la préparation additionnée ou non d'une faible quantité d'acide hyaluronique (environ 0,5% m/v d'acide hyaluronique 460kDa, soit environ une seringue de la spécialité Hyalobarrier<sup>®</sup> gel (120€))<sup>[72]</sup>.

Cette solution pourrait être une des meilleures quant au coût-efficacité, et le surcoût engendré pourrait influencer le remboursement spécifique à cet acte.

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ce travail a permis la mise au point d'une technique de dosage simultanée par CLHP UV de deux produits de dégradation des oses dans une matrice composée de chlorure de sodium isotonique, fructose et glycérol. Cette méthode permet la quantification et l'identification de faibles quantités de 5HMF et 2FA dans une préparation utilisée pour la résection de tumeurs digestives superficielles par endoscopie. C'est à notre connaissance la première fois qu'une telle méthode est développée pour le contrôle de préparations pharmaceutiques.

Au cours de ce travail nous avons également établi un protocole de fabrication de la solution de fructose 5% - glycérol 10% dans le NaCl 0,9% et mis en place les contrôles qualité adéquats. Les dosages de fructose et glycérol réalisés en collaboration avec le CBP ont permis de vérifier la concentration en substance active, ainsi que l'uniformité de la solution préparée. Le dosage des produits de dégradation permet d'assurer la sécurité d'emploi de la préparation puisque les concentrations retrouvées sont infimes et - pour le 5HMF - très inférieure à la valeur seuil de 2,5 mg/L<sup>[103]</sup>.

L'étude de stabilité réalisée *a minima* en étudiant deux lots préparés à 5 mois d'intervalle a confirmé les résultats retrouvés pour la préparation fabriquée sous azote<sup>[78]</sup>. Ces résultats devront être confirmés par des analyses complémentaires de ces lots après 6 et 12 mois de conservation.

Par ailleurs, le maintien de la stérilité des solutions au cours du temps a également pu être démontré.

Sur la base de ces résultats, nous pouvons envisager la mise en place d'une préparation hospitalière d'une solution de fructose et glycérol pour résection de néoplasies digestives par endoscopie et offrir ainsi une solution sûre, efficace et peu onéreuse aux endoscopistes en l'absence de spécialité disponible dans cette indication. Cela devrait améliorer la prise en charge des patients et faciliter l'intervention. Cela sera évalué prochainement lors de tests au bloc opératoire.

Dans un premier temps, la stabilité de cette solution sera fixée à 3 mois et sera *a posteriori* étendue avec les résultats complémentaires de l'étude de stabilité.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Stewart BW, Wild C, International Agency for Research on Cancer, World Health Organization. World cancer report 2014 [Internet]. 2014 [cité 2018 juill 28]. Available from: <http://libweb.iaea.org/library/eBooks/World-Cancer-Report2014.pdf>
2. INCA - Les cancers en France [Internet]. [cité 2018 juill 28]; Available from: [http://www.e-cancer.fr/ressources/cancers\\_en\\_france/#page=1](http://www.e-cancer.fr/ressources/cancers_en_france/#page=1)
3. PONCHON T. Diagnostic endoscopique des lésions néoplasiques superficielles du tube digestif. *Gastroentérologie Clin Biol* 2000;(24):B109-22.
4. Définition classification TNM | Institut National Du Cancer [Internet]. [cité 2018 juill 28]; Available from: <http://www.e-cancer.fr/Dictionnaire/C/classification-TNM>
5. HERON JF. La classification des cancers. In: *Cancérologie générale*. Faculté de Médecine de Caen; 2003.
6. Pioche M. Optimisation de la technique de dissection sous muqueuse à l'aide d'un bistouri à jet d'eau haute-pression pulsée pour le traitement endoscopique des tumeurs superficielles du tube digestif - Thèse [Internet]. 2015 [cité 2018 juill 25]; Available from: <http://www.theses.fr/2015LYO10166>
7. Ferlitsch M, Moss A, Hassan C, Bhandari P, Dumonceau J-M, Paspatis G, et al. Colorectal polypectomy and endoscopic mucosal resection (EMR): European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE) Clinical Guideline. *Endoscopy* 2017;49(03):270-97.
8. Pimentel-Nunes P, Dinis-Ribeiro M, Ponchon T, Repici A, Vieth M, De Ceglie A, et al. Endoscopic submucosal dissection: European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE) Guideline. *Endoscopy* 2015;47(09):829-54.
9. Weusten B, Bisschops R, Coron E, Dinis-Ribeiro M, Dumonceau J-M, Esteban J-M, et al. Endoscopic management of Barrett's esophagus: European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE) Position Statement. *Endoscopy* 2017;49(02):191-8.
10. Gérard JP. TNCD-Chapitre 5 : Cancer du rectum [Internet]. Société Natl. Fr. Gastro Entérologie2016; Available from: <https://www.snfge.org/>
11. PHELIP J-M. TNCD- Chapitre 4 : Cancer colorectal métastatique [Internet]. Société Natl. Fr. Gastro Entérologie2018; Available from: <https://www.snfge.org/>
12. [tncd\\_chap-1-cancer-oesophage\\_2016-09-23.pdf](https://www.snfge.org/) [Internet]. Société Natl. Fr. Gastro Entérologie2016; Available from: <https://www.snfge.org/>
13. [tncd\\_chap-13-adenocarcinome-intestin-grele\\_2017-09-15\\_0.pdf](https://www.snfge.org/) [Internet]. Société Natl. Fr. Gastro Entérologie2017; Available from: <https://www.snfge.org/>
14. [tncd\\_chap-03-cancer-colon-non-metastatique\\_2018-04-18.pdf](https://www.snfge.org/) [Internet]. Société Natl. Fr. Gastro Entérologie2018; Available from: <https://www.snfge.org/>
15. Haute Autorité de santé-Annexe à la note de cadrage: PROTOCOLE D'ÉVALUATION DU TRAITEMENT ENDOSCOPIQUE PAR DISSECTION SOUS MUQUEUSE DES CANCERS SUPERFICIELS DE L'ESTOMAC. 2018;42.
16. Haute Autorité de santé- Annexe à la note de cadrage : PROTOCOLE D'ÉVALUATION DU TRAITEMENT ENDOSCOPIQUE PAR DISSECTION SOUS MUQUEUSE DES CANCERS SUPERFICIELS DE L'OESOPHAGE. 2018;42.
17. Haute Autorité de santé- Note de cadrage : TRAITEMENT ENDOSCOPIQUE PAR DISSECTION SOUS MUQUEUSE DES CANCERS SUPERFICIELS DE L'OESOPHAGE. 2018;9.

18. Haute Autorité de santé- Note de cadrage : TRAITEMENT ENDOSCOPIQUE PAR DISSECTION SOUS MUQUEUSE DES CANCERS SUPERFICIELS DE L'ESTOMAC. 2018;8.
19. Ferreira A, Moleiro J, Torres J, Dinis-Ribeiro M. Solutions for submucosal injection in endoscopic resection: a systematic review and meta-analysis. *Endosc Int Open* 2015;04(01):E1-16.
20. Ponchon T. Mucosectomie endoscopique. *Acta Endosc* 1997;27(4):305-10.
21. Monographie des préparations parentérales. Actualisée en 04/2015. Eur. Pharmacopoeia Online 95
22. Soetikno R, Kaltenbach T, Yeh R, Gotoda T. Endoscopic Mucosal Resection for Early Cancers of the Upper Gastrointestinal Tract. *J Clin Oncol* 2005;23(20):4490-8.
23. TNM | UICC [Internet]. [cité 2018 août 5]; Available from: <https://www.uicc.org/resources/tnm>
24. Heresbach D, Vedrenne B, Laugier R, Saurin J-C, Burtin P, Bories E, et al. Consensus en endoscopie digestive : Conduite à tenir après polypectomie ou mucosectomie rectocolique selon le résultat de l'analyse d'anatomie pathologique. *Acta Endosc* 2011;41(4):222-9.
25. Endoscopic Classification Review Group. Update on the Paris Classification of Superficial Neoplastic Lesions in the Digestive Tract. *Endoscopy* 2005;37(6):570-8.
26. The Paris endoscopic classification of superficial neoplastic lesions: esophagus, stomach, and colon: November 30 to December 1, 2002. *Gastrointest Endosc* 2003;58(6 Suppl):S3-43.
27. Tada M. Development of the strip-off biopsy. *Gastroenterol Endosc* 1984;26:833-9.
28. Barthet M. Résection endoscopique des néoplasies digestives. e-mémoires de l'Académie Nationale de Chirurgie 2008; 7(3):56-60.
29. Barthet M. Comment réussir une mucosectomie ? Journées Francophones D'Hépatogastroentérologie et D'Oncologie Digestive 2010.
30. Heresbach D, Ponchon T, Giovannini M, Monges G, Boustière C, Laugier R. Mucosectomie rectocolique. *Acta Endosc* 2008;38(4):404-13.
31. Torii A, Sakai M, Kajiyama T, Kishimoto H, Kin G, Inoue K, et al. Endoscopic aspiration mucosectomy as curative endoscopic surgery; analysis of 24 cases of early gastric cancer. *Gastrointest Endosc* 1995;42(5):475-9.
32. Vanbiervliet G. Critères de qualité de la polypectomie mucosectomie rectocolique. *Hépatogastro* 2015;22:157-62.
33. [Atelier] Comment réussir une mucosectomie ? [Internet]. FMC-HGE2010 [cité 2018 juill 24]; Available from: <http://www.fmcgastro.org/postu-main/archives/postu-2010-paris/atelier-comment-reussir-une-mucosectomie-2/>
34. Pioche M, Vaillant E. Polypectomie, mucosectomie, dissection sous-muqueuse: trucs et astuces. *Acta Endosc* 2017;47(5):276-80.
35. Rosenberg N. SUBMUCOSAL SALINE WHEEL AS SAFETY FACTOR IN FULGURATION OF RECTAL AND SIGMOIDAL POLYPI. *Arch Surg* 1955;70(1):120.
36. Ponchon T. Dissection sous-muqueuse : technique et résultats. *Lett Hépatogastroentérologie* 2010;XIII(6):7.

