

**MEMOIRE**  
**DU DIPLÔME D'ETUDES SPECIALISEES DE**  
**PHARMACIE HOSPITALIERE ET DES COLLECTIVITES**

**Soutenu devant le Jury interrégional**

**le 17 octobre 2005**

**par Mlle GAUME Marie**

**Conformément aux dispositions de l'arrêté  
du 23 janvier 2003 tient lieu de :**

**THESE**  
**POUR LE DIPLÔME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

Formulation et étude de stabilité d'un collyre à la  
chlorhexidine pour le traitement de la kératite amibienne

**Président : Monsieur le Professeur Yves PEGON**

**Membres du Jury :** Monsieur Frédéric LAGARCE, directeur  
Madame le Professeur Isabelle COCHEREAU  
Madame Anne LE BOUIL  
Madame Véronique LE PECHEUR  
Madame Marie-Claire VENIER

## SOMMAIRE

<b><u>SOMMAIRE</u></b> .....	<b>1</b>
<b><u>LISTE DES ABREVIATIONS</u></b> .....	<b>4</b>
<b><u>I. INTRODUCTION</u></b> .....	<b>5</b>
<b><u>II. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE</u></b> .....	<b>6</b>
<b>II.1. LA KÉRATITE AMIBIENNE</b> .....	<b>6</b>
II.1.1. L'AGENT RESPONSABLE .....	6
II.1.2. EPIDÉMIOLOGIE .....	7
II.1.3. PATHOGENÈSE .....	9
II.1.4. SYMPTOMATOLOGIE CLINIQUE.....	11
II.1.5. DIAGNOSTIC .....	12
II.1.6. TRAITEMENT.....	14
II.1.7. PRÉVENTION .....	17
<b>II.2. LA CHLORHEXIDINE</b> .....	<b>18</b>
II.2.1. FORMULES CHIMIQUES.....	18
II.2.2. PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES .....	18
II.2.3. MÉCANISME D'ACTION .....	22
II.2.4. SPECTRE D'ACTIVITÉ .....	22
II.2.5. EFFETS INDÉSIRABLES.....	23
II.2.6. CONTRE-INDICATIONS ET PRÉCAUTIONS D'EMPLOI.....	24
II.2.7. MÉTHODES DE DOSAGE.....	25
<b>II.3. LA PRODUCTION D'UN COLLYRE EN MILIEU HOSPITALIER</b> .....	<b>25</b>
II.3.1. LA PRÉPARATION : UNE MISSION DES PUI.....	25
II.3.2. LA LÉGISLATION AUTOUR DES PRÉPARATIONS À L'HÔPITAL .....	27
II.3.3. PROPRIÉTÉS DES COLLYRES ET CONSÉQUENCES SUR LA FORMULATION .....	29
II.3.4. MATIÈRES PREMIÈRES ET CONDITIONNEMENTS UTILISÉS À L'HÔPITAL .....	31
II.3.5. PRÉPARATION DES MÉDICAMENTS STÉRILES .....	33
<b><u>III. ETUDE EXPERIMENTALE</u></b> .....	<b>37</b>
<b>III.1. OBJECTIF</b> .....	<b>37</b>
<b>III.2. MATÉRIEL</b> .....	<b>38</b>
III.2.1. MATIÈRES PREMIÈRES ET RÉACTIFS .....	38
III.2.2. EQUIPEMENTS.....	39
<b>III.3. MÉTHODE</b> .....	<b>42</b>

III.3.1. FORMULATION ET FABRICATION DU COLLYRE À LA CHLORHEXIDINE .....	42
III.3.2. MISE AU POINT ET VALIDATION DU DOSAGE DE LA CHLORHEXIDINE .....	43
III.3.3. STABILITÉ DU COLLYRE À LA CHLORHEXIDINE 0,02% .....	50
<b>III.4. RÉSULTATS .....</b>	<b>54</b>
III.4.1. FORMULATION ET FABRICATION DU COLLYRE À LA CHLORHEXIDINE .....	54
III.4.2. MISE AU POINT ET VALIDATION DU DOSAGE DE LA CHLORHEXIDINE .....	58
III.4.3. STABILITÉ DU COLLYRE À LA CHLORHEXIDINE 0,02% .....	74
<b>III.5. DISCUSSION .....</b>	<b>80</b>
III.5.1. DIFFICULTÉS RENCONTRÉES ET COMPROMIS.....	81
III.5.2. L'ÉVOLUTION DES RECOMMANDATIONS NÉCESSAIRE.....	86
<b><u>IV. CONCLUSION .....</u></b>	<b><u>88</u></b>
<b><u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</u></b>	<b><u>89</u></b>
<b><u>ANNEXES.....</u></b>	<b><u>94</u></b>

## LISTE DES ABREVIATIONS

ACN	Acétonitrile
AFSSAPS	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
ATU	Autorisation Temporaire d'Utilisation
BPPH	Bonnes Pratiques de Pharmacie Hospitalière
BPPrH	Bonnes Pratiques de Préparation à l'Hôpital
CMB	Concentration minimale bactéricide
CV	Coefficient de variation
DASS	Direction des Affaires Sanitaires et Sociales
ddl	Degré de liberté
Fig	Figure
GC	Gluconate de chlorhexidine
GMP	Good Manufacturing Practice
HEPA	Haute efficacité pour les particules d'air
HPLC	Chromatographie liquide haute performance
ICH	International Conference on Harmonisation
IR	Infrarouge
ISO	International Organization for Standardization
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEHD	Polyéthylène haute densité
PHMB	Polyhexaméthylène biguanide
PSM	Poste de sécurité microbiologique
PUI	Pharmacie à usage intérieur
PVC	Polychlorure de vinyle
SC	Somme des carrés
SFSTP	Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques
UV	Ultraviolet
ZAC	Zone à atmosphère contrôlée

# I. INTRODUCTION

Un collyre au gluconate de chlorhexidine à 0,02% a été prescrit par un praticien du service d'Ophtalmologie pour un patient souffrant d'une kératite amibienne. La kératite amibienne est une infection rare et grave de la cornée, causée par une amibe très répandue dans l'environnement, appartenant au genre *Acanthamoeba*.

Le collyre à la chlorhexidine n'est ni commercialisé en France ni à l'étranger. Les pharmaciens de la Pharmacie à Usage Intérieur du Centre Hospitalier Universitaire d'Angers ont donc été amenés à réfléchir à la réalisation de cette préparation.

Dans la première partie, la kératite amibienne et ses traitements ont été étudiés. Les propriétés de la chlorhexidine ont de même été détaillées. Ces recherches bibliographiques ont permis de vérifier le rapport bénéfice / risque de la préparation demandée. La réglementation existante, concernant la fabrication et le contrôle des collyres à l'hôpital, a ensuite été étudiée afin de vérifier la faisabilité technique de la préparation. Les pharmaciens doivent s'assurer qu'ils disposent des moyens techniques et du personnel afin de garantir la qualité de la préparation.

Dans la seconde partie, la formulation du collyre au gluconate de chlorhexidine a été mise au point à partir des connaissances des propriétés physico-chimiques du principe actif. La recherche bibliographique des formulations déjà utilisées et de leurs stabilités n'a en effet pas permis de retrouver de formule qui convienne à l'utilisation du collyre en ambulatoire. Le procédé de fabrication du collyre a ensuite été déterminé, ainsi que les contrôles du produit fini à réaliser. La méthode de dosage du principe actif dans la forme pharmaceutique a du être mise au point et validée. Enfin, une étude de stabilité a été réalisée afin de déterminer la péremption du collyre selon notre formulation. Elle vise à garantir la qualité de la préparation pendant, au minimum, le mois de dispensation au patient en ambulatoire. Ce travail a été l'occasion de s'interroger sur les choix pharmaceutiques à faire lors du développement de formes liquides stériles.

## II. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

### II.1. La kératite amibienne

La kératite amibienne est une infection rare et grave de la cornée, qui affecte principalement les individus porteurs de lentilles de contact. Elle entraîne des troubles de la vision et peut aboutir, dans certains cas particulièrement graves, à l'énucléation de l'œil.

L'amibe responsable de cette affection appartient au genre *Acanthamoeba*, très répandu dans l'environnement. Des amibes de ce genre, ou acanthamibes, sont aussi responsables d'encéphalites amibiennes granulomateuses, d'infections cutanées et nasopharyngées chez l'immunodéprimé (1-3).

#### II.1.1. L'agent responsable

##### II.1.1.1. Taxonomie

Les amibes sont des protozoaires appartenant au règne des protistes et à l'embranchement des Rhizopodes. La classification des espèces d'acanthamibes, décrite par *Pussard et Pons* en 1977, est basée sur des critères morphologiques, notamment sur la forme des kystes (1). Vingt-quatre espèces sont distinguées, dont huit impliquées dans des infections cornéennes : *A. castellanii*, *A. culbertsoni*, *A. polyphaga*, *A. hatchetti*, *A. rhyodes*, *A. lugdunensis*, *A. quina* et *A. griffini* (4). *A. polyphaga* est la plus fréquemment mise en cause (5, 6).

Cependant, les conditions de cultures affectent la morphologie des kystes. L'identification de l'espèce est donc parfois difficile et peu fiable. La classification morphologique tend à être abandonnée au profit de classifications génotypiques. Plusieurs ont été proposées. La classification basée sur le polymorphisme d'un fragment d'ADN ribosomique est aujourd'hui utilisée. Quinze génotypes sont distingués. Le génotype T4 est le plus fréquemment retrouvé chez les acanthamibes isolées des patients souffrants de kératite amibienne (7-9).

##### II.1.1.2. Habitat

Les amibes du genre *Acanthamoeba* sont les plus communes des amibes. Elles sont abondantes dans l'environnement, et cosmopolites. Elles vivent dans tous les lieux où se trouvent des bactéries et des déchets organiques, qui constituent leur principale source de nourriture. Elles ont été isolées dans le sol, l'air, l'eau douce, l'eau de mer, l'eau des piscines, l'eau du robinet, et

aussi dans l'eau minérale embouteillée (8). L'augmentation de la température, associée à l'accroissement du nombre de bactéries, favorise leur prolifération (10).

Ces amibes sont aussi retrouvées chez l'homme dans le nasopharynx et la gorge. Des études ont montré un taux de portage variant de 0,5 à 24% selon la population étudiée (11).

### **II.1.1.3. Cycle biologique**

Les acanthamibes sont retrouvées sous deux formes dans l'environnement (figure 1) :

- forme trophozoïte ou végétative
- forme kystique

Ces deux formes sont aussi retrouvées dans la cornée des patients infectés.

La forme végétative a une longueur de 25 à 40  $\mu\text{m}$ . Elle se déplace à l'aide d'un pseudopode hyalin et d'autres éléments, appelés acanthopodes, disposés sur toute la surface du trophozoïte (1, 11). Cette forme se réplique de façon asexuée par fission binaire et se nourrit de matières organiques, de bactéries, de champignons et d'autres protozoaires.

En réponse à des conditions environnementales défavorables, comme l'absence de nutriments ou le froid extrême pendant quelques jours, le trophozoïte se transforme en kyste. La forme kystique constitue la forme de résistance de l'amibe. Elle peut résister plusieurs années à la dessiccation, aux températures extrêmes et à de nombreux désinfectants et antimicrobiens. Cette forme permet la dissémination du parasite dans l'environnement.

Lorsque les conditions environnementales deviennent favorables, le kyste retrouve sa forme trophozoïte (1, 12).

### **Figure visible sur la thèse papier**

Fig 1 : Les différentes formes d'*A. castellanii* (8)

## **II.1.2. Epidémiologie**

### **II.1.2.1. Incidence**

Les premiers cas de kératite amibienne ont été décrits en 1973 en Angleterre et en 1975 aux Etats unis. Entre 1975 et 1981, seulement 4 autres cas ont été rapportés dans la littérature. Puis l'incidence a continuellement augmenté jusqu'au milieu des années 1990. Cette augmentation est expliquée par l'amélioration du diagnostic, et surtout par l'essor des lentilles de contact (4).

Les cas de kératite amibienne sont remarquablement rares compte tenu de la distribution des acanthamibes dans l'environnement. Aux Etats-Unis, l'incidence chez les porteurs de lentilles, a été estimée entre 1,65 et 2,01 par million en 1998 (4). En Angleterre, l'incidence globale a été chiffrée à 1,2 par million d'individus, pour les années 1998 et 1999. L'incidence, chez les porteurs de lentilles de contact, a été chiffrée à 21,1 et 17,5 par million pour ces mêmes années (13). Cette incidence, nettement plus élevée qu'aux Etats-Unis ou qu'en Europe, s'explique selon *Kilvington et al.*, par l'originalité du système de plomberie anglais. En effet, l'eau d'alimentation est stockée dans des réservoirs, à la différence des autres pays où le circuit d'eau de ville arrive directement aux points d'utilisation (14). Aucune étude épidémiologique concernant la kératite amibienne en France n'a été retrouvée. Les ophtalmologistes estiment le nombre de nouveaux cas par an, à 50.

### II.1.2.2. Facteurs de risque

Le principal facteur de risque de kératite amibienne est le port de lentilles. En effet, dans 85 à 95% des cas, le malade est porteur de lentilles de contact souples, semi-rigides ou rigides. De nombreuses études ont montré la corrélation entre l'augmentation du nombre de cas depuis le début des années 1980, et le développement du marché des lentilles de contact (11).

Les facteurs de risque, en addition avec le port de lentille, sont (4) :

- le mauvais entretien des lentilles
- les baignades en piscine, en mer ou en eau douce sans le retrait des lentilles
- les abrasions et traumatismes cornéens

L'équipe de *Radford et al.* a mis en évidence un risque accru de kératite amibienne chez les porteurs de lentilles souples renouvelées toutes les 1 à 4 semaines, et un moindre risque chez les porteurs de lentilles rigides, perméables aux gaz (15).

La kératite amibienne se développe chez les porteurs de lentilles notamment lorsqu'ils utilisent l'eau du robinet comme eau de rinçage, des produits d'entretien non stériles, ou lorsqu'ils ne changent pas quotidiennement le bain désinfectant des lentilles (11). Le parasite se multiplie dans le boîtier, dans le biofilm simultanément aux bactéries, et se fixe sur la lentille pour aller contaminer l'œil. Une étude a montré qu'environ 7% des boîtiers de lentilles sont contaminés par des acanthamibes. Seule une très faible proportion de porteurs va développer l'infection. La contamination des boîtiers est donc un facteur de risque, mais d'autres facteurs, qui ne sont pas encore clarifiés aujourd'hui, entrent en compte dans le développement de la maladie (16).

Pour les 5 à 15% des cas touchant des individus non porteurs de lentilles, les facteurs de risque sont (11) : - la kératoplastie

- le traumatisme de la cornée avec exposition aux poussières ou matières organiques

### II.1.3. Pathogenèse

La pathogenèse de la kératite amibienne peut se diviser en 2 phases. La première est représentée par l'adhésion des trophozoïtes à l'épithélium cornéen, la seconde par l'invasion du stroma cornéen par ces mêmes trophozoïtes (17).

#### II.1.3.1. Rappels anatomiques (17-19)

La cornée est une membrane transparente qui forme la partie antérieure de la face externe du globe oculaire (figure 2). Elle joue le rôle optique de dioptré convergent.

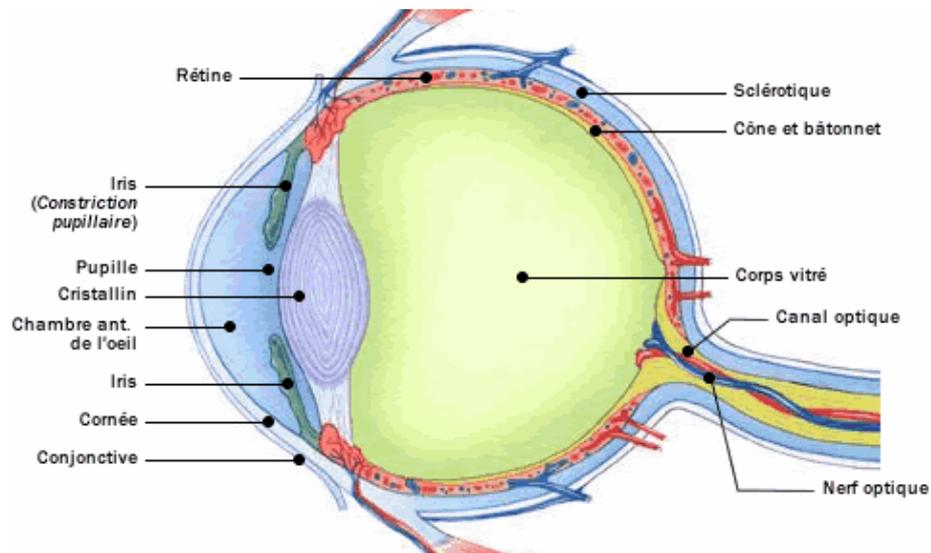


Fig 2 : Schéma anatomique de l'œil (20)

La cornée est composée de 5 couches de tissus (figure 3). L'épithélium cornéen est composé de 5 à 7 épaisseurs de cellules épithéliales non kératinisées. Le stroma cornéen est un tissu conjonctif et représente les 9/10<sup>ème</sup> de la cornée. Il est composé de lamelles conjonctives, d'une substance fondamentale et de kératocytes.

La cornée est richement innervée. Au niveau du limbe se trouvent de nombreux nerfs cornéens anastomosés entre eux, formant un véritable plexus. Du limbe, les nerfs se dirigent vers le centre de la cornée, et l'épithélium contient de nombreuses ramifications.

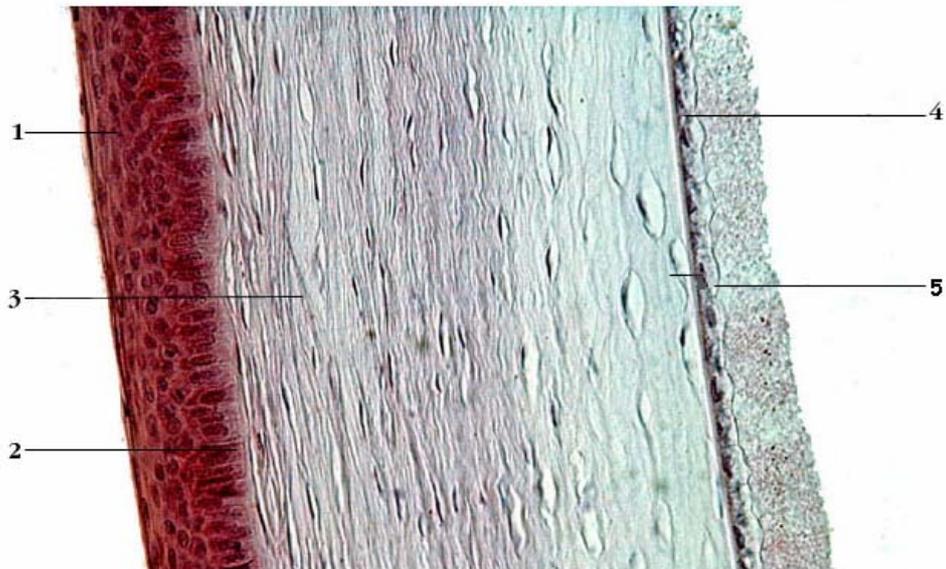


Fig 3 : Coupe de la cornée. 1 : épithélium cornéen, 2 : membrane de Bowman, 3 : stroma, 4 : membrane de Descemet, 5 : endothélium cornéen (21)

### II.1.3.2. Adhésion des parasites à l'épithélium cornéen

Les lentilles favorisent le développement de cette pathologie de deux manières. D'une part, elles servent de vecteur au parasite, de l'environnement à l'épithélium cornéen. D'autre part, leur port engendre une hypoxie et des micro-abrasions de la cornée, qui facilitent l'adhésion de l'amibe.

Sur la cornée, le trophozoïte se lie aux cellules épithéliales grâce à une mannose-binding-protéine, exprimée sur sa membrane cellulaire. Cette protéine se lie aux glycoprotéines et glycolipides mannosylées présents à la surface des cellules de l'épithélium cornéen, notamment lorsque celui-ci est érodé (8).

### II.1.3.3. Invasion de l'épithélium puis du stroma cornéen

L'adhésion des trophozoïtes à l'épithélium cornéen, est suivie d'une rapide et extensive desquamation de la surface cornéenne. Plusieurs mécanismes expliquent la cytopathogénécité du trophozoïte :

- la phagocytose
- la synthèse de protéases
- l'induction de l'apoptose

La phagocytose est le mécanisme utilisé par le trophozoïte pour se nourrir, mais aussi pour envahir l'épithélium cornéen (figure 4). Cette phagocytose est réalisée grâce à des structures présentes à la surface des amibes, ressemblant à des ventouses, appelées amoebastomes.

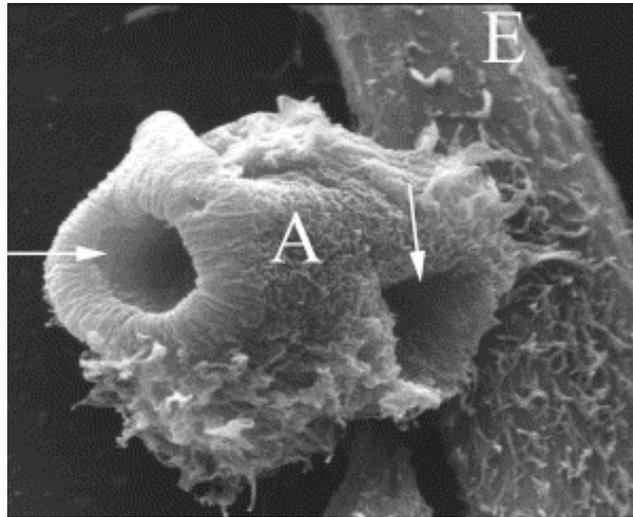


Fig 4 : Phagocytose des cellules de l'épithélium cornéen par une acanthamibe (A)  
Les flèches indiquent les amoebastomes (8)

Les acanthamibes sécrètent de nombreuses enzymes protéolytiques. Ces protéases dégradent les architectures extracellulaires de la cornée, et engendrent la cytolyse et l'apoptose des cellules de l'épithélium, du stroma cornéen, et des cellules nerveuses cornéennes (22). L'invasion du stroma cornéen par le parasite est responsable de la baisse de la vision, pouvant évoluer jusqu'à la cécité. La dégradation des cellules nerveuses cornéennes, favorisée par le chimiotactisme des acanthamibes pour ces cellules, se traduit cliniquement par une kératonévrite très douloureuse (4, 8).

La pathogénécité des acanthamibes s'explique aussi par de nombreux facteurs de virulence dits indirects : motilité, tolérance aux différentes valeurs de température, pH et osmolarité, capacité d'enkystement, résistance aux médicaments et désinfectants (8)...

## **II.1.4. Symptomatologie clinique**

### **II.1.4.1. Symptômes oculaires**

La symptomatologie clinique varie selon les individus. La majorité des patients se plaignent d'importantes douleurs oculaires, d'une sensation de corps étranger dans l'œil, d'un larmoiement, d'une photophobie, associés à un blépharospasme (contraction spasmodique des paupières) et une baisse d'acuité visuelle. La paupière est œdémateuse et le limbe hyperhémique. La douleur est

particulièrement sévère et disproportionnée compte tenu des signes cornéens. L'infection est généralement unilatérale (11, 23).

Ces signes sont peu spécifiques, et présents en cas de kératite herpétique dont l'incidence est plus importante, environ 1 cas pour 1000 individus par an en France (24).

#### **II.1.4.2. Symptômes cornéens (1, 9, 11, 16, 23, 25)**

Les premiers signes correspondent au développement des amibes dans l'épithélium cornéen. Celui-ci présente des micro-érosions, des irrégularités, et des opacifications blanchâtres. La localisation des opacifications évoque une kératite pseudo-dendritique, définie par une lésion arborescente ressemblant à une cellule nerveuse, parfois confondue avec une kératite herpétique. La sensibilité cornéenne est diminuée.

Dans un second temps, apparaissent des infiltrations stromales et une kératonévrite radiaire. Les acanthamibes migrent en effet dans le stroma le long des nerfs cornéens, du centre vers la périphérie cornéenne, provoquant un infiltrat inflammatoire (3, 6).

A un stade plus avancé sans traitement, l'infiltrat se retrouve en périphérie. Un abcès annulaire est alors observé (figure 5). Le stroma cornéen est aminci et s'opacifie. Le principal risque évolutif est la perforation de la cornée.



Fig 5 : Infiltrat annulaire (26)

#### **II.1.5. Diagnostic**

Le diagnostic doit être fait le plus précocement possible afin d'augmenter les chances de réussite du traitement. Après l'interrogatoire, qui permet de préciser la symptomatologie, les circonstances déclenchantes et l'évolution de l'affection, un examen clinique et des investigations biologiques sont réalisés.

### **II.1.5.1. Examen clinique (18)**

L'ophtalmologiste recherche les symptômes détaillés précédemment. Il réalise la mesure de l'acuité visuelle de l'œil pathologique, qu'il compare à l'autre œil. Il réalise aussi l'examen biomicroscopique de la cornée et le test de coloration du film lacrymal. Ce test consiste à instiller 1 à 2 gouttes de collyre à la fluorescéine 0,5% et permet de mettre en évidence très précisément les atteintes de l'épithélium cornéen.

### **II.1.5.2. Examen biologique (9, 11)**

Différents prélèvements peuvent être utilisés pour le diagnostic. Le plus fréquemment réalisé est le produit de grattage cornéen, mais en cas de résultats négatifs ou douteux, une biopsie cornéenne est souvent faite au bloc opératoire. Les acanthamibes peuvent aussi être recherchées sur les lentilles de contact et dans leurs étuis contenant la solution de décontamination.

L'examen direct du prélèvement au microscope après coloration, est tout d'abord réalisé à la recherche de kystes et de trophozoïtes. Le prélèvement est ensuite mis en culture dans un milieu contenant des *Escherichia coli* comme source de nutrition. Les trophozoïtes sont alors recherchés au microscope après 48 heures d'incubation, les kystes après 10 jours.

Aujourd'hui, des techniques diagnostiques très sensibles et spécifiques de biologie moléculaire se développent. La recherche et l'identification des acanthamibes peuvent être réalisées après amplification de l'ADN par PCR (Polymerase Chain Reaction). Des techniques de microscopie et d'imagerie non invasives, qui permettent la visualisation des amibes in vivo, commencent également à être utilisées.

Le diagnostic de la kératite amibienne est difficile et souvent tardif. Les premiers signes de l'infection sont peu spécifiques, l'affection est alors traitée comme une kératite herpétique, bactérienne ou fongique. Devant l'inefficacité du traitement, le diagnostic de kératite amibienne est envisagé, mais le retard a des conséquences sur l'efficacité des traitements médicamenteux, et augmente le risque d'aboutir à une kératoplastie ou à l'énucléation de l'œil (25).

## II.1.6. Traitement

Le traitement de la kératite amibienne a pour objectif d'éradiquer le microorganisme et de limiter rapidement l'inflammation. Il est basé sur l'utilisation d'associations de collyres antimicrobiens, actives sur les deux formes trophozoïtes et kystiques des acanthamibes (27).

Le traitement dure généralement plusieurs mois dans l'objectif d'éliminer tous les kystes, et d'éviter une éventuelle récurrence. En cas d'échec de la thérapie locale médicamenteuse, un traitement chirurgical est envisagé.

### II.1.6.1. Traitement médicamenteux

De nombreux antimicrobiens ont été utilisés dans le traitement de la kératite amibienne. Aujourd'hui, l'association d'une biguanide, chlorhexidine ou polyhexaméthylène biguanide (PHMB), et d'une diamidine aromatique, propamidine ou hexamidine, est souvent pratiquée. Aucun consensus n'est disponible.

#### a) Diamidines aromatiques

Une des premières molécules utilisées dans le traitement de la kératite amibienne est l'isethionate de propamidine à 0,1%. Elle est commercialisée en Angleterre sous le nom de Brolène<sup>®</sup> en collyre et en pommade ophtalmique. Elle est disponible en France après demande d'Autorisation Temporaire d'Utilisation (ATU) nominative à l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé (AFSSAPS).

L'efficacité de la propamidine a été montrée la première fois en 1985 par *Wright et al.* Ce principe actif a démontré depuis son efficacité dans plusieurs études cliniques, où il est utilisé avec différentes molécules notamment le PHMB (28) et l'association néomycine - polymyxine B - gramicidine (29).

La propamidine n'est malheureusement pas très bien tolérée à long terme, elle peut être la cause de kératopathies (9). De plus, des souches résistantes d'acanthamibes ont été mises en évidence (27).

Une autre diamidine, l'hexamidine, a été évaluée *in vitro* (30), et plusieurs cas publiés ont montré son efficacité clinique en association à la chlorhexidine en 1998 (31) ou au PHMB en 2003 (27). Un collyre d'hexamidine à 0,1% est commercialisé en France sous le nom de spécialité Désoméline<sup>®</sup>.

## b) Biguanides

Au début des années 1990, des études *in vitro* ont montré l'efficacité du PHMB sur les formes trophozoïtes et kystiques d'acanthamibes. En 1992, *Larkin et al.* ont rapporté son efficacité *in vivo*, utilisé sous forme collyre à 0,02%. De nombreuses équipes ont ensuite rapporté des cas traités avec succès par PHMB seul ou associé à divers antimicrobiens (11, 30). Le PHMB associé à la propamide en collyres est alors devenu le traitement de première ligne de la kératite amibienne. Il a nettement amélioré la prise en charge thérapeutique de la kératite amibienne (30, 32, 33). Le PHMB est très efficace sur les kystes. Il est de plus très bien toléré.

Le PHMB n'est par contre pas décrit dans la Pharmacopée Française ou Européenne. Il est commercialisé comme désinfectant, notamment pour piscines, par des établissements non pharmaceutiques. *Seal et al.* ont alors étudié l'efficacité d'une autre biguanide, la chlorhexidine, qui elle, est décrite dans la Pharmacopée (34). Cette équipe a montré, dès 1994, l'intérêt du gluconate de chlorhexidine en collyre à 0,02% dans le traitement de la kératite amibienne (16, 35, 36). Les études *in vitro* ont montré une activité équivalente ou légèrement supérieure de la chlorhexidine sur les kystes d'acanthamibes (11). Dans les années qui ont suivi les études de *Seal et al.*, l'utilisation de la chlorhexidine plutôt que le PHMB a été largement débattue (32, 33). Depuis, de nombreux cas traités avec succès par des collyres à la chlorhexidine à 0,02 % ou moins, ont été rapportés (37, 38).

