

ANNEE 2004

N°26-2004

MEMOIRE  
DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES DE PHARMACIE INDUSTRIELLE ET BIOMEDICALE

Soutenu devant le Jury Interrégional le 15 Octobre 2004

par

**Elise BOUCHARD épouse BOUSQUET**

Née le 08 décembre 1973 à Lyon (69)

CONFORMEMENT AUX DISPOSITIONS DE L'ARRETE DU 4 OCTOBRE 1988

TIENT LIEU DE

THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

**PREPARATIONS PHARMACEUTIQUES POUR LA  
DECONTAMINATION DIGESTIVE : DOSAGE ET ETUDE DE  
STABILITE DES PRINCIPES ACTIFS DES GELULES  
ADMINISTREES CHEZ LES ADULTES NEUTROPENIQUES.**

Préparations réalisées à la Pharmacie de l'Hôpital Nord, CHU de S<sup>t</sup> Etienne.  
Dosage et étude de stabilité réalisés à la Pharmacie Centrale, Hospices Civils de Lyon.

**JURY**

**Président : Professeur J.F. SABOT**

**Autres membres :**

**Professeur D. CHULIA**

**Professeur D. GUYOTAT**

**Docteur A. TERRIER**

# PLAN

	Pages
INTRODUCTION.....	1
PREMIER CHAPITRE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	2
I. Ecosystème du tube digestif : équilibre et déséquilibre.....	3
I.A. Ecosystème du tube digestif .....	3
I.A.1. Anatomie du tube digestif et sa flore.....	3
I.A.1.1. Organes.....	3
I.A.1.2. Glandes annexes.....	6
I.A.2. Ecosystème intestinal et ses facteurs de régulation.....	8
I.A.2.1. Effet de barrière.....	8
I.A.2.2. Sécrétions digestives.....	8
I.A.2.3. Péristaltisme intestinal.....	9
I.A.2.4. Système immunitaire intestinal.....	9
I.A.2.5. Translocation microbienne.....	9
I.B. Déséquilibre de l'écosystème intestinal.....	10
I.B.1. Causes des infections.....	10
I.B.1.1. Rupture de la barrière intestinale.....	10
I.B.1.2. Neutropénie.....	10
I.B.1.3. Importance de l'inoculum digestif .....	12
I.B.2. Conséquences cliniques.....	13
I.B.2.1. Manifestations cliniques gastro-intestinales.....	13
I.B.2.2. Autres conséquences.....	14
I.B.3. Germes incriminés.....	15
I.B.3.1. Bactéries.....	15
I.B.3.2. Champignons.....	16
I.B.3.3. Virus.....	17

II. Mesures préventives de l'infection d'origine digestive.....	18
II.A. Mesures préventives anti-infectieuses.....	18
II.A.1. Hygiène hospitalière et isolement du malade.....	18
II.A.1.1. Hygiène hospitalière.....	18
II.A.1.2. Isolement du malade.....	19
II.B.2. Décontamination digestive.....	19
II.B.2.1. Définition de la décontamination digestive.....	19
II.B.2.2. Indications.....	20
II.B.2.3. Avantages et inconvénients.....	20
III. Arsenal thérapeutique de la décontamination digestive.....	22
III.A. Amphotéricine B.....	22
III.A.1. Structure chimique.....	22
III.A.2. Propriétés physico-chimiques.....	23
III.A.3. Mécanisme d'action.....	23
III.A.4. Spectre d'action.....	24
III.B. Colistine.....	25
III.B.1. Structure chimique.....	25
III.B.2. Propriétés physico-chimiques.....	25
III.B.3. Mécanisme d'action.....	26
III.B.4. Spectre d'action.....	26
III.C. Gentamicine.....	27
III.C.1. Structure chimique.....	27
III.C.2. Propriétés physico-chimiques.....	27
III.C.3. Mécanisme d'action.....	28
III.C.4. Spectre d'action.....	28
III.D. Vancomycine.....	30
III.D.1. Structure chimique.....	30
III.D.2. Propriétés physico-chimiques.....	30
III.D.3. Mécanisme d'action.....	31
III.D.4. Spectre d'action.....	31
III.E. Associations utilisées.....	32
IV. Techniques de dosage des molécules.....	33
IV.A. Amphotéricine B.....	33
IV.A.1. Méthode microbiologique.....	33
IV.A.2. Electrophorèse capillaire.....	33
IV.A.3. Méthode chromatographique.....	34
IV.B. Colistine.....	35
IV.B.1. Méthode microbiologique.....	35

IV.B.2. Méthode électrophorétique.....	35
IV.B.3. Méthodes chromatographiques.....	35
IV.B.3.1. Chromatographie ionique.....	35
IV.B.3.2. CLHP.....	36
IV.C. Gentamicine.....	37
IV.C.1. Méthode microbiologique.....	37
IV.C.2. Méthodes immunologiques.....	37
IV.C.2.1. ELISA.....	37
IV.C.2.2. EMIT.....	37
IV.C.2.3. FPIA.....	38
IV.C.3. Electrophorèse capillaire.....	38
IV.C.4. Méthode chromatographique.....	39
IV.D. Vancomycine.....	40
IV.D.1. Méthode microbiologique.....	40
IV.D.2. Méthodes immunologiques.....	40
IV.D.2.1. RIA.....	40
IV.D.2.2. EMIT.....	40
IV.D.2.3. FPIA.....	40
IV.D.3. Méthodes électrophorétiques.....	41
IV.D.3.1. Electrophorèse capillaire standard.....	41
IV.D.3.2. MECC.....	41
IV.D.4. CLHP.....	41
DEUXIEME CHAPITRE : Travail personnel.....	42
I. Objectifs du travail personnel.....	43
I.A. Présentation du service d'hématologie de l'Hôpital Nord de S <sup>t</sup> Etienne.....	43
I.B. Objectifs.....	44
II. Matériel et méthodes.....	45
II.A. Description des techniques CLHP.....	45
II.A.1. Dosage de la l'amphotéricine B .....	45
II.A.1.1. Matériel utilisé.....	45
II.A.1.2. Mode opératoire.....	46
II.A.2. Dosage de la colistine.....	48
II.A.2.1. Matériel utilisé.....	48
II.A.2.2. Mode opératoire.....	48
II.A.3. Dosage de la gentamicine .....	51

II.A.3.1. Matériel utilisé.....	51
II.A.3.2. Mode opératoire.....	51
II.A.4. Dosage de vancomycine .....	54
II.A.4.1. Matériel utilisé.....	54
II.A.4.2. Mode opératoire.....	54
II.B. Plan expérimental.....	57
II.B.1. Validation des techniques de séparation CLHP.....	57
II.B.2. Etude de stabilité.....	57
II.B.2.1. Homogénéité de teneur dans le mortier.....	57
II.B.2.2. Dosage dans le temps des constituants des gélules.....	59
III. Résultats.....	60
III.A. Validation des méthodes CLHP.....	60
III.A.1. Linéarité.....	60
III.A.2. Fidélité.....	62
III.B. Etude de stabilité des gélules adultes.....	62
III.B.1. Homogénéité de teneur dans le mortier.....	62
III.B.2. Dosage dans le temps des principes actifs des gélules.....	65
IV. Discussion.....	74
IV.A. Méthodes de dosage.....	74
IV.A.1. Méthode microbiologique.....	74
IV.A.2. Méthodes immunologiques.....	74
IV.A.3. Méthodes électrophorétiques.....	75
IV.A.4. Méthodes chromatographiques.....	75
IV.B. Etude de stabilité.....	76
IV.B.1. Pré-requis à l'interprétation des résultats.....	77
IV.B.2. Interprétation des résultats.....	78
IV.B.2.1. Colistine.....	78
IV.B.2.2. Gentamicine.....	78
IV.C. Améliorations éventuelles à apporter.....	80
IV.C.1. Techniques de dosage de l'amphoréticine B.....	80
IV.C.2. Contrôles pharmacotechniques.....	80
IV.C.3. Fabrication et conservation des gélules.....	81
IV.C.4. Précision des balances.....	81
CONCLUSION.....	83
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	84

---

## TABLEAUX

---

	Pages
<b><u>Tableau I</u></b> : Composition des préparations.....	44
<b><u>Tableau II</u></b> : Fidélité des techniques de dosage pour les quatre molécules.....	62
<b><u>Tableau III</u></b> : Homogénéité de teneur de la colistine dans le mortier avant remplissage.....	63
<b><u>Tableau IV</u></b> : Homogénéité de teneur de la gentamicine dans le mortier avant remplissage.....	64
<b><u>Tableau V</u></b> : Masse des gélules dosées au cours de l'étude de stabilité .....	66
<b><u>Tableau VI</u></b> : Résultats bruts de la masse de colistine et de gentamicine retrouvée par CLHP dans les gélules au cours de l'étude de stabilité.....	67
<b><u>Tableau VII</u></b> : Teneur en colistine des gélules stockées à température ambiante.....	
<b><u>Tableau VIII</u></b> : Teneur en colistine des gélules stockées à +4°C.....	
<b><u>Tableau IX</u></b> : Teneur en colistine des gélules stockées à +40°C.....	
<b><u>Tableau X</u></b> : Teneur en gentamicine des gélules stockées à température ambiante.....	
<b><u>Tableau XI</u></b> : Teneur en gentamicine des gélules stockées à +4°C.....	
<b><u>Tableau XII</u></b> : Teneur en gentamicine des gélules stockées à +40°C.....	