37. Lépilliez V. Dissection sous-muqueuse colorectale. *Côlon Rectum* 2012;6(1):24-31.
38. Fujishiro M, Yahagi N, Nakamura M, Kakushima N, Kodashima S, Ono S, et al. Successful outcomes of a novel endoscopic treatment for GI tumors: endoscopic submucosal dissection with a mixture of high-molecular-weight hyaluronic acid, glycerin, and sugar. *Gastrointest Endosc* 2006;63(2):243-9.
39. Leblanc S. Comment je fais... une dissection sous-muqueuse ? *Côlon Rectum* 2017;11(2):98-102.
40. Pioche M, Saurin J-C, Saito Y, Ponchon T. La dissection sous- muqueuse en Europe, ou` en est-on ? *Hépatogastro* 2015 ; 22 : 253-261.
41. Zaanan A, Bouché O, Benhaim L, Buecher B, Chapelle N, Dubreuil O, et al. Gastric cancer: French intergroup clinical practice guidelines for diagnosis, treatments and follow-up (SNFGE, FFCD, GERCOR, UNICANCER, SFCD, SFED, SFRO). *Dig Liver Dis* 2018;50(8):768-79.
42. European Pharmacopoeia Online 8.8-préparations parentérales [Internet]. [cité 2016 août 24]; Available from: <http://online6.edqm.eu.doc-distant.univ-lille2.fr/ep808/>
43. Fujishiro M, Yahagi N, Kashimura K, Matsuura T, Nakamura M, Kakushima N, et al. Tissue damage of different submucosal injection solutions for EMR. *Gastrointest Endosc* 2005;62(6):933-42.
44. Devulder F, Letard JC, Sautereau D. Accessoires en endoscopie digestive. *Acta Endosc* 1999;29(S2):397-401.
45. Conio M, Rajan E, Sorbi D, Norton I, Herman L, Filiberti R, et al. Comparative performance in the porcine esophagus of different solutions used for submucosal injection. *Gastrointest Endosc* 2002;56(4):513-6.
46. Fujishiro M, Yahagi N, Kashimura K, Mizushima Y, Oka M, Enomoto S, et al. Comparison of Various Submucosal Injection Solutions for Maintaining Mucosal Elevation During Endoscopic Mucosal Resection. *Endoscopy* 2004;36(7):579-83.
47. Coumaros D, Tsesmeli N, Tzilves D, Yahagi N. Dissection sous-muqueuse endoscopique de lésions néoplasiques superficielles et de tumeurs carcinoïdes du rectum: expérience monocentrique. *Endoscopy* [Internet] 2009 [cité 2018 juill 25];41(03). Available from: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0029-1215691>
48. Kajiyama T, Hajiro K, Sakai M, Inoue K, Konishi Y, Takakuwa H, et al. Endoscopic resection of gastrointestinal submucosal lesions: a comparison between strip biopsy and aspiration lumpectomy. *Gastrointest Endosc* 1996;44(4):404-10.
49. Pioche M, Ciocirlan M, Lépilliez V, Salmon D, Mais L, Guillaud O, et al. High-pressure jet injection of viscous solutions for endoscopic submucosal dissection: a study on ex vivo pig stomachs. *Surg Endosc* 2014;28(5):1742-7.
50. Tanaka S, Kashida H, Saito Y, Yahagi N, Yamano H, Saito S, et al. JGES guidelines for colorectal endoscopic submucosal dissection/endoscopic mucosal resection: Colorectal ESD/EMR guidelines. *Dig Endosc* 2015;27(4):417-34.
51. Yandrapu H, Desai M, Siddique S, Vennalaganti P, Vennalaganti S, Parasa S, et al. Normal saline solution versus other viscous solutions for submucosal injection during endoscopic mucosal resection: a systematic review and meta-analysis. *Gastrointest Endosc* 2017;85(4):693-9.
52. Uraoka T, Saito Y, Yamamoto K, Fujii T. Submucosal injection solution for gastrointestinal tract endoscopic mucosal resection and endoscopic submucosal dissection. *Drug Des Devel Ther* 2009;2:131-8.

53. Jung YS, Park DI. Submucosal injection solutions for endoscopic mucosal resection and endoscopic submucosal dissection of gastrointestinal neoplasms. *Gastrointest Interv* 2013;2(2):73-7.
54. Lambert R. Endoscopic treatment of esophagogastric tumors. *Endoscopy* 1998;30(02):80-93.
55. Repici A, Maselli R, Carrara S, Anderloni A, Enderle M, Hassan C. Standard needle versus needleless injection modality: animal study on different fluids for submucosal elevation. *Gastrointest Endosc* 2017;86(3):553-8.
56. Kang KJ, Min B-H, Lee JH, Kim ER, Sung CO, Cho JY, et al. Alginate Hydrogel as a Potential Alternative to Hyaluronic Acid as Submucosal Injection Material. *Dig Dis Sci* 2013;58(6):1491-6.
57. Ishihara M, Kumano I, Hattori H, Nakamura S. Application of hydrogels as submucosal fluid cushions for endoscopic mucosal resection and submucosal dissection. *J Artif Organs* 2015;18(3):191-8.
58. Yamamoto H, Yube T, Isoda N, Sato Y, Sekine Y, Higashizawa T, et al. A novel method of endoscopic mucosal resection using sodium hyaluronate. *Gastrointest Endosc* 1999;50(2):251-6.
59. Jin Hyun J, Rae Chun H, Jai Chun H, Tae Jeen Y, Won Baek C, Kyun Yu S, et al. Comparison of the characteristics of submucosal injection solutions used in endoscopic mucosal resection. *Scand J Gastroenterol* 2006;41(4):488-92.
60. Yoshida N, Naito Y, Kugai M, Inoue K, Uchiyama K, Takagi T, et al. Efficacy of hyaluronic acid in endoscopic mucosal resection of colorectal tumors: Hyaluronic acid use in endoscopic therapy. *J Gastroenterol Hepatol* 2011;26(2):286-91.
61. Kim ER, Park YG, Min B-H, Lee JH, Rhee P-L, Kim JJ, et al. Usefulness of Ready-to-Use 0.4% Sodium Hyaluronate (Endo-Ease) in the Endoscopic Resection of Gastrointestinal Neoplasms. *Clin Endosc* 2015;48(5):392.
62. Hirasaki S, Kozu T, Yamamoto H, Sano Y, Yahagi N, Oyama T, et al. Usefulness and safety of 0.4% sodium hyaluronate solution as a submucosal fluid « cushion » for endoscopic resection of colorectal mucosal neoplasms: A prospective multi-center open-label trial. *BMC Gastroenterol* [Internet] 2009 [cité 2018 août 23];9(1). Available from: <http://bmcgastroenterol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-230X-9-1>
63. Yoshida N, Naito Y, Inada Y, Kugai M, Yagi N, Inoue K, et al. Multicenter study of endoscopic mucosal resection using 0.13 % hyaluronic acid solution of colorectal polyps less than 20 mm in size. *Int J Colorectal Dis* 2013;28(7):985-91.
64. Uraoka T, Fujii T, Saito Y, Sumiyoshi T, Emura F, Bhandari P, et al. Effectiveness of glycerol as a submucosal injection for EMR. *Gastrointest Endosc* 2005;61(6):736-40.
65. Kishihara T, Chino A, Uragami N, Yoshizawa N, Imai M, Ogawa T, et al. Usefulness of sodium hyaluronate solution in colorectal endoscopic mucosal resection. *Dig Endosc* 2012;24(5):348-52.
66. Hurlstone D, Fu K, Brown S, Thomson M, Atkinson R, Tiffin N, et al. EMR using dextrose solution versus sodium hyaluronate for colorectal Paris type I and 0-II lesions: a randomized endoscopist-blinded study. *Endoscopy* 2008;40(02):110-4.
67. Yoshida N, Naito Y, Inada Y, Kugai M, Kamada K, Katada K, et al. Endoscopic mucosal resection with 0.13% hyaluronic acid solution for colorectal polyps less than 20 mm: A randomized controlled trial: Hyaluronic acid in colorectal EMR. *J Gastroenterol Hepatol* 2012;27(8):1377-83.

68. Hui P, Long ZY, Jun HX, Wei W, Yong HJ, Peng LH. Endoscopic Resection With Hyaluronate Solution for Gastrointestinal Lesions: Systematic Review and Meta-Analysis. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech* 2014;24(3):6.
69. Yamamoto H, Kawata H, Sunada K, Satoh K, Kaneko Y, Ido K, et al. Success rate of curative endoscopic mucosal resection with circumferential mucosal incision assisted by submucosal injection of sodium hyaluronate. *Gastrointest Endosc* 2002;56(4):507-12.
70. Matsui Y, Inomata M, Izumi K, Sonoda K, Shiraishi N, Kitano S. Hyaluronic acid stimulates tumor-cell proliferation at wound sites. *Gastrointest Endosc* 2004;60(4):539-43.
71. Rooney P, Kumar S, Ponting J, Wang M. The role of hyaluronan in tumour neovascularization (review). *Int J Cancer* 1995;60(5):632-6.
72. Fujishiro M, Yahagi N, Kashimura K, Mizushima Y, Oka M, Matsuura T, et al. Different Mixtures of Sodium Hyaluronate and Their Ability to Create Submucosal Fluid Cushions for Endoscopic Mucosal Resection. *Endoscopy* 2004;36(7):584-9.
73. Lambert R. Treatment of Esophagogastric Tumors. *Endoscopy* 2003;35(2):118-26.
74. Bureš J, Kopáčová M, Květina J, Österreicher J, Šinkorová Z, Svoboda Z, et al. Different solutions used for submucosal injection influenced early healing of gastric endoscopic mucosal resection in a preclinical study in experimental pigs. *Surg Endosc* 2009;23(9):2094-101.
75. Jacques J, Kerever S, Carrier P, Couquet C-Y, Debette-Gratien M, Tabouret T, et al. HybridKnife high-pressure glycerol jet injection for endoscopic submucosal dissection increases procedural ease and speed: a randomised study in pigs and a human case series. *Surg Endosc* 2016;30(7):3152-9.
76. Hatogai K. Unexpected endoscopic full-thickness resection of a duodenal neuroendocrine tumor. *World J Gastroenterol* 2013;19(26):4267.
77. Matsui T, Matsubayashi H, Hotta K, Sasaki K, Ito H, Ono H. A case of carcinoma in an adenoma of the duodenal minor papilla successfully treated with endoscopic mucosal resection. *Endosc Int Open* 2016;04(03):E252-4.
78. Tall ML, Salmon D, Diouf E, Draï J, Filali S, Lépilliez V, et al. Validation du procédé aseptique et étude de stabilité d'une préparation injectable de fructose (5 %)-glycérol (10 %) dans le cadre d'un programme hospitalier de recherche clinique portant sur le traitement curatif endoscopique des lésions néoplasiques épithéliales précoces du tube digestif. *Ann Pharm Fr* 2015;73(2):139-49.
79. Décision du 5 novembre 2007 relative aux bonnes pratiques de préparation.
80. Monographie 3.2.1 Récipients de verre pour usage pharmaceutique. Actualisé en 04/2015. *Eur. Pharmacopoeia Online* 95
81. Dillingh J, Smith J. Containers [Internet]. In: Bouwman-Boer Y, Fenton-May V, Le Brun P, éditeurs. *Practical Pharmaceutics*. Cham: Springer International Publishing; 2015 [cité 2018 août 27]. page 501-36. Available from: [http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-15814-3\\_24](http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-15814-3_24)
82. Décret n° 2012-1201 du 29 octobre 2012 relatif à l'étiquetage des préparations et d'autres produits pharmaceutiques. 2012.
83. 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.