Le PHMB et la chlorhexidine sont aujourd'hui reconnus équivalents en terme de tolérance et d'efficacité dans le traitement de la kératite amibienne, mais aucune étude clinique randomisée n'a été réalisée afin de le démontrer. En France, ces 2 molécules sont prescrites. La chlorhexidine présente l'avantage d'être disponible auprès d'établissements pharmaceutiques, ce qui permet aux Pharmacies à Usage Intérieur (PUI) qui fabriquent le collyre, d'être en conformité avec les Bonnes Pratiques de Préparations à l'Hôpital (BPPrH) (39).

## c) Autres antimicrobiens

De nombreux antimicrobiens sont utilisés dans le traitement de la kératite amibienne, en association le plus souvent aux deux familles décrites précédemment. Des collyres antibiotiques (néomycine, colimycine, gentamicine...) ou antifongiques (miconazole, fluconazole, kétoconazole...) ont montré une activité sur les formes trophozoïtes des acanthamibes. Ils permettent, de plus, de diminuer le risque de surinfection et de limiter le nombre de microorganismes représentant des substrats nutritifs pour l'amibe.

De nouvelles substances ont montré une très bonne efficacité *in vitro*, comme l'amidoamine myristamidopropyl diméthylamine (1, 30) et l'hexadécylphos-phocholine (40). Leur intérêt clinique reste à démontrer sur des modèles animaux puis chez l'homme.

#### d) Corticoïdes

Des collyres de corticoïdes sont parfois utilisés, en addition aux collyres antimicrobiens, dans le traitement de la kératite amibienne. Leur utilisation a pour objectif de diminuer l'inflammation et la douleur. Les corticoïdes limitent aussi l'enkystement des trophozoïtes, qui sont plus sensibles que les kystes aux antimicrobiens (1, 9, 11, 30). Mais leur utilisation est controversée, car si leurs propriétés anti-inflammatoires et immunosuppressives limitent l'enkystement, il a été montré qu'elles favorisent aussi la libération des trophozoïtes à partir des kystes, pouvant aggraver la kératite (41).

#### e) Schéma posologique

Dans les différentes études cliniques, le schéma posologique du collyre au gluconate de chlorhexidine est généralement proche du suivant (29, 42):

- une goutte toutes les heures pendant les 3 premiers jours
- une goutte toutes les 2 heures pendant les 3 jours suivants
- une goutte 6 à 8 fois par jour pendant 4 semaines
- une goutte 4 fois par jour, pendant 4 à 6, voire 12 mois

Les gouttes des autres collyres doivent être instillées avec 5 minutes d'intervalle. Dans les cas particulièrement graves, les collyres sont aussi instillés la nuit, les premiers jours de traitement.

Lorsque la symptomatologie a régressé, le plus souvent dans les 2 à 4 premières semaines de traitement, l'utilisation des topiques antimicrobiens doit être continuée de façon à éradiquer les kystes et ainsi éviter une éventuelle récurrence.

Il est nécessaire de bien informer le patient des risques de récurrence, et d'insister sur l'importance de l'observance du traitement (6).

### **II.1.6.2. Traitement chirurgical**

#### a) Débridement chirurgical

Un débridement chirurgical large des lésions épithéliales peut être réalisé, peu après le diagnostic posé, afin de réduire la charge parasitaire et favoriser la pénétration des antimicrobiens topiques. Il correspond au pelage de l'épithélium cornéen. Des équipes ont rapporté quelques cas, où ce seul acte a permis de traiter des kératites amibiennes précocement diagnostiquées (9, 23).

#### b) Kératoplastie ou greffe de cornée

Des greffes de cornée ont fréquemment été pratiquées dans des kératites très évoluées. Aujourd'hui, le recours à la kératoplastie est de moins en moins fréquent. La kératite amibienne se guérit grâce aux seuls topiques médicamenteux, éventuellement associés au débridement chirurgical. La kératoplastie reste pratiquée en cas d'échec du traitement médicamenteux et de risque de perforation cornéenne. Mais l'indication la plus commune aujourd'hui est l'amélioration de la vision d'un œil dont l'infection a été résolue et a laissé des séquelles cornéennes (11, 23).

#### c) Enucléation

L'ablation de l'œil est parfois pratiquée en ultime ressort, après échec du traitement médicamenteux et de plusieurs kératoplasties (30).

### **II.1.7. Prévention**

La prévention de la kératite amibienne repose sur l'éviction des facteurs de risques. Chez le porteur de lentille, la prévention passe par le respect des règles d'hygiène et de désinfection des lentilles de contact et de leur boîtier. Les lentilles doivent de plus être retirées pour dormir, afin d'éviter l'hypoxie et l'abrasion cornéenne, et avant toute baignade ou douche.

Différentes études *in vitro* ont mis en cause l'activité des solutions de décontamination des lentilles de contact sur les kystes des acanthamibes (43, 44). Au début des années 1990, l'incidence des kératites amibiennes a nettement augmenté en Angleterre. Cette augmentation a été attribuée à la mise sur le marché de comprimés libérant du chlore pour la désinfection des lentilles, qui n'est pas actif sur les formes kystiques (16).

Aucune obligation n'existe quant à l'évaluation de l'efficacité de ces solutions sur les acanthamibes avant leur mise sur le marché. Le système normatif ISO (International Organization

for Standardization) oblige seulement les fabricants à évaluer leur activité sur des souches bactériennes et fongiques. Une des raisons de cette omission, est qu'il n'existe pas de méthode standard pour évaluer l'efficacité des désinfectants sur ces amibes (45).

L'incidence de la kératite amibienne peut aussi diminuer grâce au développement des lentilles journalières, qui permettent de s'affranchir des règles d'hygiène parfois contraignantes.

## **II.2. La Chlorhexidine**

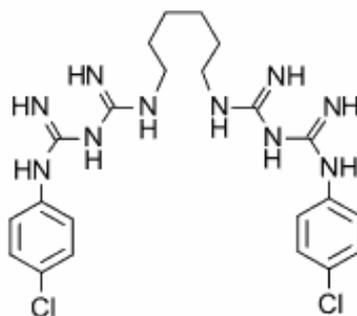
La chlorhexidine est une molécule dont la synthèse a été décrite au début des années 1950. Elle est aujourd'hui communément utilisée comme antiseptique et comme agent conservateur.

### **II.2.1. Formules chimiques**

#### **II.2.1.1. Formule brute**

La formule brute du digluconate de chlorhexidine est :  $C_{34}H_{54}Cl_2N_{10}O_{14}$ , ou encore  $C_{22}H_{30}Cl_2N_{10} \cdot 2C_6H_{12}O_7$ . La chlorhexidine a pour formule  $C_{22}H_{30}Cl_2N_{10}$  et correspond au 1,6dichlorophényl diguanidohexane (46, 47).

#### **II.2.1.2. Formule développée**



### **II.2.2. Propriétés physico-chimiques**

Les propriétés physico-chimiques et les données de compatibilité du gluconate de chlorhexidine ont été recherchées dans les ouvrages de référence tels le *Clarke's*, la Pharmacopée Européenne, le *Martindale*, et l'*Index Merck* (34, 46-48). Une recherche sur la base de données

*Medline* a ensuite été effectuée afin de compléter ces données. La recherche a été réalisée en utilisant les mots clés suivants : « chlorhexidine » associé à « compatibility », « incompatibility » ou « interaction ». Des ouvrages concernant les antiseptiques et les interactions contenant - contenu ont aussi été consultés (49-52).

### **II.2.2.1. Classe chimique**

La chlorhexidine est une bisbiguanide. Dans la classe des biguanides, sont aussi utilisés la picloxydine et le PHMB (50).

### **II.2.2.2. Caractères physico-chimiques**

La chlorhexidine est une substance cristalline, basique, de masse molaire 505,5 g/mol, de point de fusion 134 °C et pratiquement insoluble dans l'eau. Elle absorbe dans l'ultraviolet (UV) et l'infrarouge (IR). Son spectre UV varie selon le pH de la solution (46).

La chlorhexidine est commercialisée sous forme de sels solubles : le digluconate, le dihydrochlorite et le diacétate de chlorhexidine. Le digluconate de chlorhexidine est le sel le plus soluble dans l'eau. Il se dissout jusqu'à 70% p/v (50) alors que le diacétate et le dihydrochlorite ne se dissolvent que jusqu'à 1,9% et 0,06% p/v respectivement (47).

Le digluconate de chlorhexidine est commercialisé sous forme de solution aqueuse, à 20 % +/-1% p/v. Cette solution est incolore ou jaune pâle, miscible à l'eau, soluble dans l'alcool et l'acétone. Il est nécessaire de conserver la solution à l'abri de la lumière (34). La masse molaire du digluconate de chlorhexidine est de 897,8 g/mol (46). Ce composé est basique, son pKa dans l'eau à 25° Celsius (C) est de 10,8.

### **II.2.2.3. Données de compatibilité**

La chlorhexidine est une substance cationique, elle est susceptible de réagir avec différents agents anioniques.

Les sels de chlorhexidine sont incompatibles avec les dérivés anioniques, tels que les savons, les alginates, la gomme adragante, la cellulose, le lauryl-sulfate, les colorants comme l'éosine, la fluorescéine et le vert brillant. La chlorhexidine est de même incompatible avec les antiseptiques halogénés, les aldéhydes, les dérivés mercuriels, le nitrate d'argent, le sulfate de zinc et de cuivre (50).

A la concentration de 500 mg/l, les sels de chlorhexidine sont incompatibles avec les anions minéraux tels que les borates, les bicarbonates, les carbonates, les chlorures, les citrates, les nitrates, les phosphates et les sulfates, ils forment en effet, des sels de moindre solubilité. A des dilutions de 0,1 g/l ou plus, ces sels sont généralement solubles.

A la concentration de 500 mg/l et en présence de  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  ou  $Zn^{2+}$ , il est rapporté que l'acétate de chlorhexidine perd 90% de son activité en 3 jours (48).

La chlorhexidine est compatible avec les substances non ioniques, mais certaines, comme le polysorbate, peuvent l'inactiver (50).

Les solutions aqueuses de chlorhexidine à pH 6 sont stables dans le polyéthylène et le polypropylène. La perte, inférieure à la limite de 10% sur 6 mois, est attribuée à un phénomène d'adsorption (52). Il est possible d'utiliser comme contenant le verre neutre, le polypropylène et le polyéthylène (50).

#### **II.2.2.4. Produits de dégradation de la chlorhexidine**

Les solutions aqueuses de gluconate de chlorhexidine à 20% sont stables à température ambiante et à l'abri de la lumière pendant une durée supérieure à 2 ans (53, 54). Ces solutions contiennent environ 1% de produits de dégradation (54). Avant utilisation pour toute préparation hospitalière ou magistrale, ces produits doivent être recherchés et quantifiés selon la méthode chromatographique décrite dans la Pharmacopée Européenne (34).

Les conditions de dégradation de la chlorhexidine ont été décrites dans plusieurs publications (50, 53). La chlorhexidine se dégrade selon les voies B et C décrites en figure 6, après exposition à de fortes températures, après exposition à la lumière et en cas de conservation dans des conditions fortement acides ou basiques. Les mécanismes de dégradation ont été expliqués par *Revelle et al.* et *Ha et al.* (53, 54). Ces deux équipes ont identifié 12 produits de dégradation à partir de l'analyse de solutions de chlorhexidine soumises à différentes conditions de température, pH et luminosité.

Les méthodes d'analyse utilisées pour mettre en évidence ces composés ont été : la chromatographie liquide haute performance (HPLC) avec détecteur à barrette de diodes, l'HPLC couplée à un spectromètre de masse, et la résonance magnétique nucléaire. Ces méthodes ont été appliquées sur les produits de dégradation isolés et synthétisés, et sur les solutions dégradées (55).

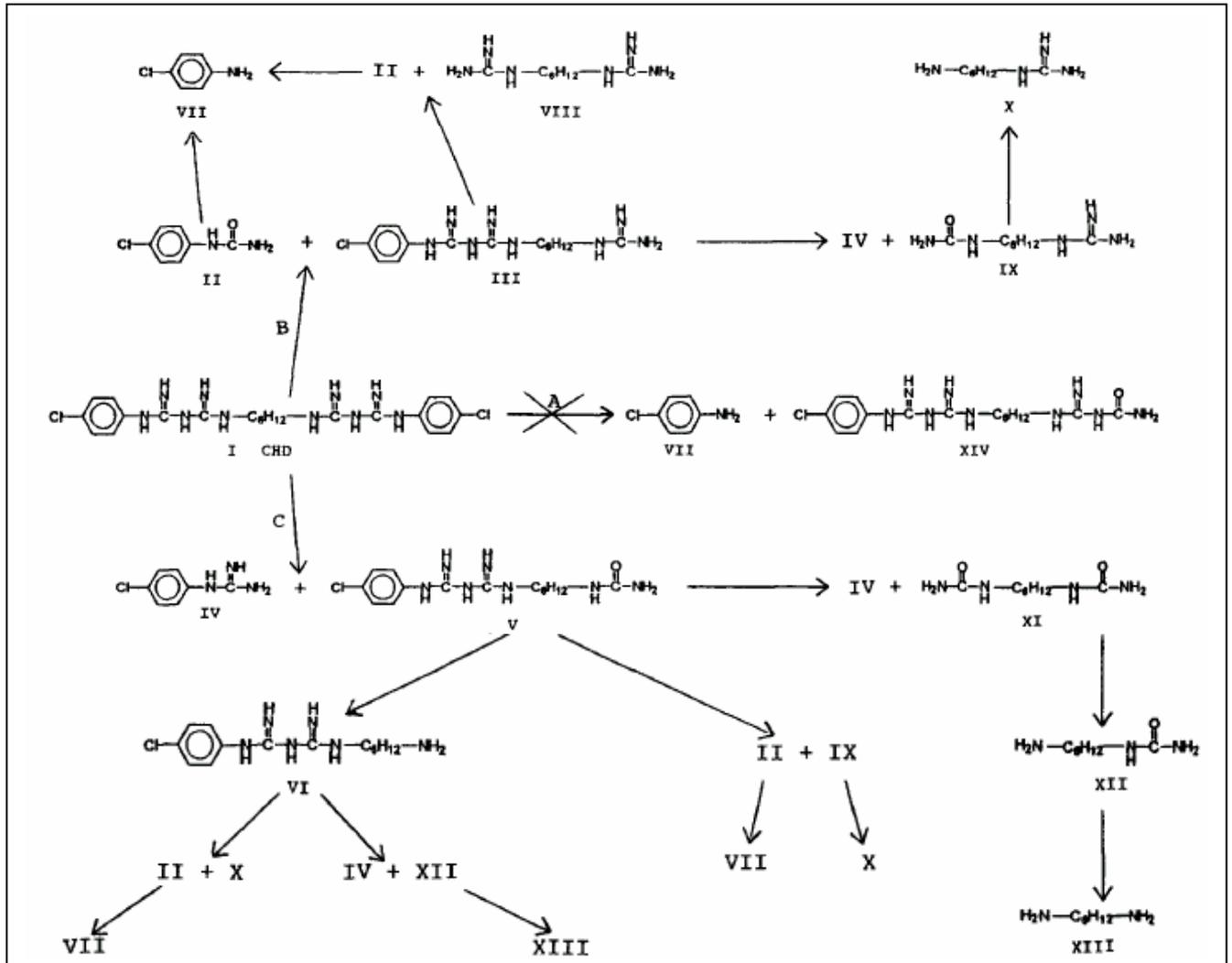


Fig 6 : Produits de dégradation de la chlorhexidine et leurs voies de formation (53)

Selon les conditions de dégradation appliquées aux solutions aqueuses de chlorhexidine, les produits de dégradation majoritairement formés sont différents.

Dans les différentes études, la quantification des produits de dégradation n'est pas réalisée. Les auteurs notent par contre un taux de chlorhexidine réduit de plus de 50% après exposition de la solution commerciale de gluconate de chlorhexidine à 20% 2 jours à 100°C (54).

De tous les produits de dégradation formés, seul le composé VII, qui correspond à la para-chloroaniline, est connu comme toxique. Aucune propriété antimicrobienne des produits de dégradation n'est rapportée dans la littérature.

### **II.2.3. Mécanisme d'action**

La chlorhexidine est un agent cationique qui réagit avec les groupements chargés négativement de la paroi des microorganismes, comme les groupements phosphates des lipopolysaccharides ou les groupements carboxyl des protéines. En présence de microorganismes, la chlorhexidine est rapidement adsorbée à leurs surfaces (50).

Le mécanisme d'action de la chlorhexidine sur les acanthamibes, comme sur les bactéries, varie selon sa concentration. Concernant son activité *in vitro*, à de faibles concentrations (5, 10 mg/l), la chlorhexidine engendre très peu de modifications morphologiques des microorganismes. A des concentrations proches de 75 mg/l, la chlorhexidine altère la membrane plasmique des amibes, avec pour conséquence la fuite des constituants cytoplasmiques de faible poids moléculaire. A forte concentration (500 mg/l), la chlorhexidine agit par précipitation et coagulation des protéines et des acides nucléiques. La paroi des microorganismes semble intacte mais leur cytoplasme apparaît coagulé (50, 56).

### **II.2.4. Spectre d'activité**

La chlorhexidine est active sur de nombreux microorganismes. Son activité dépend de la concentration et de la formulation utilisée ; elle est maximale à pH compris entre 5,5 et 7,0.

#### **II.2.4.1. Spectre d'activité antimicrobien**

La chlorhexidine en solution aqueuse a une activité létale forte sur les bactéries gram + (Concentrations Minimales Bactéricides ou CMB autour de 50 mg/l), une activité létale moyenne sur les bactéries gram – (CMB autour de 100 mg/l), une activité létale faible sur les levures, champignons et virus nus, et une activité létale nulle sur les spores bactériennes, les mycobactéries et les prions (51). L'activité de la chlorhexidine sur les parasites, mis à part les acanthamibes, est peu décrite dans la littérature.

#### **II.2.4.2. Activité sur les acanthamibes et formules utilisées**

De nombreuses études démontrant l'efficacité de la chlorhexidine *in vitro* et *in vivo*, sur les acanthamibes, sont référencées sur *Medline* (1, 30, 33, 42, 57-59). *In vitro*, les trophozoïtes et les kystes d'acanthamibes sont détruits par des solutions de gluconate de chlorhexidine de

concentration supérieure ou égale à 0,005% p/v. *In vivo*, les concentrations qui ont montré une efficacité, sont 0,02 et 0,006% p/v (11).

Les formulations du collyre au gluconate de chlorhexidine à 0,02%, dont l'utilisation est plus fréquente dans le traitement de la kératite amibienne, ont été recherchées dans la littérature. Les ouvrages de référence, tel le *Martindale* (48), l'encyclopédie Medico-Chirurgicale (3) ou le *Harrison* (2) ainsi que des ouvrages d'ophtalmologie (6, 18, 19), ont tout d'abord été consultés. Les formulations n'y sont pas détaillées.

Une recherche bibliographique a ensuite été menée sur la base de données *Medline*. Les mots clés utilisés pour les recherches ont été « chlorhexidine » associé avec « formulation », « eye drop » ou « eye ». Puis devant les résultats infructueux, la recherche a été étendue. Les mots clés utilisés ont alors été « chlorhexidine » associé avec « *Acanthamoeba keratitis* » dans le but d'obtenir les formulations utilisées par chacune des équipes ayant rapporté des cas de kératite amibienne traités par des collyres à la chlorhexidine. Les formulations des collyres à la chlorhexidine utilisés sont souvent omises. Certains auteurs rapportent l'utilisation de collyres à la chlorhexidine diluée dans du sérum physiologique (30), d'autres dans des larmes artificielles (37). La composition des larmes artificielles n'est pas détaillée, elle peut correspondre à une solution de chlorure de sodium, à une solution qui comprend de la méthylcellulose,....

## **II.2.5. Effets indésirables**

La chlorhexidine est une molécule très utilisée et très bien tolérée. Dans ce paragraphe, seuls les effets indésirables en lien avec l'instillation oculaire de la chlorhexidine sont détaillés.

### **II.2.5.1. Toxicité oculaire**

Des études *in vitro* ont montré un effet toxique de la chlorhexidine sur les cellules épithéliales cornéennes, les cellules endothéliales et les fibroblastes (60). Cette toxicité est dose dépendante. Des conjonctivites et des irritations de la muqueuse oculaire ont été rapportées après utilisation chez l'homme. A des concentrations inférieures ou égales à 0,02%, elle est considérée comme non toxique (50, 60).

Dans la base de données *Medline*, un cas de kératite ulcéreuse, imputé à la chlorhexidine après utilisation pendant 8 semaines d'un collyre au gluconate de chlorhexidine à 0,02% pour le traitement d'une kératite amibienne, a été retrouvé (60). Au moment du diagnostic, l'épithélium

cornéen avait presque totalement disparu et le stroma cornéen était partiellement atteint. Suite à des complications, une kératoplastie a dû être pratiquée.

Des lésions épithéliales cornéennes transitoires jusqu'à des ulcérations cornéennes chroniques et opacifications irréversibles ont été décrites suite à des expositions accidentelles à la chlorhexidine au cours de l'antisepsie cutanée pré-opératoire (50, 61). Des cas d'œdèmes cornéens, d'atrophie iridienne et de kératopathie bulleuse ont de même été décrits suite à l'utilisation accidentelle de solutions de chlorhexidine lors de l'irrigation intraoculaire durant des interventions de cataracte (62, 63).

#### **II.2.5.2. Hypersensibilité**

Chez l'adulte, l'absorption consécutive à l'application cutanée ou muqueuse de solutions de chlorhexidine est négligeable. Les réactions systémiques rencontrées sont des réactions d'hypersensibilité.

Des urticaires, des bronchospasmes, des œdèmes de Quincke et des chocs anaphylactiques graves ont été rapportés suite à l'application cutanée ou muqueuse de solutions aqueuses ou alcooliques de chlorhexidine. Ces réactions sont très rares mais menacent le pronostic vital des patients (50).

#### **II.2.5.3. Effets indésirables de la chloroaniline**

La chloroaniline peut entraîner des lésions oculaires. Cependant les taux de chloroaniline retrouvés dans les solutions de chlorhexidine sont négligeables, si les conditions de conservation ont été respectées (température inférieure à 25°C et abri de la lumière) (50).

### **II.2.6. Contre-indications et précautions d'emploi**

La seule contre-indication à l'utilisation de la chlorhexidine en collyre est l'hypersensibilité.

Le collyre de chlorhexidine est réservé à l'usage local oculaire. Compte tenu du pouvoir irritant de la chlorhexidine sur les muqueuses, son utilisation prolongée sous forme collyre nécessite un suivi ophtalmologique régulier.

## **II.2.7. Méthodes de dosage**

Les différentes méthodes de dosage de la chlorhexidine ont été recherchées dans le *Clarke's*, la Pharmacopée Européenne (34) et sur la base de données *Medline*. La chlorhexidine peut être dosée de différentes façons :

- Colorimétrie, ou titrimétrie avec lecture du point d'équivalence grâce à un indicateur coloré
- Potentiométrie, ou titrimétrie avec détermination du point d'équivalence par mesure de la différence de potentiel entre 2 électrodes
- Spectrométrie UV
- Chromatographie liquide à haute performance (HPLC) avec détection UV
- Chromatographie en phase gazeuse avec détecteur à ionisation de flamme ou détecteur de masse

Selon la monographie de la Pharmacopée Européenne, le dosage du gluconate de chlorhexidine s'effectue par protométrie en milieu non aqueux. Le titrant utilisé est l'acide perchlorique 0,1 mol/l ; le point d'équivalence est déterminé par potentiométrie (34).

Dans la littérature, de nombreuses méthodes de dosage de la chlorhexidine par HPLC (64-66) et par chromatographie en phase gazeuse (67, 68), sont décrites. Le système de détection utilisé pour le dosage par HPLC est généralement basé sur l'absorption UV. A pH 7, le spectre du gluconate de chlorhexidine présente 2 maximums d'absorption autour de 231 et 254 nm, avec respectivement comme coefficients d'absorptions molaires,  $4,6 \cdot 10^4$  et  $4,4 \cdot 10^4$  l/mol/cm selon la loi de Beer-Lambert (annexe 2).

## ***II.3. La production d'un collyre en milieu hospitalier***

### **II.3.1. La préparation : une mission des PUI**

Les missions des Pharmacies à Usage Intérieur (PUI) sont définies dans le décret du 26 décembre 2000 (69). Elles ont, entre autres pour missions, la préparation, le contrôle et l'approvisionnement des médicaments. Deux types de préparations sont amenés à être réalisés : les préparations magistrales et les préparations hospitalières.

### **II.3.1.1. Les préparations magistrales**

Les préparations magistrales sont des médicaments préparés extemporanément en pharmacie selon une prescription destinée à un malade déterminé (39). La réalisation de ces préparations fait partie des missions obligatoires des PUI. Les PUI doivent disposer des locaux, des moyens en personnel et des moyens en équipements nécessaires à leur réalisation (69).

### **II.3.1.2. Les préparations hospitalières**

Les préparations hospitalières sont des médicaments préparés dans une PUI selon les indications de la Pharmacopée, en raison de l'absence de spécialité disponible ou adaptée sur le territoire. Ces préparations sont dispensées sur prescription médicale à un ou plusieurs patients de l'établissement (39). La réalisation des préparations hospitalières est une mission optionnelle, soumise à autorisation préfectorale, au vu des moyens à disposition de la PUI (69). Ces préparations font l'objet d'une déclaration auprès de l'AFSSAPS (39).

### **II.3.1.3. Le collyre à la chlorhexidine : préparation magistrale ou hospitalière ?**

Au CHU d'Angers, il a été choisi de classer le collyre à la chlorhexidine dans les préparations magistrales. En effet, très peu de patients sont atteints de kératite amibienne. L'usage du collyre est peu fréquent et peut être prévu à l'avance, après le diagnostic posé. Ce collyre est donc réalisé extemporanément au vu d'une prescription.

### **II.3.1.4. Réalisation d'une préparation magistrale : accord pharmaceutique préalable**

Même si la réalisation des préparations magistrales fait partie des missions obligatoires des PUI, leur réalisation est conditionnée, comme pour toute préparation, à l'accord du pharmacien. Le pharmacien doit, en effet, étudier la faisabilité de la préparation en fonction des connaissances scientifiques, médicales et techniques, puis vérifier qu'il dispose des moyens appropriés pour la réaliser et la contrôler. S'il refuse de réaliser une préparation, il propose alors une alternative (39).

Les conséquences de ce refus doivent être mesurées, car les prescripteurs risquent de décider de faire réaliser ces préparations dans leur service, dans des conditions non optimales.

### **II.3.2. La législation autour des préparations à l'hôpital**

Les PUI doivent fonctionner conformément aux Bonnes Pratiques de Pharmacie Hospitalières (BPPH), arrêtées le 22 juin 2001 par le ministre délégué à la Santé (70). D'après ces BPPH, les préparations de médicaments dans les PUI doivent être préparées en conformité avec les Bonnes Pratiques de Préparation à l'Hôpital (BPPrH) (39).

Les BPPrH sont à l'hôpital ce que représentent les Bonnes Pratiques de Fabrication ou Good Manufacturing Practice (GMP) pour l'industrie pharmaceutique (71). Ces BPPrH sont toujours à l'état de projet, soumis à enquête publique par l'AFSSAPS, et non arrêtées par le Ministère de la Santé et des Solidarités.

Les BPPrH sont plus proches des réalités hospitalières que les GMP, et malgré leur caractère non réglementaire, elles servent de base aux pharmaciens des PUI et aux inspecteurs de la Direction des Affaires Sanitaires et Sociales (DASS). Un chapitre est consacré à la préparation des médicaments stériles.

Les dispositions générales aux activités de préparation et de contrôle, décrites dans les BPPH et les BPPrH, sont succinctement détaillées ci-dessous.

#### **II.3.2.1. Personnel**

Les préparations et les contrôles sont menés sous la responsabilité du pharmacien par des personnes compétentes, qualifiées, formées et en nombre suffisant. Chaque membre du personnel connaît ses responsabilités, définies par écrit sur des fiches de fonction, et bénéficie d'une formation initiale et continue adaptée aux tâches qui lui sont confiées (39, 70).

#### **II.3.2.2. Locaux**

Les locaux de préparation et de contrôle doivent être adaptés aux opérations effectuées et conformes aux dispositions précisées dans les BPPH (39). Ils ne sont accessibles qu'au personnel autorisé. Les BPPH indiquent comment les locaux destinés à la préparation de médicaments et aux contrôles, doivent être agencés (70).

### **II.3.2.3. Matériels et équipements**

Le matériel de préparation et de contrôle est conçu, validé et entretenu en fonction de ses objectifs. Tout appareillage, toute installation de préparation ou de contrôle doit être qualifié avant utilisation (39, 70). La qualification permet de démontrer que l'appareil ou l'équipement est capable de répondre aux exigences spécifiées. Les performances du bon fonctionnement de l'appareil sont vérifiées, selon des périodes définies, à l'aide des référentiels en vigueur, au moyen d'appareils de mesure préalablement étalonnés (39, 70).

### **II.3.2.4. Gestion de la qualité**

L'ensemble des activités reliées au processus de préparation s'inscrit dans le système de management de la qualité mis en place dans la PUI. Le système d'assurance qualité a pour objectif principal de garantir que chaque produit est conforme aux objectifs fixés. La gestion de la qualité doit être réalisée conformément aux principes définis dans les BPPH (39, 70).

Le système qualité est basé sur la mise en place d'un système documentaire comprenant un manuel qualité, des procédures, instructions et documents d'enregistrement.

Pour chaque lot d'une préparation réalisé, un dossier de lot qui contient toutes les informations et documents relatifs à la préparation, à son étiquetage, et à son contrôle, est constitué. C'est un élément essentiel en terme d'assurance qualité et de traçabilité de la préparation. Après analyse de ce dossier, le pharmacien libère ou non les préparations terminées en vue de leur dispensation (39).