---

## FIGURES

---

	Pages
<b>Figure 1</b> : Le système digestif chez l'homme.....	7
<b>Figure 2</b> : Structure chimique de l'amphotéricine B.....	23
<b>Figure 3</b> : Structures chimiques des polymyxines E <sub>1</sub> et E <sub>2</sub> .....	25
<b>Figure 4</b> : Structures chimiques des gentamicines C <sub>1</sub> , C <sub>1a</sub> et C <sub>2</sub> .....	27
<b>Figure 5</b> : Structure chimique de la vancomycine.....	30
<b>Figure 6</b> : Chromatogramme de l'amphotéricine B et 1-amino-4-nitronaphtalène.....	47
<b>Figure 7</b> : Chromatogramme de la colistine.....	50
<b>Figure 8</b> : Chromatogramme de la gentamicine.....	53
<b>Figure 9</b> : Chromatogramme de la vancomycine.....	55
<b>Figure 10</b> : Linéarité de la technique CHLP pour le dosage de la colistine.....	60
<b>Figure 11</b> : Linéarité de la technique CHLP pour le dosage de la gentamicine.....	60
<b>Figure 12</b> : Linéarité de la technique CHLP pour le dosage de la vancomycine.....	61
<b>Figure 13</b> : Linéarité de la technique CHLP pour le dosage de l'amphotéricine B.....	61
<b>Figure 14</b> : Représentation graphique de l'homogénéité de teneur de la colistine dans le mortier.....	63
<b>Figure 15</b> : Représentation graphique de l'homogénéité de teneur de la gentamicine dans le mortier.....	64
<b>Figure 16</b> : Représentation graphique de la teneur en colistine des gélules stockées à température ambiante.....	
<b>Figure 17</b> : Représentation graphique de la teneur en colistine des gélules stockées à +4°C.....	

**Figure 18** : Représentation graphique de la teneur en colistine des gélules stockées à +40°C.....

**Figure 19** : Représentation graphique de la teneur en gentamicine des gélules stockées à température ambiante.....

**Figure 20** : Représentation graphique de la teneur en gentamicine des gélules stockées à +4°C.....

**Figure 21** : Représentation graphique de la teneur en gentamicine des gélules stockées à +40°C.....



---

## ABREVIATIONS

---

BPPrH	Bonnes Pratiques de Préparations à l'Hôpital (p. )
CHU	Centre Hospitalo-universitaire (p. )
CLHP	Chromatographie Liquide à Haute Performance (p. 38)
CLIN	Comité de lutte contre les infections nosocomiales (p. )
CV	Coefficient de variation (p. )
DDS	Décontamination Digestive Sélective (p. )
ELISA	Enzyme-linked ImmunoSorbent Assay (p. )
EMIT	Enzyme-multiplied immunoassay technique / Dosage immunoenzymatique....(p. 38)
FPIA	Fluorescence Polarization Immuno-Assay / Dosage immunologique par polarisation de fluorescence (p. )
HCL	Hospices Civils de Lyon (p. )
LA	Leucémie Aigüe (p. )
MECC	Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography / Electrophorèse capillaire électrocinétique micellaire (p.34)
PN	Polynucléaires Neutrophiles (p. )
PUI	Pharmacie à Usage Intérieur (p. )
RIA	RadiolImmunoAssay (p. )
TD	Tube Digestif (p. )
UFC	Unité Formant Colonie (p. )
UV	Ultra-Violet (p. )

## INTRODUCTION

Les progrès réalisés depuis une vingtaine d'années dans le traitement des leucémies aigües (LA) et notamment la polychimiothérapie, les allogreffes et les autogreffes, ont permis d'améliorer de façon nette le nombre de rémissions. Mais ce traitement n'est obtenu qu'au prix d'épisodes aplasiques profonds et souvent durables ; la neutropénie souvent atteinte est responsables de la gravité des états infectieux. L'infection est la première cause de mortalité lors du traitement des leucémies aigües. La lutte contre le risque infectieux est devenu un objectif prioritaire, elle réside notamment au niveau de la prévention qui fait appel aux mesures d'hygiène générale concernant les soins apportés au malade, à la qualité de l'environnement et aux mesures médicamenteuses. Celles ci prennent en compte particulièrement la désinfection du nez, de la gorge et du tube digestif. C'est dans ce cadre que la Pharmacie de l'Hôpital Nord du Centre Hospitalo-Universitaire (CHU) de S<sup>t</sup> Etienne a été sollicitée pour préparer des formes pharmaceutiques de décontamination du tube digestif.

De plus en plus, les Pharmacies à Usage Intérieur (PUI) sont amenées à contrôler leurs préparations pharmaceutiques selon les Bonnes Pratiques de Préparations à l'Hôpital (BPPrH). C'est dans ce contexte que le laboratoire de contrôle de la Pharmacie Centrale des Hospices Civils de Lyon s'est engagé à contrôler à la demande de la Pharmacie de l'Hôpital Nord les gélules et le sirop de décontamination digestive.

Dans un premier temps, une revue des méthodes d'analyse des constituants de ces préparations permettra de réaliser une analyse critique puis de choisir celle qui convient le mieux pour le dosage en routine dans le laboratoire de contrôle.

Dans un deuxième temps, nous exposerons les techniques de dosage mises au point pour les quatre molécules (colistine, gentamicine, vancomycine et amphotéricine B) puis l'étude de stabilité réalisée sur les gélules pour adultes, pendant une durée de six mois avec trois modes de conservation différents pour évaluer les modalités de conservation de ces préparations.

***PREMIER CHAPITRE :***

***ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE***

## **I. Ecosystème du tube digestif : équilibre et déséquilibre**

### **I.A. Ecosystème du tube digestif**

On sait que tout le tube digestif, de la cavité buccale jusqu'au rectum, est colonisé par une flore bactérienne et mycosique, mais le rôle de chaque site de colonisation n'est toujours pas élucidé (1).

L'écosystème du tube digestif correspond à l'ensemble de la microflore de la lumière digestive qui vit en symbiose avec son hôte, l'organisme humain. Cette microflore est en état d'équilibre dynamique qualitativement et quantitativement.

Une population de environ  $10^{14}$  micro-organismes peuple le tractus digestif. Nous savons qu'il existe une série d'habitats bactériens confinés dans des espaces anatomiquement définis. Schématiquement, la population bactérienne, peu abondante dans l'estomac et dans l'intestin grêle, croît tout le long du gros intestin. Ainsi, dans l'intestin grêle, les niveaux de population varient de  $10^3$  à  $10^7$  UFC (Unité Formant Colonie) par millilitre (mL) de liquide, alors que dans le colon, ils peuvent s'élever jusqu'à  $10^{11}$  par gramme de matière (2).

#### **I.A.1. Anatomie du tube digestif et sa flore**

La flore du tractus digestif est très diversifiée et fluctuante en fonction des organes le composant, de l'alimentation et des individus.

##### **I.A.1.1. Organes**

Le tube digestif est composé de plusieurs organes décrits ci-dessous par ordre d'avancée du bol alimentaire.

###### ➤ la cavité buccale :

La cavité buccale comprend des habitats bien distincts représentés par les joues, la langue, le palais, les gencives, la plaque dentaire et la salive. Les bactéries présentes sont très polymorphes, aérobies ou anaérobies, avec des taux de  $10^5$  à  $10^7$  par gramme de liquide et appartiennent surtout au genre *Streptococcus* et *Enterobacteriaceae*. L'écosystème buccal est soumis à de très fortes variations en fonction de l'hygiène buccale et de l'alimentation (2).

➤ le pharynx :

Il est composé de l'oropharynx et du laryngopharynx. Il est le passage commun pour les aliments, les liquides et l'air, d'où son nom de carrefour aérodigestif.

➤ l'œsophage :

Il s'étend du pharynx à l'estomac en passant par le diaphragme, il a une longueur d'environ 25 cm,

➤ l'estomac :

L'estomac est en forme de J quand il est rempli, il est situé sur le côté gauche. L'estomac est stérile lorsque son pH est inférieur à 3. La charge microbienne apportée par l'alimentation est rapidement détruite par le pH naturellement acide de l'estomac, la croissance microbienne reprend dès que le pH remonte à 3-4, si bien que la flore gastrique présente des fluctuations en fonction de l'alimentation et du nycthémère.

Les taux normaux ne dépassent pas  $10^4$ - $10^5$  UFC par mL de liquide gastrique. Les espèces les plus fréquemment identifiées sont les plus résistantes au pH acide : *Streptococcus*, *Neisseria*, *Lactobacillus* et levures (2).

➤ l'intestin grêle :

Il comprend trois segments :

- le duodénum, en forme incurvée autour du pancréas, il mesure environ 25 cm de long,
- le jéjunum, qui s'étend du duodénum à l'iléon, il mesure environ 2,5 mètres de long,

Ces deux premiers segments, appelés aussi « intestin proximal » sont peu colonisés par les bactéries. Les prélèvements obtenus à partir du duodénum sont parfois stériles et ne dépassent rarement  $10^4$  ou  $10^5$  UFC/mL. En période post-prandiale, cette population se trouve multipliée par 100 ou 1000 mais diminue rapidement sous l'effet du péristaltisme intestinal. Les bactéries généralement identifiées sont celles de la flore de passage (surtout le Streptocoque), elles sont variables selon l'état nutritionnel de chaque individu. Il ne semble pas que cette flore puisse s'implanter en dehors de cas pathologiques comme l'achlorhydrie ou la dénutrition.

- l'iléon, la partie terminale de l'intestin grêle, il mesure environ 3,5 mètres de long. En période post-prandiale, la population varie entre  $10^3$  et  $10^7$  UFC/mL. Elle représente une flore de transition avec la flore colique, elle est composée pour l'essentiel d'Enterobactéries et d'anaérobies (*Streptococcus* et *Bacteroides*). Deux ou trois heures

après le repas, on observe une baisse quantitative du nombre de germes, liée probablement au péristaltisme intestinal.