84. 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.
85. 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.
86. 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.
87. Himmele R, Sawin D-A, Diaz-Buxo JA. GDPs and AGEs: impact on cardiovascular toxicity in dialysis patients. *Adv Perit Dial Conf Perit Dial* 2011;27:22-6.
88. 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* 2015;35(1):35-42.
89. 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.
90. 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.
91. Truzzi C, Annibaldi A, Illuminati S, Finale C, Rossetti M, Scarponi G. Determination of Very Low Levels of 5-(Hydroxymethyl)-2-furaldehyde (HMF) in Natural Honey: Comparison Between the HPLC Technique and the Spectrophotometric White Method. *J Food Sci* 2012;77(7):C784-90.
92. Morales FJ. Hydroxymethylfurfural (HMF) and Related Compounds [Internet]. In: Stadler RH, Lineback DR, éditeurs. *Process-Induced Food Toxicants*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2008 [cité 2018 août 12]. page 135-74. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/9780470430101.ch2e>
93. de Andrade JK, Komatsu E, Perreault H, Torres YR, da Rosa MR, Felsner ML. In house validation from direct determination of 5-hydroxymethyl-2-furfural (HMF) in Brazilian corn and cane syrups samples by HPLC–UV. *Food Chem* 2016;190:481-6.
94. Ariffin AA, Ghazali HM, Kavousi P. Validation of a HPLC method for determination of hydroxymethylfurfural in crude palm oil. *Food Chem* 2014;154:102-7.
95. Haybrard J, Simon N, Danel C, Pinçon C, Barthélémy C, Tessier FJ, et al. Factors Generating Glucose Degradation Products In Sterile Glucose Solutions For Infusion: Statistical Relevance Determination Of Their Impacts. *Sci Rep [Internet]* 2017 [cité 2018 juill 25];7(1). Available from: <http://www.nature.com/articles/s41598-017-12296-5>
96. Haybrard J. Impact du mode stérilisation sur la formation des produits de dégradation du glucose dans les solutions glucosées injectables [Internet]. 2017 [cité 2018 juill 25]; Available from: <http://pepite.univ-lille2.fr/notice/view/UDSL2-workflow-8619>
97. Monographie glycérol. Actualisée en 01/2017.
98. Hubert P, Nguyen-Huu J-J, Boulanger B, Chapuzet E, Chiap P, Cohen N, et al. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures: A SFSTP proposal – Part II. *J Pharm Biomed Anal* 2007;45(1):70-81.
99. 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.

100. 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.
101. 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. *J Pharm Biomed Anal* 2008;48(3):760-71.
102. USP Monographs: Fructose and Sodium Chloride Injection [Internet]. [cité 2018 juill 28]; Available from: [http://www.pharmacopeia.cn/v29240/usp29nf24s0\\_m34390.html](http://www.pharmacopeia.cn/v29240/usp29nf24s0_m34390.html)
103. Monographie fructose. Actualisée en 01/2016. Eur. Pharmacopoeia Online 95
104. Guideline IHT, others. Validation of analytical procedures: text and methodology. Q2 R1 [Internet] 2005 [cité 2016 août 24];1. Available from: <http://somatek.com/content/uploads/2014/06/sk140605h.pdf>
105. Sautou V, Société française de pharmacie clinique, Groupe d'évaluation et de recherche sur la protection en atmosphère contrôlée. Guide méthodologique des études de stabilité des préparations. Clermont-Ferrand; [Pau: SFCP ; GERPA; 2013.
106. Monographie 2.6.1- Stérilité. Actualisée en 04/2011. Eur. Pharmacopoeia Online 95
107. Monographie 5.1.9-Indications sur l'application de l'essai de stérilité. Actualisée en 01/2009. Eur. Pharmacopoeia Online 95
108. Monographie 2.6.14- Endotoxines bactériennes. Actualisée en 01/2018. Eur. Pharmacopoeia Online 95
109. monographie 5.1.10-Recommandations pour la réalisation de l'essai des endotoxines bactériennes. Actualisée en 07/2016. Eur. Pharmacopoeia Online 95
110. European Pharmacopoeia Online 8.8-monographie 2.9.19 [Internet]. [cité 2016 août 24]; Available from: <http://online6.edqm.eu.doc-distant.univ-lille2.fr/ep808/>
111. Monographie 2.9.29- Contamination particulière: Particules non visibles. Actualisée en 04/2011. Eur. Pharmacopoeia Online 95
112. Sigward E, Fourgeaud M, Vazquez R, Guerrault-Moro M-N, Brossard D, Crauste-Manciet S. Aseptic simulation test challenged with microorganisms for validation of pharmacy operators. *Am J Health Syst Pharm* 2012;69(14):1218-24.
113. Melo FC de, Souza RF de, Coutinho PLA, Souza MO de, Melo FC de, Souza RF de, et al. Synthesis of 5-Hydroxymethylfurfural from Dehydration of Fructose And Glucose Using Ionic Liquids. *J Braz Chem Soc* 2014;25(12):2378-84.

## ANNEXE 1 : Place de l'EMR et l'ESD dans la prise en charge des tumeurs de l'œsophage (1/2)

	Carcinomes épidermoïdes (cellules squameuses)	
	En France <sup>[12,16,17]</sup>	En Europe <sup>[8]</sup>
Bilan pré-thérapeutique	<p>Endoscopie œso-gastrique avec coloration vitale ou virtuelle et biopsies multiples</p> <p style="text-align: center;">Classification TNM et Paris (tumeurs superficielles)</p> <p style="text-align: center;">Bilan d'extension Etat général, comorbidités</p>	<p>Endoscopie haute résolution pour tous les patients avec dysplasie de haut grade ou cancer superficiel</p> <p style="text-align: center;">Classification de Paris (probabilité de cancer invasif) Biopsies pour confirmer la dysplasie</p>
Traitement	<p>Résection muqueuse endoscopique (EMR) pour les néoplasies superficielles ou à faible risque ganglionnaire &lt;10mm</p> <p style="text-align: center;">Dissection sous muqueuse (ESD) si &gt;10mm</p> <p style="text-align: center;">Chirurgie si lésion &gt;2/3 circonférence (sténose)</p>	<p>EMR si lésion &lt; 10mm si résection endoscopique « en bloc » peut être assurée</p> <p style="text-align: center;">ESD recommandée en 1<sup>e</sup> intention</p>
Traitements complémentaires	<p>AUCUN : Résection R0 en bloc lésion superficielle m2 + pas d'envahissement lympho-vasculaire</p> <p>A DISCUTER : Résection R0 en bloc tumeurs m3/sm1 ≤200µm bien différenciées + pas d'envahissement lympho-vasculaire</p> <p>CHIMIOThERAPIE OU CHIRURGIE : Lésions sm2 ou &gt;200µm, faiblement différenciées/invasion lympho-vasculaire/ marges profondes positives</p> <p>SURVEILLANCE ± REINTERVENTION : marges latérales positives et pas d'autres critères péjoratifs</p>	
Suivi	<p>Examen clinique et scanner thoraco-abdominal tous les 6 mois pendant 5 ans.</p> <p>Examen ORL annuel et fibroscopie digestive à 2 ans</p>	<p>Endoscopie à 3-6 mois puis tous les ans par endoscopie haute résolution ± colorants et biopsies des lésions suspectes</p>

## ANNEXE 2 : Place de l'EMR et l'ESD dans la prise en charge des tumeurs de l'œsophage (2/2)

	Œsophage de Barrett	
	En France <sup>[12,16,17]</sup>	En Europe <sup>[8,9]</sup>
Bilan pré-thérapeutique	<p>Endoscopie oeso-gastrique avec coloration vitale ou virtuelle et biopsies multiples</p> <p>Classification TNM et Paris (tumeurs superficielles)</p> <p>Bilan d'extension Etat général, comorbidités</p>	<p>Endoscopie haute résolution pour tous les patients avec dysplasie de haut grade ou cancer superficiel</p> <p>Classification de Paris (probabilité de cancer invasif) Biopsies pour confirmer la dysplasie</p>
Traitement	<p>Résection des lésions visibles</p> <p>Mucosectomie (EMR) pour les néoplasies superficielles ou à faible risque ganglionnaire &lt;15mm</p> <p>Dissection sous muqueuse (ESD) si &gt;15mm, difficile à soulever ou à risque d'invasion sous muqueuse</p>	<p>EMR en 1<sup>e</sup> intention</p> <p>ESD à considérer si lésion &gt;15mm, faiblement surélevée et risque d'invasion sous muqueuse</p>
Traitements complémentaires	<p>AUCUN : Résection R0 en bloc lésion superficielle avec adénocarcinome muqueux</p> <p>A DISCUTER : Résection R0 en bloc tumeurs sm1 ≤500µm bien différenciées + pas d'envahissement lympho-vasculaire</p> <p>CHIRURGIE : Lésions &gt;500µm, faiblement différenciées/ invasion lympho-vasculaire/ marges profondes positives</p> <p>SURVEILLANCE ± REINTERVENTION : marges latérales positives et pas d'autres critères péjoratifs Cancer superficiel sur muqueuse de Barrett : radiofréquence, coagulation au plasma argon, réintervention</p>	
Suivi	<p>Examen clinique et scanner thoraco-abdominal tous les 6 mois pendant 5 ans. Fibroscopie digestive à 2 ans</p>	<p>Endoscopie à 3-6 mois puis tous les ans par endoscopie haute résolution ± colorants et biopsies des lésions suspectes</p>