### **II.3.2.5 Contrôles**

Les contrôles réalisés concernent les matières premières, les articles de conditionnement, les préparations terminées et l'environnement. Les différentes méthodes d'analyses doivent être validées, et les équipements utilisés qualifiés (39).

Dans l'attente des résultats des contrôles et de leur validation par le pharmacien, les matières premières, articles de conditionnement et préparations sont mis en quarantaine (39).

## **II.3.3. Propriétés des collyres et conséquences sur la formulation**

### **II.3.3.1. Définition et propriétés des collyres**

Selon la Pharmacopée Européenne, les collyres sont des solutions ou des suspensions stériles, aqueuses ou huileuses, contenant un ou plusieurs principes actifs et destinées à l'instillation oculaire (34).

Lorsqu'un collyre est administré, il est perçu par l'œil comme un corps étranger. Son instillation peut provoquer avec plus ou moins d'intensité (17, 72):

- un larmoiement,
- une fermeture des paupières,
- une sensation douloureuse,
- une rougeur de la conjonctive.

La formulation du collyre doit être réalisée de façon à ce que ces réactions soient minimisées : le pH du collyre doit se rapprocher de la neutralité, et l'osmolarité doit se rapprocher de celle des larmes. Les collyres doivent de plus être stériles, et limpides s'ils se présentent sous la forme d'une solution (34).

Même si le collyre est bien toléré, le temps de persistance du collyre sur la cornée et la conjonctive, est réduit. Il est donc nécessaire, pour certaines affections, de répéter les instillations ou de remplacer le collyre par une pommade ophtalmique (72).

### **II.3.3.2. Formulation des collyres**

L'ajout d'excipients doit être étudié afin d'obtenir un collyre répondant aux propriétés de neutralité et d'isotonie. D'autres excipients peuvent être ajoutés afin de stabiliser le pH (mélange acide/base tampon), solubiliser le principe actif, stabiliser la préparation, ou améliorer la pénétration, prolonger l'action du collyre... Les excipients choisis doivent bien sur être inertes vis à vis du principe actif, des matériaux de conditionnement et de l'organisme.

Le choix des excipients nécessite la connaissance des propriétés physico-chimiques du principe actif. Les données de solubilité dans l'eau, de stabilité à la lumière, à l'humidité, à l'oxygène de l'air et de compatibilité du principe actif, doivent être disponibles.

#### a) Ajustement du pH

Le pH d'un collyre doit se rapprocher du pH du liquide lacrymal, qui est compris entre 7,4 et 7,7. Mais l'œil peut supporter sans réagir de plus grands écarts grâce au pouvoir tampon des larmes. L'ajustement du pH ne peut de plus être réalisé que si le principe actif est stable, soluble et actif aux alentours de pH = 7. Si l'ajustement du pH est nécessaire et possible, il se fait en général à l'aide des tampons phosphates et le mélange acide borique/borate de sodium (72).

Le pH de la formule est contrôlé à l'aide d'un pHmètre qui mesure la différence de potentiel entre 2 électrodes plongeant dans la solution à examiner. Les électrodes utilisées pour la mesure du pH en solution aqueuse sont généralement une électrode de verre associée à une électrode au calomel saturé (34).

#### b) Ajustement de l'osmolarité

L'osmolarité correspond au nombre de particules osmotiques par litre de solvant. L'osmolalité correspond au nombre de particules osmotiques par kg de solvant. Pour un collyre aqueux, l'osmolarité est égale à l'osmolalité.

L'osmolarité des collyres doit se rapprocher de celle des larmes afin d'éviter les réactions réflexes de l'œil décrites précédemment. L'osmolarité des larmes est proche de celle du sang, soit 295 +/- 15 mosmol/l. L'œil sain peut supporter des concentrations osmolaires s'écartant de cet intervalle, mais il est possible que pour un œil pathologique, il n'en soit pas de même. L'ajustement se fait à l'aide d'isotonisants tels le chlorure de sodium, le glucose, le mannitol, les substances tampons (72)... Le glucose doit être évité car il s'agit d'un bon milieu de culture microbien.

L'osmolarité de la formule est contrôlée, selon la Pharmacopée Européenne, à l'aide d'un osmomètre dont le principe est basé sur la mesure de l'abaissement cryoscopique de la solution (34).

#### c) Limpidité

Un collyre doit être limpide s'il se présente en solution.

La limpidité de la formule peut être contrôlée par turbidimétrie, par néphélométrie ou par méthode visuelle, en comparaison à des solutions de références dites « d'opalescence » décrites dans la Pharmacopée Européenne (34). La turbidimétrie repose sur la mesure de l'absorption de la lumière. La néphélométrie est basée sur la mesure de la lumière diffractée.

#### d) Stérilité

Un collyre doit être stérile, et rester stérile durant son utilisation s'il est conditionné en récipient multidoses (34). L'état stérile de la préparation est obtenu par l'application d'un procédé de fabrication adapté (cf paragraphe II.3.5.).

D'après la Pharmacopée Européenne (34), l'utilisation de flacons multidoses est limitée à 4 semaines après ouverture et peut être réduite sur spécification du fabricant. Afin de rester stériles après ouverture, il est spécifié que les collyres aqueux en récipients multidoses doivent contenir un conservateur antimicrobien, à moins que la préparation présente elle-même des propriétés microbiennes adéquates. L'efficacité de la conservation antimicrobienne doit alors être évaluée selon la méthode décrite dans la Pharmacopée Européenne (34). Cette méthode est basée sur la contamination artificielle de la préparation au moyen d'un inoculum connu de microorganismes. Le dénombrement des bactéries et champignons ensemencés est ensuite réalisé. Aucun microorganisme ne doit être retrouvé au terme des 28 jours.

La stérilité du lot de fabrication est vérifiée sur un échantillon représentatif de ce lot. L'essai peut consister en la filtration du produit et la mise en culture du filtre, ou en l'ensemencement direct du produit dans des milieux de culture, selon la Pharmacopée Européenne (34). Quelque soit la méthode utilisée, celle-ci doit être validée pour chaque préparation à contrôler. La validation repose sur l'ensemencement d'un inoculum de microorganismes, connu et décrit dans la Pharmacopée Européenne, dans le milieu de culture contenant le filtre ou dans le milieu de culture contenant le produit à examiner. Une croissance microbienne doit être observée dans les milieux de culture contenant l'inoculum.

### **II.3.4. Matières premières et conditionnements utilisés à l'hôpital**

#### **II.3.4.1. Matières premières**

Les matières premières utilisées (principes actifs et excipients) pour l'exécution des préparations à l'hôpital, doivent répondre aux spécifications de la Pharmacopée Européenne (39).

Elles peuvent être de différentes origines :

- fabricant, distributeur ou importateur de matières premières à usage pharmaceutique, déclarés auprès de l'AFSSAPS
- fabricant, distributeur ou importateur de la même matière première que celle entrant dans une spécialité pharmaceutique autorisée en France
- spécialité pharmaceutique

Pour la préparation de médicaments stériles, les spécialités pharmaceutiques utilisées comme matière première doivent être stériles (39).

Les matières premières non enregistrées pour la médecine humaine ou non décrites à la pharmacopée ne peuvent pas être utilisées, sauf exception dans le cadre de maladies rares et graves et sous réserves qu'elles aient bénéficié d'une expertise physico-chimique et toxicologique adaptée (39).

Certaines opérations de contrôles sur les matières premières peuvent être réalisées par l'établissement pharmaceutique qui les fournit, si celui-ci est autorisé par l'AFSSAPS. Le bulletin d'analyse donné avec la matière première permet alors à la PUI de s'affranchir des contrôles déjà réalisés ; une identification est souvent simplement effectuée (39, 69, 73).

#### **II.3.4.2. Conditionnement**

Le conditionnement doit maintenir la qualité de la préparation, être adapté à l'administration et être de manipulation facile pour le patient.

Les récipients utilisés pour le conditionnement doivent satisfaire aux exigences relatives aux récipients et aux matériaux utilisés pour leur fabrication, de la Pharmacopée Européenne (34). Concernant les préparations ophtalmiques, la Pharmacopée Européenne précise qu'elles doivent être conservées dans des conditionnements stériles, étanches, à fermeture inviolable. Le volume des flacons de collyre multidoses est limité 10 ml (34).

##### **a) Flaconnage**

Les flacons en verre sont les plus utilisés pour le conditionnement des collyres à l'hôpital. Ils présentent de nombreux avantages. Ils ont, en effet, une grande résistance mécanique et thermique qui leur permet d'être autoclavés. Ils sont étanches aux gaz et à la vapeur d'eau, et présentent une bonne inertie (17, 72).

Le verre pour usage pharmaceutique est classé en 4 catégories, selon sa résistance hydrolytique. La décharge hydrolytique du verre correspond à la libération d'hydroxyde de sodium,

lorsqu'il est en contact avec l'eau. Le verre de type I est un verre neutre ou borosilicaté dont la résistance hydrolytique élevée est due à la composition chimique de la masse. Le verre de type II est généralement un verre sodocalcique dont la résistance hydrolytique élevée résulte d'un traitement de surface. Les verres de type III et IV sont habituellement des verres sodocalciques dont les résistances hydrolytiques sont respectivement moyenne et faible (34). Chaque type de verre peut être incolore ou teinté. Les flacons en verre de type I présentent l'intérêt de pouvoir être soumis à plusieurs lavages et autoclavages, sans perdre leur qualité.

La Pharmacopée Européenne impose l'utilisation de verre de type I ou II pour le conditionnement en verre des préparations aqueuses à usage parentéral, mais aucune qualité particulière pour le flaconnage des collyres (34).

#### b) Fermeture et dispositif d'administration

Les fermetures des flacons de verre consistent généralement à l'hôpital en l'utilisation de bouchons en caoutchouc, sur lesquelles une capsule est sertie.

La Pharmacopée Européenne impose que les fermetures en caoutchouc répondent à différentes exigences si elles sont destinées à l'obturation de flacons contenant des préparations parentérales, mais aucune si elles sont destinées à l'obturation de flacons contenant un autre type de préparation (34).

### **II.3.5. Préparation des médicaments stériles**

Les collyres doivent être stériles. Les méthodes de préparation de médicaments stériles sont décrites dans la Pharmacopée Européenne et les BPPrH (34, 39).

#### **II.3.5.1. Procédés d'obtention de l'état stérile**

Il existe 3 procédés de préparation de médicaments stériles :

- les procédés de stérilisation terminale
- la filtration terminale
- la préparation aseptique.

Le procédé de stérilisation terminale de référence à l'hôpital est la stérilisation par la chaleur humide en autoclave. Ce procédé doit être utilisé en priorité, si le principe actif le supporte (34, 39).

Le procédé de stérilisation par filtration consiste en la filtration de la solution sur une membrane antimicrobienne de porosité généralement inférieure ou égale à 0,22 µm. Elle est réalisée aussi près que possible du point de remplissage, dans un environnement où le risque de contamination microbienne est maîtrisé. L'équipement, le matériel, les matières premières et articles de conditionnement utilisés ont si possible été soumis à un procédé de stérilisation. Les opérations qui suivent la filtration stérilisante sont réalisées dans des conditions aseptiques. Cette méthode peut être utilisée après avoir vérifié que les constituants de la préparation n'adsorbent pas sur le filtre (34, 39).

La préparation aseptique consiste à maintenir la stérilité d'un produit obtenu à partir de composants stériles. Les opérations de préparation ont lieu au sein d'installations conçues pour empêcher toute contamination microbienne (34, 39).

Quelle que soit la méthode utilisée, celle-ci doit être validée par des contrôles adéquats. Le procédé fait lui-même l'objet de vérifications régulières par simulation de préparations avec des milieux de croissance microbienne, aussi appelées tests de remplissage aseptique (TRA). Une préparation type, dont le mode opératoire est déterminé à partir des différentes préparations stériles fabriquées selon le procédé à valider, est réalisée avec un milieu de culture en remplacement du véhicule. Elle est ensuite incubée 14 jours et examinée en vue de détecter une éventuelle multiplication microbienne (34).

Avant la libération d'un lot de produits stérilisés par filtration ou préparés dans des conditions aseptiques, un échantillon approprié doit être soumis à l'essai de stérilité (34).

### **II.3.5.2. Niveaux de risque microbiologique**

Pour les procédés par filtration stérilisante et préparation aseptique, deux niveaux de risque sont définis (39) :

- le risque faible de contamination, lorsque la préparation est réalisée en système clos, avec du matériel stérile non réutilisable et des matières premières stériles
- le risque élevé de contamination, où la préparation est réalisée en système ouvert au moins lors d'une des étapes.

Le système clos est un système permettant le prélèvement et le transfert d'un produit stérile, sans qu'il ne rentre en contact avec l'environnement.

### II.3.5.3. Zones à atmosphère contrôlée

Les Zones à Atmosphère Contrôlée (ZAC) sont constituées de locaux et/ou d'équipements dont les qualités microbiologique et particulaire sont maîtrisées. Ces qualités sont obtenues notamment grâce au traitement de l'air par un système de filtration haute efficacité pour les particules d'air (HEPA). Différentes ZAC sont distinguées : les salles, les isolateurs et les postes de sécurité microbiologique aussi appelés hottes.

Ces ZAC doivent être qualifiées et leur maintenance préventive doit être organisée. De nombreux contrôles journaliers comme annuels sont réalisés afin de garantir la qualité des ZAC.

Les BPPrH distinguent 4 classes de ZAC selon leur niveau de contamination (39). Les caractéristiques particulières de ces différentes classes de ZAC sont décrites dans le tableau suivant :

Classe	Au repos		En activité	
	Nombre maximal autorisé de particules par m <sup>3</sup> , de taille égale ou supérieure à			
	0,5 µm	5 µm	0,5 µm	5 µm
A	3 500	0	3 500	0
B	3 500	0	350 000	2 000
C	350 000	2 000	3 500 000	20 000
D	3 500 000	20 000	Non défini	Non défini

Les recommandations des BPPrH, concernant la surveillance microbiologique des ZAC en activité, sont décrites dans le tableau suivant :

	Limites recommandées de contamination microbiologique			
	Echantillon d'air ufc/m <sup>3</sup> (a)	Boîtes de Pétri (diamètre 90mm) ufc/4 heures (b)	Gélose de contact (diamètre 55 mm) ufc/plaque	Empreintes de gant (5 doigts) ufc/gant
A	<1	<1	<1	<1
B	10	5	5	5
C	100	50	25	-
D	200	100	50	-

(a): l'abréviation ufc désigne le nombre d'unités formant des colonies

(b): certaines boîtes de pétri peuvent être exposées pendant moins de 4 heures.

La PUI du CHU d'Angers dispose de salles classe B et C équipées de postes de sécurité microbiologique (PSM) à flux laminaire de classe A.

#### II.3.4.4. Classification des ZAC et préparation stériles

Le choix de la classe de la ZAC pour la réalisation d'une préparation stérile, dépend du niveau de risque de contamination, défini précédemment, et du procédé de stérilisation (39).

Si le risque microbiologique pour la réalisation de la préparation est élevé, les recommandations des BPPrH sont décrites dans le tableau suivant :

	Zone de préparation	Environnement immédiat
Isolateur en surpression	Classe A	Non classé
Isolateur en dépression	Classe A	Classe C
Salle à atmosphère contrôlée avec hotte à flux laminaire	Classe A	Classe B

Si le risque microbiologique lors de la réalisation de la préparation est faible, les recommandations des BPPrH sont décrites dans le tableau suivant :

	Zone de préparation	Environnement immédiat
Isolateur en surpression	Classe A	Non classé
Isolateur en dépression	Classe A	Classe C
Salle à atmosphère contrôlée avec hotte à flux laminaire	Classe A	Classe C

### **III. ETUDE EXPERIMENTALE**

#### ***III.1. Objectif***

Nous avons vu précédemment que le collyre au gluconate de chlorhexidine à 0,02% est un des traitements de première ligne de la kératite amibienne. Son intérêt thérapeutique a été démontré dans de nombreuses études (9, 11, 16, 36). Le rapport bénéfice / risque de la préparation demandée est favorable, la faisabilité technique du collyre au gluconate de chlorhexidine a donc été étudiée.

Quelques formulations, utilisées par des équipes médicales, ont été retrouvées dans la littérature, mais leurs stabilités sont soit très courtes, soit inconnues (30, 37, 74). Avant de chercher à mettre au point notre propre formule, plusieurs pharmaciens hospitaliers, notamment du centre hospitalier national d'ophtalmologie des Quinze-Vingt et de l'hôpital Bichat Claude Bernard à Paris, ont été contactés de façon à obtenir leurs formulations, leurs données de stabilité et leurs références bibliographiques. Les pharmaciens contactés, qui préparent le collyre au gluconate de chlorhexidine pour le traitement de la kératite amibienne, utilisent pour formule le gluconate de chlorhexidine dilué dans du sérum physiologique. Mais une précipitation, observée après quelques jours, limite la durée de péremption de cette formule à 4 jours. Une formulation plus stable du collyre a donc été recherchée.

Dans un premier temps, une étude a été réalisée afin de déterminer la formulation, le conditionnement, la méthode de fabrication du collyre ainsi que les contrôles nécessaires en cours de fabrication et du produit fini. La méthode de dosage du principe actif dans le produit fini a dû être mise au point et validée.

Dans un second temps, une étude a été menée afin d'établir la péremption de la préparation. Le collyre à la chlorhexidine peut être utilisé durant l'hospitalisation des patients, et en ambulatoire. Dans ce dernier cas, le collyre est délivré aux rétrocessions (secteur de la PUI destiné à la vente de médicaments au public). L'objectif de l'étude est d'obtenir une stabilité minimum de 8 semaines afin de permettre la dispensation des collyres pour un mois, et la réalisation des contrôles nécessaires à la libération du lot de fabrication. Le contrôle dont le résultat est le plus long à obtenir, est le contrôle de stérilité ; les résultats sont obtenus après 14 jours. La stabilité du collyre après ouverture doit de même être étudiée.

## **III.2. Matériel**

### **III.2.1. Matières premières et réactifs**

#### **III.2.1.1. Formulation et préparation des collyres**

Pour la préparation des collyres, les matières premières utilisées sont : la solution de gluconate de chlorhexidine à 20% (BUFA B.V. Pharmaceutical Products, Uitgeest, Hollande), le gluconate de potassium (Merck, Hohenbrunn, Allemagne), l'eau pour préparation injectable et l'eau stérile (Fresenius Kabi France, Sèvres, France).

Les articles de conditionnement utilisés sont : les flacons de verre type I brun de 10 ml (Wheaton, Millville NJ, USA), les bouchons de caoutchouc et les capsules en aluminium (Centraver, Linselles, France) et les compte-gouttes stériles (Société Parisienne de Verrerie, Orly Senia, France).

#### **III.2.1.2. Mise au point et validation du dosage de la chlorhexidine**

L'acétonitrile pour HPLC est obtenu chez Carlo Erba (Val de Reuil, France). La triéthylamine pour HPLC et l'acide orthophosphorique sont obtenus chez VWR International (Fontenay sous bois, France). Le dihydrogénophosphate de potassium est obtenu chez Merck (Darmstadt, Allemagne). L'eau déminéralisée utilisée pour la préparation du tampon et des échantillons est obtenue grâce au système MilliQ plus 185 de Millipore (Molsheim, France).

Pour la préparation des échantillons, sont aussi utilisés la solution de gluconate de chlorhexidine à 20% (BUFA B.V. Pharmaceutical Products, Uitgeest, Hollande) et le gluconate de potassium (Merck, Hohenbrunn, Allemagne).

#### **III.2.1.3. Etude de stabilité**

##### **a) Limpidité**

Les réactifs utilisés pour la fabrication des solutions témoins sont le sulfate d'hydrazine (Sigma-Aldrich, Steinheim, Allemagne) et l'hexaméthylènetétramine (Acros Organics, Geel, Belgique).

#### b) pH

La solution tampon à pH=7, utilisée pour l'étalonnage du pHmètre est obtenue chez Merck (Darmstadt, Allemagne).

#### c) Osmolarité

Des solutions de calibration et de contrôle (Pro-Bio-Qual, Lyon, France) de l'osmomètre sont utilisées pour le calibrage et pour la vérification journalière du bon fonctionnement de l'appareil.

#### d) Dosage

Les matières premières utilisées pour le dosage de la chlorhexidine ont déjà été détaillées dans le paragraphe III.2.1.2..

### **III.2.2. Equipements**

#### **III.2.2.1. Formulation et préparation du collyre à la chlorhexidine**

La stérilisation des flacons de verre de type I et du matériel réutilisable nécessaire à la préparation, est effectuée par un autoclave (Subtil/Crépieux, Chassieu, France, référence MRP2001).

La préparation des collyres est réalisée en salle blanche classe C, sous un poste de sécurité microbiologique à flux laminaire horizontal (Jouan, Saint-Herblain, France, référence MSC9) classe A, selon les BPPrH (39).

#### **III.2.2.2. Mise au point et validation du dosage de la chlorhexidine**

Avant la mise au point de la méthode sur l'HPLC dédiée à l'étude, une étude préliminaire a été réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre UV/Visible (UNICAM, Cambridge, Grande Bretagne, série 8700) et d'une HPLC équipée d'un détecteur à barrette de diodes (Agilent 1100, Hewlett Packard, Les Ullis, France).

La mise au point et la validation du dosage a été effectuée sur un système de chromatographie liquide haute performance (Spectraphysics, Stockholm, Suède) composé d'un injecteur (Spectrasystem AS3500), d'une pompe (Spectrasystem P4000) et d'un détecteur UV-

Visible (Spectrasystem UV1000). L'ensemble de la chaîne chromatographique est piloté par le logiciel ChromQuest (EZChrom Elite component). La séparation chromatographique est effectuée sur colonne Equisorb<sup>®</sup> C6, 5 $\mu$ m, 15cm (Cluzeau, Sainte-Foy-La-Grande, France).

L'étude de spécificité à nécessité l'utilisation d'un second système HPLC, muni d'un détecteur UV/Visible qui peut effectuer des mesures à 2 longueurs d'onde simultanément (Surveyor, ThermoFinnigan, San José, Canada).



Fig 7 : Chaîne chromatographique Spectrapysics

### III.2.2.3. Etude de stabilité

#### a) Mesure du pH

Le pHmètre (Tacussel électronique, Lyon, France) utilisé ne dispose pas de sonde de température. Le pH varie en fonction de la température, nous avons donc choisi de lire sa valeur avec une précision de 0,1 unité pH seulement. Afin de limiter l'erreur liée à la température, la solution tampon est ramenée à la température des échantillons avant étalonnage du pHmètre, chaque jour de mesure.

### b) Détermination de l'osmolarité

Un micro-osmomètre automatique (Roebeling, Berlin, Allemagne, type 13/13DR Autocal) d'une précision d'1 mosmol/l est utilisé.

### c) Stérilité

L'essai de stérilité est réalisé par la technique de filtration sur membrane recommandée par la Pharmacopée Européenne (34), à l'aide du système clos Stéritest<sup>®</sup> (Millipore, Bedford, USA).

Ce système permet de mettre en culture de façon aseptique dans 2 milieux (AES Laboratoire, Bruz, France), les membranes qui ont servi à filtrer la solution à tester. Les 2 milieux de culture utilisés sont conformes à la Pharmacopée Européenne (34). Il s'agit d'un milieu au thioglycolate destiné à la recherche de bactéries anaérobies et aérobies et d'un milieu à l'hydrolysate de caséine et de soja, destiné à la recherche de bactéries aérobies, levures et moisissures.

Les milieux de cultures contenant les membranes sont incubés à 30°C (milieu au thioglycolate), ou à 22°C (milieu à l'hydrolysate de caséine). L'état stérile de la préparation est vérifié si aucune croissance microbienne n'est observée pendant 14 jours d'incubation.



Fig 8 : Système de filtration sur membrane Stéritest<sup>®</sup>

## **III.3. Méthode**

### **III.3.1. Formulation et fabrication du collyre à la chlorhexidine**

#### **III.3.1.1. Formulation**

Tout d'abord le véhicule doit être déterminé en fonction des données de solubilité de la chlorhexidine. Puis, l'ajout d'excipients est étudié de façon à ce que notre collyre réponde aux propriétés requises des collyres.

Le véhicule et les excipients ont été choisis parmi les substances pharmaceutiques ayant une monographie à la Pharmacopée, en tenant compte des incompatibilités connues avec le principe actif. Les compositions des spécialités existantes contenant de la chlorhexidine, décrites dans le Vidal<sup>®</sup> et sur le site Internet Theriaque<sup>®</sup> (75, 76), ont aidé à la mise au point de la formule.

#### **III.3.1.2. Conditionnement**

Les articles de conditionnement doivent répondre aux exigences de la Pharmacopée (34). De plus, ces articles ne doivent pas engendrer d'interaction contenu - contenant avec la solution de collyre.

#### **III.3.1.3. Etude du marché**

Une étude de marché a été effectuée de façon à commander les articles de conditionnement et les excipients, dans les meilleures conditions, auprès de laboratoires pharmaceutiques autorisés par l'AFSSAPS, conformément au BPPrH (39).

#### **III.3.1.4. Vérification des propriétés de la formulation**

La conformité des matières premières et des articles de conditionnement à la Pharmacopée a été vérifiée (34). Le collyre a ensuite été préparé selon notre formulation. Les propriétés de celui-ci, osmolarité, pH et limpidité, ont été vérifiées avant de valider la formulation.

### **III.3.1.5. Méthode de préparation**

Les collyres doivent être stériles. La méthode d'obtention de l'état stérile a été choisie en fonction des propriétés du principe actif, des excipients et des articles de conditionnement.

Comme nous avons vu au paragraphe II.2.2.2., la chlorhexidine se dégrade sous l'action de fortes températures. Il a été démontré que la décomposition de la chlorhexidine en chloroaniline est liée, lors de l'autoclavage, aux conditions de température, de durée du cycle de stérilisation, et au pH de la solution. Lors des différents cycles de stérilisation testés, la formation de chloroaniline est restée faible pour des solutions de chlorhexidine acides, mais a augmenté de façon importante pour des solutions de chlorhexidine à des pH supérieurs ou égaux à 6,5 (17, 77, 78).

Si le pH de notre collyre est proche de la neutralité, l'état stérile des collyres, devra être obtenu par un autre procédé.

Le procédé de fabrication choisi doit être validé selon les principes décrits dans la Pharmacopée et les BPPrH (34, 39).

### **III.3.1.6. Détermination des contrôles à réaliser**

Les contrôles à réaliser, en lien avec les propriétés requises des collyres, ont été définis à l'aide de la Pharmacopée Européenne et des BPPrH (34, 39). Les contrôles concernent les matières premières, les articles de conditionnement, la préparation en cours de fabrication, le produit fini et l'environnement.

Les contrôles d'environnement ne seront pas détaillés. Ils sont régulièrement réalisés durant toute la période d'utilisation des ZAC, selon des procédures validées.

## **III.3.2. Mise au point et validation du dosage de la chlorhexidine**

### **III.3.2.1. Mise au point de la méthode de dosage**

La méthode de dosage par protométrie en milieu non aqueux, décrite dans la Pharmacopée Européenne (34), ne peut pas être utilisée pour doser le gluconate de chlorhexidine (GC) dans sa forme collyre, car le gluconate de potassium interfère. Parmi les autres méthodes de dosage

possibles, et avec le matériel à disposition, nous avons choisi de doser le GC par chromatographie liquide haute performance.

#### a) Etude préliminaire à la mise au point

Un échantillon de GC a tout d'abord été testé avec la technique dite de « recherche universelle » mise au point au laboratoire de Toxicologie du CHU d'Angers pour la recherche des toxiques dans le sang. Dans cette méthode, la phase mobile est constituée d'acétonitrile (ACN) et d'une solution D de pH= 6,2 contenant de l'acide dihydrophosphorique ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ) à 0,02 mol/l et de la triéthylamine à 0,032 mol/l. Elle est utilisée selon un mode gradient évoluant des proportions 85/15 aux proportions 20/80 du mélange solution D/ACN.

#### b) Mise au point

A partir du temps de rétention du GC obtenu avec le système chromatographique décrit précédemment, la méthode de dosage a été mise au point sur la chaîne HPLC à détecteur UV/Visible mise à disposition pour l'étude. Plusieurs essais ont été réalisés afin de déterminer la colonne, le solvant d'élution, le débit de la pompe et la méthode de détection.

#### c) Préparation des échantillons

La préparation des échantillons a ensuite été étudiée. Une dilution au  $1/1000^{\text{ème}}$  dans la phase mobile de la solution de GC à 20%, qui correspond à la concentration dans le collyre, a tout d'abord été testée. Devant les surfaces des pics obtenus, la solution à 20% a ensuite été diluée au  $1/20000^{\text{ème}}$  et le volume d'injection limité à 20 $\mu$ l.

Notre collyre est une solution aqueuse. Nous avons alors ensuite choisi de diluer la solution de GC à 20% au  $1/1000^{\text{ème}}$  dans l'eau, de façon à obtenir la même concentration en solution aqueuse que dans notre collyre. Puis la solution à 0,02% a été diluée au  $1/20^{\text{ème}}$  dans un mélange constitué des composants de la phase mobile. La proportion d'acétonitrile est minimisée par rapport à sa proportion dans l'éluant, de façon à ce que le pic du GC soit fin et symétrique.

#### d) Vérification de la proportionnalité entre la concentration et le signal

Après avoir déterminé les conditions opératoires, la proportionnalité entre les surfaces des pics obtenus et les concentrations en GC dans les échantillons a été vérifiée. Une gamme, obtenue à partir de 5 échantillons de GC dont la concentration varie de 100 à 300 mg/l a été préparée. La

relation entre la concentration et la mesure a été étudiée selon une régression linéaire par la méthode des moindres carrés.

#### e) Etude de l'effet de l'excipient

La relation entre la concentration et la mesure a ensuite été étudiée en présence de l'excipient. Afin de limiter l'impact d'un éventuel effet matrice, une gamme a été préparée à partir de 5 échantillons de GC, qui contiennent chacun la même concentration d'excipient. L'effet matrice correspond aux éventuelles variations du signal mesuré, liées aux interactions physico-chimiques entre la substance à doser et les autres molécules présentes dans l'échantillon.