On peut rappeler que les bactéries ont une signification clinique que si leur nombre dépasse  $10^7$ - $10^8$  UFC/g. Ceci n'est jamais le cas dans l'intestin grêle, en dehors de circonstances pathologiques particulières que l'on développera ultérieurement (p.12) (2).

➤ le gros intestin :

Il est segmenté en trois grandes parties :

- le caecum, en forme de sac, c'est le premier segment du gros intestin,
- le colon, qui est segmenté par ordre d'avancée du bol alimentaire, en colon ascendant droit, puis en colon transverse, puis en colon gauche descendant, et enfin le colon sigmoïde,
- le rectum, qui s'ouvre à l'extérieur par l'anus.

Le gros intestin est le segment du tube digestif le plus riche en micro-organismes, surtout au niveau du caecum, du colon ascendant droit et du rectum. On admet qu'il contient  $10^9$  à  $10^{11}$  bactéries par gramme de contenu luminal :

- ❖ 99% sont des bactéries anaérobies strictes (*Bacteroides*, *Clostridium*, *Peptostreptococcus*, Bifidobactéries) et aérobies gram négatif comme les enterobactéries,
- ❖ 1% sont des bactéries anaérobies facultatives.

La nature et la quantité des substrats sont différents dans le colon droit et le colon gauche, il en résulte une variation de flore entre ces deux parties du colon, par exemple, le colon gauche contient beaucoup plus de bactéries méthanogènes que le colon droit (2).

La flore des selles :

Le nombre total de bactéries par gramme de selles varie de  $10^9$  à  $10^{11}$  particules donnant naissance à des colonies. Il existe environ une centaine d'espèces bactériennes : sur 100, 60 sont des espèces d'anaérobies strictes et 40 sont des espèces d'anaérobies facultatives.

La flore résidante est appelée flore autochtone. Elle est composée :

- en majorité de *Bactéroïdes* et de *Bifidobacteriums*,
- en minorité d'*Escherichia coli*, de *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus faecium*, Lactobacilles et *Clostridium perfringens*.

La flore inconstante est une flore provenant de l'extérieur, en particulier de la nourriture, qui transite et qui peut parfois s'implanter, c'est la flore allochtone. Elle est composée de ;

- bactéries gram négatif (*Pseudomonas aeruginosa* et entérobactéries)

- des bactéries gram positif (*Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus aureus* et bactéries anaérobies)
- levures : *Candida albicans*.

La figure 1 (p. 7) nous rappelle l'anatomie générale du tube digestif.

### **I.A.1.2. Glandes annexes**

Les organes du tube digestif sont rattachés à des glandes digestives indispensable pour la digestion :

- ❖ les glandes salivaires : trois paires de glandes déversent leurs sécrétions dans la bouche, les glandes parotides, submandibulaires et les petites glandes sublinguales.
- ❖ le foie : il est la plus grosse glande de l'organisme, il est le siège de nombreuses fonctions de métabolisation.
- ❖ la vésicule biliaire : elle renferme la bile qui permet la digestion des aliments gras.
- ❖ le pancréas : il produit un large éventail d'enzymes et synthétise l'insuline et le glucagon (3).

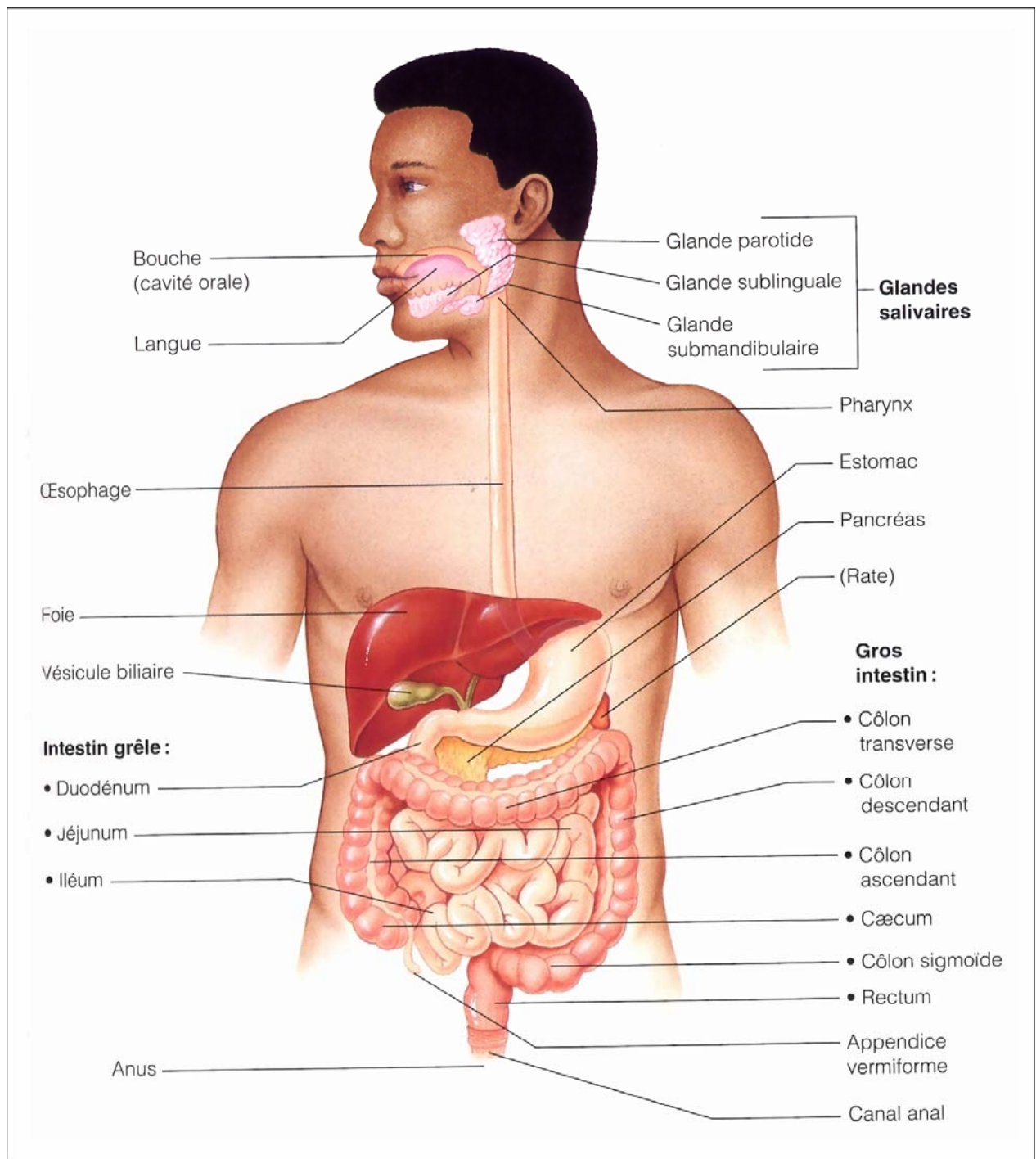


Figure 1 : le système digestif chez l'homme (d'après 12).



## **I.A.2. Ecosystème intestinal et ses facteurs de régulation**

Différents facteurs jouent un rôle important dans l'équilibre de la flore intestinale :

- ❖ l'effet de barrière,
- ❖ les sécrétions digestives,
- ❖ le péristaltisme,
- ❖ le système immunitaire intestinal (ayant une réactivité propre différente de celle du système immunitaire périphérique).

### **I.A.2.1. Effet de barrière**

De nombreuses espèces bactériennes colonisant le Tube Digestif (TD) sont capables de s'opposer à l'implantation et à la multiplication des bactéries exogènes potentiellement pathogènes. Cette capacité de protéger le TD est appelé « effet de barrière » ou « résistance à la colonisation ». La flore de barrière permet l'élimination des bactéries potentiellement dangereuses.

Ces bactéries appartiennent toujours à la flore dominante : *Bacteroides*, *Peptostreptococcus* et *Clostridium*. Elles sont dotées de capacité d'antagonisme qui repose sur une compétition pour les sites d'attachement épithéliaux, sur la production de métabolites toxiques ou de substances telles que des antibiotiques (*Peptostreptococcus*).

L'alimentation, par l'apport de différents substrats, influence l'implantation des espèces pathogènes exogènes, ainsi que le pH intraluminal, le potentiel redox et la motricité digestive.

Le rôle de l'effet de barrière est :

- ✓ de diminuer le nombre des espèces pathogènes,
- ✓ d'inhiber les toxines produites par ces mêmes bactéries.

### **I.A.2.2. Sécrétions digestives**

#### ➤ L'acidité gastrique :

Le suc gastrique a un pouvoir bactéricide pH-dépendant. Lorsque le pH est supérieur à 3, le suc gastrique perd son effet bactéricide. Cet effet est dû simplement à l'acidité.

Dans les conditions physiologiques, une charge bactérienne est détruite en une quinzaine de minutes. Après le repas, l'augmentation du pH ralentit l'effet de « stérilisation » (2).

➤ Le mucus intestinal :

La structure du mucus intestinal, avec sa richesse en radicaux glucidiques, représente pour les bactéries une sorte de piège les empêchant d'accéder à la surface de l'épithélium et d'y adhérer. Le mucus lui-même est balayé par le péristaltisme, ceci permettant d'éliminer les bactéries accumulées en son sein. De plus, le mucus semble se mélanger aux Immunoglobulines A (Ig A) sécrétées et représente donc une barrière immunitaire supplémentaire (2).

### ***I.A.2.3. Péristaltisme intestinal***

Le péristaltisme exerce un effet de balayage qui s'oppose à la pullulation bactérienne. L'intensité du péristaltisme dans le grêle supérieur expliquerait le peu de colonisation et de multiplication bactérienne. L'inverse a été démontré dans l'iléon, le caecum et le colon ascendant où la motricité est moins active.