### ANNEXE 3 : Place de l'EMR et l'ESD dans la prise en charge des tumeurs gastriques

	En France <sup>[15,18,41]</sup>	En Europe <sup>[8]</sup>
Bilan pré-thérapeutique	<p>Endoscopie œso-gastrique et biopsies</p> <p>Classification TNM Classification de Lauren :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Intestinal glandulaire</li> <li>• Diffus (Linites)</li> <li>• Mixte</li> </ul> <p>Bilan d'extension, Evaluation de l'état général et comorbidités Recherche d'une prédisposition familiale (Syndrome de Lynch, mutation CDH1) Recherche d'infection par <i>Helicobacter pylori</i></p>	<p>Endoscopie de bonne qualité, idéalement chromoendoscopie digitale ou de contraste</p>
Traitement	<p>Traitement endoscopique principalement pour les adénocarcinomes de type intestinal EMR si taille ≤10mm ESD si &gt;10mm</p> <p>Première intention si adénocarcinome intestinal bien/moyennement différencié de stade I ou II de la classification de Paris, de moins de 30mm ou sans limite de taille si non ulcéré, bien différencié et intra-muqueux</p>	<p>Résection endoscopique des tumeurs superficielles à faible risque d'invasion ganglionnaire Mucosectomie si ≤10-15mm et faible probabilité d'histologie avancée (Paris 0 à IIa) ESD Traitement de choix pour la plupart des lésions néoplasiques gastriques superficielles</p>
Traitements complémentaires	<p>AUCUN : Résection R0 en bloc de lésions dysplasiques ou adénocarcinome intra-muqueux de type intestinal sans ulcération ni invasion lympho-vasculaire A DISCUTER : Résection R0 en bloc d'adénocarcinome intra-muqueux intestinal ulcéré ≤30mm ou adénocarcinome sous muqueux sm1 (&lt;500µm) et sans invasion lympho-vasculaire. Résection R0 de lésions non ulcérées intra-muqueuses faiblement différenciées ≤20mm CHIRURGIE : Carcinomes diffus peu différenciés ou invasion lympho-vasculaire, infiltration sous muqueuse &gt;500µm, marges verticales positives, ulcération de tumeurs &gt;30mm SURVEILLANCE ± REINTERVENTION : Marges latérales positives ou résection fragmentée (Piece-meal) sans autres marqueurs péjoratifs</p>	
Suivi	<p>Endoscopie de surveillance 3 à 6 mois après résection puis tous les ans (chromoendoscopie)</p>	<p>Endoscopie à 3-6 mois puis annuellement Tumeurs ulcérées ou indifférenciées : Scanner abdominal à discuter Surveillance endoscopique + biopsies à 3 mois, 9 ou 12 mois puis annuellement pour résection piece-meal ou marges latérales positives</p>

## ANNEXE 4 : Place de l'EMR et l'ESD dans la prise en charge des tumeurs coliques

	En France <sup>[14]</sup>	En Europe <sup>[7,8]</sup>
Bilan pré-thérapeutique	<p>Coloscopie et biopsies</p> <p>Classification TNM</p> <p>Bilan d'extension, Evaluation de l'état général et comorbidités Recherche d'une prédisposition familiale (Syndrome de Lynch, Polypose adénomateuse)</p>	<p>Endoscopie haute définition et chromoendoscopie</p>
Traitement	<p>La majorité des lésions superficielles coliques peuvent être efficacement retirées par polypectomie et/ou mucosectomie</p> <p>ESD à considérer pour le retrait de lésions à haute suspicion d'invasion limitée de la sous-muqueuse et en particulier celles &gt;20mm ou les lésions ne pouvant pas être retirées de manière optimale pas les autres techniques</p>	
Traitements complémentaires	<p>AUCUN :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Résection R0 en bloc d'un adénome dégénéré de type intramuqueux</li> <li>Résection R0 en bloc de carcinomes sous muqueux ≤1000µm si lésion sessile ou plane, ou limitée au maximum au tiers supérieur du pied si pédiculé</li> </ul> <p>ET critères de sécurité (adénocarcinome bien/ moyennement différencié, sans invasion lympho-vasculaire, marges &gt;1mm et pas de budding)</p> <p>A DISCUTER : Adénome dégénéré en sous muqueux</p> <p>SURVEILLANCE : si résection incomplète ou absence des tous les critères de sécurité</p>	<p>AUCUN : Résection R0 en bloc de carcinome bien différencié (G1/G2), sm1 (≤1000µm) et pas d'atteinte lympho-vasculaire</p> <p>CHIRURGIE : atteinte lympho-vasculaire, invasion sous muqueuse &gt; sm1, marges profondes positives ou non évaluables ou tumeur peu différenciée avec invasion sous muqueuse</p> <p>SURVEILLANCE : Marges latérales positives en l'absence d'autres facteurs péjoratifs</p>
Suivi	<p>Imagerie hépatique, thoracique, dosage Antigène Carcino Embryonnaire (ACE), Scanner tous les 3 mois pendant 3 ans, puis tous les 6 mois pendant 2 ans</p>	<p>Endoscopie à 3-6 mois puis, si pas de récurrence, annuellement</p> <p>Tumeurs ulcérées ou indifférenciées : Scanner abdominal à discuter</p> <p>Colonoscopie + biopsies à 3 mois pour résection piece-meal ou marges latérales positives sans indication de chirurgie</p>

## ANNEXE 5 : Place de l'EMR et l'ESD dans la prise en charge des tumeurs rectales

	En France <sup>[10]</sup>	En Europe <sup>[7,8]</sup>
Bilan pré-thérapeutique	<p>Toucher rectal, Rectoscopie, Coloscopie, Echo-endoscopie rectale et biopsies</p> <p>Classification Anatomique Classification TNM</p> <p>Bilan d'extension, Evaluation de l'état général et comorbidités Recherche d'une prédisposition familiale (Syndrome de Lynch : chromoendoscopie ou coloration virtuelle)</p>	<p>Endoscopie haute définition et chromoendoscopie</p> <p>Lésions rectales avec facteurs endoscopiques suspects d'invasion sous muqueuse : détermination du stade par Ultrasons endoscopiques ou IRM</p>
Traitement	<p>Exérèse locale par voie trans-anales : ESD ou microchirurgie trans-anales endoscopique (++) Adénocarcinome in situ ou sm1, bien/moyennement différencié, sans invasion lympho-vasculaire, sans budding et sans contingentement mucineux ou à cellules indépendantes Tumeur T1 sm1/2, N0 &lt;30mm : exérèse locale par chirurgie trans-anales ou ESD voire mucosectomie</p>	<p>La majorité des lésions superficielles rectales peuvent être efficacement retirées par polypectomie et/ou mucosectomie ESD à considérer pour le retrait de lésions à haute suspicion d'invasion limitée de la sous-muqueuse et en particulier celles &gt;20mm ou les lésions ne pouvant pas être retirées de manière optimale par les autres techniques</p> <p>Polypes sessiles ou plans : Non invasifs ≤9mm résection par anse froide Non invasifs 10-19mm résection à l'anse chaude avec injection sous muqueuse Non invasif &gt;20mm mucosectomie (en bloc si &lt;25mm) ± Piece-meal (&gt;40mm référer à un centre expert)</p> <p>Polypes pédiculés : Tête &gt;20mm ou pied &gt;10mm de diamètre : résection à l'anse chaude et injection de sérum adrénaliné ou hémostase mécanique Tête ≤20mm ou pied ≤10mm de diamètre : Résection par anse chaude Suspicion d'invasion sous muqueuse superficielle : mucosectomie ou ESD</p> <p>Suspicion d'invasion sous muqueuse profonde : chirurgie</p>
Traitements complémentaires	<p>Si exérèse incomplète ou extension tumorale en profondeur supérieure à celle attendue, ou présence de facteurs péjoratifs : Chirurgie (proctectomie)</p>	
Suivi	<p>Examen clinique tous les 3 mois pendant 2 ans puis biannuel pendant 3 ans</p> <p>Dosage ACE tous les 3 mois</p> <p>Echo abdominale et radiographie thoracique en alternance avec scanner thoraco-abdomino-pelvien tous les 3 mois pendant 2 ans puis biannuel pendant 3 ans</p> <p>Coloscopie à 3 ans</p>	

## ANNEXE 6 : Résumé des études ex vivo et in vivo chez l'animal (1/3)

Réf	Type de publication	Groupe(s) étudié(s)	Composition étude	Paramètres évalués	Résultats	Commentaires																						
[58]	Ex vivo et In vivo chez l'animal	Contrôle : NaCl 0,9% (C) Test : 1% HA	2 estomacs de porc 5 estomacs sur chien vivant EMR	<b>Élévation muqueuse</b> <b>Changements histologiques</b> <b>Cicatrisation 1 sem</b> <b>après</b>	<b>Élévation muqueuse</b> 10 min après injection : Maintenu (HA) vs aplatie (C) <b>Histologie et cicatrisation</b> : pas de différence	- Durée élévation : HA > C. - Sécurité d'emploi : HA = C																						
[45]	In vivo chez l'animal	NaCl 0,9% ± Adrénaline Glucose 50% Glycéol® HA + indigo carmin	5 groupes de 5 porcs	<b>Durée de maintien de la surélévation muqueuse</b>	<b>Durée d'élévation</b> : NaCl ± adrénaline < autres solutions Glucose 50% ≈ Glycéol® HA > autres solutions	- Concentration et masse moléculaire HA : inconnues - Pas de données sur l'impact clinique.																						
[46]	Ex vivo chez l'animal Aveugle	NaCl 0,9% NaCl 3,75% Glucose 20% (G20%) Glycéol® 0,5% HA 800KDa 0,25% HA 1900KDa	Estomacs de porc Expérience réalisées à 5 reprises	<b>Élévation de la muqueuse et son maintien</b>	<b>Élévation initiale et maintien élévation</b> : Solutions d'HA > autres solutions. NaCl 3,75% ≈ G20% ≈ Glycéol®. NaCl 0,9% légèrement < autres solutions. Même viscoélasticité des deux solutions d'HA	- Supériorité de HA. Mais coût élevé. - Glycéol® : meilleure élévation parmi les autres solutions. - Pas de données sur l'impact clinique.																						
[59]	Ex vivo chez l'animal	NaCl 0,9% Mannitol 20% HA 0,1% HPMC 0,3% Fibrinogène 2%	Colon transverse de « mongrel » Expérience répétée 4 fois	<b>Viscosité (Pa)</b> <b>Osmolarité (mmol/kg)</b> <b>Maintien élévation muqueuse &gt; 50% (min)</b>	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Viscosité</th> <th>Osm</th> <th>Elév.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>NaCl 0,9%</td> <td>0,0043</td> <td>286</td> <td>&lt; 20</td> </tr> <tr> <td>Mannitol 20%</td> <td>0,0142</td> <td>1279</td> <td>&lt;30</td> </tr> <tr> <td>HA 0,1%</td> <td>0,0511</td> <td>282</td> <td rowspan="3">&gt;60</td> </tr> <tr> <td>HPMC 0,3%</td> <td>0,0707</td> <td>297</td> </tr> <tr> <td>Fibrinogène 2%</td> <td>0,0534</td> <td>327</td> </tr> </tbody> </table>		Viscosité	Osm	Elév.	NaCl 0,9%	0,0043	286	< 20	Mannitol 20%	0,0142	1279	<30	HA 0,1%	0,0511	282	>60	HPMC 0,3%	0,0707	297	Fibrinogène 2%	0,0534	327	Corrélation du maintien de l'élévation muqueuse avec la viscosité mais pas avec l'osmolarité
	Viscosité	Osm	Elév.																									
NaCl 0,9%	0,0043	286	< 20																									
Mannitol 20%	0,0142	1279	<30																									
HA 0,1%	0,0511	282	>60																									
HPMC 0,3%	0,0707	297																										
Fibrinogène 2%	0,0534	327																										