### **III.3.2.2. Validation de la méthode de dosage**

La méthode de dosage de la chlorhexidine a été validée selon les recommandations de la Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques (SFSTP) et de l'International Conference on Harmonisation (ICH). Le guide de validation analytique de la SFSTP (79) et les guides Q2A et Q2B de l'ICH (80, 81) sont destinés à aider l'industrie pharmaceutique à valider leurs procédures analytiques en vue de l'octroi d'une autorisation de mise sur le marché (AMM).

Selon ces recommandations, la méthode de dosage du principe actif d'un médicament doit satisfaire aux conditions de spécificité, de linéarité, d'exactitude et de fidélité.

#### a) Etude de spécificité

La spécificité d'un dosage signifie que la procédure analytique garanti que le signal mesuré provient bien de la substance à analyser. Pour vérifier la spécificité d'un dosage, il faut vérifier l'absence d'interférence entre la substance à analyser et les impuretés, les produits de dégradation de cette substance susceptibles d'être présents dans l'échantillon, ainsi que les différents composants du produit fini. Trois expérimentations ont été réalisées afin d'évaluer la spécificité de notre méthode d'analyse.

#### - Etude du « blanc »

Le chromatogramme obtenu après injection de l'excipient, dit « blanc », a été comparé au chromatogramme d'un échantillon de collyre, afin de vérifier l'absence d'interférence entre le pic du GC et les éventuels pics correspondant à des substances apportées par le gluconate de potassium ou les solutions utilisées pour la dilution de l'échantillon avant injection. Pour la préparation du

« blanc », le gluconate de potassium est en effet dilué dans les mêmes solutions que les échantillons de GC.

Si un pic est découvert au temps de rétention du GC, il sera considéré comme significatif s'il est supérieur au seuil de détection du GC. Selon la SFSTP, le seuil de détection (SD) est estimé à partir du bruit de fond du chromatogramme du « blanc » (79) et est calculé à l'aide de la formule suivante :

$$SD = 3 \times h_{\max} \times R$$

avec  $h_{\max}$  = amplitude maximale du signal sur une distance égale à 20 fois la largeur à mi hauteur du pic du gluconate de chlorhexidine sur un chromatogramme d'un échantillon de collyre.

et  $R$  = facteur de réponse quantité / signal exprimé en hauteur

#### - Modification de la phase mobile

Une 2<sup>de</sup> méthode de dosage du GC a été mise au point. La force ionique et la proportion d'acétonitrile dans la phase mobile ont été modifiées de façon à obtenir une séparation différente qui permettrait de mettre en évidence une éventuelle substance coéluée au GC dans notre méthode d'analyse. L'éluant est ainsi composé de 60% d'acétonitrile et de 40% de tampon phosphate ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{H}_3\text{PO}_4$ ) à 0,020 mol/l.

#### - Etude des produits de dégradation

Les impuretés et les produits de dégradation du GC ne sont pas à disposition. Nous avons donc dégradé une solution de GC selon les données de l'étude de *Ha et al* (53). 2 ml de solution à 200 mg/l ont été mélangés à 200  $\mu\text{l}$  de soude ou d'acide chlorhydrique à 1 mol/l, puis placés à 80°C pendant 4 ou 24 heures. Les voies de dégradation et les composés formés dans ces conditions sont en effet différents (53).

Les chromatogrammes obtenus après injection des solutions « extemporanées » ou « dégradées » sont comparés visuellement. Le rapport des surfaces du pic obtenues à 2 longueurs d'onde, 254 et 280 nm, pour chacun des échantillons, a été calculé. Ce rapport (surface à 254 nm / surface à 280 nm) doit être stable et compris dans l'intervalle de confiance [2,4 – 2,5] pour satisfaire à l'étude de spécificité. En effet, en cas de présence d'un produit de dégradation coélué au GC, la modification des quantités de GC et de ce produit, liée aux conditions de basicité ou d'acidité, devrait engendrer une modification de ce rapport du fait de leurs différences d'absorption molaire.

L'intervalle de confiance du rapport a été déterminé au risque  $\alpha$  de 5%, après injection à 12 reprises du même échantillon de gluconate de chlorhexidine préparé extemporanément.

La longueur d'onde 254 nm correspond à la longueur d'onde de notre méthode de dosage. La longueur d'onde 280 nm a été choisie car elle est suffisamment éloignée de 254 nm et car, selon le spectre du gluconate de chlorhexidine, celui-ci absorbe. Son coefficient d'absorption molaire à 280 nm est de  $1,6.10^4$  l/mol/cm.

#### b) Etude de linéarité et d'exactitude

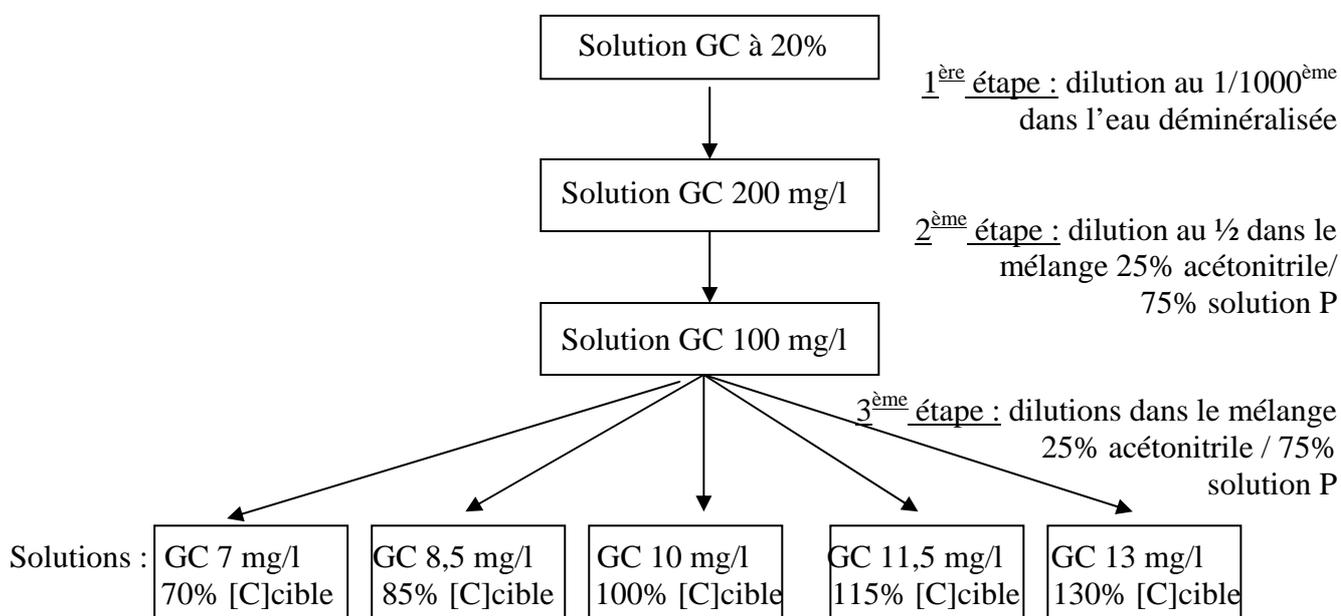
La linéarité d'une méthode d'analyse correspond à sa capacité d'obtenir des résultats directement proportionnels à la concentration en principe actif présent dans l'échantillon.

L'exactitude, ou justesse, exprime l'étroitesse de l'accord entre la valeur exacte de référence et la valeur moyenne trouvée en appliquant la méthode d'analyse un certain nombre de fois.

Les études de linéarité et d'exactitude ont été réalisées simultanément selon les recommandations de la SFSTP (79) et de l'ICH (80, 81). L'étude de linéarité est réalisée à partir de 2 gammes (une première préparée à partir du GC seul et une seconde à partir de la forme pharmaceutique reconstituée, le collyre) de façon à vérifier l'absence d'effet matrice.

L'étude de linéarité a nécessité la préparation de 15 échantillons (N=15), repartis en 5 groupes j (k=5) de 3 mesures ( $n_j=3$ ) pour chacune des 2 gammes.

#### - Préparation des échantillons pour la gamme « GC dans eau »



Solution P : solution aqueuse d' $H_3PO_4$  à 0,025 mol/l et de  $KH_2PO_4$  à 0,05 mol/l, contenant en plus de la triéthylamine à 0,004 mol/l. Son pH est de 2,5.

La gamme est constituée de 5 points qui couvrent l'intervalle 70 à 130% de la concentration cible, c'est à dire 140, 170, 200, 230 et 260 mg/l de GC, comme le recommande l'ICH (80, 81).

Le rapport phase aqueuse / phase organique des échantillons est stable. Il varie seulement de 75,9/24,1 à 76,6/23,4, selon les échantillons. Son impact sur la symétrie des pics sera négligeable.

- Préparation des échantillons pour la gamme « GC dans sa forme reconstituée »

Les échantillons de GC dans sa forme reconstituée, le collyre, ont été obtenus de la même façon que les échantillons de GC dans l'eau, mis à part que la solution à 200 mg/l, obtenue après l'étape 1, est diluée lors des étapes 2 et 3 avec le mélange : 25% acétonitrile + 75% de solution P + gluconate de potassium 1,86 g/l.

Chaque échantillon contient une concentration de gluconate de potassium sensiblement égale, variant de 1,74 à 1,80 g/l, afin de stabiliser un éventuel effet matrice. La concentration en gluconate de potassium, de l'échantillon GC 10 mg/l est de 1,77 g/l équivalent à la dilution au 1/20<sup>ème</sup> de la concentration de gluconate de potassium, 35,5 g/l, dans le collyre.

- Analyse statistique

L'étude de linéarité est basée sur l'estimation de 2 droites de régression linéaire par la méthode des moindres carrés (droite D1 d'équation  $y=b_1x+a_1$  : principe actif dans sa forme reconstituée ; droite D2 d'équation  $y=b_2x+a_2$  : principe actif seul).

La validité des droites de régression, l'existence de pentes significatives et l'égalité à 0 des ordonnées à l'origine, sont vérifiées à l'aide de tests de Student et de Fisher. Les paramètres des 2 droites, pentes et ordonnées à l'origine, sont comparés par des tests de Student, de façon à vérifier qu'elles sont superposables.

Les hypothèses nécessaires au modèle sont : la distribution normale des mesures et l'égalité des variances dans les groupes de mesures. La distribution gaussienne des mesures a été vérifiée par la lecture des boîtes à moustaches obtenues à l'aide du logiciel Minitab<sup>®</sup>, l'homogénéité des variances par le test de Cochran.

L'étude de l'exactitude a pour objectif de vérifier que les concentrations mesurées se rapprochent des concentrations théoriques des échantillons. Elle nécessite d'utiliser un système de référence permettant d'estimer les concentrations retrouvées. Le système de référence utilisé est la droite D2, comme le propose la SFSTP. Le taux de recouvrement moyen est alors calculé.

Les hypothèses de distribution normale des mesures et d'homogénéité des variances dans les groupes de mesures ont été vérifiées, de la même façon que dans l'étude de linéarité.

#### - Critères d'acceptabilité

Nous considérerons le taux de recouvrement moyen acceptable, s'il est compris dans l'intervalle de 100% +/- 5%, au risque  $\alpha$  de 5%.

#### c) Etude de fidélité

La fidélité de la procédure d'analyse exprime l'étroitesse de l'accord entre une série de mesures provenant de multiples prises d'un même échantillon homogène dans des conditions prescrites. La fidélité se divise en trois niveaux : la répétabilité, la précision intermédiaire et la reproductibilité. La répétabilité exprime la fidélité pour des conditions opératoires identiques, pendant un court intervalle de temps. La précision intermédiaire exprime les variations intra-laboratoire : jours différents, opérateurs différents... La reproductibilité, qui n'a pas été étudiée, exprime la fidélité entre laboratoires.

#### - Préparation des échantillons

L'étude de fidélité a été réalisée selon les recommandations de la SFSTP (79) et de l'ICH (80, 81). Six échantillons ( $n_j$ ) de la concentration cible de GC dans sa forme collyre, ont été préparés chaque jour pendant 3 jours ( $k=3$ ), par différents opérateurs, de la même façon que l'échantillon GC 10 mg/l, obtenu précédemment pour l'étude d'exactitude et de linéarité.

#### - Analyse statistique

L'étude statistique consiste à calculer les coefficients de variation de répétabilité et de précision intermédiaire. Elle nécessite d'estimer les concentrations à partir des mesures, à l'aide d'un système de référence. Le système de référence utilisé est la droite D1, comme le propose la SFSTP.

Les hypothèses de distribution normale des mesures et d'homogénéité des variances dans les groupes de mesures ont été vérifiées.

#### - Critères d'acceptabilité

Nous considérons la fidélité de la méthode acceptable si les coefficients de variation calculés sont inférieurs à 5%.

### **III.3.3. Stabilité du collyre à la chlorhexidine 0,02%**

#### **III.3.3.1. Planification de l'étude de stabilité**

L'étude de stabilité a été réalisée à l'aide des recommandations de l'ICH, destinées à l'industrie pharmaceutique (82).

##### a) Conditions de conservation

D'après les données bibliographiques, nous savons que le GC est stable à température ambiante et à l'abri de la lumière. La stabilité du collyre est donc étudiée à température ambiante, favorable à l'utilisation du collyre en ambulatoire. Le conditionnement utilisé est opaque à la lumière.

L'étude de stabilité après ouverture a été réalisée en simulant les conditions d'utilisation : ouverture des flacons toutes les 2 heures de 8 heures à minuit en faisant perler une goutte à l'extrémité du compte goutte. Il est en effet impossible de retirer une goutte toutes les 2 heures, le volume final serait trop faible pour réaliser les contrôles.

##### b) Durée de l'étude

Selon les objectifs fixés, notre étude de stabilité consiste à vérifier la stabilité du collyre pendant 8 semaines, et à vérifier sa stabilité après ouverture. L'évolution des propriétés du collyre est suivie chaque semaine pendant 6 semaines sur des flacons restés fermés jusqu'au jour des analyses, et après 3, 7 et 14 jours après ouverture des flacons.

##### c) Préparation des collyres

Selon les recommandations de l'ICH (82), l'étude de stabilité doit être réalisée sur un minimum de 3 lots de production, pendant la durée de péremption proposée pour le produit. Les lots de fabrication utilisés pour la détermination de la durée de péremption du produit pharmaceutique

doivent de plus être préparés de la même façon que les lots de fabrication future : même quantité d'unités produites, même formulation, même articles de conditionnement, même procédé de fabrication...

Les lots de fabrication des collyres à la chlorhexidine ne contiennent que 7 collyres. 14 lots ont du être préparés pour la réalisation de l'étude de stabilité, selon la méthode développée et décrite dans les paragraphes III.3.1.2. et III.4.1.4.. Chaque lot comprend 7 flacons contenant une même solution : 56 ml du collyre fabriqué dans une seringue de 60 ml, répartis dans 7 flacons de 8ml.

#### d) Planification des contrôles

L'étude de stabilité a été réalisée en 2 temps, de septembre à novembre 2004, et de juin à août 2005. La planification des contrôles, regroupant les 2 études, est décrite dans le tableau I.

	lot 1	lot 2	lot 3	lot 4	lot 3'	lot 4'	lot 5	lot 6	lot 7	lot 8	lot 7' à 10'
Jour	Concentration en gluconate de chlorhexidine				osmolarité		PH			Limpidité	stérilité
J0											
J0+3											
J0+7											
J0+14											
J7											
J7+3											
J7+7											
J7+14											
J14											
J14+3											
J14+7											
J14+14											
J21											
J21+3											
J21+7											
J21+14											
J28											
J28+3											
J28+7											
J28+14											
J35											
J35+3											
J35+7											
J35+14											
J42											
J42+3											
J42+7											
J42+14											

Tableau I : Planification des contrôles de l'étude de stabilité

### III.3.3.2. Paramètres étudiés et critères d'acceptabilité

L'ICH recommande d'étudier l'évolution de tous les paramètres susceptibles d'être modifiés au cours du temps ainsi que tous les paramètres garantissant la qualité, la sécurité et l'efficacité du produit pharmaceutique (82, 83). A l'aide du guide Q6A (84) se rapportant aux différents essais nécessaires à la libération de lot et à la détermination de la péremption, et à l'aide de la Pharmacopée Européenne, nous avons choisi d'étudier dans le temps la concentration en principe actif, le pH, l'osmolarité, la limpidité, l'aspect visuel du collyre (coloration) et la stérilité.

#### a) Concentration en chlorhexidine

La concentration en GC est déterminée par HPLC. La mise au point et la validation de la méthode d'analyse est expliquée dans les parties III.3.2. et III.4.2..

Le premier jour de l'étude de stabilité, une gamme d'étalonnage est réalisée de la même façon que la gamme « GC dans sa forme reconstituée » dans l'étude de linéarité. La droite de régression correspondante est calculée selon la méthode des moindres carrés. Les paramètres de la droite obtenue, pente et ordonnée à l'origine, sont comparés par des tests de Student, à ceux de l'étude de linéarité. Si la droite obtenue n'est pas significativement différente de la droite D1, elle sera utilisée pour le calcul des concentrations des échantillons. Chaque jour de mesures, la concentration de 2 solutions contrôles C1 à 150 mg/l et C2 à 250 mg/l préparées extemporanément, est vérifiée avant et après le passage des échantillons, afin de vérifier la qualité de la droite d'étalonnage. Les concentrations mesurées ne devront pas varier de plus de 5% par rapport aux concentrations théoriques.

La concentration en GC dans le collyre sera considérée comme stable tant que la concentration mesurée n'a pas diminué de plus de 5% par rapport à la concentration initiale. Ce seuil de 5% est celui proposé par l'ICH (83). D'autres auteurs considèrent un médicament stable tant que la concentration en principe actif n'a pas diminué de plus de 10% (85, 86).

#### b) Contrôle de la limpidité et de l'aspect visuel du collyre

La limpidité a été contrôlée selon la méthode décrite dans la Pharmacopée Européenne (34). Dans des tubes à essais spécifiques, le contenu du flacon est comparé à des suspensions témoins, à l'œil nu sur fond noir et à la lumière du jour. Quatre suspensions témoins (I à IV) sont préparées extemporanément à partir de solutions de sulfate d'hydrazine et d'hexaméthylènetétramine. Le liquide est considéré comme limpide si son opalescence n'est pas plus prononcée que celle de la

suspension témoin I. L'aspect du collyre, notamment sa coloration, est visualisé au même moment que le contrôle de limpidité.

La limpidité et l'aspect visuel du collyre, ne doivent pas évoluer durant la durée de péremption.

#### c) Contrôle du pH

Le pH est contrôlé grâce à un pHmètre dont l'électrode est directement plongée dans le flacon de collyre. Le pHmètre est étalonné chaque jour de mesure avec une solution tampon à pH=7.

Aucune recommandation concernant les critères d'acceptabilité n'est émise dans les guides de l'ICH (82-84). Le pH du collyre sera considéré comme stable tant que le pH mesuré n'aura pas varié de plus de 5% par rapport au pH initial. Une variation de pH dans l'intervalle [6,7 à 7,5] n'a pas de conséquence sur l'œil.

#### d) Contrôle de l'osmolarité

L'osmolarité est mesurée à l'aide d'un osmomètre dont le fonctionnement est contrôlé chaque jour de mesure avec de l'eau distillée et un contrôle interne à 321 mosmol/l. L'osmolarité de l'eau doit être de 0 et celle du contrôle ne doit pas varier de plus de 2%.

De même que pour l'évolution du pH, les critères d'acceptabilité de la variation de l'osmolarité ne sont pas définis dans les guides de l'ICH (82-84). Les limites de variation de l'osmolarité ont été fixées à 5% de la valeur initiale, comme pour la variation de concentration en principe actif, soit l'intervalle [264 - 292 mosmol/l]. En effet, les causes de variation de l'osmolarité et de la concentration en principe actif sont liées : évaporation du solvant, dégradation du principe actif et/ou excipients...

#### e) Contrôle de la stérilité

La stérilité des collyres est vérifiée à l'aide de l'équipement Steritest<sup>®</sup> décrit au paragraphe III.2.2.3.. Le collyre est filtré puis les membranes sont rincées avec 250 ml d'eau pour préparation injectable de façon à éliminer les substances adsorbées.

Les collyres testés devront être stériles jusqu'à la fin de la durée de péremption fixée.

## **III.4. Résultats**

### **III.4.1. Formulation et fabrication du collyre à la chlorhexidine**

#### **III.4.1.1. Détermination de la Formulation de la préparation**

Le GC est soluble dans l'eau. La dilution au 1/1000<sup>ème</sup> de la solution au gluconate de chlorhexidine à 20% dans l'eau représente notre formulation de départ.

##### a) Ajustement du pH

Nous avons vu que l'activité du GC est optimum à des pH compris entre 5,5 et 7,0 et que sa stabilité est maximale entre 5,0 et 8,0 (49). L'ajustement du pH à 7 est donc possible.

La formulation de départ du collyre contient très peu de GC et le solvant est l'eau. Le pH de cette formule est vraisemblablement proche de la neutralité. La mesure du pH vérifie cette hypothèse, le pH mesuré est d'environ 7,1. Aucune substance tampon ne sera ajoutée dans la formulation du collyre.

##### b) Ajustement de l'osmolarité

La formulation de départ du collyre comprend très peu de GC et le solvant est l'eau. L'osmolarité de cette formule est vraisemblablement proche de 0. La mesure de l'osmolarité vérifie cette hypothèse, l'osmolarité mesurée est de 1 mosmol/l. L'ajout d'un isotonisant est nécessaire.

##### - Choix de l'isotonisant

A l'aide des données de la littérature, notre choix s'est porté sur le gluconate de potassium. Ce sel est décrit dans la Pharmacopée Européenne et son utilisation comme excipient est décrite dans le *Martindale* (48). Aucune publication rapportant une incompatibilité avec la chlorhexidine n'est référencée sur *Medline*. De plus, le gluconate de potassium est utilisé comme isotonisant dans de nombreuses spécialités collyres contenant du gluconate de chlorhexidine (Visiodose<sup>®</sup> collyre, Dacryne<sup>®</sup> collyre).

##### - Calcul de la quantité d'isotonisant à ajouter

L'abaissement du point de congélation ( $\Delta t$ ) de la solution de GC à 0,02% est tout d'abord déterminé.

D'après la loi de Raoult, on a : 
$$\Delta t = \frac{K \times i \times C}{M}$$

avec  $K$  : constante cryoscopique du solvant

$C$  : concentration en g pour 100 g de solvant

$M$  : masse molaire de la substance dissoute

$i$  : coefficient de dissociation de la substance dissoute à concentration iso-osmotique

Pour la solution de GC à 0,02%, on a :

$K = -18,6^\circ\text{C}$  (constante cryoscopique de l'eau)

$i_{(\text{GC})} =$  inconnu. Nous considérerons qu'il est égal à celui du chlorure de sodium 0,9% dans l'eau, qui est de 1,85.

$M_{(\text{GC})} = 897,8 \text{ g/mol}$

$C_{(\text{GC})} = 0,02 \text{ \% p/v}$  (ou  $0,02 \text{ \% p/p}$ ).

Donc l'abaissement cryoscopique de la solution est :  $\Delta t = -7,665 \cdot 10^{-4} \text{ }^\circ\text{C}$ . Il est donc minime.

La quantité de gluconate de potassium (GK) à ajouter est ensuite calculée.

D'après Lumière et Chevrotier : 
$$C_{(\text{GK})} = \frac{\Delta t_{(\text{collyre})} - \Delta t_{(\text{GC})}}{\Delta t_{(\text{GK}1\%)}}$$

Et l'abaissement cryoscopique voulu est celui du plasma, soit  $\Delta t_{(\text{collyre})} = -0,52^\circ\text{C}$

et 
$$\Delta t_{(\text{GK}1\%)} = \frac{-18,6 \times 1,85 \times 1}{234,25}$$
, soit  $\Delta t_{(\text{GK}1\%)} = -0,147^\circ\text{C}$

Donc, 
$$C_{(\text{GK})} = \frac{-0,52 - (-7,665 \cdot 10^{-4})}{-0,147}$$

$$C_{(\text{GK})} = 3,54 \text{ \%}$$

La quantité de gluconate de potassium à ajouter dans 100 ml de solution aqueuse de gluconate de chlorhexidine à 0,02% est donc de 3,54 grammes.

### c) Limpidité

Le gluconate de chlorhexidine et le gluconate de potassium sont solubles dans l'eau. Notre collyre doit donc être limpide et exempt de particules (34).

#### d) Stérilité

Nous avons vu que les collyres aqueux conditionnés en récipients multidoses doivent contenir un conservateur antimicrobien afin d'éviter leur contamination après ouverture (34).

La chlorhexidine est douée de propriétés antimicrobiennes. L'acétate et le gluconate de chlorhexidine sont utilisés comme agents conservateurs antimicrobiens dans des collyres à des concentrations variants de 0,01 à 0,05% (48, 77). Dans notre collyre, la concentration en gluconate de chlorhexidine est comprise dans cet intervalle. Nous n'avons donc pas ajouté de conservateur antimicrobien dans la formulation.

La formulation de notre collyre est donc, pour 100 ml :

Gluconate de chlorhexidine à 20%	0,1 ml
Gluconate de potassium	3,54 g
Eau stérile	qsp 100 ml

Le gluconate de chlorhexidine et le gluconate de potassium ont été achetés auprès de laboratoires pharmaceutiques déclarés auprès de l'AFSSAPS, conformément au BPPrH (39).

Les propriétés de la formulation ont ensuite été vérifiées. La solution est limpide, incolore, de pH 7,1 et d'osmolarité 278 mosmol/l. L'osmolarité mesurée est légèrement différente de l'osmolarité du plasma. Cette différence peut s'expliquer par l'approximation du coefficient de dissociation dans le calcul de la quantité de gluconate de potassium à ajouter. La quantité de gluconate de potassium dans la formulation n'a pas été modifiée, car l'osmolarité mesurée est proche de celle ciblée, et bien tolérée par l'œil.

#### **III.4.1.2. Choix du conditionnement**

##### a) Choix des flacons

Afin de ne pas modifier le pH de notre collyre en solution aqueuse, nous avons choisi d'utiliser des flacons en verre de type I ou type II. La chlorhexidine est de plus sensible à la lumière, nous avons donc recherché des flacons en verre de type I ou II teintés.

Après étude du marché et évaluation des coûts, les flacons choisis, pour le conditionnement des collyres à la chlorhexidine 0,02%, sont des flacons en verre de type I, bruns, d'un volume de 10

ml. La recherche de flacons en verre de type II, teintés, vendus en petites quantités, est restée infructueuse.

#### b) Fermeture et dispositif d'administration

Les bouchons en caoutchouc utilisés pour le conditionnement du collyre à la chlorhexidine, satisfont aux exigences de la Pharmacopée Européenne pour les bouchons destinés au conditionnement des solutions parentérales. Une capsule en aluminium est ensuite sertie sur le bouchon de façon à rendre la fermeture inviolable.

Les compte-gouttes utilisés sont en polychlorure de vinyle (PVC) et polyéthylène haute densité (PEHD). Ils satisfont aux exigences concernant les matériaux de la Pharmacopée Européenne. D'après les données de compatibilité de la chlorhexidine, le PEHD peut être utilisé. Aucune donnée n'a par contre été retrouvée concernant le risque d'interaction entre la chlorhexidine et le PVC.

Les compte-gouttes sont achetés stériles. Ils sont délivrés aux patients ou au service d'Ophthalmologie avec les flacons de collyre. Le patient ou l'infirmière devra, à la première utilisation du collyre, retirer le bouchon caoutchouc et adapter le compte goutte au flacon.

#### **III.4.1.4. Processus de fabrication**

La préparation des collyres comporte plusieurs étapes : le mélange des différentes matières premières de la formulation, le remplissage et la fermeture des flacons, et la stérilisation.

Le pH de notre collyre est proche de 7,0, nous avons donc choisi de fabriquer les collyres au gluconate de chlorhexidine à 0,02% dans des conditions aseptiques et de les stériliser par filtration stérilisante.

Les collyres au gluconate de chlorhexidine à 0,02% sont préparés, filtrés et conditionnés sous poste de sécurité microbiologique à flux laminaire vertical classe A, placé dans une salle à atmosphère contrôlée classe C, selon les BPPrH (39). L'environnement est contrôlé, l'équipement qualifié, le personnel formé et soumis à des règles d'habillement et d'hygiène strictes. Un système documentaire d'assurance qualité est mis en œuvre, conformément aux BPPrH (39).

Le protocole de fabrication, qui détaille la préparation du matériel, l'entrée en salle, le nettoyage et la désinfection et la préparation du collyre, est détaillé dans l'annexe 1.

### **III.4.1.5. Contrôles**

En cours de fabrication, l'aide manipulateur contrôle l'identité des matières premières, les volumes et les pesées réalisés par le manipulateur, comme pour toute autre préparation fabriquée à la PUI du CHU d'Angers. Le manipulateur et l'aide manipulateur notent sur la fiche de fabrication si un problème inhabituel a eu lieu durant la fabrication.

Sur le produit fini, la concentration en gluconate de chlorhexidine, la limpidité, et la stérilité du collyre sont contrôlées. Des contrôles sont aussi réalisés sur l'étiquetage.

Le pharmacien libère le lot au vu des résultats de ces contrôles, et des résultats de la surveillance microbiologique des ZAC.

## **III.4.2. Mise au point et validation du dosage de la chlorhexidine**

### **III.4.2.1. Mise au point**

#### a) Système de détection

D'après les spectres UV/Visible du GC et du gluconate de potassium (annexe 2), nous avons choisi de régler le détecteur à 254 nm. A cette longueur d'onde, qui correspond à un maximum d'absorption du GC, l'interférence entre les 2 molécules est minime ; le gluconate de potassium absorbe très peu. De plus, il est préférable de réaliser la mesure à des longueurs d'ondes qui s'éloignent de 220 nm vers le visible, pour améliorer la spécificité du dosage. Beaucoup plus de molécules absorbent en effet autour de 220 nm.