### ***I.A.2.4. Système immunitaire intestinal***

Les bactéries de la flore intestinale ne doivent pas être considérées comme une masse inerte mais comme des éléments interagissant activement avec l'épithélium et le système immunitaire intestinal. Elles génèrent un stimulus privilégié du système immunitaire intestinal, elles ont par contre peu d'effet sur le système immunitaire périphérique (2). Ce système immunitaire local est indépendant du système immunitaire périphérique.

### ***I.A.2.5. Translocation microbienne***

La translocation bactérienne est définie comme le passage de bactéries à travers la barrière intestinale suivie d'une migration dans les vaisseaux lymphatiques mésentériques. Le phénomène est physiologique et les germes sont parfois retrouvés dans le sang via la veine porte. Toutefois, le phénomène devient pathologique lorsqu'il est consécutif à la pullulation intraluminaire et induit chez certains patients des accidents septicémiques graves.

Les anaérobies strictes comme *Clostridium*, *Fusobacterium* et *Bacteroides* sont capables parfois de translocation mais ce sont les bacilles entériques Gram négatif du tube digestif endogènes (*Escherichia coli*, *Proteus*, *Klebsiella pneumoniae* et *Enterobacter*) qui ont un fort pouvoir de translocation (4), ainsi que le genre *Lactobacillus* (anaérobie préférentiel) est responsable de la majorité des translocations (3).

## ***I.B. Déséquilibre de l'écosystème intestinal***

Nous allons nous intéresser tout particulièrement aux déséquilibres de l'écosystème intestinal chez les patients hospitalisés dans les services d'oncologie et d'Hématologie. Ces déséquilibres provoquent chez ce type de patients des infections variées et souvent graves. L'infection demeure la cause principale de décès des malades en aplasie.

### ***I.B.1. Causes des infections***

#### ***I.B.1.1. Rupture de la barrière intestinale***

##### ➤ La chimiothérapie :

La cause principale de ces infections est la chimiothérapie qui entraîne une altération physique et physiologique de la muqueuse digestive par effet direct cytotoxique. En effet, la muqueuse digestive est très sensible à l'action des agents anticancéreux. Ceux ci sont les premiers responsables de mucites.

L'utilisation de traitements cytotoxiques de plus en plus intensifs entraîne une augmentation du nombre, de la profondeur et de la durée des phases d'aplasie chez un même patient.

##### ➤ L'alimentation parentérale :

Une expérimentation menée chez le rat a montré la possibilité qu'une altération de la barrière intestinale, due à une alimentation parentérale exclusive et à une inactivité de l'intestin, pouvait favoriser la translocation de levures en dehors du tube digestif (5).

Les relations existant entre la dénutrition et la survenue d'une infection sont complexes. La dénutrition apparaît chez le patient cancéreux comme un facteur de risque supplémentaire. Steffen a montré que le processus de translocation bactérienne, entraînant le passage des bactéries dans la circulation sanguine, est facilité par la dénutrition et le déficit immunitaire (4).

#### ***I.B.1.2. Neutropénie***

La neutropénie correspond à un taux de Polynucléaires Neutrophiles circulants inférieur à 1 G /L (calculés lors de l'établissement de la Numération Formule NF à partir d'un prélèvement sanguin). La valeur normale des PN se situe entre 2 et 7,5 G/L les deux sexes confondus.

### ➤ **Profondeur de la neutropénie**

Il est démontré que, plus la profondeur de la neutropénie est importante, plus le patient a des risques de développer une infection : le risque d'infection, significatif au dessous de 1 G/L, se majore considérablement au dessous de 0,5 G/L, et devient maximal pour un taux inférieur à 0,1 G/L (6).

Rappelons que lors des aplasies, les PN peuvent descendre à 0,5 G/L, parfois même à 0,1 G/L et il n'est pas rare d'en observer aucun dans la numération formule (0 G/L) pendant plusieurs jours. Dans le cas des greffes de moelle, la neutropénie est toujours profonde et prolongée et expose les patients à un risque infectieux majeur.

L'utilisation d'antibiotiques à large spectre et en association pour la prophylaxie de ces infections est responsable à long terme d'une neutropénie et d'un déséquilibre de la flore digestive.

Les corticoïdes au long cours sont aussi responsables d'immunodépression. Les macrophages alvéolaires pulmonaires n'exercent plus leur rôle sous l'effet de la cortisone (7). L'infection est due à l'aplasie médullaire provoquée par les traitements immunosuppresseurs (8).

L'infection reste une manifestation clinique intrinsèque aux LA, elle est due à l'inhibition de l'hématopoïèse normale. Les altérations du système immunitaire sont variées selon le type de LA et concernent :

- l'immunité humorale, facilitant ainsi certaines infections bactériennes à Gram négatif et surtout à Gram positif (Streptocoques),
- l'immunité à médiation cellulaire, entraînant des infections par des microorganismes à développement intracellulaires, qui, du fait de leur persistance macrophagique, sont la source d'infections récidivantes et rebelles.
- la fonction phagocytaire, facilitant les infections fongiques : *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*. et *Aspergillus*.

La survenue d'infections graves parasitaires et virales peut être observée :

- infection parasitaire : *Pneumocystis carinii*, Toxoplasmose,
- infection virale : Herpès, Cytomégalovirus (9).

Au cours des déficits immunitaires, certains germes tels *Salmonella* peuvent persister de façon anormale dans le tractus digestif. La présence de *Clostridium difficile* pourrait expliquer la fréquence des colites pseudo-membraneuses au cours des états d'immunodépression (3).

### ➤ **Durée de la neutropénie**

Il a été observé que la répartition des pathogènes est différente selon la durée de la neutropénie. En début d'aplasie, il apparaît plutôt des infections bactériennes ; si l'aplasie dure dans le temps, les infections fongiques vont s'installer majoritairement (10).

Une durée de neutropénie est considérée comme importante lorsque celle-ci dépasse les sept jours, elle peut se trouver dans :

- les déficits congénitaux ou acquis (immunosuppresseurs) des mécanismes effecteurs de l'immunité spécifique et non spécifique, humorale et cellulaire aboutissant à un silence immunologique quasi total,
- la pathologie hématologique sous jacente (leucémie aiguë) qui peut être durable, et qui induit l'inhibition de l'hématopoïèse.

#### **I.B.1.3. Importance de l'inoculum digestif**

Une trop forte colonisation digestive peut provoquer des infections ; différentes situations décrites ci-dessous peuvent augmenter l'inoculum digestif :

- l'hygiène de vie du patient (contamination orofécale),
- l'alimentation souillée par des germes pathogènes ou non : l'équilibre quantitatif et qualitatif de la flore peut être modifié sous l'action d'agents infectieux extérieurs. Ces agents infectieux sont le plus souvent des bactéries mais peuvent être aussi des virus ou des champignons voire même des parasites (6). L'alimentation est à la fois une source digestive et aérienne de contamination aspergillaire. Par exemple, le poivre et le thé sont porteurs d'*Aspergillus sp.* dans 100% des cas, les légumes et les fruits frais contaminés par du compost ou du terreau peuvent véhiculer des spores aspergillaires (11). Des normes permettent d'interdire un aliment si l'analyse révèle plus d'une colonie de champignons filamenteux pour 100 mg d'aliment (7),
- l'augmentation du pH gastrique responsable d'une pullulation bactérienne gastrique,
- la dénutrition responsable d'une pullulation d'entérobactéries et de germes anaérobies au niveau du grêle supérieur, souvent associée au cancer,
- l'altération de la motricité responsable d'une pullulation d'entérobactéries et de germes anaérobies au niveau de l'intestin grêle.

## **I.B.2. Conséquences cliniques**

L'infection est la plus importante cause de morbidité et de mortalité chez le malade atteint d'hémopathie maligne (notamment leucémie aiguë lymphoblastique LAL et leucémie aiguë myeloblastique LAM). L'infection peut commencer au niveau du tube digestif et elle se présente la plupart du temps sous forme de septicémie (avec risque de choc septique) ou de pneumonie.

Certaines infections d'origine digestive contractées par les patients leucémiques neutropéniques sont parfois des infections nosocomiales, c'est à dire contractées à l'Hôpital dans un délai supérieur à 48 heures, elles peuvent résulter aussi de l'état immunologique du patient. L'infection nosocomiale est difficile à définir et à évaluer chez les patients pris en charge en alternance à domicile et en hospitalisation.

### **I.B.2.1. Manifestations cliniques gastro-intestinales**

#### ➤ Les mucites :

Les mucites sont définies par des lésions de la muqueuse digestive, elles sont fréquentes chez le patient neutropénique ; on peut observer des stomatites, pharyngites, gingivites, des oesophagites et des infections gastriques. Parfois on observe une cellulite génito-anale dont les principaux responsables sont le bacille pyocyanique et les germes anaérobies.

Comme nous l'avons dit précédemment, la chimiothérapie est la principale cause des mucites. Toutefois, ces mucites peuvent être provoquées par des agents pathogènes variés : *Herpes virus*, streptocoques, germes anaérobies ou bacilles Gram négatif (9).

#### **Les diarrhées :**

Une diarrhée est signalée chez 5 à 30% des patients traités sous antibiothérapie. Plusieurs types de diarrhée peuvent être rencontrés :

- la diarrhée simple : modérée, aqueuse avec possibilité de douleurs abdominales et de fièvre. Les antibiotiques à large spectre et l'association de plusieurs antibiotiques sont incriminés. Ils provoquent un désordre métabolique dû à la perte de la microflore colique normale (diarrhée osmotique).
- les colites droites hémorragiques : diarrhée sanglante, elle se manifeste aussi par des douleurs sans fièvre. L'ampicilline et les céphalosporines sont responsables de ces diarrhées. Elles sont dues à une prolifération anormale de *Klebsiella oxytoca*, germe présent en minorité dans la lumière digestive (3).