## ANNEXE 7 : Résumé des études ex vivo et in vivo chez l'animal (2/3)

Réf	Type de publication	Groupe(s) étudié(s)	Composition étude	Paramètres évalués	Résultats	Commentaires
[43]	In vivo chez l'animal	NaCl 0,9% et 3,75% Glucose 5%, 10%, 15%, 20% 30%, 40%, 50% Glycéol® 0,25% HA 1900KDa dans NaCl 0,9% +indigo carmin	4 miniporcs	<b>Dommages tissulaires</b> après 30 min et 1 semaine Par <b>endoscopie et analyse histologique</b>	<b>Pas de dommages tissulaires</b> visibles par endoscopie et histologie pour : NaCl 0,9%, Glucose 5% et 10%, Glycéol® et les deux solutions d'HA. <b>Dommages légers</b> pour Glucose 15% <b>Dommages importants</b> et érosion muqueuse après 1 semaine pour NaCl 3,75% et Glucose 20% <b>Dommages cellulaires massifs</b> et ulcération persistante après 1 semaine pour glucose 30%, 40% et 50%	- Ne pas employer de solutions hypertoniques à part le glycéol.  - Le meilleur rapport entre élévation muqueuse et dommages tissulaires est obtenu par le mélange HA + Glycéol
[74]	In vivo chez l'animal	Glycérol 10% + 0,5% bleu patenté (A) 0,5% HPMC dans du Ringer Lactate (B)	21 porcs (estomacs) 2 EMR simultanées par porc (1 / solution)	<b>Evaluation histologique et immunologique</b> précoce de la <b>cicatrisation muqueuse</b>	% fibres de collagène : 2,1% (A) vs 1,57% (B) % fibres élastiques : 3,23% (A) vs 2,93% (B)	- Plus de signes précoces de cicatrisation avec glycérol que HPMC après 1 semaine
[60]	Ex vivo et in vivo chez l'animal	NaCl 0,9% MucoUP 0,4% MucoUP dilué 0,2% MucoUP dilué 0,13% MucoUP dilué 0,1% + indigo carmin	Oesophages et colons de porc  Sur mini porc vivant	<b>Pression à l'injection</b> <b>Élévation muqueuse</b>  <b>Durée élévation</b> <b>Durée EMR</b>	<b>Pression à l'injection</b> corrélé avec la concentration en HA <b>Maintien de l'élévation</b> : HA > NaCl 0,9% <b>Durée de l'élévation</b> <2 min (NaCl), <3min (HA 0,1%), ≤4min (HA>0,1%) <b>Durée EMR</b> : 139 s ≈2min	- Résultats œsophage ≈ colon - Durée élévation HA > NaCl 0,9% - C min efficace HA = 0,13%
[56]	Ex vivo et in vivo chez l'animal	Hydrogels d'alginate 0,3% Acide hyaluronique 0,5% Glycérol (+ Fructose 5%)	6 miniporcs (estomac)	<b>Hauteur de l'élévation</b> sous muqueuse (ex vivo)  <b>Réactions tissulaires</b> par <b>endoscopie et histologie</b> (in vivo)	Diminution significative de <b>l'élévation muqueuse</b> après 3min pour HA et Glycérol, après 10min pour alginate. Quelques dilatations et congestions capillaires ainsi que quelques changements fibreux avec l'alginate (NS)	- Changements inflammatoires minimes dans la sous muqueuse

## ANNEXE 8 : Résumé des études ex vivo et in vivo chez l'animal (3/3)

Réf	Type de publication	Groupe(s) étudié(s)	Composition étude	Paramètres évalués	Résultats	Commentaires								
[49]	Ex vivo chez l'animal	NaCl 0,9% Hydroxyéthylamidon (Voluven®) Glycérol (+fructose) Mélange de poloxamer 0,5% HA	Estomacs de porc ESD 15 essais pour chaque solution + 50 essais pour HA et NaCl	<b>Viscosité</b> pour toutes les solutions  <b>Vitesse de résection</b> pour NaCl et HA	<b>Viscosité :</b> Voluven® : 4,64 mPa.s Glycérol + fructose : 3,40 mPa.s HA : 45,18 mPa.s Mélange de poloxamer : 12,36 mPa.s NaCl 0,9% : 1 mPa.s <b>Vitesse de résection HA &gt; NaCl</b>	- Nouvel injecteur à jet permet l'injection de solutions visqueuses sans obstruction du cathéter. HA permet une ESD plus rapide que NaCl 09%								
[75]	In vivo chez Animal et Homme <b>Prospectif Randomisé</b> enveloppes (porc) <b>Aveugle</b>	NaCl 0,9% Mélange de glycérol + Indigo carmin	20 ESD sur estomacs de porc 38 ESD chez l'Homme	<b>Vitesse de dissection</b> <b>Taille tumeur</b> <b>Durée opération</b> <b>Taux résection en bloc</b> <b>Taux résection R0</b> <b>Complications</b> <b>Appréciation opérateur</b>	<b>Vitesse de dissection (mm<sup>2</sup>/min) :</b> Glycérol (28,94) > NaCl (20,91). <b>Taille tumeur</b> Glycérol ≈ NaCl <b>Résection en bloc : 100%</b> <b>R0 : 100%</b> (Glycérol) vs 90% (NaCl) Non significatif <b>Saignement : Glycérol ≈ NaCl</b> <b>Appréciation opérateur :</b> Glycérol (7,3/10) > NaCl (4,7/10)	- Nécessité d'essais randomisés contrôlés chez l'Homme								
[55]	Ex vivo chez l'animal	NaCl 0,9% Glycérol 4% Gélatine succinylée Voluven Eleview (Poloxamer)	Estomac et rectum de 6 porcs	<b>Viscosité (Pa.s)</b> <b>Élévation muqueuse</b>	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Viscosité</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>NaCl</td> <td>0,68 (37°C)</td> </tr> <tr> <td>Voluven</td> <td>4,75 (20°C)</td> </tr> <tr> <td>Eleview</td> <td>5,4 (20°C)</td> </tr> </tbody> </table> <p><b>Élévation muqueuse &gt; 9,5mm</b> (Estomac) ou 11,8mm (Rectum) sauf NaCl. Élévation maintenue pendant 30 min pour toutes les solutions sauf NaCl</p>		Viscosité	NaCl	0,68 (37°C)	Voluven	4,75 (20°C)	Eleview	5,4 (20°C)	Pas de différence significative entre solutions visqueuses en terme d'élévation, malgré une différence de viscosité. Etude ex vivo
	Viscosité													
NaCl	0,68 (37°C)													
Voluven	4,75 (20°C)													
Eleview	5,4 (20°C)													