#### b) Choix de la phase mobile

Après traitement d'un échantillon de GC selon la méthode dite de « recherche universelle », on remarque que la substance est éluée après 25 minutes environ. Nous avons alors choisi d'augmenter la proportion d'acétonitrile et d'abaisser le pH de la solution aqueuse, afin d'accélérer l'élution de la chlorhexidine. Un mélange de 55% de solution P ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  0,05 mol/l +  $\text{H}_3\text{PO}_4$  0,025 mol/l + triéthylamine 0,004 mol/l dans l'eau), et de 45% d'acétonitrile (ACN) a été utilisée selon un mode isocratique. Le pic du GC a ainsi été obtenu en environ 3 minutes et 30 secondes. Le débit de la pompe est fixé à 1,5 ml/minute.

### III.4.2.2. Préparation des échantillons

#### a) Choix des dilutions et du diluant

La proportion d'acétonitrile dans la phase mobile est de 45%. De façon à obtenir un pic fin et symétrique, la proportion d'acétonitrile dans le diluant, utilisé pour la préparation des échantillons, est minimisée à 25%. Les échantillons de collyre et de GC à 20% dilués au 1/1000<sup>ème</sup> dans l'eau, ont donc été dilués au 1/20<sup>ème</sup> dans le mélange 75% solution P / 25% ACN.

La figure 9 montre un chromatogramme obtenu selon ce procédé.

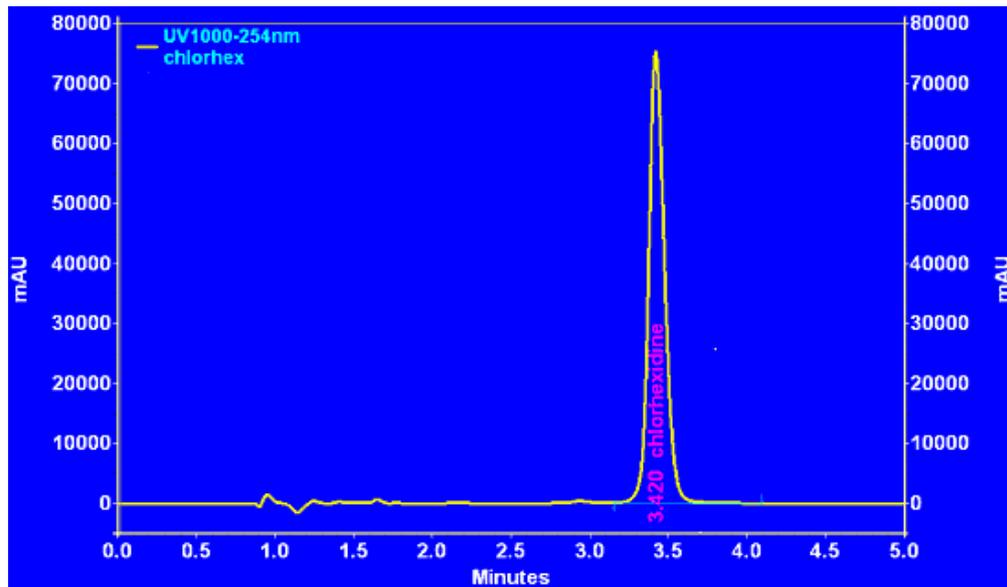


Fig 9 : chromatogramme : chlorhexidine diluée dans l'eau puis ACN/solution P

Les pics obtenus sont symétriques et fins.

#### b) Vérification de la proportionnalité entre la concentration et la mesure

La droite de régression, obtenue selon la méthode des moindres carrés à partir de la gamme d'échantillons de GC, est représentée en figure 10.

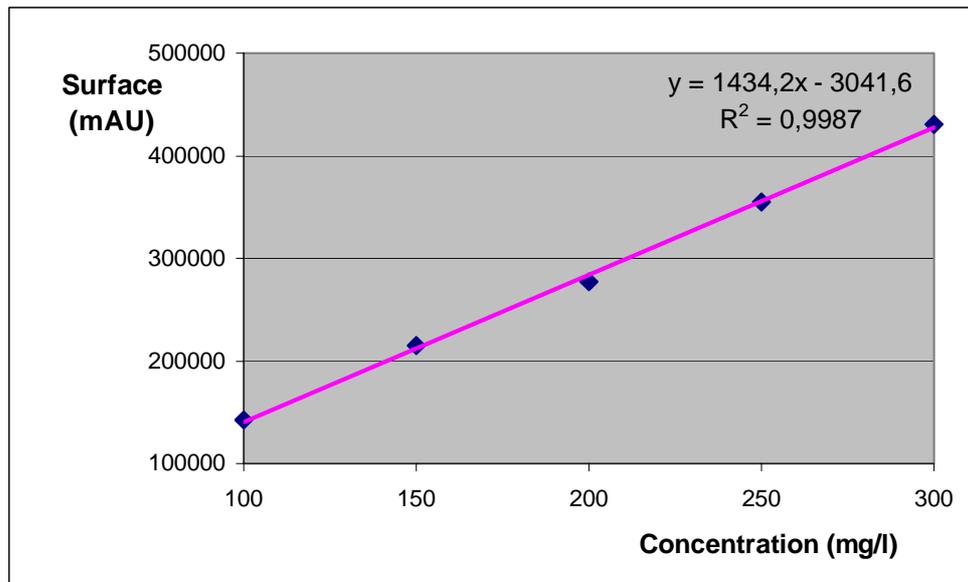


Fig 10 : droite de régression obtenue à partir de la gamme de GC de concentration variant de 100 à 300 mg/l

D'après la figure 10, les surfaces des pics obtenus varient de façon linéaire en fonction des concentrations de GC.

c) Vérification de la proportionnalité entre la concentration et la mesure en présence d'excipient

La droite de régression obtenue à partir de la gamme d'échantillons de GC contenant chacun la même concentration de gluconate de potassium est représentée en figure 11.

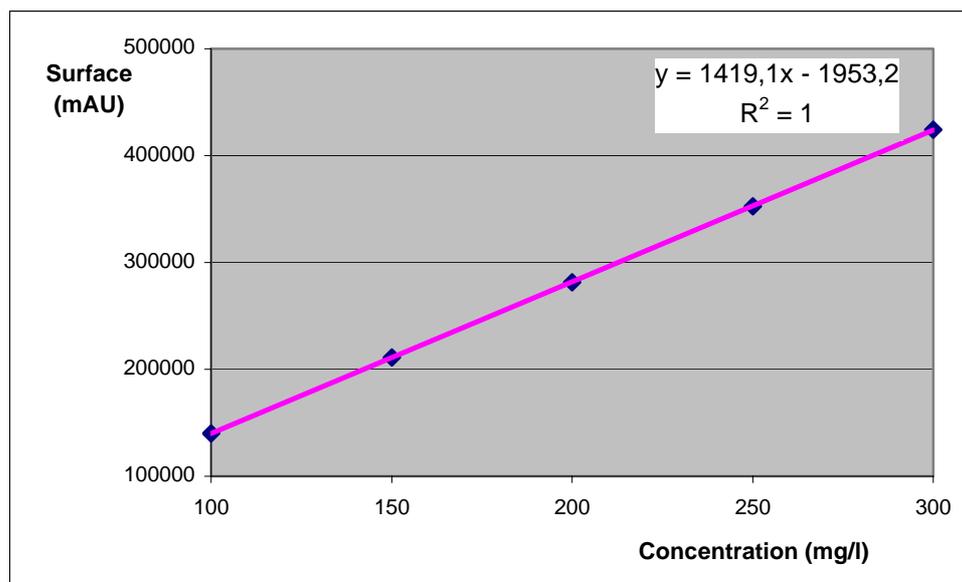


Fig 11 : droite de régression obtenue à partir de la même gamme que fig 10, en présence de gluconate de potassium

D'après la figure 11, la relation entre la concentration de GC et la surface mesurée est linéaire, en présence de l'excipient.

### III.4.2.3. Validation de la méthode de dosage

#### a) Spécificité

- Etude du « blanc »

Le chromatogramme qui correspond à l'injection de l'échantillon sans GC aussi appelé « blanc » est représenté en figure 12.

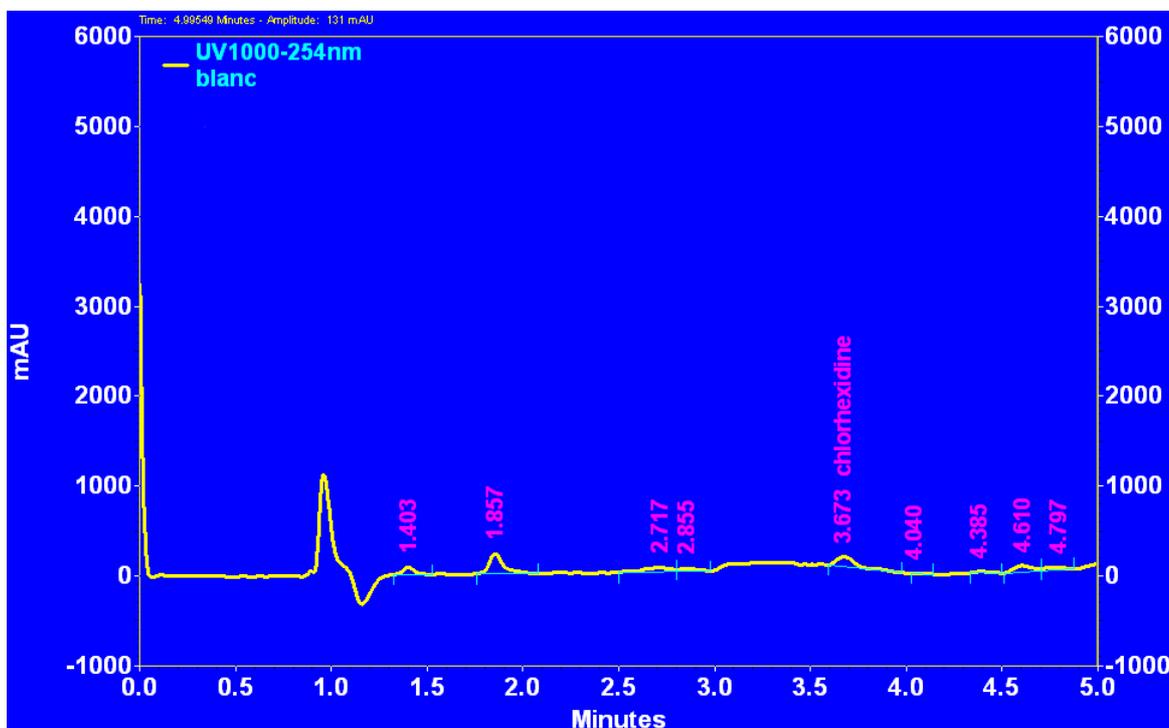


Fig 12 : chromatogramme de l'échantillon sans GC ou « blanc »

D'après le chromatogramme, et en connaissance du temps de rétention de la chlorhexidine qui a été de 3,6 minutes juste après le passage du blanc, un pic de surface minimale, interfère avec celui du GC. La hauteur de ce pic est mesurée à 260 mAU.

Le seuil de détection est estimé à 3,0 mg/l à partir du bruit de fond. Il correspond à 540 mAU.

La présence de ce composé est donc considérée comme négligeable. Ce pic peut être lié à une petite quantité de gluconate de chlorhexidine restée au niveau de l'injecteur.

- Modification de la phase mobile

Le chromatogramme obtenu à partir de la solution de GC à 200 mg/l après modification de la phase mobile ne fait pas apparaître de nouveau pic aux alentours de celui du GC (figure 13). Il y a donc très peu de risque qu'une impureté soit coéluée au GC dans notre méthode d'analyse.

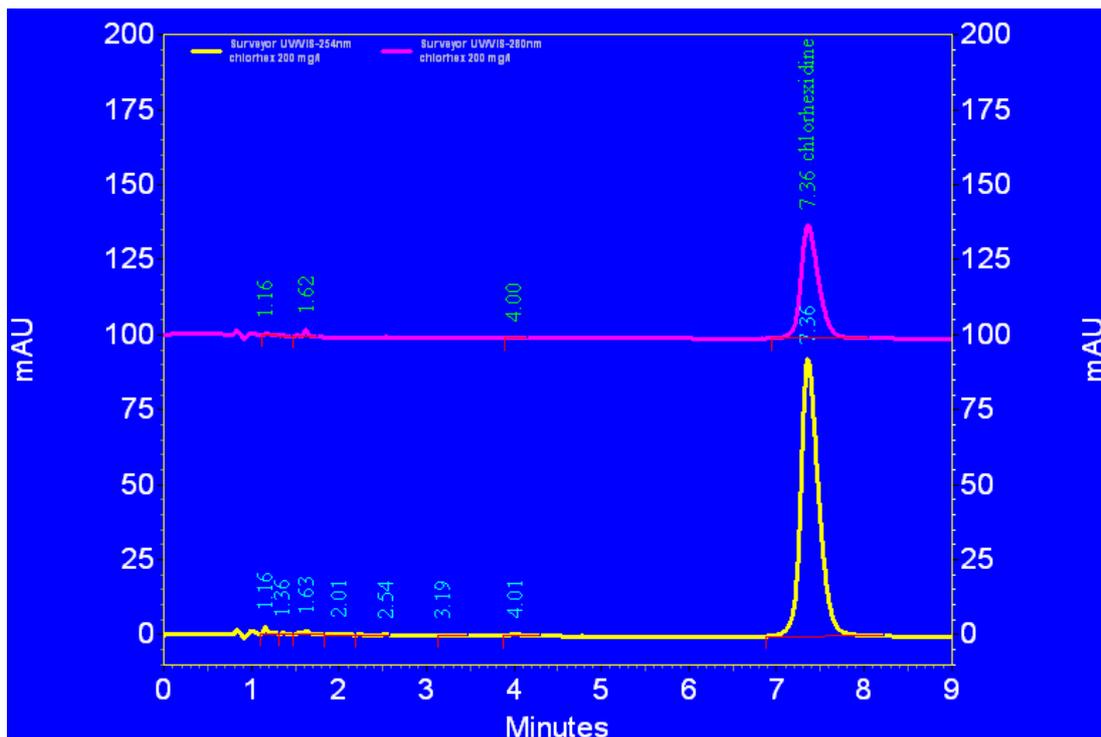


Fig 13 : chromatogrammes d'un échantillon analysé après modification de la phase mobile (en jaune en bas, détection à 254 nm ; en rose en haut, à 280 nm)

#### - Etude des produits de dégradation

Les chromatogrammes qui correspondent à l'injection des solutions « dégradées » de GC après 4 heures de contact avec l'acide chlorhydrique (figure 14) ou la soude 1 mol/l (figure 15), font apparaître de nouveaux pics, en comparaison au chromatogramme correspondant à la solution préparée extemporanément (figure 9). Aucun d'eux n'interfère avec celui du GC.

Sur les chromatogrammes des solutions « dégradées » pendant 24 heures, aucun autre pic apparaît et le GC est presque complètement détruit.

Les rapports des surfaces du pic du gluconate de chlorhexidine à 254 et 280 nm, mesurées à partir des solutions « dégradées » dans la soude ou l'acide chlorhydrique, sont compris dans l'intervalle de confiance [2,4 – 2,5].

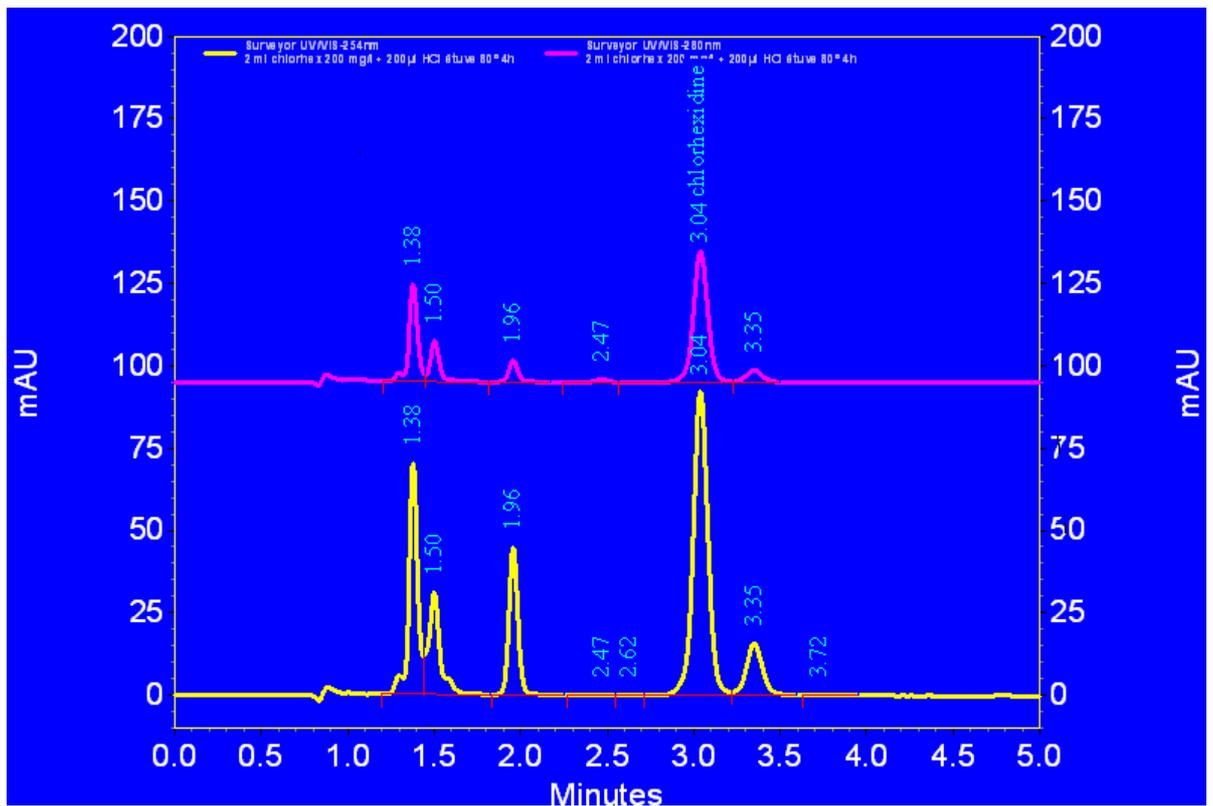


Fig 14 : Chromatogramme de la solution à 200 mg/l « dégradée » par de l'HCl 1mol/l (en jaune, détection à 254 nm ; en rose, à 280 nm)

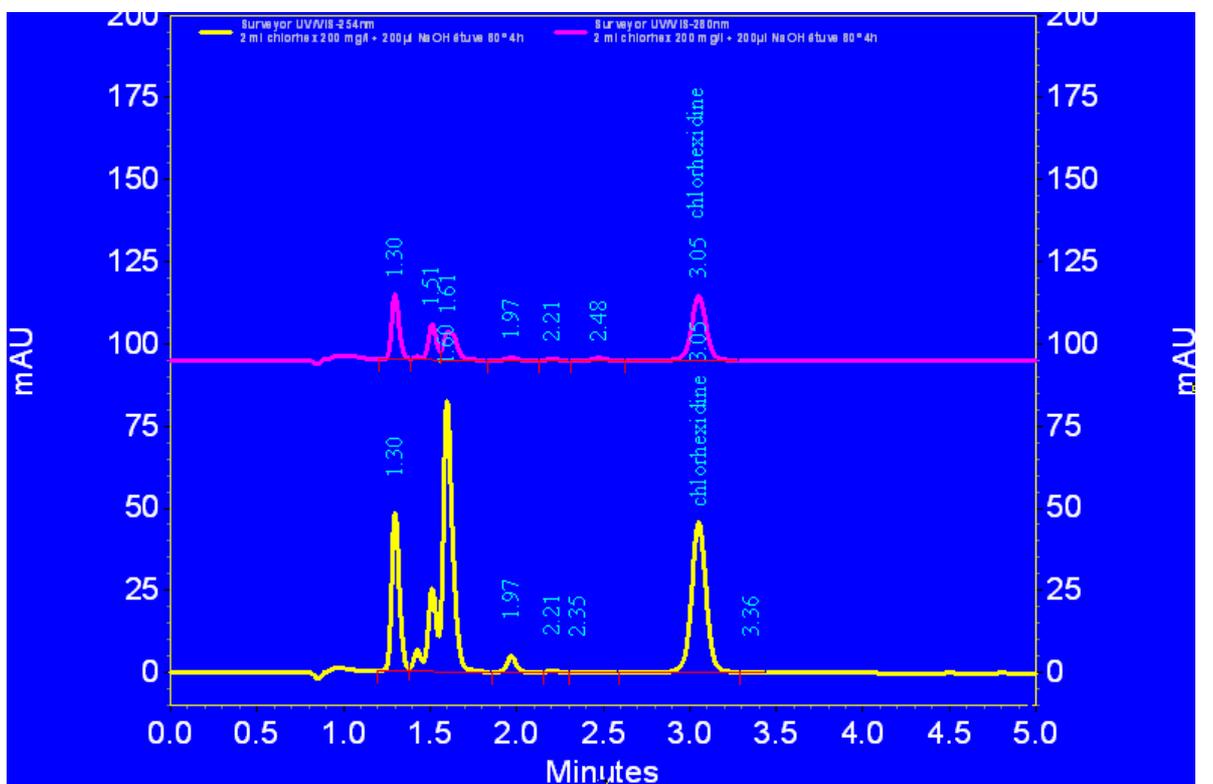


Fig 15 : Chromatogramme de la solution « dégradée » par la soude à 1mol/l

D'après les résultats de ces 3 expérimentations, nous pouvons conclure que notre méthode de dosage est spécifique.

b) Etude de linéarité et d'exactitude

Deux gammes d'étalonnage ont été réalisées :

- une gamme avec le principe actif seul
- une gamme avec la forme pharmaceutique reconstituée

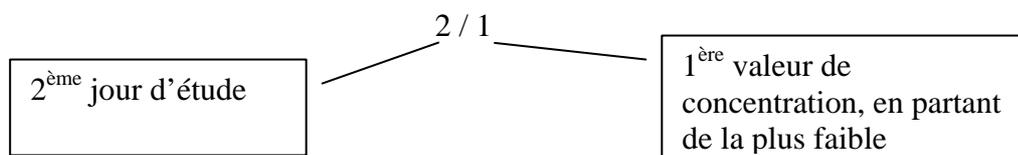
Les résultats bruts des analyses réalisées pour l'étude de linéarité et d'exactitude sont décrits dans le tableau II.

n° dosage (i / j)	[GC] théorique en mg/l ( $X_{ij}$ )	GC dans eau	GC dans sa forme reconstituée
		Surface $Y_{ij}$	Surface $Y_{ij}$
1 / 1	140,0	196167	194742
2 / 1		198883	197874
3 / 1		196377	198889
3 / 4	170,0	239157	240629
2 / 2		243131	238425
3 / 2		241431	240110
1 / 3	200,0	281541	283487
2 / 3		276983	275041
3 / 3		280038	280823
1 / 4	230,0	324283	325460
2 / 4		326660	323407
3 / 4		325213	323892
1 / 5	260,0	367606	364568
2 / 5		372956	363826
3 / 5		369511	366532

Tableau II : Résultats bruts de l'étude de linéarité et d'exactitude

[GC] : concentration en GC

Le numéro de dosage se lit avec la logique suivante :



- Analyse statistique : vérification de la linéarité

Vérification des hypothèses

L'examen visuel des boîtes à moustaches permet de vérifier l'absence de valeur aberrante et de vérifier la distribution normale des données. En effet aucun résultat ne se trouve à l'extérieur des boîtes et chaque partie de chaque boîte représente un quartile, signe d'une distribution gaussienne (annexe 3).

L'homogénéité des variances a été vérifiée selon le test de Cochran. Les variances  $s_j^2$  au sein des groupes de même concentration, et le C de Cochran sont calculés à l'aide des formules suivantes :

$$C_{\text{calculé}} = s_j^2 \max / \sum_{j=1}^k s_j^2$$

$$s_j^2 = \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 / n$$

Les variances et le C de Cochran calculés sont regroupés dans le tableau III.

	GC dans eau	GC dans collyre
$s^2(140)$	$2,28.10^6$	$4,67.10^6$
$s^2(170)$	$3,98.10^6$	$1,33.10^6$
$s^2(200)$	$5,39.10^6$	$1,86.10^7$
$s^2(230)$	$1,43.10^6$	$1,15.10^6$
$s^2(260)$	$7,35.10^6$	$1,96.10^6$
$C_{\text{calculé}}$	0,360	0,672
$C(0,05,5,2)$	0,684	

Tableau III : Vérification de l'homogénéité des variances

On a  $C_{\text{calculé}} < C_{(0,05,k,n-1)}$ , les variances sont donc homogènes au risque  $\alpha$  de 5%.

#### Calcul des coefficients de corrélation

Pour déterminer le coefficient de corrélation r, il est nécessaire de calculer au préalable la covariance  $S_{x_{ij}y_{ij}}$  des variables  $x_{ij}$  et  $y_{ij}$  à l'aide de la formule suivante :

$$S_{x_{ij}y_{ij}} = \frac{\sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^{n_j} (x_{ij} - \bar{x})(y_{ij} - \bar{y})}{(N - 1)}$$

avec  $\bar{x}$  : moyenne générale des concentrations dans les k groupes

et  $\bar{y}$  : moyenne générale des surfaces mesurées dans les k groupes

Le coefficient de corrélation est ensuite calculé à l'aide de la formule suivante:

$$r = \frac{S_{x_{ij}y_{ij}}}{s_{x_{ij}} \cdot s_{y_{ij}}}$$

On obtient :

	GC dans eau	GC dans collyre
r	0,9992	0,9994

Les valeurs calculées des coefficients de corrélation sont tout à fait satisfaisantes ( $r > 0,999$ ).

### Estimation des droites de régression

Les pentes et ordonnées des droites D1 et D2 ont été calculées à l'aide des formules suivantes.

$$b = \frac{\sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^{n_j} (x_{ij} - \bar{x}) \cdot (y_{ij} - \bar{y})}{\sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^{n_j} (x_{ij} - \bar{x})^2} \quad \text{et} \quad a = \bar{y} - b \bar{x}$$

Les ordonnées à l'origine et les pentes des droites D1 (GC dans collyre) et D2 (GC dans eau) sont détaillés dans le tableau IV.

	GC dans eau	GC dans collyre
a	$-3,94 \cdot 10^3$	$1,08 \cdot 10^3$
b	$1,43 \cdot 10^3$	$1,40 \cdot 10^3$

Tableau IV : paramètres des droites D1 et D2.

Les droites de régression linéaire D1 et D2 sont représentées dans les figures 14 et 15. Les écart-types des surfaces moyennes calculées à partir des mesures des 3 échantillons de même concentration, ne sont pas représentés ; ils sont inférieurs à 1% des surfaces moyennes.

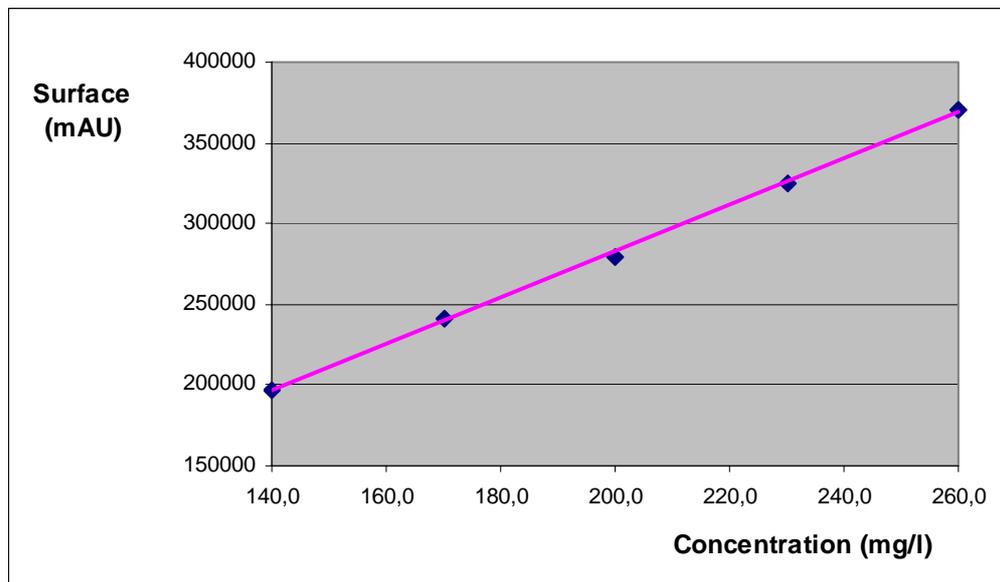


Fig 14 : Droite de régression D1 du GC dans sa forme reconstituée

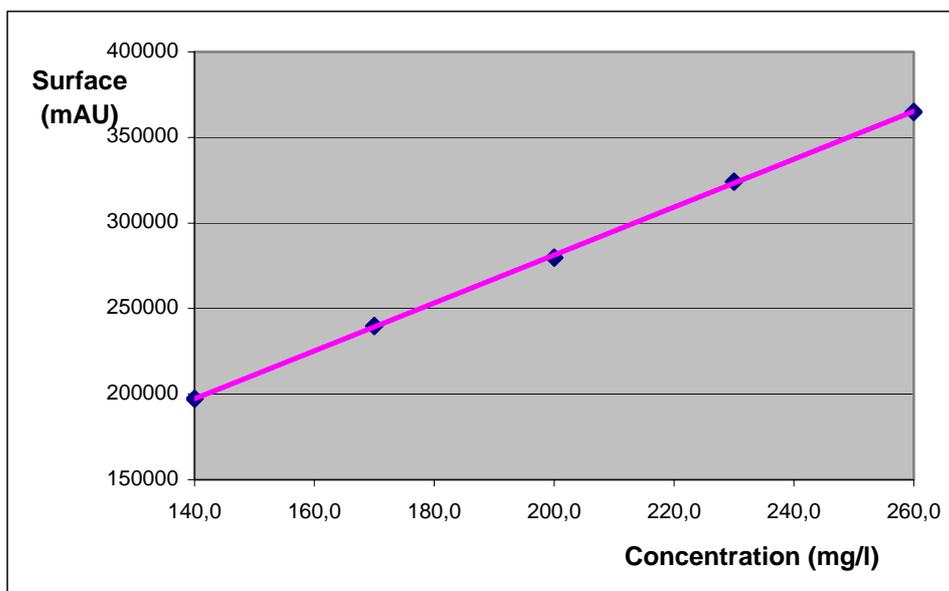


Fig 15 : Droite de régression D2 du GC dans l'eau

Comparaison des ordonnées à l'origine des 2 droites de régression à 0

Les ordonnées à l'origine des droites de régression D1 et D2 ont été comparées à 0 à l'aide du test de Student. Le t de Student et la variance de l'ordonnée à l'origine ( $s^2_a$ ) sont calculés à l'aide des formules suivantes :

$$t = \frac{|a|}{s_a} \quad \text{et} \quad s^2_a = s^2_{y_{ij}} \times \left( \frac{1}{N} + \frac{\bar{x}^2}{\sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^{n_j} (x_{ij} - \bar{x})^2} \right)$$

$$\text{avec } s^2_{y_{ij}} = \frac{\sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^{n_j} (y_{ij} - \bar{y})^2 - b^2 \sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^{n_j} (x_{ij} - \bar{x})^2}{N - 2}$$

Les valeurs obtenues sont regroupées dans le tableau V.