- les colites pseudo-membraneuses : toutes les familles d'antibiotiques sont responsables de ces colites, en particulier les antibiotiques actifs sur les anaérobies, sauf les macrolides. Certains facteurs tel l'immunodépression favorisent ces colites. L'affection est rapportée à *Clostridium difficile* qui est une bactérie anaérobie stricte. Les diarrhées sont vertes et les douleurs, quasi constantes, sont accompagnées parfois de météorismes importants.

### **I.B.2.2. Autres conséquences**

Ces infections sont graves et se manifestent par des infections urinaires, des septicémies ou des pneumonies à porte d'entrée digestive.

#### **Les infections urinaires :**

Les germes d'origine digestive responsables d'infection urinaire empruntent le plus souvent la voie ascendante à partir de la flore digestive ; l'infection est plus fréquente chez la femme dont l'urètre est plus court.

#### **Les infections pulmonaires :**

L'infection pulmonaire est l'infection la plus fréquente chez le patient cancéreux, aussi bien bactérienne que mycosique. Elle pourrait résulter d'une aspiration accidentelle de sécrétions digestives contaminées par la flore bactérienne intestinale. Bergmans et al. ont montré dans une étude que c'est la colonisation de l'oropharynx qui est responsable des pneumonies chez les malades ayant un respirateur artificiel (12). La contamination se fait par passage des germes de l'œsophage vers la trachée par le carrefour aérodigestif (1).

Cette pneumopathie peut être favorisée par une obstruction locale (cancer du poumon, métastases pulmonaires).

Les pneumopathies à germes Gram négatif sont les plus fréquentes. La plus importante est la pneumopathie à *Klebsiella pneumoniae*. Ce germe est un saprophyte banal de l'intestin, sous l'effet d'une antibiothérapie ou après une cure de chimiothérapie supprimant la flore de barrière, il peut proliférer de façon anormale. Il peut en outre acquérir des plasmides de résistance.

Chez les patients neutropéniques, de nombreux pathogènes peuvent être rencontrés dans l'infection pulmonaire : *Staphylococcus aureus*, bacilles à Gram négatif, *Aspergillus sp.*, *Mucor sp.* (9).

➤ Les bactériémies :

Une bactériémie, comme nous l'avons vu antérieurement, est consécutive à une translocation bactérienne. Elle peut toujours s'avérer mortelle et elle doit toujours être prise au sérieux chez le patient neutropénique.

Une bactériémie traduit la présence de bactéries viables dans le sang. Elle peut engendrer une fièvre ou non. Une fièvre peut être d'origine infectieuse ou non. Quelque soit l'étiologie supposée, toute fièvre survenant chez un patient neutropénique doit être considérée comme d'origine infectieuse.

Les germes responsables d'infections à hémocultures positives chez le patient cancéreux sont :

- dans 60% des cas, des cocci à Gram positif : les Staphylocoques à coagulase négative sont les germes les plus souvent retrouvés et n'entraînent qu'une faible mortalité,
- dans 40% des cas, les bacilles à Gram négatif dont *Escherichia coli* qui est le germe le plus souvent rencontré (9).

### **I.B.3. Germes incriminés**

#### **I.B.3.1 Bactéries**

Les infections les plus fréquentes et les plus graves sont les infections bactériennes.

➤ Les bactéries à Gram négatif :

La majorité des infections sévères chez l'immunodéprimé sont causées par des bactéries Gram négatives aéro-anaérobies facultatives provenant du TD : entérobactéries, *Klebsiella*, *Salmonella* ou *Pseudomonas aeruginosa*. Le réservoir de ces bactéries Gram négatif peut aussi être environnemental (*Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter*).

Les infections à bacilles Gram négatif les plus fréquentes sont les infections urinaires. Ces bacilles sont aussi responsables de bactériémies, pneumopathies, d'infections de plaies opératoires. Chez les entérobactéries, *Escherichia coli* est plus fréquemment rencontré (infections urinaires). Les autres espèces en cause sont : le groupe *Klebsiella*, *Enterobacter* et *Serratia* et les *Proteus* Indole plus. Ces dernières bactéries présentent de nombreuses résistances, aussi bien naturelles qu'acquises. Depuis le début des années 1990, *Klebsiella* puis d'autres entérobactéries ont acquis une résistance transférable (plasmidique) touchant la plupart des béta lactamines (bétalactamase à spectre élargi BLSE) (6).



➤ Les bactéries à Gram positif :

Certains auteurs ont montré qu'une recrudescence des infections à cocci Gram positif (Staphylocoques et Streptocoques) survenait chez les patients traités sous antibioprofylaxie orale (13, 14).

Les staphylocoques sont les bactéries à Gram positif les plus souvent responsables d'infections nosocomiales. Le réservoir de *Staphylococcus aureus* est essentiellement nasal chez le sujet sain. Un portage cutané et anal est souvent associé au portage nasal. Ainsi, la transmission est manuportée et les bactéries peuvent être transmises au patient neutropénique. *Staphylococcus epidermidis* a un rôle croissant dans les infections nosocomiales par transmission manuportée. En France, la prévalence des *Staphylococcus aureus* résistants à la méthicilline (SAMR) est très importante. Ces SAMR sont souvent multirésistants et posent des problèmes de traitement des patients infectés.

Les entérocoques, les corynébactéries et *Clostridium difficile* peut être transmis au sein de services hospitaliers, en particulier en pédiatrie pour *Clostridium difficile* (6).

La survenue de mucite est une porte d'entrée des streptocoques situé en majorité dans l'oropharynx (15, 16).

➤ Les champignons :

Les infections fongiques sont de plus en plus souvent retrouvées chez les patients cancéreux. Leur incidence est élevée chez le patient en aplasie prolongée avec une immunosuppression majeure (leucémie, greffe de moelle).

L'origine des infections fongiques est généralement digestive endogène mais peut aussi provenir de l'air ambiant ou de la nourriture (*Aspergillus* qui est un agent redoutable d'infection chez les neutropéniques).

*Candida albicans* est le plus fréquent des germes de candidoses et est responsable de la majorité des infections fongiques en milieu hospitalier (6). Certaines levures et en particulier *Candida albicans* sont des saprophytes du TD et sont en minorité. Toutefois, *C. albicans* et même *C. tropicalis* peuvent être à l'origine de véritables infections digestives (candidoses oesophagienne et digestive) ou systémiques (par translocation intestinale). La candidose survient le plus souvent chez des patients profondément immunodéprimés.

Des infections à *Fusarium* et *Trichosporum* ont été rapportées (17).

Compte tenu de la gravité potentielle de ces infections fongiques, leur prévention est un problème majeur en oncologie.

➤ Les virus :

L'incidence des infections virales chez le patient cancéreux a également augmenté. Les infections virales sont fréquentes en particulier chez le patient en neutropénie prolongée (6).

Le virus *Herpes simplex* est le virus majoritairement retrouvé chez les neutropéniques, en particulier au cours de traitement d'induction des LA et après greffe de moelle. Les virus d'origine exogène apportés par l'alimentation sont rarement retrouvés tels *Adenovirus*, *Enterovirus*, et plus rarement *Papovirus* et *Paramyxovirus* (18).

## **II. Mesures préventives de l'infection d'origine digestive**

### **II.A. Mesures préventives anti-infectieuses**

La lutte contre les infections est la problématique majeure de la prise en charge des patients neutropéniques dans les services d'Oncologie et d'Hématologie. Les Comités de Lutte contre les Infections Nosocomiales (CLIN) ont développé ou renforcé la politique d'hygiène dans les établissements.

La prévention de l'infection est basée sur deux actions :

- empêcher la transmission des germes de l'environnement au malade (isolement du malade et mesures d'hygiène hospitalière),
- protéger celui-ci de sa propre flore microbienne en réduisant le réservoir (mesures d'hygiène personnelle et décontamination digestive).

Les sites les plus fréquemment colonisés par des germes saprophytes, mais potentiellement source d'infection chez les neutropéniques, sont :

- ✓ les gencives,
- ✓ le parodonte,
- ✓ l'oropharynx,
- ✓ l'œsophage,
- ✓ et l'intestin (6).

#### **II.A.1. Hygiène hospitalière et isolement du malade**

##### **II.A.1.1. Hygiène hospitalière**

Le lavage des mains du personnel hospitalier étant amené à être au contact du malade est le premier pilier du contrôle de l'infection dans les services d'Oncologie et d'Hématologie. Il doit être effectué avant et après tout contact avec le malade.

Les autres principales mesures d'hygiène sont : le port de gants, de surblouses, de masques et l'utilisation d'un matériel propre à chaque malade.

Cette hygiène doit aussi être présente dans l'alimentation ingérée par le malade neutropénique, l'alimentation devant être la plus stérile possible.

Une désinfection du nez et une hygiène bucco-dentaire doivent être réalisées très régulièrement ainsi que des soins cutanés (hygiène corporelle soignée surtout sur les plis, mains, visage et périnée) (19).

### **II.A.1.2. Isolement du malade**

Le principe de l'isolement est de faire respirer au malade un air dénué des germes environnants de l'Hôpital. L'isolement peut se faire de deux façons :

- soit en regroupant dans un même secteur les patients ayant la même bactérie multirésistante : le personnel affecté à ces malades est distinct du personnel des autres malades. Des systèmes de codification ou de pictogrammes sont installés sur la porte de la chambre ou du secteur.
- soit en chambre individuelle. Cet isolement est destiné en particulier au malade recevant une greffe de moelle osseuse. Il est réalisé par le biais de chambres stériles à flux d'air laminaire ou d'isolateur appelé communément « bulle ». L'isolement protecteur par flux laminaire doit être réservé aux neutropénies sévères de plus de deux semaines où son efficacité est indiscutable pour éliminer les spores aériennes d'*Aspergillus* (20). Le sas d'accès à la chambre est en en dépression par rapport à la chambre et en surpression par rapport au couloir (7).