## ANNEXE 9 : Résumé des études multicentriques (1/2)

Réf	Type de publication	Groupe(s) étudié(s)	Nombre de patients	Paramètres évalués	Résultats	Commentaires																																				
[64]	Etude <b>Multicentrique</b> (2 institutions) <b>Prospective Ouverte</b> 1 groupe/hôpital	Contrôle : NaCl 0,9%  Test : Glycéol® + indigo carmin	211 patients et 223 Lateral spreading tumors colorectales  EMR  5 endoscopistes expérimentés	<b>Résection en bloc (RB)</b> <b>Résection R0</b> <b>Complications</b> <b>Récidives</b>	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>NaCl</th> <th>Glycéol®</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>RB</td> <td>48,7%</td> <td>63,6%</td> </tr> <tr> <td>R0</td> <td>24,8%</td> <td>45,5%</td> </tr> </tbody> </table> <p>1 <b>perforation</b> avec NaCl Moins de <b>saignements immédiats</b> avec le glycéol (0,9% vs 7%) mais plus de <b>saignements retardés</b> (6,4% vs 4,4%) <b>Récidives</b> : 7,7% (Glycéol) vs 12,4% (NaCl) = Non significatif</p>		NaCl	Glycéol®	RB	48,7%	63,6%	R0	24,8%	45,5%	- Résultats cliniques : Glycéol® > NaCl 0,9%. - Pas d'étude en aveugle.																											
	NaCl	Glycéol®																																								
RB	48,7%	63,6%																																								
R0	24,8%	45,5%																																								
[62]	Etude <b>multicentrique</b> (6 hôpitaux) <b>Prospective Non contrôlée Ouverte</b>	Contrôle : 0  Test : 0,38 - 0,4% HA (m/v) (Poudre + NaCl) ± adrénaline ± indigo carmin	41 patients  Lésions néoplasiques (5 – 20mm)  Colorectal  EMR (77,5%) ou ESD (22,5%)	<b>Résection complète (R0) en bloc</b> <b>Taux d'utilité (TU) :</b> % de R0 en bloc nécessitant - de 2 injections additionnelles pendant la procédure <b>Complications</b> <b>Temps procédure</b> <b>Volume injecté</b> <b>Facilité procédure</b> <b>Récurrence, Tissus néoplasique résiduel</b> <b>Cicatrisation à 8 sem</b>	<b>R0 en bloc</b> : 85% (HA) vs 72,9 – 85% (NaCl dans la littérature) <b>Taux d'utilité</b> : 82,5% 4,9% de <b>saignements</b> <b>Temps EMR</b> : 6,7±14,3min <b>Volume</b> : 6,8±8,1mL <b>Facilité</b> : bon/ excellent 87,5% Pas de <b>récurrence</b> ni <b>tissus néoplasiques résiduels</b> après 8 semaines 100% <b>cicatrisé</b>	- Taux d'utilité : Validité ? - Efficacité + sécurité d'emploi - Pas de bras contrôle - Hétérogénéité de la solution testée (Adrénaline : effet sur la prévention des saignements, indigo carmin)																																				
[63]	<b>Etude Multicentrique</b> (11 institutions) <b>Prospective Non contrôlée Ouverte</b>	Contrôle : 0  Test: (MucoUP® dilué) 0,13% HA + indigo carmin	624 patients  Lésions colorectales <20mm  40 endoscopistes Expérience variable (500 – 15000 cas)	<b>Résection en bloc (RB)</b> <b>R0</b> en fonction de la localisation (loc) / Taille / morphologie de la lésion (morph) <b>Temps opératoire</b> <b>Complications</b>	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Loc</th> <th>Côlon G</th> <th>Côlon D</th> <th>Rectum</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>RB</td> <td>96,7%</td> <td>91,6%</td> <td>90,8%</td> </tr> <tr> <td>R0 (N)</td> <td>81,4%</td> <td>77,5%</td> <td>72,4%</td> </tr> <tr> <th>Taille</th> <th colspan="2">5 – 10 mm</th> <th>11 – 20 mm</th> </tr> <tr> <td>RB</td> <td colspan="2">95,1%</td> <td>85,1%</td> </tr> <tr> <td>R0 (N)</td> <td colspan="2">79,6%</td> <td>72,2%</td> </tr> <tr> <th>Morph</th> <th colspan="2">Proéminent</th> <th>Superficiels</th> </tr> <tr> <td>RB</td> <td colspan="2">94,5%</td> <td>87,1%</td> </tr> <tr> <td>R0 (N)</td> <td colspan="2">79,6%</td> <td>69,2%</td> </tr> </tbody> </table> <p><b>Temps</b> : 2,1±1,5 min <b>Saignements post opératoires</b> : 1,1% . <b>Perforations</b> : 0%</p>	Loc	Côlon G	Côlon D	Rectum	RB	96,7%	91,6%	90,8%	R0 (N)	81,4%	77,5%	72,4%	Taille	5 – 10 mm		11 – 20 mm	RB	95,1%		85,1%	R0 (N)	79,6%		72,2%	Morph	Proéminent		Superficiels	RB	94,5%		87,1%	R0 (N)	79,6%		69,2%	- Efficacité + sécurité d'emploi - Impact de la morphologie, de la taille et de la localisation de la tumeur sur les résections en bloc, mais pas sur R0 - Pas de bras contrôle
Loc	Côlon G	Côlon D	Rectum																																							
RB	96,7%	91,6%	90,8%																																							
R0 (N)	81,4%	77,5%	72,4%																																							
Taille	5 – 10 mm		11 – 20 mm																																							
RB	95,1%		85,1%																																							
R0 (N)	79,6%		72,2%																																							
Morph	Proéminent		Superficiels																																							
RB	94,5%		87,1%																																							
R0 (N)	79,6%		69,2%																																							

## ANNEXE 10 : Résumé des études multicentriques (2/2)

Réf	Type de publication	Groupe(s) étudié(s)	Nombre de patients	Paramètres évalués	Résultats	Commentaires																		
[61]	<b>Etude Multicentrique</b> (2 hôpitaux) <b>Prospective Randomisée</b> (tél. ou fax) (Randomisation stratifiée en bloc) <b>Ouverte</b>	Contrôle : NaCl 0,9% (C)  Test : 0,4% HA (EndoEase®)	154 patients  Lésions : Gastriques (72) et colorectales (82)  EMR ou ESD	<b>Taux d'utilité (TU)</b>  <b>Facilité de la résection</b>  <b>Complications</b>  <b>Volume utilisé (V)</b>  <b>Temps opératoire</b>	<table border="1"> <thead> <tr> <th><i>TU</i></th> <th><i>Estomac</i></th> <th><i>Colorectal</i></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><i>NaCl</i></td> <td>35,6%</td> <td>67,7%</td> </tr> <tr> <td><i>HA</i></td> <td>89,2%</td> <td>95,3%</td> </tr> <tr> <th><i>Facilité</i></th> <th><i>Estomac</i></th> <th><i>Colorectal</i></th> </tr> <tr> <td><i>NaCl</i></td> <td>17,1%</td> <td>76,9%</td> </tr> <tr> <td><i>HA</i></td> <td>73%</td> <td>97,7%</td> </tr> </tbody> </table> <p><b>Complications :</b>  <i>Hémorragies</i> : 4 (C) vs 6 (HA)  <i>Perforation</i> : 1 (C) vs 2 (HA)  <b>Volume</b> : C &gt; HA  <b>Temps opératoire</b> : Non Significatif (N)</p>	<i>TU</i>	<i>Estomac</i>	<i>Colorectal</i>	<i>NaCl</i>	35,6%	67,7%	<i>HA</i>	89,2%	95,3%	<i>Facilité</i>	<i>Estomac</i>	<i>Colorectal</i>	<i>NaCl</i>	17,1%	76,9%	<i>HA</i>	73%	97,7%	- Facilité de résection : subjectif  - Ouvert  EndoEase® : - Plus de complications - V injecté < - Temps opératoire =
<i>TU</i>	<i>Estomac</i>	<i>Colorectal</i>																						
<i>NaCl</i>	35,6%	67,7%																						
<i>HA</i>	89,2%	95,3%																						
<i>Facilité</i>	<i>Estomac</i>	<i>Colorectal</i>																						
<i>NaCl</i>	17,1%	76,9%																						
<i>HA</i>	73%	97,7%																						

## ANNEXE 11 : Résumé des études monocentriques (1/2)

Réf	Type de publication	Groupe(s) étudié(s)	Nombre de patients	Paramètres évalués	Résultats	Commentaires
[38]	Etude <b>Monocentrique Prospective Ouvverte Non contrôlée</b>	1900KDa HA + glycéol®  Ratio : 1 : 7 (tumeurs gastriques sans cicatrice) sinon 1 : 3	67 tumeurs chez 54 patients ESD	<b>R0 endoscopique R0 histologique Complications Récidives</b>	<b>R0 endoscopique : 94% R0 histologique : 78% 1 perforation (fibrose+++) 2 saignements post opératoires Aucune récurrence après 1an</b>	Efficacité et sécurité d'emploi du mélange glycéol + HA
[66]	Etude <b>Monocentrique Prospective Randomisée En Aveugle (Endoscopistes)</b> + IDE ne connaissant pas les hypothèses de l'étude	Contrôle : Glucose + adrénaline 1/10000 <sup>e</sup> + indigo carmin 5% (G)  Test : Acide hyaluronique + indigo carmin 5% (HA)	174 patients Lésions type I ou 0- II (classification de Paris) ou Lateral spreading tumors <30mm  Colorectal  EMR	<b>Résection R0 Perforation Hémorragies Récurrences</b>	<b>R0 : 72% (G) vs 69% (HA) [Non Significatif] Perforations : Non Significatif Saignements retardés : Non Significatif Saignements immédiats : 0 (G) vs 3 (HA) Récurrences : Non Significatif</b>	Pas de différence significative entre les deux groupes en termes d'efficacité et de complications
[65]	Etude <b>Monocentrique prospective Randomisée (Enveloppes) Ouvverte</b>	Contrôle : NaCl 0,9% (C)  Test : 0,2% HA (MucoUP® dilué au ½) Pas d'adrénaline ni indigo carmin	94 patients Tumeurs colorectales ≤20mm EMR	<b>Facilité d'injection Facilité de capture Temps d'injection Hémorragies post procédure Volume injecté Temps EMR Résection en bloc R0</b>	<b>Facilité d'injection : HA &gt; NaCl Facilité de capture : HA &gt; NaCl Temps d'injection : Non Significatif Hémorragies : Pas de différence Volume injecté : Non Significatif Temps EMR : Non Significatif R0 en bloc : Non Significatif</b>	Injection et capture plus aisée avec HA Pas d'amélioration clinique ni de diminution du temps opératoire ou des complications

## ANNEXE 12 : Résumé des études monocentriques (2/2)

Réf	Type de publication	Groupe(s) étudié(s)	Nombre de patients	Paramètres évalués	Résultats	Commentaires
[67]	Etude <b>Monocentrique Prospective Randomisée</b> (ordinateur) (blocs permutés sans stratification) <b>Ouverte</b>	Contrôle : NaCl 0,9% + indigo carmin (C)  Test : 0,13% HA (MucoUP® dilué) + indigo carmin	196 patients  Tumeurs superficielles colorectales <20mm  7 endoscopistes d'expérience variable (500 – 15000 cas)	<b>R0</b> <b>Résection en bloc</b> <b>Maintien de l'élévation</b> <b>Complications</b> <b>Relation R0 – expérience de l'endoscopiste</b> <b>Temps opératoire</b>	<b>R0</b> : 65,6% (C) vs 79,5% (HA) <b>Résection en bloc</b> : 97,9% (C) vs 96,7% (HA) Non significatif <b>Maintien de l'élévation</b> : 54,1% (C) vs 83,9% (HA) <b>Complications</b> : Pas de différence saignements post-opératoires, pas de perforation <b>R0 par endoscopistes peu expérimentés</b> : 62,1% (C) vs 79,3% (HA)	Maintien de l'élévation : HA > NaCl 0,9%. Nombre de R0 : HA > NaCl 0,9%. Résections en bloc et complications : HA = NaCl 0,9%  HA à favoriser si peu expérimenté.

## ANNEXE 13 : Résumé des méta-analyses

Réf biblio	Type étude ? prospectif : retrospectif,	Groupe(s) comparé(s)	Nombre de patients	Paramètre étudié	Résultats	Conclusions, commentaires
[68]	Méta analyse	Contrôle : NaCl 0,9% Test : HA à différentes concentrations	4 études randomisées contrôlées (585 patients)	<b>R0 en bloc</b> <b>Complications</b> <b>Maintien élévation muqueuse</b>	Pas de différence significative R0 et R0 en bloc Pas de différence significative en terme de complications. Elévation plus longue avec HA que NaCl 0,9%	
[19]	Méta analyse	G50% vs HA (82) NaCl 0,9% vs : (385) HA (209) G50% (72) Hydroxyéthylamidon(25) Gélatine succinylée (43) Fibrinogène(36)	9 études randomisées contrôlées (792 patients) EMR	<b>Résection complète (R0)</b> <b>Complications : saignements, coagulation, perforations</b> <b>Elévation muqueuse (études animales)</b>	Pas de différence en terme de résection complète ni de complications	Peu de publications de haut niveau de preuve. Pas de signal en faveur d'une des solutions testées d'un point de vue clinique.
[51]	Méta analyse	NaCl 0,9% Solutions visqueuses : Hydroxyéthylamidon, Glucose 50%, HA, Gélatine succinylée	5 études contrôlées randomisées EMR colorectal (504 patients)	<b>R0 en bloc</b> <b>Lésions résiduelles</b> <b>Complications</b>	Amélioration du nombre de résections R0 en bloc et diminution du nombre de lésions résiduelles avec les solutions visqueuses. Pas de différence en terme de complication.	Utilisation des solutions visqueuses recommandée pour les larges lésions. Pas de différence significative pour lésions < 2cm.