	GC dans eau	GC dans collyre
a	$-3,94 \cdot 10^3$	$1,08 \cdot 10^3$
$s^2_a$	$1,01 \cdot 10^7$	$7,84 \cdot 10^6$
t	1,24	0,39

Tableau V : ordonnées à l'origine, leur variance et t de Student

Pour les 2 droites, on a  $t < t_{(0,05, 13)} = 2,16$ . Les ordonnées à l'origine des droites de régression D1 et D2 ne sont donc pas significativement différentes de 0 au risque  $\alpha$  de 5%.

### Existence d'une pente significative

Les pentes des droites de régression D1 et D2 ont été comparées à 0 à l'aide du test de Student. Le t de Student et la variance des pentes ( $s_b^2$ ) sont calculés à l'aide des formules suivantes :

$$t = \frac{|b|}{s_b} \quad \text{et} \quad s_b^2 = \frac{s^2 y_{ij}}{\sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^{n_j} (x_{ij} - \bar{x})^2}$$

Les valeurs obtenues sont regroupées dans le tableau VI.

	GC dans eau	GC dans collyre
b	$1,43 \cdot 10^3$	$1,40 \cdot 10^3$
$s_b^2$	241	187
t	92	102

Tableau VI : pentes, leur variance et t de Student

Pour les 2 droites  $t > t_{(0,05,26)} = 2,16$ , les pentes sont donc significativement différentes de 0 au risque  $\alpha$  de 5%. Les erreurs expérimentales et d'ajustement ne sont pas à l'origine des pentes.

### Validité des droites de régression

La validité des droites de régression D1 et D2 est vérifiée à l'aide du test de Fisher.

Les calculs nécessaires pour la réalisation ce test sont détaillés dans le tableau VII.

Source de variation	ddl	Somme des carrés (SC)	variances	F
Erreur expérimentale	N-k	$\sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^{n_j} (Y_{ij} - \bar{Y}_j)^2$	$S_E^2 = \frac{\sum E^2}{(N - k)}$	$F_2 = \frac{S_L^2}{S_E^2}$
Erreur de la régression	k-2	$\sum L^2 = \sum R^2 - \sum E^2$	$S_L^2 = \sum L^2 / (k-2)$	

Tableau VII : formules utilisées pour tester la validité des droites de régression

avec  $\sum R^2 = \sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^{n_j} (y_{ij} - \bar{y})^2 - b^2 \sum_{j=1}^k n_j (\bar{x} - \bar{x})^2$ ,

et  $\bar{x}$  = concentration moyenne dans chacun des groupes k.

Les résultats sont détaillés dans les tableaux VIII et IX.

GC dans eau				
Source de variation	ddl	SC	Variances	F
Erreur expérimentale	10	$4,09 \cdot 10^7$	$4,09 \cdot 10^6$	3,55
Erreur régression	3	$4,36 \cdot 10^7$	$1,45 \cdot 10^7$	

Tableau VIII : Validité de la droite de régression D2

GC dans collyre				
Source de variation	ddl	SC	Variances	F
Erreur expérimentale	10	$5,55 \cdot 10^7$	$5,55 \cdot 10^6$	0,62
Erreur régression	3	$1,03 \cdot 10^7$	$3,43 \cdot 10^6$	

Tableau IX : Validité de la droite de régression D1

On a  $F < F_{(0,05;3;10)} = 3,71$ , les ajustements réalisés pour le calcul des 2 droites de régression sont donc valides au risque  $\alpha$  de 5%.

### Comparaison des 2 droites de régression

Les pentes et les ordonnées à l'origine des droites D1 et D2 sont comparées par des tests de Student. Le t de Student pour la comparaison des 2 pentes est calculé tel que :

$$t = \frac{|b_1 - b_2|}{\sqrt{s^2 b_1 + s^2 b_2}}$$

Le t de Student pour la comparaison des 2 ordonnées à l'origine est calculé tel que :

$$t = \frac{|a_1 - a_2|}{\sqrt{s^2 a_1 + s^2 a_2}}$$

Les valeurs obtenues sont résumées dans les tableaux X et XI.

	GC dans eau	GC dans collyre
b	$1,43 \cdot 10^3$	$1,40 \cdot 10^3$
$s^2_b$	241	187
t	1,57	

Tableau X : comparaison des pentes

	GC dans eau	GC dans collyre
a	$-3,94 \cdot 10^3$	$1,08 \cdot 10^3$
$s_a$	$1,01 \cdot 10^7$	$7,84 \cdot 10^6$
t	1,19	

Tableau XI : comparaison des ordonnées à l'origine

On a  $t < t_{(0,05 ; 26)} = 2,06$ , les droites D1 et D2 sont donc superposables.

D'après l'étude de linéarité, les gammes « GC dans eau » et « GC dans sa forme collyre » sont linéaires et superposables. La présence de gluconate de potassium dans un échantillon ne modifie pas significativement le signal obtenu à partir de l'échantillon de même concentration en GC mais sans excipient.

Les 2 gammes peuvent donc être utilisées comme systèmes de référence ; c'est à dire que les gammes d'étalonnage peuvent être réalisées indifféremment dans l'eau ou dans le gluconate de potassium.

- Analyse statistique : vérification de l'exactitude

Changement de variable

Selon les recommandations de la SFSTP, afin d'étudier l'exactitude, le pourcentage de recouvrement entre les concentrations théoriques et les concentrations calculées avec les paramètres de la droite D2, a été déterminé.

La concentration est calculée à partir des surfaces mesurées avec la formule suivante :

$$X_{\text{calculée}} = \frac{y_{ij} - a_2}{b_2}$$

Les pourcentages de recouvrement sont calculés à partir de la formule suivante :

$$Y_{ij} = \frac{X_{\text{calculé}}}{x_{ij}} \times 100$$

Les valeurs obtenues sont décrites dans le tableau XII.

N°dosage	$x_{ij}$	$X_{\text{calculé}}$	$Y_{ij}$
1 / 1	140,0	138,6	99,0
2 / 1	140,0	140,8	100,6
3 / 1	140,0	141,5	101,1
1 / 2	170,0	170,7	100,4
2 / 2	170,0	169,1	99,5
3 / 2	170,0	170,3	100,2
1 / 3	200,0	200,6	100,3
2 / 3	200,0	194,7	97,3
3 / 3	200,0	198,7	99,4
1 / 4	230,0	229,9	99,9
2 / 4	230,0	228,4	99,3
3 / 4	230,0	228,8	99,5
1 / 5	260,0	257,2	98,9
2 / 5	260,0	256,6	98,7
3 / 5	260,0	258,5	99,4

Tableau XII : Données mesurées et calculées pour l'étude de l'exactitude

Vérification des hypothèses nécessaires à l'étude d'exactitude

La distribution normale des mesures a été vérifiée dans l'étude de linéarité.

L'homogénéité des variances est vérifiée grâce au test de Cochran dont les formules de calcul ont été détaillés précédemment. Les valeurs obtenues sont décrites dans le tableau XIII.

groupe "concentration"	140 mg/l	170 mg/l	200 mg/l	230 mg/l	260 mg/l
n	3	3	3	3	3
variance	1,16	0,22	2,27	0,11	0,14
$C_{\text{calculé}}$	0,58				
$C(0,05, 5, 2)$	0,68				

Tableau XIII : vérification de l'homogénéité des variances

On a  $C_{\text{calculé}} < C_{(0,05,5,2)}$ , les variances au sein des groupes de concentrations sont donc homogènes.

### Test de validité des moyennes

La validité des moyennes est vérifiée selon un test de Fisher. Les calculs nécessaires sont détaillés dans le tableau XIV. Les résultats des calculs sont détaillés dans le tableau XV.

Variations	ddl	Somme des carrés	Variances	F <sub>calculé</sub>
Variation totale	N-1	$\sum T^2 = \sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^{n_j} (Y_{ij} - \bar{Y})^2$	$S^2_T = \frac{\sum T^2}{(N-1)}$	$F_3 = \frac{S^2_C}{S^2_E}$
Variation intra-groupe	N-k	$\sum E^2 = \sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^{n_j} (Y_{ij} - \bar{Y}_j)^2$	$S^2_E = \frac{\sum E^2}{(N-k)}$	
Variation inter-groupe	k-1	$\sum C^2 = \sum T^2 - \sum E^2$	$S^2_C = \frac{\sum C^2}{(k-1)}$	

Tableau XIV : formules utilisées pour le test de validité des moyennes

Variation	ddl	SC	Variances	F calculé
Variation totale	14	11,68	0,83	1,24
Variation intragroupe	10	7,80	0,78	
Variation intergroupe	4	3,88	0,97	

Tableau XV : résultats du test de validité des moyennes

On a  $F < F_{(0,05;4;10)} = 3,48$ , les variations des observations entre les différents groupes sont dues aux erreurs expérimentales. L'intervalle de confiance du recouvrement moyen peut donc être valablement calculé.

### Estimation du taux de recouvrement moyen et de son intervalle de confiance

Le taux de recouvrement moyen et son intervalle de confiance ont été calculés à l'aide des formules suivantes :

$$\bar{Y} = \sum_{j=1}^k (1/kn_j) \sum_{i=1}^{n_j} Y_{ij} \quad \text{et} \quad I_{RM} = \bar{Y} \pm \frac{t_{(\alpha;14)} \cdot S_T}{\sqrt{N}}$$

Le taux de recouvrement moyen calculé est de 99,6% et son intervalle de confiance est [99,1 ; 100,1] dans la gamme de concentration de GC variant de 140 à 260 mg/l. Selon les critères d'acceptabilité fixés (100% +/- 5%), le taux de recouvrement moyen est jugé satisfaisant.

Notre méthode de dosage est donc exacte.

## b) Etude de fidélité

### - Résultats bruts et changement de variable

Selon les recommandations de la SFSTP, l'étude de fidélité nécessite d'estimer les concentrations à partir des surfaces mesurées, à l'aide des paramètres de la droite D1.

Les concentrations sont donc calculées à l'aide de la formule suivante :

$$X_{\text{calculée}} = \frac{y_{ij} - a_1}{b_1}$$

Les surfaces mesurées et les concentrations calculées à partir des paramètres de D1 sont décrites dans le tableau XVI.

n° dosage	x <sub>ij</sub>	y <sub>ij</sub>	X <sub>calculée</sub>
1 / 1 18/05/05	200,0	284552	202,4
1 / 2	200,0	280094	199,2
1 / 3	200,0	283751	201,8
1 / 4	200,0	282687	201,1
1 / 5	200,0	283654	201,8
1 / 6	200,0	282933	201,3
2 / 1 25/05/05	200,0	292096	207,8
2 / 2	200,0	293822	209,0
2 / 3	200,0	289929	206,2
2 / 4	200,0	287603	204,6
2 / 5	200,0	292637	208,2
2 / 6	200,0	294068	209,2
3 / 1 26/05/05	200,0	278329	198,0
3 / 2	200,0	277837	197,6
3 / 3	200,0	281797	200,4
3 / 4	200,0	284221	202,2
3 / 5	200,0	283289	201,5
3 / 6	200,0	281858	200,5

Tableau XVI : surfaces mesurées et concentrations calculées pour l'étude de fidélité

### Vérification des hypothèses

D'après la lecture des boîtes à moustaches, il n'y a pas de valeur aberrante, et la distribution est gaussienne (annexe 4).

L'homogénéité des variances a été vérifiée selon un test de Cochran (tableau XVII).

	Variance
jour 1	1,22
jour 2	3,17
jour 3	3,45
Ccalculé	0,44
C(0,05;3;6)	0,68

Tableau XVII : Vérification de l'homogénéité des variances

Les variances des 3 groupes de mesures sont homogènes au risque  $\alpha$  de 5% selon le test de Cochran ( $C < C_{(0,05;3;6)}$ ).

- Analyse statistique

Les moyennes et dispersions des groupes de mesures sont décrites dans le tableau XVIII.

	Moyenne	n	ddl=n-1	Variance
jour 1	201,3	6	5	1,22
jour 2	207,5	6	5	3,17
jour 3	200,0	6	5	3,45

Tableau XVIII : moyennes et dispersions des groupes de mesure lors de l'étude de fidélité

Calcul des variances de répétabilité et de fidélité intermédiaire

Les variances sont calculées à l'aide des formules suivantes :

$$S_{r^2} = \frac{\sum_{j=1}^k S_j^2}{k}, \text{ pour la variance de répétabilité}$$

$$S_R^2 = S_{r^2} + \frac{\sum_{j=1}^k (m_j - \bar{m})^2}{k-1} - \frac{S_{r^2}}{n}, \text{ pour la variance de fidélité intermédiaire}$$

On obtient :  $S_{R^2} = 18,25$

et  $S_{r^2} = 2,61$

Calcul des coefficients de variation de répétabilité et de fidélité intermédiaire

Les erreurs de répétabilité et de reproductibilité sont exprimées sous forme de coefficients de variation (CV) :

$$CV_r = 100 \frac{S_r}{m}, \text{ pour la répétabilité}$$

$$CV_R = 100 \frac{SR}{m}, \text{ pour la fidélité intermédiaire}$$

On obtient :  $CV_r = 0,80$

Et  $CV_R = 2,10$

Les coefficients de variation de répétabilité et de précision intermédiaire sont inférieurs à 5%. La fidélité de la procédure est jugée satisfaisante.

Notre méthode de dosage répond aux conditions de spécificité, de linéarité, d'exactitude et de fidélité. Elle est donc valide.

### III.4.3. Stabilité du collyre à la chlorhexidine 0,02%

#### III.4.3.1. Evolution de la concentration de gluconate de chlorhexidine

La droite de régression correspondant à la gamme d'étalonnage réalisée le 1<sup>er</sup> jour de l'étude est superposable aux droites de régression obtenues durant l'étude de linéarité (annexe 5).

Les concentrations des solutions C1 et C2 mesurées chaque jour de mesure, s'écartent de moins de 5 % de leurs concentrations théoriques. Leurs variations moyennes et maximales, calculées à partir des mesures des 16 jours d'analyses, sont données dans le tableau XIX.

	Variation moyenne [GC] mesurée / [GC] théorique	Variation maximale [GC] mesurée / [GC] théorique
Contrôle C1 en début de série de dosage	+/- 0,8 %	+/- 1,4 %
Contrôle C2 en début de série de dosage	+/- 0,8 %	- 1,8 %
Contrôle C1 en fin de série de dosage	+/- 1,2 %	+ 2,9 %
Contrôle C2 en fin de série de dosage	+/- 0,7 %	- 1,9 %

Tableau XIX : Vérification de la qualité de la gamme d'étalonnage

La gamme d'étalonnage réalisée à J0 a été utilisée durant la durée de l'étude. Les valeurs brutes des mesures de concentration sont disponibles en annexe 6.

#### a) Evolution de la concentration

La figure 16 permet de visualiser l'évolution sur 8 semaines, des concentrations des 4 lots 1, 2, 3 et 4, et de leur concentration moyenne. Les mesures prises en compte sont les mesures effectuées chaque semaine sur les flacons non ouverts, et les mesures réalisées 7 et 14 jours après ouverture des flacons à J42.

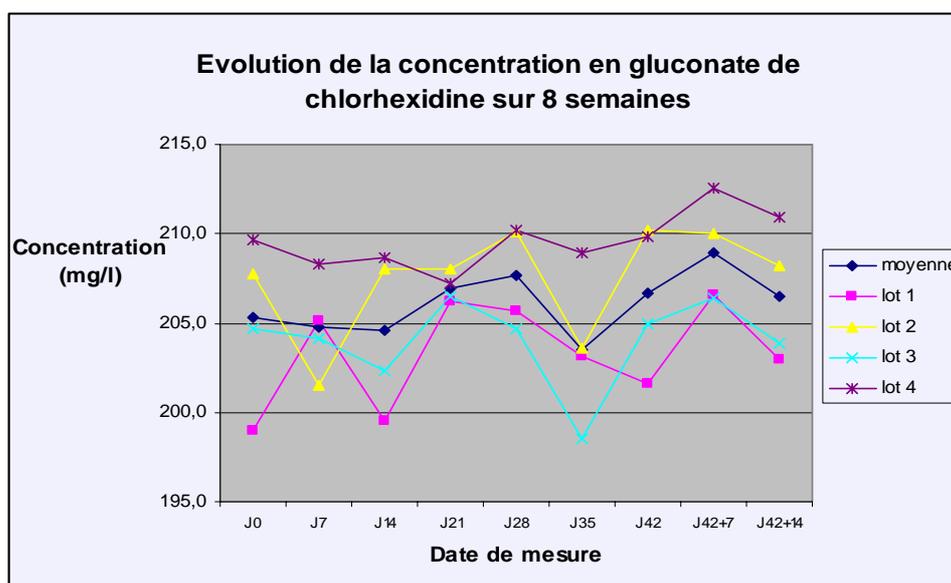


Fig 16 : Evolution de la concentration en GC dans les collyres pendant 8 semaines

D'après le graphique, la concentration en GC est stable pendant 8 semaines. On remarque que les concentrations à J0 sont supérieures à celles attendues (200 mg/l). Cette variation, inférieure à 5%, peut s'expliquer par la variabilité liée à la fabrication. Une erreur liée à la précision des volumes des seringues, peut par exemple être en cause.

La variation des concentrations au cours du temps, exprimée en pourcentage par rapport aux concentrations initiales, a été calculée pour chacun des lots. Les résultats sont décrits dans la figure 17.

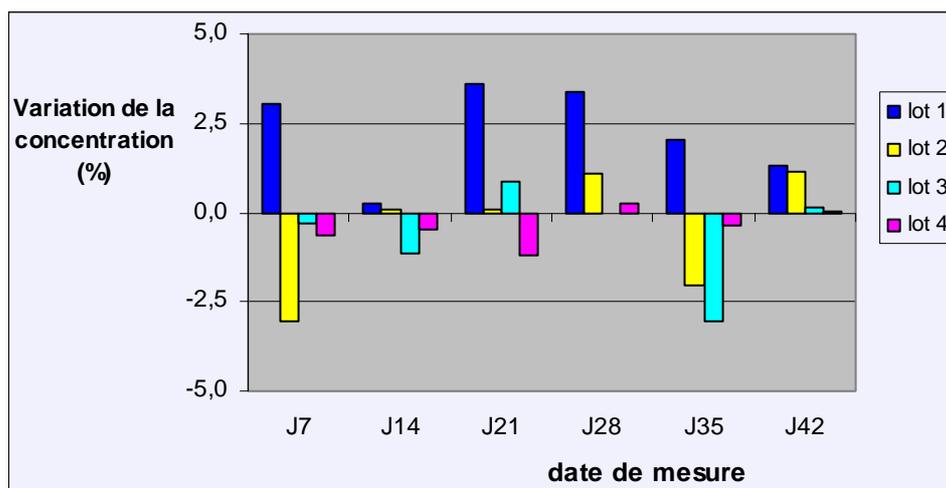


Fig 17 : Variation de la concentration en GC dans les collyres pendant 8 semaines

L'ensemble des concentrations mesurées est compris dans l'intervalle de 5% autour de la concentration initiale. La concentration de GC dans les collyres est donc stable pendant 8 semaines après leur fabrication.

Les variations observées peuvent être liées à la méthode d'analyse, au procédé de fabrication des collyres et à la dégradation du principe actif.

#### b) Evolution de la concentration après ouverture des flacons

La figure 18 permet de visualiser l'évolution des variations des concentrations moyennes des 7 flacons de chaque lot, après 3, 7 et 14 jours d'ouverture, exprimées en pourcentage par rapport aux concentrations moyennes des jours d'ouverture.

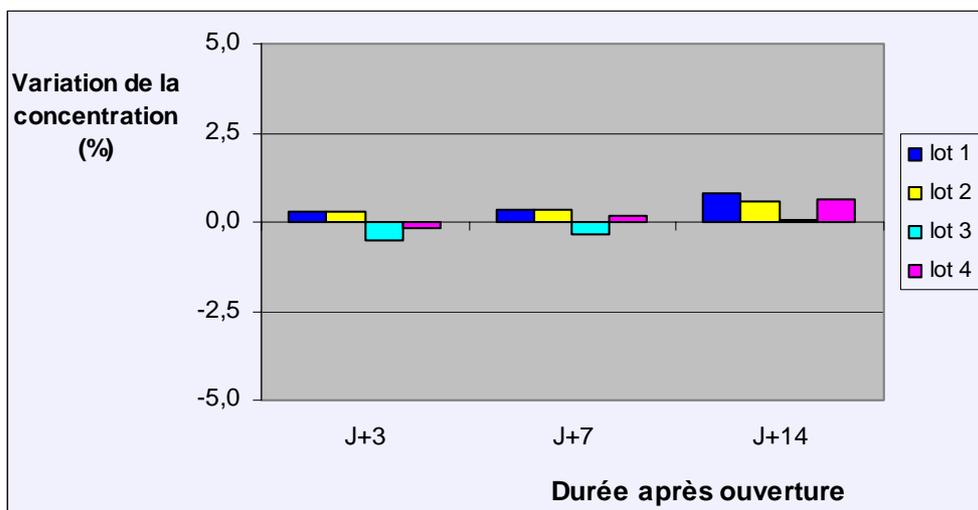


Figure 18 : Variation de la concentration de GC après ouverture des flacons

Les concentrations moyennes de chaque lot varient de moins de 1% après ouverture.

La concentration en gluconate de chlorhexidine est donc stable pendant 8 semaines et 14 jours après ouverture et « pseudo-utilisation » des collyres, dans la limite des 8 semaines de péremption.

### III.4.3.2. Evolution du pH

Les résultats bruts sont disponibles en annexe 7.

#### a) Evolution du pH

La figure 19 permet de visualiser l'évolution du pH des 3 lots 5, 6 et 7 et du pH moyen calculé à partir des valeurs de pH de ces 3 lots, en fonction de la date de mesure.

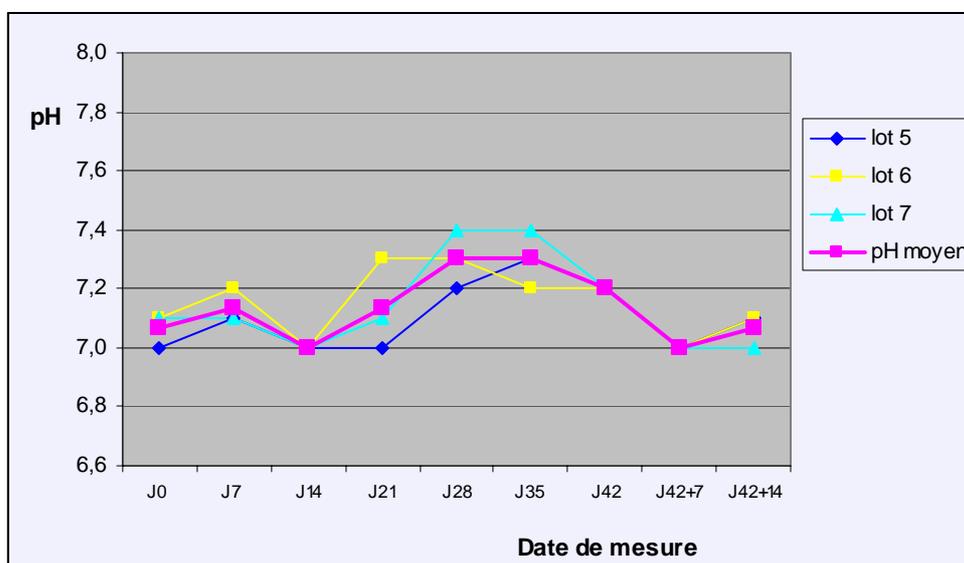


Figure 19 : Evolution du pH des collyres sur 8 semaines

D'après la figure 19, aucune variation importante de pH n'est mise en évidence.

Les variations de pH de chaque lot, exprimées en pourcentage de la valeur mesurée à J0, ont été calculées et sont décrites dans la figure 20.

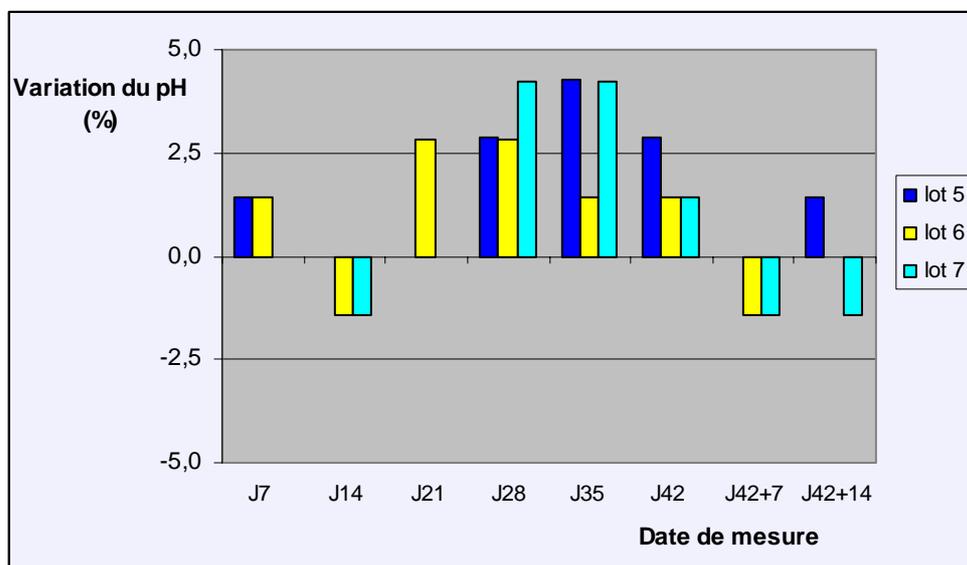


Figure 20 : Variation du pH des collyres sur 8 semaines

Les variations de pH sont comprises dans l'intervalle fixé de 5% autour des valeurs de pH initiales. Le pH est donc stable pendant 8 semaines.

#### b) Evolution du pH après ouverture des flacons

Les variations des pH moyens calculés à partir des pH des 7 flacons de chaque lot, exprimées en pourcentage des pH moyens des jours d'ouverture des flacons, ont été calculées après 3, 7 et 14 jours d'ouverture (figure 21).

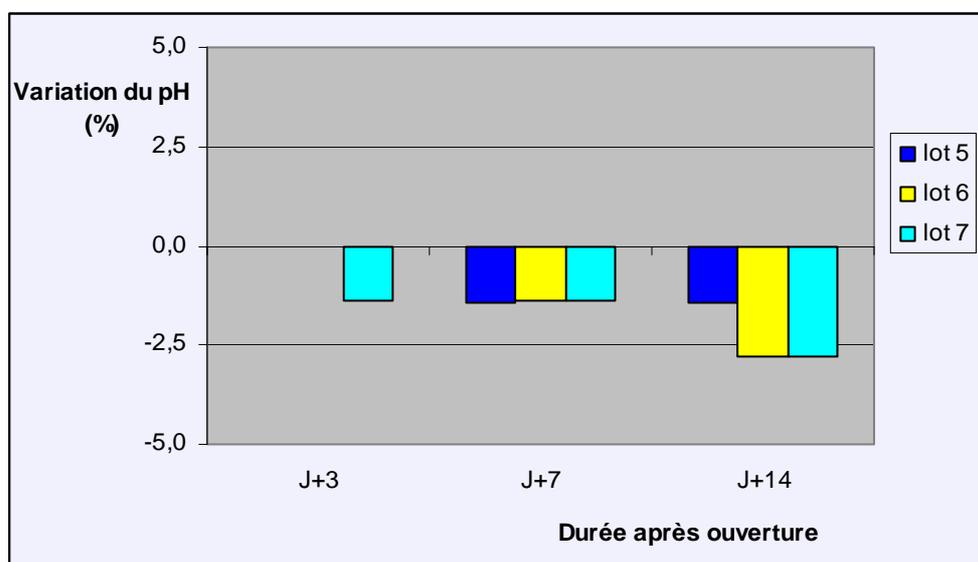


Figure 21 : Variation du pH après ouverture des flacons

Les variations des valeurs moyennes de pH, mesurées après 3, 7 et 14 jours d'ouverture, varient de moins de 5% par rapport aux valeurs moyennes des pH des jours d'ouverture.

Le pH du collyre est donc stable pendant 8 semaines et 14 jours après ouverture et utilisation des flacons, dans la limite des 8 semaines de péremption.

### III.4.3.3. Evolution de l'osmolarité

Les résultats bruts sont disponibles en annexe 8. L'osmolarité des contrôles internes, mesurée chaque jour de mesure, varie en moyenne de 0,6% et au maximum de 1,9% autour de la valeur cible (321 mosmol/l). Les mesures d'osmolarité effectuées sont donc valides.

#### a) Evolution de l'osmolarité des flacons non ouverts

L'évolution de l'osmolarité des lots 3' et 4' et de leur osmolarité moyenne est visualisée dans la figure 22.