### **II.B.2. Décontamination digestive**

Le programme de décontamination du malade de sa propre flore microbienne comprend plusieurs étapes qu'il est nécessaire de respecter le plus régulièrement possible :

- une décontamination de la peau et des muqueuses du malade par une toilette minutieuse et répétée,
- une décontamination digestive pour éviter sa propre auto-infestation. Nous allons parler tout particulièrement de la décontamination digestive.

#### **II.B.2.1. Définition de la décontamination digestive**

Le concept de base de la décontamination digestive est de prévenir les infections en réduisant le nombre de micro-organismes dans le tube digestif, au niveau de l'oropharynx, de l'estomac et de l'intestin (1). Les molécules utilisées sont souvent celles qui ne passent pas la barrière digestive, certaines molécules absorbables tel le cotrimoxazole (triméthoprime/sulfaméthoxazole) peuvent être utilisées.

La décontamination digestive correspond à deux possibilités selon le spectre d'action des molécules utilisées :

- une décontamination digestive « totale » : administration d'antibiotiques à large spectre en association (gentamicine, vancomycine, tobramycine),

- au début des années 1980, on a montré que les infections documentées étaient dues majoritairement à des bacilles Gram négatif à point de départ digestive. De ce fait est apparue la décontamination digestive « sélective » DDS ou « partielle » : administration d'antibiotiques à spectre moins large qui préservent la flore intestinale (aminosides, cotrimoxazole, colistine et quinolones). Ces molécules détruisent entre autres les bacilles Gram négatif laissant la flore anaérobie qui empêche la colonisation de la muqueuse digestive par les bactéries exogènes. La DDS est toujours composée d'un ensemble de molécules antibiotiques et/ou antifongiques par voie locale associée ou non à des antibiotiques par voie parentérale.

### ***II.B.2.2. Indications***

La décontamination digestive est utilisée le plus souvent dans les services lourds de soins intensifs, aussi bien en réanimation (21), en chirurgie (22), qu'en Hématologie. Les patients peuvent être des transplantés (23), multi-traumatiques en soins intensifs (24), cirrhotiques et cancéreux. Chez les transplantés, la décontamination du tube digestif permet de prévenir des infections postopératoires (25).

En Hématologie, le principe d'une décontamination digestive n'est habituellement retenu que dans les neutropénies de longue durée sans fièvre (9).

### ***II.B.2.3. Avantages et inconvénients***

Depuis une vingtaine d'années, de nombreuses études sur la DDS ont été publiées et donnent des résultats souvent contradictoires.

#### ***Avantages***

Paradoxalement, certains auteurs ont montré, dans leur étude, l'importance pronostique en terme de mortalité, d'une colonisation intestinale par des germes à Gram négatif nosocomiaux : ils ont observés une diminution de la mortalité lors de réduction des germes Gram négatif par une décontamination digestive. Ce traitement a permis de montrer son efficacité sur la prévention des infections (26, 27, 28; 29,30). En ce qui concerne le traitement antifongique associé, l'amphotéricine B et l'itraconazole réduisent la fréquence des infections à Candida ou les infections aspergillaires superficielles (17, 31, 32).

Le fluconazole a prouvé son efficacité dans la prophylaxie infectieuse de Candida chez les patients neutropéniques ou recevant une greffe de moelle osseuse (33, 34).

La DDS est efficace dans la réduction de la colonisation. Il est difficile toutefois de juger une relation entre la mortalité et l'inefficacité de la DDS quand les études sont réalisées dans des services de pathologies lourdes (SIDA, cancer en phase terminale...). Des études plus intéressantes devraient se réaliser dans des services où la maladie influence au minimum le pronostic vital (traumatisés, brûlés...).

### ***Inconvénients***

La DDS n'est pas dénuée d'effets indésirables comme les nausées, les vomissements et les diarrhées.

Certains auteurs ont montré qu'elle n'est pas efficace sur la baisse de la colonisation bactérienne (fèces et sondes nasogastriques) et des épisodes infectieux. Elle ne prévient pas toujours les infections postopératoires. En ce qui concerne les traitements antifongiques, aucune molécule prévient le risque d'infection aspergillaire grave fongique ; certains auteurs n'ont pas démontré l'efficacité de l'itraconazole sur la prévention des infections à *Candida* (35, 36).

Avec l'usage de certaines molécules, sont apparues des résistances bactériennes (37, 38, 27, 39), qui ont été décrites dans la littérature :

- *Escherichia coli* vis à vis des quinolones (40, 41),
- les entérocoques vis à vis de la vancomycine (42).

La DDS entraîne un déséquilibre de la flore digestive car on observe une réduction des infections imputant les bacilles Gram négatif et une augmentation des cocci Gram positif (43).

De plus, elle ne préviendrait pas une baisse de la mortalité. Une étude a été faite sur deux groupes de patients d'une unité de soins intensifs, l'un ayant une DDS, l'autre non ; une réduction des infections respiratoires est observée dans le groupe ayant eu la DDS, mais la mortalité entre les deux groupes n'est pas significativement différente (44). Lors de sévères neutropénies, la DDS n'a pas réduit la morbidité et la mortalité due aux infections (45).

En conclusion, la DDS reste un sujet controversé. Il est difficile de se prononcer en faveur ou non de son application. En 1997, la Société d'Amérique des maladies infectieuses recommandait de ne pas prescrire une décontamination digestive car aucune n'allie l'efficacité et la non-potentialisation de la résistance bactérienne. Un consensus clinique, épidémiologique et microbiologique est un élément essentiel pour établir des directives pour la prévention des infections chez les patients neutropéniques (10). En pratique, la surveillance des cultures des selles est fastidieuse mais reste indispensable pour être sûr de l'absence de résistance, et permet de mieux déterminer l'efficacité de la DDS (46).

### **III. Arsenal thérapeutique de la décontamination digestive**

L'arsenal thérapeutique pour la décontamination digestive est très varié et concerne plusieurs classes thérapeutiques. Nous avons choisi de développer les molécules utilisées dans les gélules de décontamination digestive :

- dans les gélules Adulte : colistine, gentamicine,
- dans les gélules Enfant : colistine, gentamicine, vancomycine et amphotéricine B.

Un aperçu bibliographique sera réalisé pour les associations d'antibiotiques utilisés dans la décontamination digestive.

Nous avons choisi de développer la partie structure des molécules pour mieux interpréter le comportement de celles-ci tout au long de l'analyse en CLHP, ainsi que leur spectre d'action pour la compréhension de leur utilisation dans la décontamination du tube digestif. Les effets indésirables ne seront pas abordés car ils sont réduits à des effets digestifs du fait de l'administration particulière par voie orale (faible résorption gastro-intestinale) :

- amphotéricine B : nausée, vomissement, douleur épigastrique et/ou abdominale, diarrhée, hémorragie digestive, anorexie,
- colistine : nausée, vomissement,
- gentamicine n'a pas d'effet indésirable digestif,
- vancomycine : nausée et diarrhée.

La pharmacocinétique de ces molécules ne sera pas abordée car ces dernières sont utilisées dans le cadre de la décontamination digestive justement parce qu'elles passent très peu la barrière digestive. On les retrouve très peu dans l'organisme et leur concentration reste maximum dans le tractus digestif.

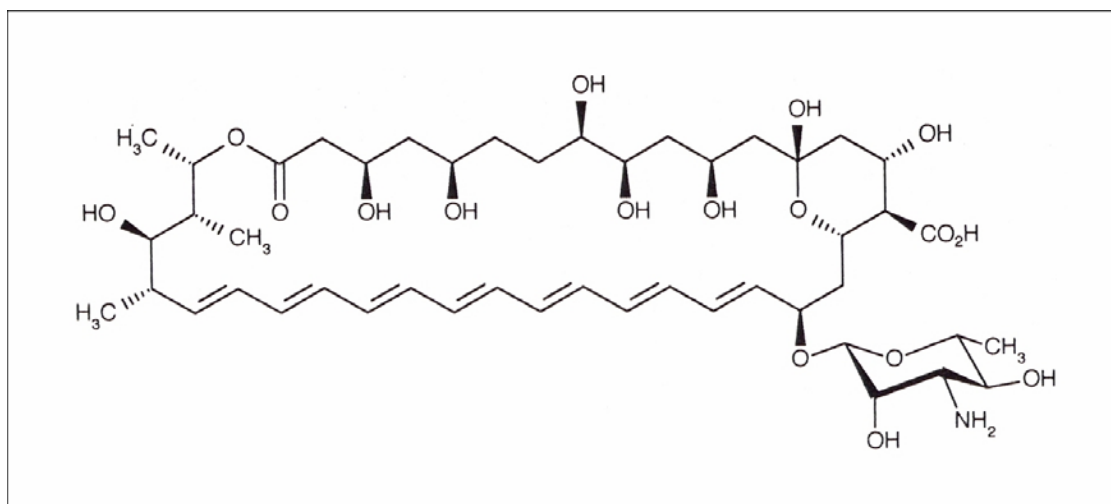
#### **III.A. Amphotéricine B**

##### **III.A.1. Structure chimique**

L'amphotéricine B est un mélange de polyènes antifongiques produits par certaines souches de *Streptomyces nodosus*.

Sa masse moléculaire est élevée.

C'est une molécule cyclique fermée par une liaison ester interne (cycle lactone), elle comprend deux parties : une partie apolaire rigide constituée de 7 doubles liaisons conjuguées responsables de la forte lipophilie de la molécule, et une partie polaire comportant un grand nombre de groupe hydroxyles et un sucre aminé, la mycosamine.