# ANNEXE 14 : Aide à l'interprétation de l'essai des endotoxines bactériennes (Manuel Charles River)

## Endosafe® - PTS™

Guide d'utilisation



```

***** ENDOSAFE Test Record *****
          V7.12A 7/30/2008
DateTime:.....05/14/09 @ 08:04:34AM
Device: .....3211
OperatorID: .....GBBS
Cartridge:.....Endotoxin
Temperature: ...Start: 37.0C End: 37.0C
Method: .....KX-122
Cartridge Lot#: .....8260166
Cartridge Cal Code: .....112236952011
Range:.....1-0.01
Range Time:.....Sec: 122-769
Onset Times:..... >769 314 >769 342
Slope: -0.400.....Intercept: +2.086
Dilution:.....1
Sample Lot:.....B82260
Sample ID: .....LRW
Sample Rxn Time CV:.....0.0% Pass
Spike Value:.....0.074 EU/mL
Spike Rxn Time CV:.....6.0% Pass
Spike Recovery:.....93% Pass
Test Suitability:.....Pass
Sample Value:.....<0.010 EU/mL
    
```

**Gamme de dosage de la cartouche**  
 Limite de détection = Point le plus bas de la gamme (0.05 EU/mL).

**Temps de réaction des 4 canaux.**  
 1 & 3 sont les échantillons, 2 & 4 sont les échantillons surchargés.

**Facteur de dilution:**  
 1 = pur, 10 = 1:10, 100 = 1:100 etc...

**CV % des canaux 1 & 3**  
 Représente la différence des temps de réaction entre les 2 canaux.  
 Doit être < 25 % pour un test valide.

**CV % des canaux 2 & 4**  
 Représente la différence des temps de réaction entre les 2 canaux.  
 Doit être < 25 % pour un test valide.

**% de recouvrement des échantillons surchargés des canaux 2 & 4**  
 Doit être compris entre 50 % et 200 % pour un test valide.

**Test de conformité**  
 Evalue le CV de l'échantillon, le CV de la surcharge et le pourcentage de recouvrement.  
 "Pass" indique la validité du test : le dosage réalisé est exploitable.

**Concentration en endotoxines de l'échantillon (corrigée du facteur de dilution)**  
 > ou < indique que l'échantillon est en dehors de la gamme de détection.

**Note :** les échantillons surchargés correspondent au mélange de l'échantillon avec une quantité connue d'endotoxines. Ce contrôle correspond à une recherche d'interférences (inhibition ou activation). La réaction LAL est une cascade enzymatique sujette aux interférences de l'échantillon. L'inhibition diminue la réactivité enzymatique, aboutissant à une valeur d'endotoxines détectée inférieure à celle attendue. A l'inverse, une activation augmente la réactivité enzymatique, aboutissant à une valeur d'endotoxines détectée supérieure à celle attendue. Le % de recouvrement est la différence entre la valeur théorique de la surcharge et sa valeur trouvée. Un % de recouvrement < 50 % indique que moins de la moitié de la quantité d'endotoxines théorique a été retrouvée : l'échantillon est donc inhibiteur. Cette vérification de pourcentage de recouvrement évite de rendre des faux négatifs. Un CV % > 25 % indique que le pipetage a été mal effectué ou indique la présence de bulles.

[eurendo@eu.crl.com](mailto:eurendo@eu.crl.com)



charles river | endotoxin and microbial detection

# ANNEXE 15 : Résultats des essais des endotoxines bactériennes (solutions pures)

J0

<pre> ***** ENDOSAFE Test Record ***** V712F 3/26/2015 DateTime: ..... 17-08-18 @ 12:17:20 Device: ..... 6930 OperatorID: ..... MR Cartridge: ..... Endotoxin Temperature: .. Start: 37.0C End: 37.0C Method: ..... KX-122 Cartridge Lot#: ..... 7603165 Cartridge Cal Code: ..... 114542352964 Range: ..... 1-0.01 Range Time: ..... Sec: 145-823 Onset Times: ..... &gt;823 &gt;823 &gt;823 &gt;823 Slope: -0.377 ..... Intercept: +2.161 Dilution: ..... 1 Sample Lot: ..... 18731H 19 Sample ID: ..... 18731H 19 Sample Rxn Time CV: ..... 0.0% Pass Spike Value: ..... &lt;0.000 EU/mL Spike Rxn Time CV: ..... 0.0% Pass Spike Recovery: ..... &lt; 0% Fail Test Suitability: ..... Fail Sample Value: ..... &lt;0.010 EU/mL                 </pre>	<pre> ***** ENDOSAFE Test Record ***** V712F 3/26/2015 DateTime: ..... 17-08-18 @ 11:20:34 Device: ..... 6930 OperatorID: ..... MR Cartridge: ..... Endotoxin Temperature: .. Start: 37.0C End: 37.0C Method: ..... KX-122 Cartridge Lot#: ..... 7603165 Cartridge Cal Code: ..... 114542352964 Range: ..... 1-0.01 Range Time: ..... Sec: 145-823 Onset Times: ..... &gt;823 &gt;823 &gt;823 &gt;823 Slope: -0.377 ..... Intercept: +2.161 Dilution: ..... 1 Sample Lot: ..... 18731H 11 Sample ID: ..... 18731H 11 Sample Rxn Time CV: ..... 0.0% Pass Spike Value: ..... &lt;0.000 EU/mL Spike Rxn Time CV: ..... 0.0% Pass Spike Recovery: ..... &lt; 0% Fail Test Suitability: ..... Fail Sample Value: ..... &lt;0.010 EU/mL                 </pre>	<pre> ***** ENDOSAFE Test Record ***** V712F 3/26/2015 DateTime: ..... 17-08-18 @ 10:27:25 Device: ..... 6930 OperatorID: ..... MR Cartridge: ..... Endotoxin Temperature: .. Start: 37.0C End: 37.0C Method: ..... KX-122 Cartridge Lot#: ..... 7603165 Cartridge Cal Code: ..... 114542352964 Range: ..... 1-0.01 Range Time: ..... Sec: 145-823 Onset Times: ..... &gt;823 &gt;823 &gt;823 &gt;823 Slope: -0.377 ..... Intercept: +2.161 Dilution: ..... 1 Sample Lot: ..... 18731H 2 Sample ID: ..... 18731H 2 Sample Rxn Time CV: ..... 0.0% Pass Spike Value: ..... &lt;0.000 EU/mL Spike Rxn Time CV: ..... 0.0% Pass Spike Recovery: ..... &lt; 0% Fail Test Suitability: ..... Fail Sample Value: ..... &lt;0.010 EU/mL                 </pre>
---	---	---

M5

<pre> ***** ENDOSAFE Test Record ***** V712F 3/26/2015 DateTime: ..... 17-08-18 @ 13:56:03 Device: ..... 6930 OperatorID: ..... MR Cartridge: ..... Endotoxin Temperature: .. Start: 37.0C End: 37.0C Method: ..... KX-122 Cartridge Lot#: ..... 7603165 Cartridge Cal Code: ..... 114542352964 Range: ..... 1-0.01 Range Time: ..... Sec: 145-823 Onset Times: ..... &gt;823 &gt;823 &gt;823 &gt;823 Slope: -0.377 ..... Intercept: +2.161 Dilution: ..... 1 Sample Lot: ..... 17974H 3 Sample ID: ..... 17974H 3 Sample Rxn Time CV: ..... 0.0% Pass Spike Value: ..... &lt;0.000 EU/mL Spike Rxn Time CV: ..... 0.0% Pass Spike Recovery: ..... &lt; 0% Fail Test Suitability: ..... Fail Sample Value: ..... &lt;0.010 EU/mL                 </pre>	<pre> ***** ENDOSAFE Test Record ***** V712F 3/26/2015 DateTime: ..... 17-08-18 @ 13:34:27 Device: ..... 6930 OperatorID: ..... MR Cartridge: ..... Endotoxin Temperature: .. Start: 37.0C End: 37.0C Method: ..... KX-122 Cartridge Lot#: ..... 7603165 Cartridge Cal Code: ..... 114542352964 Range: ..... 1-0.01 Range Time: ..... Sec: 145-823 Onset Times: ..... &gt;823 &gt;823 &gt;823 &gt;823 Slope: -0.377 ..... Intercept: +2.161 Dilution: ..... 1 Sample Lot: ..... 17974H 2 Sample ID: ..... 17974H 2 Sample Rxn Time CV: ..... 0.0% Pass Spike Value: ..... &lt;0.000 EU/mL Spike Rxn Time CV: ..... 0.0% Pass Spike Recovery: ..... &lt; 0% Fail Test Suitability: ..... Fail Sample Value: ..... &lt;0.010 EU/mL                 </pre>	<pre> ***** ENDOSAFE Test Record ***** V712F 3/26/2015 DateTime: ..... 17-08-18 @ 13:08:37 Device: ..... 6930 OperatorID: ..... MR Cartridge: ..... Endotoxin Temperature: .. Start: 37.0C End: 37.0C Method: ..... KX-122 Cartridge Lot#: ..... 7603165 Cartridge Cal Code: ..... 114542352964 Range: ..... 1-0.01 Range Time: ..... Sec: 145-823 Onset Times: ..... &gt;823 &gt;823 &gt;823 &gt;823 Slope: -0.377 ..... Intercept: +2.161 Dilution: ..... 1 Sample Lot: ..... 17974H 1 Sample ID: ..... 17974H 1 Sample Rxn Time CV: ..... 0.0% Pass Spike Value: ..... &lt;0.000 EU/mL Spike Rxn Time CV: ..... 0.0% Pass Spike Recovery: ..... &lt; 0% Fail Test Suitability: ..... Fail Sample Value: ..... &lt;0.010 EU/mL                 </pre>
---	---	---