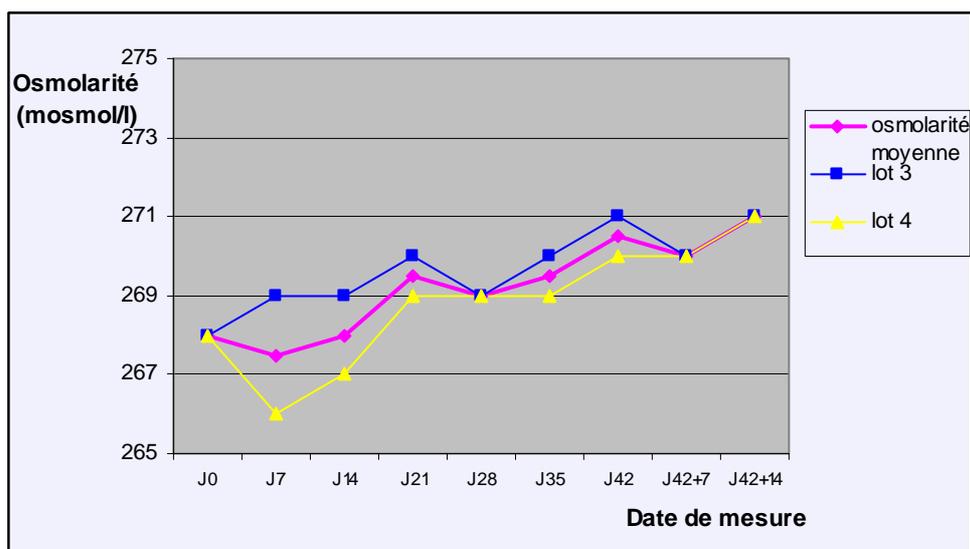


Figure 22 : Evolution de l'osmolarité des collyres sur 8 semaines

D'après les résultats bruts et la figure 22, on remarque que l'osmolarité du collyre augmente légèrement au cours du temps.

Les variations des osmolarités de chacun des lots au cours du temps, exprimées en pourcentage par rapport aux osmolarités initiales, ont été calculées et sont décrites dans la figure 23.

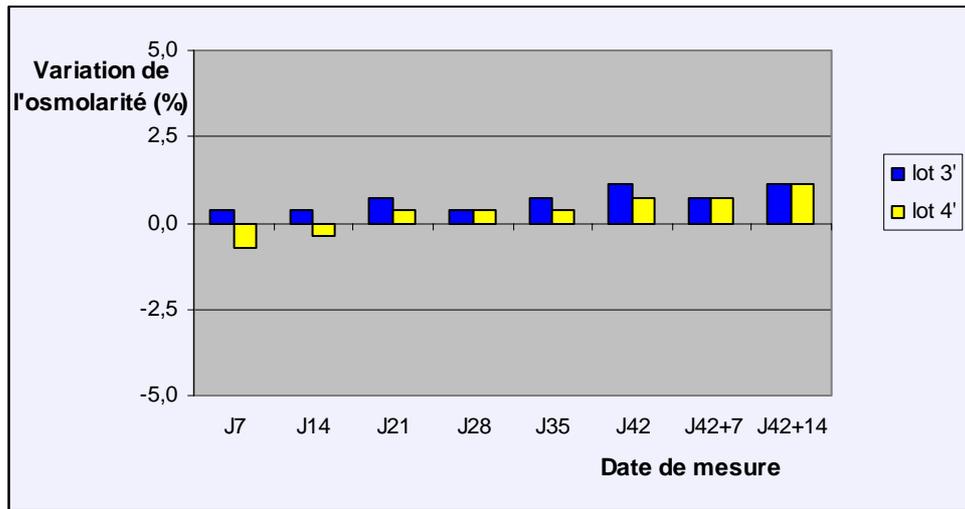


Fig 23 : Variation de l'osmolarité des collyres sur 8 semaines

Les variations calculées sont inférieures à 5%. L'osmolarité du collyre est donc stable pendant 8 semaines.

#### b) Evolution de l'osmolarité après ouverture des flacons

Les variations, après 3, 7 et 14 jours d'ouverture des flacons, des osmolarités moyennes calculées à partir des 7 flacons de chaque lot, par rapport aux osmolarités moyennes des jours d'ouverture, ont été calculées et sont décrites dans la figure 24.

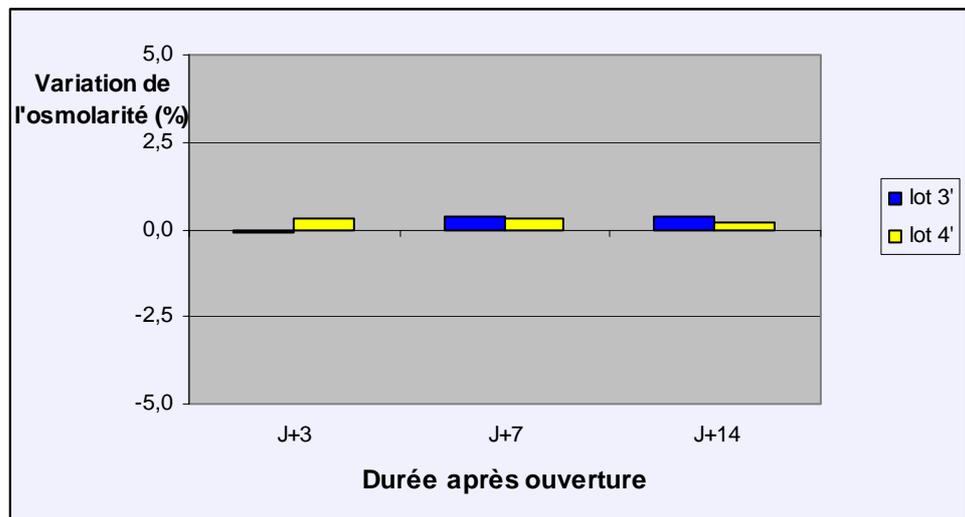


Fig 24 : Variation de l'osmolarité après ouverture des collyres

Les variations sont inférieures à 5%, l'osmolarité des collyres est donc stable pendant 8 semaines et 14 jours après ouverture des flacons, dans la limite des 8 semaines de péremption.

#### **III.4.3.4. Evolution de la limpidité**

Les collyres à la chlorhexidine, conservés en flacons fermés, sont restés incolores et limpides pendant 6 semaines. De même, ils sont restés incolores et limpides pendant 14 jours après ouverture et « pseudo-utilisation ».

Le collyre est donc limpide pendant 8 semaines et 14 jours après ouverture et utilisation des flacons, dans la limite des 8 semaines de péremption.

#### **III.4.3.5. Etude de la stérilité**

Les collyres non ouverts sont restés stériles durant les 6 semaines de contrôle prévues. De même, les collyres sont restés stériles après ouverture et « pseudo-utilisation ».

La méthode de contrôle de la stérilité du collyre à la chlorhexidine n'a pas été validée, nous pouvons donc simplement conclure qu'aucune croissance microbienne n'a lieu dans les collyres pendant 8 semaines et 14 jours après ouverture dans la limite des 8 semaines de péremption.

### ***III.5. Discussion***

La formulation de notre collyre au gluconate de chlorhexidine répond aux propriétés requises ou recommandées de la Pharmacopée Européenne et des ouvrages de galéniques (17, 34, 72). Il est en effet limpide, proche de la neutralité et proche de l'osmolarité des larmes. Le procédé d'obtention de l'état stérile des collyres par filtration stérilisante est validé selon la Pharmacopée Européenne (34).

De plus, la stabilité de notre collyre a été démontrée pendant 8 semaines, qui permet son utilisation en ambulatoire. Après ouverture, le flacon peut être conservé 14 jours, tout en tenant compte de la date de péremption.

### **III.5.1. Difficultés rencontrées et compromis**

#### **III.5.1.1. Une demande au moment du besoin**

Lorsque la réalisation d'une préparation magistrale ou hospitalière est demandée par un praticien pour un de ces patients, le pharmacien doit étudier rapidement sa faisabilité. En effet, la demande de réalisation d'une préparation est faite au moment du besoin pour le patient.

La détermination de la formule de la préparation, de la méthode de fabrication et des contrôles à réaliser sur la préparation, peut être réalisée rapidement. Par contre, la mise au point et la validation de méthodes analytiques, si elles sont nécessaires, ou la détermination de la péremption de la préparation, demandent plus de temps.

Dans l'intérêt du patient, le pharmacien est donc souvent obligé de satisfaire à la demande sans avoir étudié la stabilité de la préparation. Généralement, celui-ci fixe une durée de péremption très courte. Puis il organise l'étude de stabilité afin de déterminer une péremption plus longue, qui permet ensuite plus de commodité pour le patient.

#### **III.5.1.2. Manque de données bibliographiques**

Le moyen de répondre rapidement à la demande d'une nouvelle préparation, est d'avoir à disposition les données bibliographiques qui permettent sa réalisation.

Lors de l'étude pour déterminer la formulation et la stabilité du collyre à la chlorhexidine, des difficultés ont été rencontrées devant le manque de données à disposition. Les ouvrages de référence tel le *Martindale* (48) ou le *Harrison* (2) ne détaillent ni la formulation ni la stabilité du collyre au gluconate de chlorhexidine recommandé dans la kératite amibienne. Ils n'indiquent que la concentration à utiliser : 0,02%. L'Encyclopédie Médico-chirurgicale (3) ne cite pas dans les traitements de la kératite amibienne le collyre à la chlorhexidine. La partie dédiée à cette pathologie a été rédigée en 1995.

Les données concernant la formulation et la stabilité du collyre ont donc été recherchées dans les publications. Mais lorsque les équipes médicales publient, elles s'intéressent essentiellement aux résultats cliniques. Les formulations utilisées ne sont pas systématiquement décrites. Les conditions de fabrication et les durées de péremption utilisées, ne sont jamais détaillées.

### III.5.1.3. Formulation

#### a) Une formule simple

La formule établie du collyre au gluconate de chlorhexidine est simple. Le risque d'effets indésirables liés aux excipients comme l'hypersensibilité, est donc limité. De même, les problèmes d'approvisionnement, de fabrication et de contrôle sont réduits.

#### b) pH du collyre

Le pH de notre collyre est neutre. Nous n'avons donc pas ajouté de tampon. La formule est donc simplifiée, mais l'ajout d'un tampon aurait peut être été intéressant afin que la solution collyre conserve sa neutralité au contact de l'œil. Nous savons en effet que l'efficacité de la chlorhexidine est maximale à des pH compris entre 5,5 et 7.

#### c) Efficacité antimicrobienne

D'après la Pharmacopée Européenne (34), lorsque les collyres sont conservés en récipients multidoses, un conservateur antimicrobien doit être ajouté à la formulation. Le gluconate de chlorhexidine à 0,02% est utilisé comme conservateur antimicrobien. Nous ne prenons donc pas de risque à ne pas ajouter d'autres agents antimicrobiens dans la formulation. Mais pour être conforme à la Pharmacopée, il reste à vérifier son efficacité antimicrobienne, en collaboration avec le laboratoire de bactériologie.

Lors de l'utilisation du collyre, le patient doit aussi respecter certaines conditions d'hygiène de façon à limiter le risque de contamination. Le compte-gouttes doit être refermé après chaque utilisation. Et lors de la manipulation, aucun contact entre l'extrémité du compte-gouttes et une surface sale, comme l'œil ou les doigts ne doit avoir lieu.

#### d) Essai de stérilité

La stérilité des flacons a été étudiée à l'aide du système de filtration sur membrane de Stéritest® de Millipore. Aucune croissance microbienne n'a eu lieu durant l'étude, mais la méthode n'a pas été validée comme le recommande la Pharmacopée (34). Afin de valider la méthode, il faut vérifier que lorsqu'un inoculum de microorganismes viables est ajouté aux milieux de cultures contenant les membranes utilisées pour filtrer le collyre, une croissance microbienne est mise en évidence. Si aucun développement microbien n'est observé, les membranes ont alors retenu un

composé à activité antimicrobienne, qu'il est nécessaire d'inhiber par dilution ou neutralisation. L'adsorption sur les membranes est très fréquente. Des membranes spécifiques sont mêmes commercialisées pour réaliser la filtration de produits contenant des agents antimicrobiens.

Notre collyre contient pour principe actif un antimicrobien. Le rinçage réalisé après la filtration peut avoir éliminé le principe actif éventuellement adsorbé, mais nous ne l'avons pas vérifié. Sans avoir validé notre méthode de contrôle, nous pouvons seulement conclure qu'aucune croissance microbienne n'a lieu dans nos collyres, et pas à leur stérilité.

D'après l'expérience de l'équipe pharmaceutique de l'Hôpital Hôtel-Dieu à Paris, la validation de l'essai de stérilité est longue et compliquée. Beaucoup de principes actifs sont retenus par les membranes, et la détermination des volumes et des solutés de rinçage est difficile. Une réflexion est en cours avec le laboratoire de bactériologie, pour réaliser la validation de l'essai de stérilité du collyre à la chlorhexidine, dont la méthodologie servira ensuite à la validation des essais de stérilité des autres préparations stériles non stérilisées par autoclavage.

La libération d'un lot de fabrication d'une préparation ne devrait pas être réalisée tant que l'essai de stérilité n'est pas validé. Le risque pris lors de la libération du collyre à la chlorhexidine est limité, car si des germes sont apportés au collyre lors de la fabrication, leur quantité est minime. De plus, le gluconate de chlorhexidine à 200 mg/l est bactéricide. Le nombre de germes apporté lors de l'administration est vraisemblablement très faible.

L'essai de stérilité doit être validé afin de garantir la stérilité de notre collyre mais l'étude de stabilité de l'état stérile, telle que nous l'avons réalisée, n'est pas à refaire. Le procédé de fabrication de fabrication des collyres par filtration stérilisante est validé. Si le test de stérilité est validé de même, et ensuite réalisé sur chaque lot de production conformément à la Pharmacopée, il n'y a aucun risque que la préparation se contamine durant le stockage.

#### **III.5.1.4. Procédé de fabrication**

Les collyres à la chlorhexidine sont fabriqués sous poste de sécurité microbiologique classe A, dans une zone à atmosphère contrôlée classe C selon les BPPrH (39). L'état stérile de la préparation est obtenu par filtration. Ce choix est dicté par les moyens en équipements de la PUI du CHU d'Angers, mais n'est pas conforme aux recommandations des BPPrH (39). En effet, lors de la réalisation d'une préparation stérile à risque microbiologique élevé (selon la définition décrite dans

le paragraphe II.3.5.2.), la préparation doit être réalisée sous PSM classe A dans un environnement classe B. Notre procédé de fabrication a tout de même été validé selon les recommandations de la Pharmacopée Européenne (34) et du Good Manufacturing Practice (71). Cet essai consiste à fabriquer des lots de collyres de formulation type, en utilisant comme véhicule un milieu nutritif. La formulation type est établie à partir des différentes préparations de collyres stérilisés par filtration stérilisante. Si aucune croissance microbienne n'est mise en évidence après 14 jours d'incubation, le procédé de fabrication est validé.

La Pharmacopée Européenne (34) et les BPPrH (39) recommandent d'utiliser, si possible, une méthode de stérilisation terminale, où le collyre est stérilisé dans son conditionnement final. Concernant notre collyre, plusieurs publications (17, 77, 78) nous ont conduit à choisir le moyen de filtration stérilisante pour la préparation de notre collyre, mais le *Martindale* (48) indique que les solutions diluées de chlorhexidine peuvent être autoclavées. Afin de statuer, il aurait été nécessaire de vérifier les propriétés et la stabilité des collyres autoclavés. Nous aurions pu lors de l'étude de stabilité, fabriquer des lots selon les 2 modes d'obtention de l'état stérile, une moitié des lots de collyres autoclavés, et l'autre moitié des lots de collyres filtrés. La fabrication puis les mesures d'osmolarité, de pH et surtout de concentration auraient pris par contre plus de temps.

### **III.5.1.5. Validation de dosage et étude de stabilité**

#### **a) Une collaboration nécessaire**

La réalisation des contrôles et de l'étude de stabilité nécessite d'avoir à disposition l'équipement nécessaire et le personnel formé. Afin de mener notre étude de stabilité, la collaboration avec différents services du CHU a été utile : le laboratoire de biochimie pour la mesure de l'osmolarité, le laboratoire de pharmacologie pour la mise au point et le dosage de la chlorhexidine et la mesure du pH. La faculté de pharmacie nous avait de même mis à disposition un pHmètre et un osmomètre durant la première étude de stabilité.

Ces moyens mis à disposition ne sont pas toujours conformes aux recommandations ou optimums. La PUI du CHU d'Angers s'équipe donc progressivement en matériel et s'entoure du personnel compétent pour mener à bien les contrôles de plus en plus exigeants demandés par la Pharmacopée (34) et les BPPrH (39).

#### b) Mesure du pH

Le pHmètre utilisé n'est par exemple pas conforme à la Pharmacopée. Il n'est calibré qu'avec une seule solution tampon, alors que la Pharmacopée Européenne recommande d'en utiliser deux (34).

Afin de limiter le risque d'erreur de détermination du pH, le pH de la solution étalon a été choisi à partir de la connaissance du pH du collyre à la chlorhexidine. Une solution étalon à pH = 7 a été utilisée.

#### c) Méthode de dosage

Notre méthode de dosage est spécifique, linéaire et exacte. La spécificité aurait pu être étudiée plus simplement si un système chromatographique avec détecteur à barrettes de diodes avait été disponible.

Notre méthode présente l'intérêt d'être rapide : la préparation des échantillons ne comporte que 2 dilutions, et la durée d'analyse est de 5 minutes. Cette méthode est, de plus, beaucoup plus spécifique que la méthode par spectrométrie UV/Visible que nous aurions utilisé en cas de non mise à disposition d'une HPLC par le laboratoire de pharmacologie-toxicologie.

#### d) Etude de stabilité

L'ICH recommande pour les études de stabilité, d'étudier l'évolution de tous les paramètres susceptibles d'être modifiés au cours du temps, ainsi que tous les paramètres qui garantissent la qualité, la sécurité et l'efficacité du produit. L'évolution de la concentration du principe actif doit être étudiée dans le temps, mais aussi l'évolution de la concentration des produits de dégradation (82-84). Afin de réaliser l'étude en un minimum de temps et avec les moyens à disposition, seule l'étude concernant le principe actif a été réalisée. La quantité de produits de dégradation est alors globalement estimée à partir de l'évolution de la concentration en gluconate de chlorhexidine. Le risque pris est minime dans notre cas car les produits de dégradation sont connus, et toxiques qu'à de fortes concentrations.

### III.5.2. L'évolution des recommandations nécessaire

La problématique de production à l'hôpital est différente de la production industrielle. Le développement d'une nouvelle spécialité médicamenteuse dure en effet plusieurs années pendant lesquelles l'efficacité, la qualité et la sécurité du médicament, sont étudiées. En Europe, ces études sont réalisées à l'aide des recommandations et exigences scientifiques, techniques et réglementaires de l'ICH et des Pharmacopées nationales, européenne ou internationale. L'ICH, qui rassemble les trois principales régions du monde impliquées dans le développement des nouveaux médicaments (l'Union Européenne, les Etats-Unis et le Japon), traite des exigences applicables aux essais analytiques, pharmaco-toxicologiques et cliniques nécessaires à la demande d'AMM, et émet des recommandations sur la présentation du dossier d'AMM. Les Pharmacopées internationales, européennes ou nationales, servent de base aux laboratoires de contrôle des médicaments pour la vérification de la qualité des substances pharmaceutiques et des formes galéniques.

A l'hôpital, la réalisation de préparations n'est pas soumise à autorisation d'une autorité de santé. Concernant l'efficacité et la sécurité de la préparation, aucune étude n'est demandée. Le pharmacien doit lui-même évaluer le rapport bénéfice / risque de la préparation à partir des données de la littérature et de ses connaissances scientifiques. Il est ensuite responsable de la réalisation de cette préparation, avec le prescripteur.

Concernant la qualité des préparations, la réglementation est plus étoffée. Les préparations doivent être réalisées selon les exigences de la Pharmacopée Française et Européenne, des BPPH et des BPPrH (34, 39, 70). Aucune recommandation n'existe par contre pour aider les pharmaciens hospitaliers à la validation des méthodes d'analyse nécessaires aux contrôles, ou à la détermination de la péremption des préparations. Afin de produire un médicament de qualité, le pharmacien hospitalier a donc intérêt à tenir compte des recommandations de l'ICH (80-84).

Les recommandations de l'ICH sont très complètes et difficiles à adapter à la production hospitalière. Le pharmacien doit alors suivre les grandes lignes et faire des compromis selon les moyens matériels et humains à disposition. En effet, suivre les recommandations demande des moyens en temps, en personnel et en équipements que n'ont pas les hôpitaux. Les recommandations de l'ICH pour la validation des méthodes d'analyse du principe actif seul ou dans sa forme galénique peuvent être suivies (80, 81). Par contre, les recommandations de l'ICH concernant les études de stabilité sont inadaptées (82-84). Elles sont faites pour déterminer des durées de péremption de plusieurs années, pour des lots de production d'une autre échelle de grandeur qu'à l'hôpital et avec des moyens matériels et humains que ne dispose pas l'hôpital. L'ICH recommande

par exemple d'étudier la stabilité des médicaments dans des conditions d'humidité et de température définies. Certaines conditions fixées correspondent à des études de vieillissement accéléré, d'autres aux conditions prévisibles de conservation du médicament.

Mais une évolution de la réglementation autour des préparations à l'hôpital est prévisible et a d'ailleurs commencé. La loi du 1<sup>er</sup> juillet 1998 a défini l'obligation de déclarer à l'AFSSAPS, toutes préparations hospitalières fabriquées au sein des PUI. Les objectifs de cette déclaration semblent être de vérifier le rapport bénéfice / risque des préparations hospitalières et ainsi sécuriser leur utilisation. L'interdiction de certaines préparations, dont le rapport bénéfice / risque n'est pas favorable, est probable.

## IV. CONCLUSION

La réalisation de cette étude a été très formatrice et a permis de faire évoluer plusieurs points dans la réalisation des collyres au CHU d'Angers. Depuis l'étude, les collyres sont réalisés dans des flacons en verre de type I et le procédé de fabrication des collyres par filtration stérilisante est validé. La réalisation de la validation des essais de stérilité est en cours de réflexion aux laboratoires de contrôle de la pharmacie et laboratoire de bactériologie, et sera prochainement réalisé. La méthodologie pour la réalisation des études de stabilité est connue. La mise en place d'une nouvelle étude de stabilité pour la réalisation de nouveaux collyres, comme les collyres d'antibiotiques dits « renforcés », sera plus rapide.

La réalisation de préparations à l'hôpital est une activité très intéressante et valorisante. Elle est en partie liée à l'absence d'investissement par les laboratoires pharmaceutiques, pour la fabrication de médicaments destinés à traiter des pathologies rares. Mais les moyens à disposition de l'hôpital sont moindres. Les médicaments produits à l'hôpital n'ont pas les mêmes garanties en terme de qualité, de sécurité et d'efficacité que les spécialités pharmaceutiques qui ont une AMM.

Selon l'AFSSAPS, la déclaration obligatoire des préparations hospitalières a pour objectif d'identifier les alternatives disponibles aux préparations et d'identifier les préparations indispensables, puis de rechercher des moyens de les orienter vers le processus d'AMM. Pour la réalisation de préparations comme le collyre à la chlorhexidine, qui est peut être classé dans les préparations hospitalières par certains hôpitaux, il est peu probable que des industries pharmaceutiques soient intéressées à le commercialiser. Ce type de préparation sera vraisemblablement toujours produit dans les pharmacies à Usage Intérieur. Ces PUI doivent donc acquérir les moyens de développer et de déterminer les péremptions de ces préparations, afin de garantir leur qualité.

Comme en témoigne les nombreuses questions posées sur la messagerie électronique intra-professionnelle des pharmaciens hospitaliers, la réalisation de nouvelles préparations et la détermination de leur péremption posent beaucoup de difficultés aux équipes pharmaceutiques. Lors de la réalisation de telles études dans un établissement de santé, il serait nécessaire de mettre à profit les données obtenues aux autres équipes pharmaceutiques. Les résultats pourraient être rendus accessibles au moyen d'un site Internet tel celui développé par l'Association pour le Développement de l'Internet en Pharmacie Hospitalière (ADIPH) ou celui de l'AFSSAPS. L'AFSSAPS pourrait, en effet en plus de répertorier les formulations et les indications des préparations hospitalières, compiler, analyser et valider les données de stabilité, afin de les diffuser aux pharmaciens hospitaliers.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Schuster FL, Visvesvara GS. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *Int J Parasitol* 2004;34(9):1001-27.
2. Braunwald E, Fauci A, Kasper S, Hauser S, Longo D, Jameson J. Harrison. Principes de Médecine Interne. 15ème ed. Paris; 2002.
3. Encyclopédie Médico-chirurgicale. Elsevier ed; 1995.
4. Niederkorn J. The pathogenesis of Acanthamoeba keratitis. 1999.
5. Creisson G, Salame N, Delbosc B. Kératites interstitielles. *EMC - Ophtalmologie* 2004;1(2):89-101.
6. Offret H, Labetoulle M, Fran E. Thérapeutiques médicamenteuses en ophtalmologie. Paris; 2003.
7. De Jonckheere JF. Epidemiological typing of Acanthamoeba strains isolated from keratitis cases in Belgium. *Bull Soc Belge Ophtalmol* 2003(287):27-33.
8. Khan NA. Pathogenesis of Acanthamoeba infections. *Microb Pathog* 2003;34(6):277-85.
9. Marciano-Cabral F, Cabral G. Acanthamoeba spp. as agents of disease in humans. *Clin Microbiol Rev* 2003;16(2):273-307.
10. Mougeot G. Infections à protozoaires et environnement. *Revue Francaise des Laboratoires* 2001;2001(336):25-31.
11. Illingworth CD, Cook SD. Acanthamoeba keratitis. *Surv Ophthalmol* 1998;42(6):493-508.
12. Carrette S, Marechal-Courtois C, Hernandez J, Hayette MP, Deprez M, Duchesne B. [Report of a case of Acanthamoeba keratitis]. *Bull Soc Belge Ophtalmol* 2000;275:49-53.
13. Radford CF, Minassian DC, Dart JK. Acanthamoeba keratitis in England and Wales: incidence, outcome, and risk factors. *Br J Ophthalmol* 2002;86(5):536-42.
14. Kilvington S, Gray T, Dart J, Morlet N, Beeching JR, Frazer DG, et al. Acanthamoeba keratitis: the role of domestic tap water contamination in the United Kingdom. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45(1):165-9.
15. Radford CF, Lehmann OJ, Dart JK. Acanthamoeba keratitis: multicentre survey in England 1992-6. National Acanthamoeba Keratitis Study Group. *Br J Ophthalmol* 1998;82(12):1387-92.
16. Seal DV. Acanthamoeba keratitis. *Bmj* 1994;308(6937):1116-7.
17. Van Ooteghem M. Préparations ophtalmiques. Paris: Lavoisier; 1995.
18. Flament J. Ophtalmologie. Pathologie du système visuel. MASSON ed. Vélizy-Villacoublay; 2002.
19. Pitié-Salpêtrière UPVPeMCFdM. Enseignement d'ophtalmologie. In: Collège des Ophtalmologistes Universitaires de France; 2004.

20. Centre Hospitalier d'Antibes. Coupe de l'oeil. In: <http://www.ch-antibes.fr/dons/greffe.htm>; 2004.
21. Coupe de la cornée. <http://www.sci.u-szeged.hu/zoolcell/histo/kottam/kottam0.html>.
22. Alizadeh H, Pidherney MS, McCulley JP, Niederkorn JY. Apoptosis as a mechanism of cytolysis of tumor cells by a pathogenic free-living amoeba. *Infect Immun* 1994;62(4):1298-303.
23. Caburet A. La kératite amibienne. Besançon: Faculté de médecine et de pharmacie de Besançon; 1995.
24. Les kératites herpétiques. *Prescrire* 2003;244(23):770-772.
25. Claerhout I, Goegebuer A, Van Den Broecke C, Kestelyn P. Delay in diagnosis and outcome of Acanthamoeba keratitis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2004;242(8):648-53.
26. Bourges JL. Anneau cornéen correspondant à la réaction immunitaire. In: <http://www.snof.org/maladies/amibes.html>; 2004.
27. Perez-Santonja JJ, Kilvington S, Hughes R, Tufail A, Matheson M, Dart JK. Persistently culture positive acanthamoeba keratitis: in vivo resistance and in vitro sensitivity. *Ophthalmology* 2003;110(8):1593-600.
28. Duguid IG, Dart JK, Morlet N, Allan BD, Matheson M, Ficker L, et al. Outcome of acanthamoeba keratitis treated with polyhexamethyl biguanide and propamidine. *Ophthalmology* 1997;104(10):1587-92.
29. Hargrave SL, McCulley JP, Hussein Z. Results of a trial of combined propamidine isethionate and neomycin therapy for Acanthamoeba keratitis. Brolene Study Group. *Ophthalmology* 1999;106(5):952-7.
30. Schuster FL, Visvesvara GS. Opportunistic amoebae: challenges in prophylaxis and treatment. *Drug Resist Updat* 2004;7(1):41-51.
31. Murdoch D, Gray TB, Cursons R, Parr D. Acanthamoeba keratitis in New Zealand, including two cases with in vivo resistance to polyhexamethylene biguanide. *Aust N Z J Ophthalmol* 1998;26(3):231-6.
32. Kilvington S. Chemotherapy for acanthamoeba keratitis. *Lancet* 1995;345(8952):392.
33. Elder MJ, Dart JK. Chemotherapy for acanthamoeba keratitis. *Lancet* 1995;345(8952):791-2; author reply 792-3.
34. Pharmacopée Européenne. 5ème ed. Ligugé: Direction de la Qualité du Médicament du Conseil de l'Europe; 2004.
35. Seal DV, Hay J, Kirkness CM. Chlorhexidine or polyhexamethylene biguanide for acanthamoeba keratitis. *Lancet* 1995;345(8942):136.
36. Seal D, Hay J, Kirkness C, Morrell A, Booth A, Tullo A, et al. Successful medical therapy of Acanthamoeba keratitis with topical chlorhexidine and propamidine. *Eye* 1996;10 ( Pt 4):413-21.
37. Kosrirukvongs P, Wanachiwanawin D, Visvesvara GS. Treatment of acanthamoeba keratitis with chlorhexidine. *Ophthalmology* 1999;106(4):798-802.