*Figure 2 : Structure chimique de l'amphotéricine B (d'après 47)*

### **III.A.2. Propriétés physico-chimiques**

L'amphotéricine B se présente sous la forme d'une poudre jaune, insoluble dans l'eau et dans la plupart des solvants organiques ; il n'est soluble que dans le Diméthylsulfoxyde DMSO jusqu'à 30-40 mg/mL et le propylèneglycol.

Grâce à l'adjonction de sels biliaires (désoxycholate de sodium), elle peut être mise en suspension colloïdale dans l'eau à pH 2 ou 11; la constante d'association désoxycholate-amphotéricine B étant faible, au dessous de 0,1 mg/mL, on observe une dissociation du complexe et la molécule se retrouve isolée et insoluble dans le milieu aqueux (Merck).

### **III.A.3. Mécanisme d'action**

L'amphotéricine B exerce directement sur la cellule fongique, deux types d'effets sont décrit ci-dessous :

- ❖ des effets membranaires par formation de complexes insolubles avec les stérols de la membrane fongique. La paroi des levures est constituée essentiellement par de l'ergostérol, alors que les cellules humaines contiennent essentiellement du cholestérol. L'amphotéricine B a une affinité supérieure pour l'ergostérol que pour le cholestérol. Il en résulte une altération de la perméabilité cellulaire et la fuite d'ions potassium (48),



- ❖ des effets métaboliques : les polymères provoquent une augmentation de la consommation d'oxygène, une altération de la transformation de l'ATP (Adénosine Tri Phosphate) en ADP (Adénosine Diphosphate). Ils diminuent la synthèse des composés azotés et glucidiques , et inhibent la respiration conduisant à la mort de la cellule fongique (49).

En plus de son action sur les cellules fongiques, elle agirait également de façon indirecte en stimulant les mécanismes de défense de l'hôte mais les mécanismes impliqués ne sont pas actuellement élucidés.

#### **III.A.4. Spectre d'action**

Il s'étend sur la plupart des champignons saprophytes et pathogènes, pour cette raison, l'amphotéricine B reste le chef de file incontesté des substances antifongiques, d'autant plus qu'elle est active aussi sur les agents responsables des mycoses tropicales (blastomycose, histoplasmosse, sporotrichose...) et les protozoaires (*Trichomonas*, *Leishmania*). Son spectre d'action inclut :

- *Candida*,
- *Cryptococcus neoformans*,
- *Blastomyces dermatitidis*,
- *Coccidioides immitis*,
- *Histoplasma capsulatum*,
- *Aspergillus* (49).

Aux doses utilisées en clinique, l'amphotéricine B n'est que fongistatique *in vivo*, la molécule n'a pas d'action antibactérienne ni antivirale.

### III.B. Colistine

#### III.B.1. Structure chimique

Le sulfate de colistine est un mélange de sulfates de polypeptides produit par certaines souches de *Bacillus polymyxa* variété *colistinus*. Ces polypeptides sont appelés polymyxines.

La colistine est constituée majoritairement des polymyxines E<sub>1</sub> (ou colistine A) et E<sub>2</sub> (ou colistine B). C'est un décapeptide basique contenant un cycle heptapeptide et une chaîne grasse en position N terminale différente selon la polymyxine (figure 2).

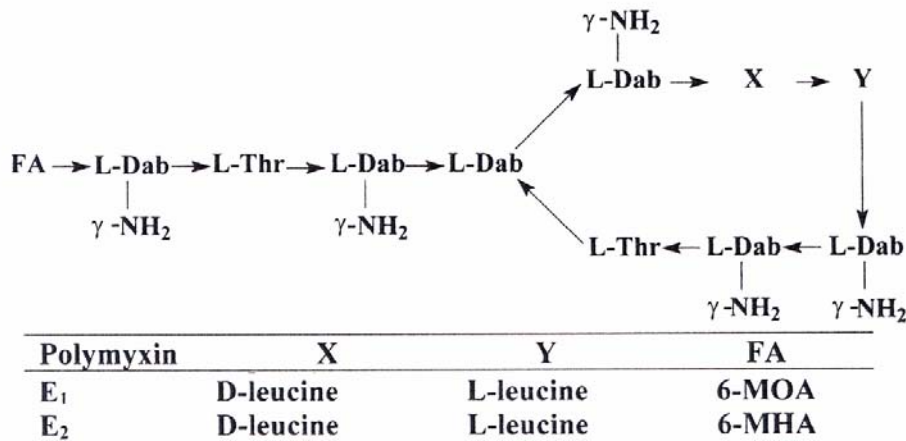


Figure 3 : Structures chimiques des polymyxines E<sub>1</sub> et E<sub>2</sub> (d'après 50). FA, « Fatty Acid » acide gras; 6-MOA, acide 6-méthyl octanoïque; 6-MHA, acide 6-méthyl heptanoïque

#### III.B.2. Propriétés physicochimiques

La colistine est une poudre blanche crémeuse très hygroscopique, sans odeur. Elle est soluble dans l'eau, assez soluble dans l'éthanol et pratiquement insoluble dans l'acétone et dans l'éther. La colistine est stable en solution aqueuse quand le pH est compris entre 5,5 et 8.

Selon DECOLIN D., les groupements aminés des acides aminés constituant la molécule sont fixés par la molécule dérivatisante (51).

### **III.B.3. Mécanisme d'action**

La colistine désorganise la membrane externe de la bactérie. Elle a une activité bactéricide par action directe sur la membrane cytoplasmique ; elle agirait comme un agent surfactif en s'insérant entre les couches lipidiques et protidiques de la membrane, modifiant ainsi sa perméabilité (49).

### **III.B.4. Spectre d'action**

La colistine possède un spectre d'action caractéristique car celui-ci est réduit aux bacilles aérobies Gram négatif :

- *Escherichia coli*
- *Klebsiella*
- *Enterobacter*
- *Salmonella*
- *Shigella*
- *Pseudomonas aeruginosa*,
- *Acinetobacter*.

Les espèces ci dessous sont naturellement résistantes à la colistine :

- aérobies à Gram positif : cocci et bacilles,
- aérobies à Gram négatif : *Proteus*, *Providencia*, *Serratia*, *Legionella*, *Campylobacter*
- cocci et bacilles anaérobies comme *Bacteroides*,
- mycobactéries (52).

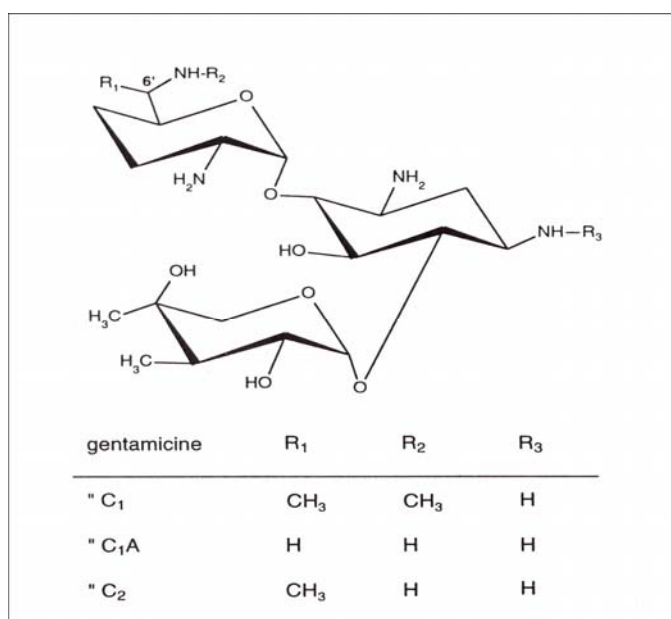
Cette molécule ne connaît peu de résistance acquise.

### III.C. Gentamicine

#### III.C.1. Structure chimique

Le sulfate de gentamicine est constitué par un mélange de molécules produite par *Micromonospora purpurea* : gentamicines C<sub>1</sub>, C<sub>1a</sub>, C<sub>2a</sub> et C<sub>2</sub>.

La gentamicine est un aminoside (ou aminoglycoside). Elle est composée de sucres aminés reliés en 4 et 6 à un hexose diaminé central (2-désoxystreptamine) par une liaison glycosidique.



*Figure 4 : Structure chimique des gentamicines C<sub>1</sub>, C<sub>1a</sub> et C<sub>2</sub> (d'après 47)*

#### III.C.2. Propriétés physicochimiques

Le sulfate de gentamicine possède les propriétés physicochimiques suivantes :

- poudre blanche inodore,
- soluble dans l'eau et peu soluble dans les solvants organiques (alcool, éther),
- thermostable et stable à pH neutre,
- sensible aux variations de pH, elle est de caractère basique.
- étant inactive en milieu acide, il ne faut pas acidifier les urines lorsqu'on l'utilise pour traiter une infection urinaire (6).

On observe une incompatibilité physico-chimique de la gentamicine avec l'héparine, les pénicillines et les céphalosporines (49).

### **III.C.3. Mécanisme d'action**

La gentamicine a une action de type bactéricide qui se déroule en deux phases consécutives :

#### Phase I oxygéo-dépendante :

Elle se fixe sur des récepteurs externes, puis elle pénètre passivement les membranes bactériennes au niveau :

- Du peptidoglycane des bactéries gram positif,
- Des pores des bactéries Gram négatif.

Elle se fixe alors sur la membrane cytoplasmique, puis est transportée par mécanisme actif oxygéo-dépendant jusqu'aux ribosomes (49).

La phase I peut être bloquée ou inhibée par le calcium  $Ca^{++}$ , le magnésium  $Mg^{++}$ , l'hyperosmolarité, une réduction de pH et l'anaérobiose.