# ANNEXE 16 : Résultats des essais des endotoxines bactériennes (solutions diluées 1/50<sup>e</sup>)

J0

Test Record	Test Record	Test Record
<pre> ***** ENDOSAFE Test Record ***** V712F 3/26/2015 DateTime: ..... 17-08-18 @ 16:33:13 Device: ..... 6930 OperatorID: ..... MR Cartridge: ..... Endotoxin Temperature: .. Start: 37.0C End: 37.0C Method: ..... KX-122 Cartridge Lot#: ..... 7603165 Cartridge Cal Code: ..... 114542352964 Range: ..... 1-0.01 Range Time: ..... Sec: 145-823 Onset Times: ..... &gt;823 316 &gt;823 370 Slope: -0.377 ..... Intercept: +2.161 Dilution: ..... 50 Sample Lot: ..... 18731H 19 Sample ID: ..... 18731H 19 Sample Rxn Time CV: ..... 0.0% Pass Spike Value: ..... 0.092 EU/mL Spike Rxn Time CV: ..... 11.1% Pass Spike Recovery: ..... 94% Pass Test Suitability: ..... Pass Sample Value: ..... &lt;0.500 EU/mL </pre>	<pre> ***** ENDOSAFE Test Record ***** V712F 3/26/2015 DateTime: ..... 17-08-18 @ 18:05:35 Device: ..... 6930 OperatorID: ..... MR Cartridge: ..... Endotoxin Temperature: .. Start: 37.0C End: 37.0C Method: ..... KX-122 Cartridge Lot#: ..... 7603165 Cartridge Cal Code: ..... 114542352964 Range: ..... 1-0.01 Range Time: ..... Sec: 145-823 Onset Times: ..... &gt;823 342 &gt;823 376 Slope: -0.377 ..... Intercept: +2.161 Dilution: ..... 50 Sample Lot: ..... 18731H 11 Sample ID: ..... 18731H 11 Sample Rxn Time CV: ..... 0.0% Pass Spike Value: ..... 0.080 EU/mL Spike Rxn Time CV: ..... 6.7% Pass Spike Recovery: ..... 82% Pass Test Suitability: ..... Pass Sample Value: ..... &lt;0.500 EU/mL </pre>	<pre> ***** ENDOSAFE Test Record ***** V712F 3/26/2015 DateTime: ..... 17-08-18 @ 15:24:27 Device: ..... 6930 OperatorID: ..... MR Cartridge: ..... Endotoxin Temperature: .. Start: 37.0C End: 37.0C Method: ..... KX-122 Cartridge Lot#: ..... 7603165 Cartridge Cal Code: ..... 114542352964 Range: ..... 1-0.01 Range Time: ..... Sec: 145-823 Onset Times: ..... &gt;823 362 &gt;823 430 Slope: -0.377 ..... Intercept: +2.161 Dilution: ..... 50 Sample Lot: ..... 18731H 2 Sample ID: ..... 18731H 2 Sample Rxn Time CV: ..... 0.0% Pass Spike Value: ..... 0.060 EU/mL Spike Rxn Time CV: ..... 12.1% Pass Spike Recovery: ..... 61% Pass Test Suitability: ..... Pass Sample Value: ..... &lt;0.500 EU/mL </pre>

M5

Test Record	Test Record	Test Record
<pre> ***** ENDOSAFE Test Record ***** V712F 3/26/2015 DateTime: ..... 17-08-18 @ 17:42:38 Device: ..... 6930 OperatorID: ..... MR Cartridge: ..... Endotoxin Temperature: .. Start: 37.0C End: 37.0C Method: ..... KX-122 Cartridge Lot#: ..... 7603165 Cartridge Cal Code: ..... 114542352964 Range: ..... 1-0.01 Range Time: ..... Sec: 145-823 Onset Times: ..... &gt;823 334 &gt;823 392 Slope: -0.377 ..... Intercept: +2.161 Dilution: ..... 50 Sample Lot: ..... 17974H 3 Sample ID: ..... 17974H 3 Sample Rxn Time CV: ..... 0.0% Pass Spike Value: ..... 0.078 EU/mL Spike Rxn Time CV: ..... 11.3% Pass Spike Recovery: ..... 79% Pass Test Suitability: ..... Pass Sample Value: ..... &lt;0.500 EU/mL </pre>	<pre> ***** ENDOSAFE Test Record ***** V712F 3/26/2015 DateTime: ..... 17-08-18 @ 17:17:07 Device: ..... 6930 OperatorID: ..... MR Cartridge: ..... Endotoxin Temperature: .. Start: 37.0C End: 37.0C Method: ..... KX-122 Cartridge Lot#: ..... 7603165 Cartridge Cal Code: ..... 114542352964 Range: ..... 1-0.01 Range Time: ..... Sec: 145-823 Onset Times: ..... &gt;823 358 &gt;823 378 Slope: -0.377 ..... Intercept: +2.161 Dilution: ..... 50 Sample Lot: ..... 17974H 2 Sample ID: ..... 17974H 2 Sample Rxn Time CV: ..... 0.0% Pass Spike Value: ..... 0.075 EU/mL Spike Rxn Time CV: ..... 3.8% Pass Spike Recovery: ..... 76% Pass Test Suitability: ..... Pass Sample Value: ..... &lt;0.500 EU/mL </pre>	<pre> ***** ENDOSAFE Test Record ***** V712F 3/26/2015 DateTime: ..... 17-08-18 @ 16:54:37 Device: ..... 6930 OperatorID: ..... MR Cartridge: ..... Endotoxin Temperature: .. Start: 37.0C End: 37.0C Method: ..... KX-122 Cartridge Lot#: ..... 7603165 Cartridge Cal Code: ..... 114542352964 Range: ..... 1-0.01 Range Time: ..... Sec: 145-823 Onset Times: ..... &gt;823 342 &gt;823 384 Slope: -0.377 ..... Intercept: +2.161 Dilution: ..... 50 Sample Lot: ..... 17974H 1 Sample ID: ..... 17974H 1 Sample Rxn Time CV: ..... 0.0% Pass Spike Value: ..... 0.078 EU/mL Spike Rxn Time CV: ..... 8.2% Pass Spike Recovery: ..... 79% Pass Test Suitability: ..... Pass Sample Value: ..... &lt;0.500 EU/mL </pre>

# ANNEXE 17 : Fiche de fabrication des solutions de Fructose 5% et glycérol 10% (Hôpital E. Herriot, Lyon)

Hospices civils de Lyon – Pharmacie de l'Hôpital E. Herriot  
UF « Préparation et contrôle des médicaments »



## GASTRO-ENTEROLOGIE

### Solution stérile de fructose 5% (m/v) - glycérol 10% (v/v) - 100 mL

#### Indication

Injection intramucosale pour le repérage de la couche sous-muqueuse lors des résections endoscopiques.

#### Composition qualitative et quantitative

Fructose .....	5,0 g
Glycérol .....	10 ml
Chlorure de sodium 0,9 % .....	qsp. 100 ml



#### Mode opératoire

**L'ensemble des opérations de préparation est réalisé dans une zone d'atmosphère contrôlée de classe A**

- Peser le fructose et prélever le glycérol.
- Dans une éprouvette graduée, ajouter le fructose et le glycérol.
- Compléter le volume avec du chlorure de sodium 0,9%.
- Remplir les poches EVAM® de 250 ml à 100 ml en effectuant une filtration stérilisante (0,22µm).

#### Conditionnement

Poche EVAM® de 250 ml remplies à 100 ml. Les poches sont suremballées.

#### Contrôles

Dosage du sodium, essai de stérilité et recherche d'endotoxines.

#### Conservation

6 mois après fabrication à température ambiante (15 - 25C°).

FACULTE DE PHARMACIE DE LILLE  
**MEMOIRE de DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES**  
**(tenant lieu de Thèse en vue du Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie)**  
Année Universitaire 2017/2018

**Nom : ROCHE**  
**Prénom : Marine**

**Titre du mémoire / thèse :**

**MISE EN ŒUVRE ET CONTROLE QUALITE D'UNE SOLUTION DE FRUCTOSE  
ET DE GLYCEROL DESTINEE A L'ENDOSCOPIE DIGESTIVE**

**Mots-clés :** Solution de fructose-glycérol pour endoscopie digestive ; préparation pharmaceutique, faisabilité ; contrôle qualité ; produits de dégradation du fructose

---

**Résumé :**

Depuis les années 1980, la prise en charge des lésions néoplasiques superficielles du tube digestif a été révolutionnée par l'apparition de deux techniques endoscopiques : La mucosectomie et la dissection sous muqueuse. Ces techniques permettent le retrait des tumeurs « en bloc », facilitant ainsi l'analyse histologique et limitant le risque de rechute. Cependant, ces techniques sont associées à des risques élevés de complications qui peuvent être réduits par l'injection d'une solution adaptée dans la sous-muqueuse.

Devant l'absence de spécialité disponible dans cette indication, nous avons développé une méthode de production aseptique d'une solution de fructose 5% et glycérol 10% dans le chlorure de sodium dans des flacons de verre. Dans l'optique de garantir la qualité de la préparation réalisée, nous avons mis en œuvre un ensemble de contrôles de la préparation (teneurs en fructose et en glycérol, essai d'endotoxine et de stérilité, particules non visibles, osmolalité) et développé une méthode de dosage simultané de deux produits de dégradation du fructose (5-hydroxyméthylfurfural (5-HMF) et 2-furaldéhyde (2-FA)) par chromatographie liquide haute performance couplée à une détection UV-visible.

Nous avons ensuite vérifié la stabilité des solutions préparées pour mise à disposition de cette préparation hospitalière dans le service d'endoscopie digestive.

La méthode de production a permis l'obtention d'une solution homogène conforme aux spécifications relatives aux injectables. La solution préparée est restée stable et stérile au moins cinq mois conservée à température ambiante.

Nous envisageons de tester la préparation au bloc opératoire afin d'éventuellement optimiser sa formulation, pour répondre aux besoins des endoscopistes et optimiser la prise en charge des patients.

---

**Membres du jury :**

**Président :**

**Odou Pascal**, Pharmacien, Professeur des Universités – Praticien Hospitalier, Lille

**Assesseur(s) :**

**Lannoy Damien**, Pharmacien, Maître de Conférences des Universités-Praticien Hospitalier, Lille

**Chillon Jean-Marc**, Pharmacien, Professeur des Universités-Praticien Hospitalier, Amiens

**Branche Julien**, Gastro-entérologue, Praticien Hospitalier, Lille