38. Kitagawa K, Nakamura T, Takahashi N, Oikawa Y, Ikeda T. A novel combination treatment of chlorhexidine gluconate, natamycin (pimaricin) and debridement for a *Acanthamoeba* keratitis. *Jpn J Ophthalmol* 2003;47(6):616-7.
39. AFSSAPS. Bonnes Pratiques de Préparation à l'Hôpital (soumis à enquête publique). Paris; 2002.
40. Walochnik J, Duchene M, Seifert K, Obwaller A, Hottkowitz T, Wiedermann G, et al. Cytotoxic activities of alkylphosphocholines against clinical isolates of *Acanthamoeba* spp. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46(3):695-701.
41. McClellan K, Howard K, Niederkorn JY, Alizadeh H. Effect of steroids on *Acanthamoeba* cysts and trophozoites. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42(12):2885-93.
42. Kumar R, Lloyd D. Recent advances in the treatment of *Acanthamoeba* keratitis. *Clin Infect Dis* 2002;35(4):434-41.
43. Hiti K, Walochnik J, Faschinger C, Haller-Schober EM, Aspöck H. One- and two-step hydrogen peroxide contact lens disinfection solutions against *Acanthamoeba*: How effective are they? *Eye* 2004.
44. Hiti K, Walochnik J, Haller-Schober EM, Faschinger C, Aspöck H. Viability of *Acanthamoeba* after exposure to a multipurpose disinfecting contact lens solution and two hydrogen peroxide systems. *Br J Ophthalmol* 2002;86(2):144-6.
45. Beattie TK, Seal DV, Tomlinson A, McFadyen AK, Grimason AM. Determination of amoebicidal activities of multipurpose contact lens solutions by using a most probable number enumeration technique. *J Clin Microbiol* 2003;41(7):2992-3000.
46. Moffat A, Osselton D, Widdop B. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons. 3ème édition ed. London: Pharmaceutical Press; 2004.
47. The Merck index. An encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. 12ème ed: Merck Research Laboratories; 1996.
48. Martindale : The complete drug reference. BPharm, MRPharmS ed. London: Pharmaceutical Press; 2004.
49. Dauphin A, Mazin C. Les antiseptiques et les désinfectants. ARNETTE ed. Paris; 1994.
50. Fleurette J, Freney J, Reverdy ME. Antisepsie et Désinfection. ESKA ed. Paris; 1995.
51. Fleurette J, Freney J, Reverdy ME, Tissot-Guerraz E. Guide pratique de l'antisepsie et de la désinfection. ESKA ed. Paris; 1997.
52. Postaire E. Les matières plastiques à usage pharmaceutique. Edition Médicales Internationales ed. Paris; 1991.
53. Ha Y, Cheung AP. New stability-indicating high performance liquid chromatography assay and proposed hydrolytic pathways of chlorhexidine. *J Pharm Biomed Anal* 1996;14(8-10):1327-34.
54. Revelle LK, Doub WH, Wilson RT, Harris MH, Rutter AM. Identification and isolation of chlorhexidine digluconate impurities. *Pharm Res* 1993;10(12):1777-84.

55. Rouessac F, Rouessac A. *Analyse chimique Methodes et techniques instrumentales modernes*. Dunod ed. Paris; 2000.
56. Khunkitti W, Hann AC, Lloyd D, Furr JR, Russell AD. Biguanide-induced changes in *Acanthamoeba castellanii*: an electron microscopic study. *J Appl Microbiol* 1998;84(1):53-62.
57. Seal DV, Hay J, Wright P, Kirkness CM. In vitro sensitivity testing for alternate therapy in resistant strains of *acanthamoeba*. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993:979.
58. Elder MJ, Kilvington S, Dart JK. A clinicopathologic study of in vitro sensitivity testing and *Acanthamoeba keratitis*. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994;35(3):1059-64.
59. Tirado-Angel J, Gabriel MM, Wilson LA, Ahearn DG. Effects of polyhexamethylene biguanide and chlorhexidine on four species of *Acanthamoeba* in vitro. *Curr Eye Res* 1996;15(2):225-8.
60. Murthy S, Hawksworth NR, Cree I. Progressive ulcerative keratitis related to the use of topical chlorhexidine gluconate (0.02%). *Cornea* 2002;21(2):237-9.
61. Tabor E, Bostwick DC, Evans CC. Corneal damage due to eye contact with chlorhexidine gluconate. *Jama* 1989;261(4):557-8.
62. Anders N, Wollensak J. Inadvertent use of chlorhexidine instead of balanced salt solution for intraocular irrigation. *J Cataract Refract Surg* 1997;23(6):959-62.
63. Klebe S, Anders N, Wollensak J. Inadvertent use of chlorhexidine as intraocular irrigation solution. *J Cataract Refract Surg* 1998;24(6):729-30.
64. Cheung AP, Mavar R, Carlson C, Chiang WK. Problems affecting the liquid chromatographic quantitation of chlorhexidine digluconate in ophthalmic solutions. *J Pharm Biomed Anal* 1991;9(1):41-5.
65. Pesonen T, Holmalahti J, Pohjola J. Determination of chlorhexidine in saliva using high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Appl* 1995;665(1):222-5.
66. Marengo E, Gianotti V, Angioi S, Gennaro MC. Optimization by experimental design and artificial neural networks of the ion-interaction reversed-phase liquid chromatographic separation of twenty cosmetic preservatives. *J Chromatogr A* 2004;1029(1-2):57-65.
67. Gavlick WK, Davis PK. Gas chromatographic determination of p-chloroaniline in a chlorhexidine digluconate-containing alcohol foam surgical scrub product. *J AOAC Int* 1994;77(3):583-6.
68. Miribel L, Brazier JL, Comet F, Lecompte D. Gas-liquid chromatographic determination of chlorhexidine in pharmaceutical formulations. *J Chromatogr* 1983;268(2):321-8.
69. Ministère de l'Emploi et de la Solidarité. Décret n°2000-1316 du 26 décembre 2000 relatif aux pharmacies à usage intérieur et modifiant le code de la santé publique. *Journal officiel de la République Française* 2000;302:20954.
70. Ministère de l'Emploi et de la Solidarité. Ministère délégué à la Santé. *Bonnes Pratiques de Pharmacie Hospitalière*. 1ère édition ed. Paris: DHOS; 2001.
71. European Commission. *Good manufacturing practice*. Brussels; 2003.

72. Le Hir A. Pharmacie galénique. Bonnes pratiques de fabrication des médicaments. MASSON ed. Paris; 2001.
73. [www.legifrance.gouv.fr](http://www.legifrance.gouv.fr). Article L5138-3 du Code de la Santé Publique. Chapitre VIII : Matières premières à usage pharmaceutique.
74. Gonzales Ponsjoan S, Goethals M, Acosta Artilles P, Cabrera Franquis F, Del Rio Lozano I, Diez del Pino A. Stability of 0,02% chlorhexidine digluconate ophtalmic solution by high performance liquid chromatography and UV spectrophotometry. EJHP 2003;4.
75. Dictionnaire VIDAL. 80ème ed. Issy les moulineaux; 2005.
76. Gie SIPS. Theriaque Banque de données sur le médicament. [www.theriaque.org](http://www.theriaque.org).
77. Jaminet F, Delattre L, Delporte JP, Moes A. [Effect of temperature of sterilization and of pH on stability of chlorhexidine in solution]. Pharm Acta Helv 1970;45(1):60-3.
78. Dolby J, Gunnarsson B, Kronberg L, Wikner H. Stability of chlorhexidine when autoclaving. Pharm Acta Helv 1972;47(10):615-20.
79. Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques. Guide de validation analytique. Rapport d'une commission SFSTP. Méthodologie. STP Pharma Pratiques 1992;2(4):205-226.
80. International Conference on Harmonisation. Guideline for Industry Q2A. Text on Validation of Analytical Procedures. 1995.
81. International Conference on Harmonisation. Guidance for Industry Q2B. Validation of Analytical Procedures : méthodology. 1996.
82. International Conference on Harmonisation. Guidance for Industry Q1A Stability Testing of New Drug Substances and Products. 2004.
83. International Conference on Harmonisation. Guidance for Industry Q1E Evaluation of Stability Data. 2004.
84. International Conference on Harmonisation. Specifications : Test Procedures and Acceptance Criteria for New Drug Substances and New Drug products: Chemical substances Q6A. 1999.
85. Newton DW, Miller KW. Estimating shelf-life of drugs in solution. Am J Hosp Pharm 1987;44(7):1633-40.
86. Centre Régional d'Information sur le Médicament CHU Rennes. Dates limites d'utilisation des médicaments. Bulletin d'information du médicament et de pharmacovigilance 1998;80.

## **ANNEXES**

Annexe 1 : Protocole de fabrication du collyre au gluconate de chlorhexidine

Annexe 2 : Spectres UV du gluconate de chlorhexidine et du gluconate de potassium

Annexe 3 : Boîtes à moustaches des données de l'étude de linéarité

Annexe 4 : Boîtes à moustaches des données de l'étude de fidélité

Annexe 5 : Gamme "chlorhexidine dans sa forme reconstituée" obtenue à J0 de l'étude de stabilité

Annexe 6 : Résultats bruts des concentrations mesurées durant l'étude de stabilité

Annexe 7 : Résultats bruts des pH mesurés durant l'étude de stabilité

Annexe 8 : Résultats bruts des osmolarités mesurées durant l'étude de stabilité

Annexe A : Signatures



## PREPARATION SOUS HOTTE :

### **1<sup>ère</sup> ETAPE**

- Peser dans une cupule stérile 3,94 g de gluconate de potassium sur la balance Centorius
- Mettre la poudre dans le bécher de 250 ml (sous la hotte)
- Ajouter 100 ml d'eau stérile à l'aide de la seringue de 50 ml
- Agiter à l'agitateur jusqu'à obtention d'une solution limpide

### **2<sup>ème</sup> ETAPE**

- Prélever 0,12 ml de chlorhexidine à l'aide de la seringue de 1 ml
- Transférer les 0,12 ml de chlorhexidine dans une seringue de 12 ml
- Faire q.s.p. 12 ml avec de l'eau stérile prélevée dans le flacon de 20 ml
- Mettre un obturateur universel et homogénéiser

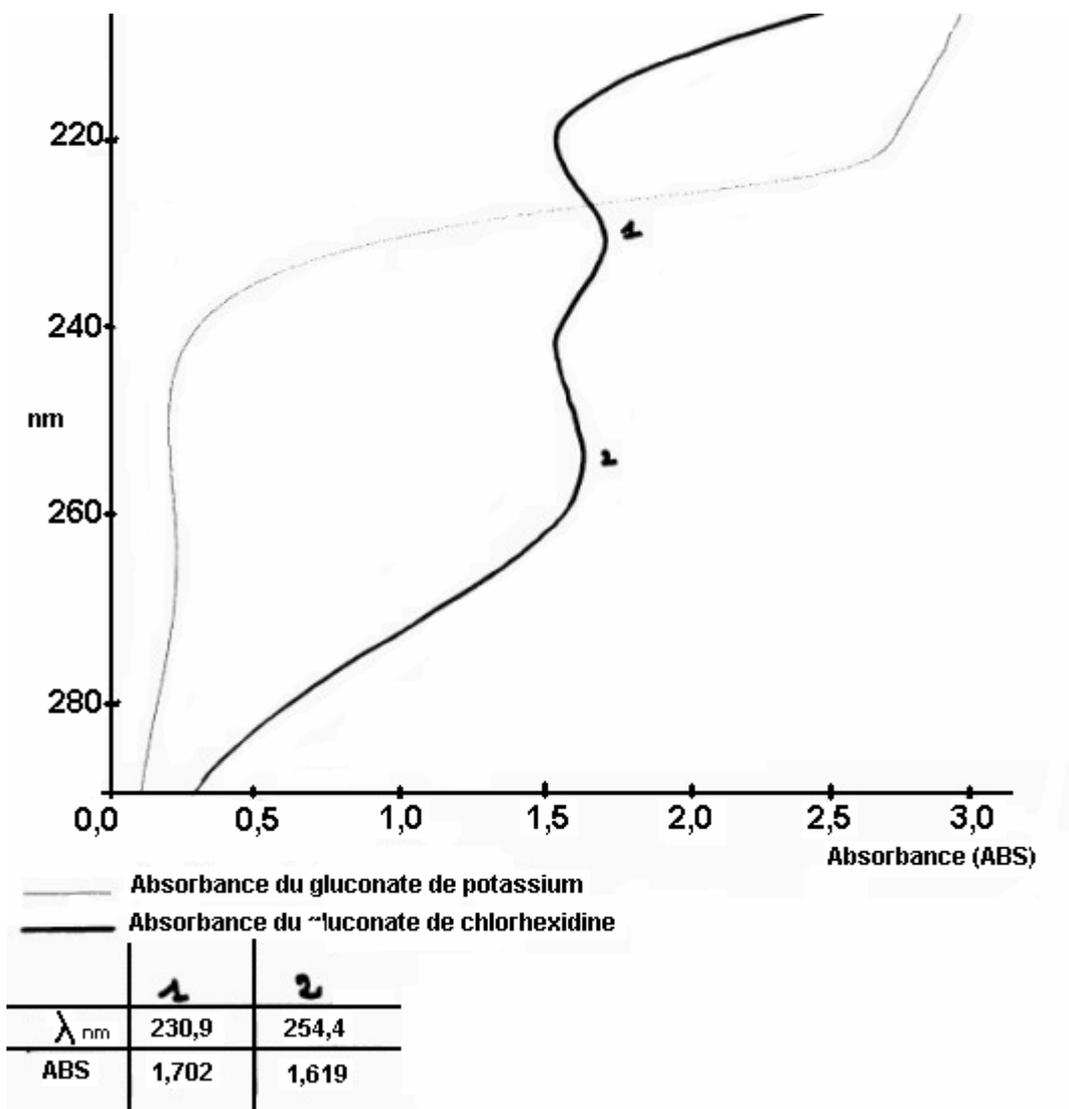
### **3<sup>ème</sup> ETAPE**

- Transférer 5,6 ml de solution de chlorhexidine 0,2 % (faite à l'étape 2) dans une seringue de 60 ml
- Faire q.s.p. 56 ml avec la solution de gluconate de potassium (faite à l'étape 1)
- Mettre un obturateur universel et homogénéiser
- Retirer l'obturateur et poser un filtre stérile à 0,22 µm
- Répartir la solution dans 7 flacons : 8 ml par flacon. De 56 à 48, 48 à 40, 40 à 32, 32 à 24, 24 à 16, 16 à 8, 8 à 0 ml
- Boucher les flacons avec les bouchons caoutchouc
- Poser les capsules aluminium dessus
- En dehors de la hotte sertir les flacons à l'aide de la pince à sertir
- Etiqueter

Si une 2de série doit être réalisée, répéter l'étape 3 en utilisant le reste de solution de chlorhexidine 0,2% faite à l'étape 2

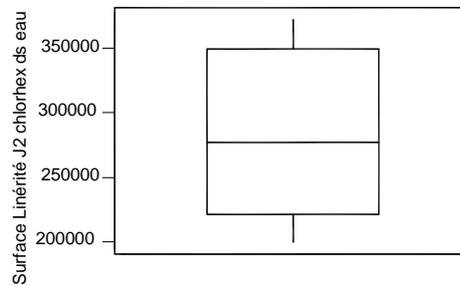
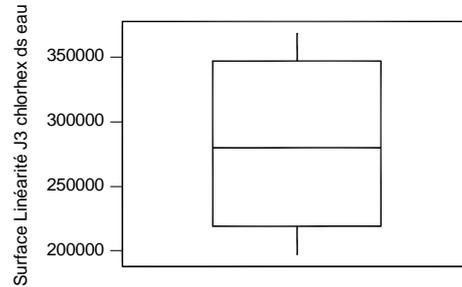
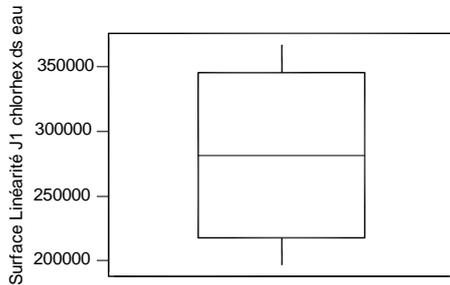
- Une fois terminé, enlever tout le matériel de la hotte
- Nettoyer la hotte et les surfaces avec l'Anios détergent, désinfectant surfaces hautes selon protocole
- Fermer la hotte et la laisser en veille

**Annexe 2 : spectre d'absorbance du gluconate de potassium et du gluconate de chlorhexidine**

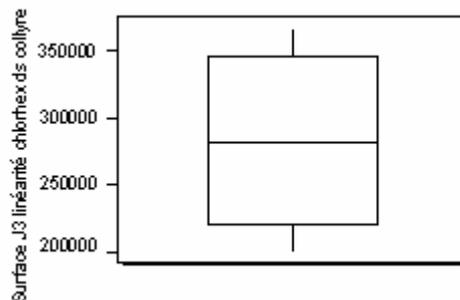
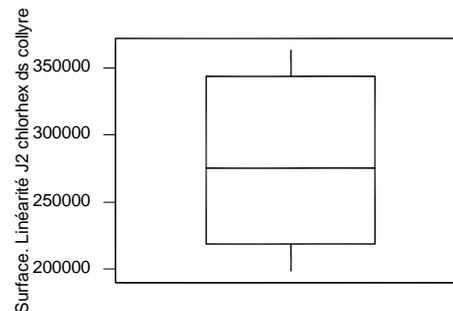
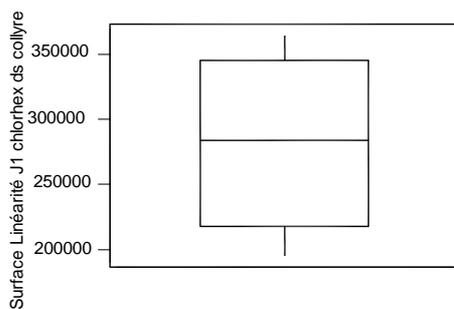


### Annexe 3 : vérification de la distribution gaussienne des données de l'étude de linéarité

- Boîte à moustache des données de J1, J2 et J3 gamme "chlorhexidine dans eau"

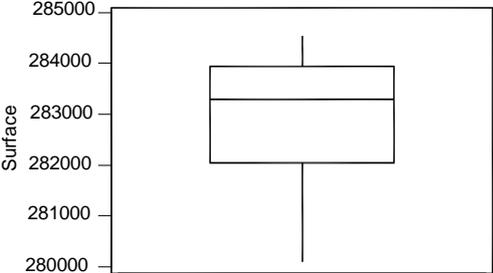


- Boîte à moustache des données de J1, J2 et J3 gamme "chlorhexidine dans sa forme reconstituée"

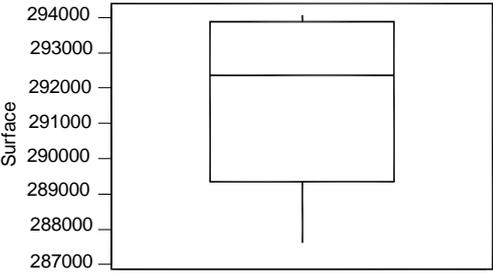


# Annexe 4 : vérification de la distribution gaussienne des données de l'étude de fidélité

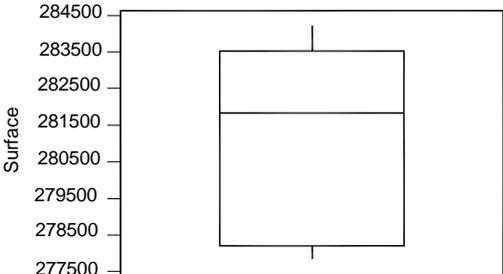
- Boîte à moustache des mesures de J1



- Boîte à moustache des mesures de J2



- Boîte à moustache des mesures de J3



# Annexe 5 : gamme « chlorhexidine dans sa forme reconstituée » réalisée à J0 de l'étude de stabilité

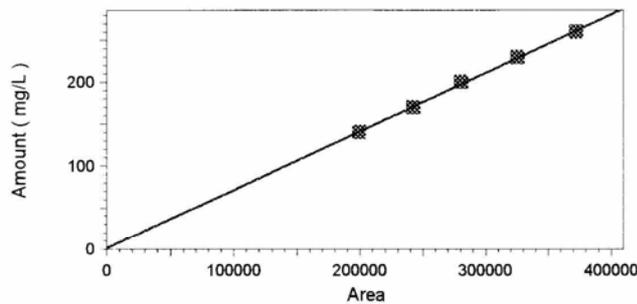
## ChromQuest Calibration Report

Page 1 of 1

Method: C:\ChromQuest\Projects\Routine\Method\chlorhex.met  
 Print Time: 06/06/2005 11:58:38  
 User: sr  
 Instrument: HPLC UV

chlorhexidine (UV1000-254nm)  
 Average RF: 0.000703893 RF StDev: 5.78097e-006 RF %RSD: 0.821286  
 Scaling: None LSQ Weighting: None Force Through Zero: Off  
 Replicate Mode: Replace  
 Fit Type: Linear  
 $y = 0.000698384x + 1.53596$   
 Goodness of fit (r<sup>2</sup>): 0.998713

Peak: chlorhexidine -- ESTD -- UV1000-254nm



	Level 1	Level 2	Level 3	Level 4	Level 5
Amount	140	170	200	230	260
Area	199413	242734	280519	325858	372356
RF	0.000702060	0.00070035512	0.00071296418	0.00070582891	0.0006982565
Last Area	547707522	1243831	4244204	9345236	07213527
Residual	-0.802857	-1.05756	2.55399	0.889948	-1.58352
Rep StDev					
Rep %RSD					
Rep 1 Area	199413	242734	280519	325858	372356
Rep 1 User	sr	sr	sr	sr	sr
Rep 1 Data File	C:\ChromQuest\Projects\Routine\Data\Cal_chlorhex	C:\ChromQuest\Projects\Routine\Data\Cal_chlorhex	C:\ChromQuest\Projects\Routine\Data\Cal_chlorhex	C:\ChromQuest\Projects\Routine\Data\Cal_chlorhex	C:\ChromQuest\Projects\Routine\Data\Cal_chlorhex
	GK050606-001.dat	GK050606-002.dat	GK050606-003.dat	GK050606-004.dat	GK050606-005.dat
Rep 1 Sample ID	chlorhex 140	chlorhex 170	chlorhex 200	chlorhex 230	chlorhex 260
	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l
Rep 1 Calib. Time	06/06/2005 11:10:39	06/06/2005 11:17:20	06/06/2005 11:24:01	06/06/2005 11:30:42	06/06/2005 11:37:22

## Annexe 6 : Résultats bruts « évolution de la concentration en chlorhexidine »

	Concentration (mg/l)			
	lot 1	lot 2	lot 3	lot 4
J0 : 06/06/05	199,0	207,8	204,7	209,7
J0+3 : 09/06/05	197,2	207,5	203,3	209,3
J0+7 : 13/06/05	198,8	202,3	201,1	208,6
J0+14 : 20/06/05	201,7	206,4	202,5	208,1
J7 : 13/06/05	205,1	201,5	204,1	208,3
J7+3 : 16/06/05	203,7	203,4	200,0	209,7
J7+7 : 20/06/05	203,1	206,9	200,2	206,3
J7+14 : 27/06/05	207,8	207,4	198,9	208,0
J14 : 20/06/05	199,5	208,0	202,3	208,7
J14+3 : 23/06/05	207,5	210,9	205,5	211,3
J14+7 : 27/06/05	205,7	210,1	208,3	212,4
J14+14 : 04/07/05	202,7	205,6	206,1	210,9
J21 : 27/06/05	206,2	208,0	206,5	207,2
J21+3 : 30/06/05	198,5	208,8	199,9	204,2
J21+7 : 04/07/05	201,3	207,5	202,2	210,6
J21+14 : 11/07/05	202,8	209,6	208	208,7
J28 : 04/07/05	205,7	210,1	204,7	210,2
J28+3 : 07/07/05	207,0	205,8	203,2	210,2
J28+7 : 11/07/05	207,7	210,0	203,3	213,0
J28+14 : 18/07/05	205,6	208,2	205,9	211,0
J35 : 11/07/05	203,1	203,6	198,5	208,9
J35+4 : 15/07/05	208,2	206,2	200,5	204,1
J35+7 : 18/07/05	202,0	207,8	199,6	202,0
J35+14 : 25/07/05	207,9	211,8	201,7	214,5
J42 : 18/07/05	201,6	210,2	205	209,8
J42+3 : 21/07/05	201,9	211	206,3	211,4
J42+7 : 25/07/05	206,6	210	206,4	212,6
J42+14 : 01/08/05	203,0	208,2	203,9	210,9

C1 : solution contrôle à 150 mg/l

C2 : solution contrôle à 250 mg/l

## Annexe 7 : Résultats bruts « évolution du pH »

Jour	pH		
	Lot 5	Lot 6	lot 7
J0 : 06/06/2005	7,0	7,1	7,1
J0+3 : 09/06/2005	7,0	7,1	7,0
J0+7 : 13/06/2005	7,0	7,0	7,0
J0+14 : 20/06/2005	6,9	7,0	7,0
J7 : 13/06/2005	7,1	7,2	7,1
J7+3 : 16/06/2005	7,0	7,2	7,2
J7+7 : 20/06/2005	7,1	7,2	7,2
J7+14 : 27/06/2005	6,9	7,0	7,0
J14 : 20/06/2005	7,0	7,0	7,0
J14+3 : 23/06/2005	7,1	7,2	7,2
J14+7 : 27/06/2005	7,0	7,1	7,2
J14+14 : 04/07/2005	6,9	7,0	7,1
J21 : 27/06/2005	7,0	7,3	7,1
J21+3 : 30/06/2005	7,1	7,1	7,0
J21+7 : 04/07/2005	6,9	7,0	7,1
J21+14 : 11/07/2005	7,0	7,0	7,1
J28 : 04/07/2005	7,2	7,3	7,4
J28+3 : 07/07/2005	7,0	7,2	7,1
J28+7 : 11/07/2005	7,1	7,2	7,2
J28+14 : 18/07/2005	7,0	7,1	7,1
J35 : 11/07/2005	7,3	7,2	7,4
J35+4 : 15/07/2005	7,1	7,2	7,3
J35+7 : 18/07/2005	7,0	7,2	7,2
J35+14 : 25/07/2005	7,0	7,0	7,0
J42 : 18/07/2005	7,2	7,2	7,2
J42+3 : 21/07/2005	7,2	7,2	7,2
J42+7 : 25/07/2005	7,0	7,0	7,0
J42+14 : 01/08/2005	7,1	7,1	7,0

## Annexe 8 : Résultats bruts « évolution de l'osmolarité »

Jour	Osmolarité (mosmol/l)		
	lot 3'	lot 4'	C
J0 : 06/09/2004	268	268	323
J0+3 : 09/09/2004	267	268	319
J0+7 : 13/09/2004	270	268	321
J0+14 : 20/09/2004	269	269	323
J7 : 13/09/2004	269	266	321
J7+3 : 16/09/2004	268	268	321
J7+7 : 20/09/2004	269	268	323
J7+14 : 27/09/2004	272	269	320
J14 : 20/09/2004	269	267	323
J14+3 : 23/09/2004	269	270	320
J14+7 : 27/09/2004	271	270	320
J14+14 : 04/10/2004	269	262	320
J21 : 27/09/2004	270	269	320
J21+3 : 30/09/2004	271	270	322
J21+7 : 04/10/2004	270	270	320
J21+14 : 11/10/2004	270	269	321
J28 : 04/10/2004	269	269	320
J28+3 : 07/10/2004	270	269	321
J28+7 : 11/10/2004	270	270	321
J28+14 : 18/10/2004	273	272	327
J35 : 11/10/2004	270	269	321
J35+4 : 15/10/2004	270	268	323
J35+7 : 18/10/2004	274	268	327
J35+14 : 25/10/2004	270	270	317
J42 : 18/10/2004	271	270	327
J42+3 : 21/10/2004	269	270	322
J42+7 : 25/10/2004	270	270	317
J42+14 : 01/11/2004	271	271	326

---

**Nom - Prénoms : GAUME Marie, Jacqueline, Catherine**

**Titre de la Thèse :**

**FORMULATION ET ETUDE DE STABILITE D'UN COLLYRE A LA CHLORHEXIDINE POUR  
LE TRAITEMENT DE LA KERATITE AMIBIENNE**

---

**Résumé de la Thèse :**

La kératite amibienne est une infection rare et grave de la cornée, causée par une amibe très répandue dans l'environnement, appartenant au genre *Acanthamoeba*. Un des traitements de première ligne est le collyre au gluconate de chlorhexidine à 0,02%, qui n'existe pas sur le marché. Les pharmaciens du CHU d'Angers ont donc été amenés à réfléchir sur la réalisation de cette préparation.

Une étude bibliographique a été réalisée afin d'étudier l'efficacité, la sécurité puis la faisabilité technique de ce collyre. Aucune formulation n'a été retrouvée dans la littérature qui permette l'utilisation du collyre en ambulatoire. Une étude de formulation puis une étude de stabilité ont donc été réalisées afin de fixer la péremption de la préparation. La mise au point et la validation du dosage de la chlorhexidine par HPLC ont été effectuées dans le même temps.

La formule déterminée est simple. Elle est stable pendant 8 semaines après fabrication, ce qui permet l'utilisation du collyre au gluconate de chlorhexidine en ambulatoire. Le collyre peut de plus être utilisé 14 jours après ouverture du flacon.

La réalisation de ce travail a été l'occasion de s'interroger sur les choix pharmaceutiques à faire lors du développement de préparations sous forme liquide stérile à l'hôpital.

---

**MOTS CLES : Kératite amibienne ; Gluconate de chlorhexidine ; Collyre ; Formulation ;  
Etude de stabilité**

---

**JURY**

**PRESIDENT : M. Yves PEGON, Faculté de Pharmacie de NANTES**

**DIRECTEUR : M. Frédéric LAGARCE, Pharmacie CHU d'ANGERS**

**MEMBRES : Mme Isabelle COCHEREAU, Service d'Ophtalmologie CHU ANGERS**

Mme Anne LE BOUIL, **Laboratoire de Pharmacologie-Toxicologie CHU ANGERS**

Mme Véronique LE PECHEUR, **Pharmacie CHU ANGERS**

Mme Marie-Claire VENIER, **Faculté de Pharmacie d'ANGERS**

---

**Adresse de l'auteur : 31 rue beurepaire 49100 ANGERS  
gaume.marie@caramail.com**