#### Phase II énergie dépendante :

Elle se passe dans le cytoplasme de la cellule bactérienne (49). Elle agit par inhibition de la synthèse protéique de la bactérie. Elle agit au niveau des sous-unités ribosomales 30S, provoquant une transcription incorrecte de l'information des codons non sens de l'ARN messager. Cette fausse transcription aboutit à la formation de protéines qui ne sont alors pas fonctionnelles et dont l'apparition amène la mort de la cellule bactérienne. Cette action aboutit à un effet bactéricide intense, rapide, indépendant de la densité bactérienne (absence « d'effet inoculum »), dépendant beaucoup plus de la concentration initiale d'antibiotique que de la durée d'exposition des bactéries (activité « concentration dépendante ») et persistant plusieurs heures après la fin de l'exposition des bactéries (« effet post antibiotique » marqué) (19).

Elle entraîne également une altération de la structure de la membrane cellulaire et des anomalies dans le métabolisme bactérien.

### **III.C.4. Spectre d'action**

La gentamicine a théoriquement un large spectre, elle est naturellement active sur plusieurs types de bactéries :

- les aérobies à Gram positif : Staphylocoques méticilline sensible, *Listeria monocytogenes*, *Corynebacterium diphtheriae*,
- les aérobies à Gram négatif : *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Enterobacter aerogenes* et *E. cloacae*, *Serratia*, *Salmonella*, *Proteus mirabilis* et *P. vulgaris*, *Campylobacter*.

Certaines bactéries sont modérément sensibles à la gentamicine :

- les *Pseudomonas* dont le bacille pyocyanique (*Pseudomonas aeruginosa*),
- *Acinetobacter*,
- Staphylocoques résistants à la méthicilline,
- *Klebsiella* (19).

Sont naturellement résistants :

- les aérobies Gram positif : streptocoques, les entérocoques, les pneumocoques,
- les aérobies Gram négatif : *Providencia stuartii*,
- toutes les anaérobies strictes : *Clostridium* et *Bacteroides*,
- toutes les bactéries intracellulaires : *Clamidia*, Mycoplasmes...(52).

Il existe plusieurs types de résistances :

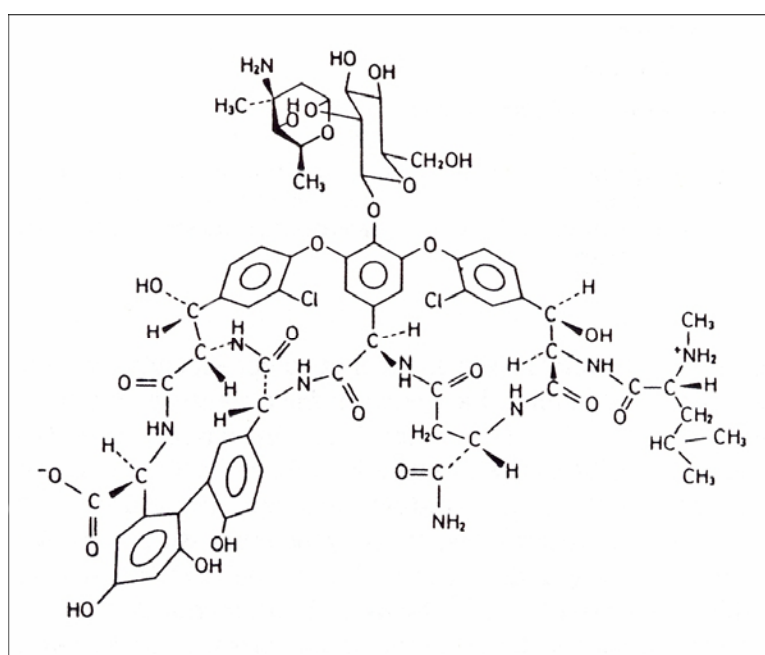
- résistance naturelle : due à l'imperméabilité de la membrane bactérienne. C'est le cas des germes anaérobies (*Clostridium*, *Bacteroides*) et des anaérobies aérotolestants (streptocoques et entérocoques).
- résistance acquise. Elle est due à une modification génétique de la bactérie :
  - ✓ soit par résistance chromosomique (mutation au niveau du chromosome) : elle est très rare, due à des mutants d'une souche sensible,
  - ✓ soit par résistance extra-chromosomique, par l'intermédiaire d'un plasmide. Ces plasmides codent la sécrétion d'enzymes cytoplasmiques inactivatrices de trois types : les phosphotransférases, les nucléotidyltransférases et les acétyltransférases (49).

Bien qu'inactive in vitro sur les Streptocoques, les Entérocoques et Pneumocoques, elle possède toutefois sur ces bactéries une activité synergique avec les bêtalactamines ou avec les glycopeptides (vancomycine) et peut être utilisée en association in vivo pour des infections graves. Cette synergie s'explique par le fait que la résistance des Streptocoques pour la gentamicine est de bas niveau (19).

### III.D. Vancomycine

#### III.D.1. Structure chimique

Le chlorhydrate de vancomycine est le chlorhydrate d'un mélange de molécules, isolées de *Streptomyces orientalis*, mélange dont le principal constituant est la vancomycine B. Il s'agit d'un glycopeptide tricyclique. Il est composé d'un heptapeptide linéaire dont cinq acides aminés sont des composés aromatique. Ces derniers sont rattachés entre eux pour former un noyau triphényl'éther et un noyau diphenyle (47).



*Figure 5 : structure chimique de la vancomycine (d'après 48)*

#### III.D.2. Propriétés physicochimiques

La vancomycine se présente sous une poudre blanche, hygroscopique, facilement soluble dans l'eau, peu soluble dans l'alcool. Son activité est maximale en pH alcalin (49).

### **III.D.3. Mécanisme d'action**

La vancomycine est une molécule bactéricide par plusieurs mécanismes d'action :

- elle inhibe essentiellement la synthèse du peptidoglycane (53) par action au niveau de la polymérisation de la paroi bactérienne. Ce mécanisme s'explique par l'attachement de la vancomycine au groupement terminal D-alanyl-D-alanine du peptidoglycane. La transglycolase, enzyme permettant d'amarrer les précurseurs du peptidoglycane sur celui-ci, est dans l'incapacité de fixer les précurseurs sur la peptidoglycane entraînant l'accumulation cytoplasmique de ces précurseurs.
- elle altère la membrane cytoplasmique,
- et inhibe la synthèse de l'ARN (49).

### **III.D.4. Spectre d'action**

La vancomycine n'agit que sur les bactéries à gram positif (*Clostridium difficile*) et surtout le Staphylocoque méticilline résistant (SAMR) (19). Les espèces habituellement sensibles sont :

- Les aérobies Gram positif : *staphylococcus aureus* et *S. non aureus*, y compris les souches non aureus résistantes à la méticilline (SAMR), *Listeria*, Entérocoques, les streptocoques, y compris les pneumocoques,
- Les anaérobies : *Clostridium*, y compris *C. difficile*, *Peptostreptococcus* (49, 52).

Les espèces résistantes sont :

- Les aérobies à Gram positif : *Nocardia asteroïdes*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Erysipelothrix*, *Lactobacilles*,
- Ensemble des aérobies à Gram négatif (dont les entérobactéries)
- Mycobactéries
- Rickettsies
- *Mycoplasma*
- *Chlamydiae*
- Tréponèmes (49, 52).

On observe une émergence lente mais réelle de la résistance bactérienne acquise vis à vis de la vancomycine. Cette résistance concerne les Staphylocoques et les Entérocoques (53).



### **III.E. Associations utilisées**

Les associations d'antibiotiques et d'antifongiques étudiées sont d'une grande diversité, les plus récentes sont citées ci-dessous :

- polymyxine E/aminoside/amphotéricine B + 4 jours de céphalosporine en IV (24) est l'association la plus classique. L'aminoside utilisé est le plus souvent la gentamicine, mais il peut être la tobramycine (54), la céfotaxime (55, 56) mais aussi encore, la ceftriaxone (57),
- polymyxine/aminoside + ciprofloxacine IV 4 jours. L'aminoside utilisé peut aussi bien être la gentamicine (58) que la tobramycine (59),
- amoxicilline – acide clavulanique/ciprofloxacine (60, 61).

## **IV. Techniques de dosage des molécules**

Les différentes techniques énoncées ci-dessous sont en majorité réalisées pour le dosage en milieu biologique et particulièrement dans le sérum. Peu d'auteurs ont dosé les molécules étudiées dans les formes pharmaceutiques.

### **IV.A. Amphotéricine B**

#### **IV.A.1. Méthode microbiologique**

C'est la méthode de la Pharmacopée Européenne IV<sup>ème</sup> édition. Elle présente l'avantage principal d'un faible coût et d'une simplicité de réalisation.

Le principe de cette méthode est le suivant : l'activité de l'amphotéricine B est estimée par comparaison de l'inhibition de la croissance de micro-organismes sensibles (*Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763) provoquée respectivement par des concentrations connues d'amphotéricine B à examiner et par la solution de substance étalon (amphotéricine B SCR). Le titrage de l'amphotéricine B se fait par diffusion en gélose (mesure des diamètres d'inhibition).

#### **IV.A.2. Electrophorèse capillaire**

L'électrophorèse capillaire selon la technique MECC (Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography) avec détecteur à barrette de diode est une technique de dosage permettant aussi d'identifier précisément les molécules dosées : le dosage de l'amphotéricine B donne des résultats identiques à ceux obtenus en Chromatographie Liquide à Haute Performance (CLHP).

Le principe de la MECC est le suivant : le capillaire est rempli par un tampon, soit acide (phosphate ou borate), soit basique (borate) soit par un ampholyte (molécule ayant des fonctions acide et basique à la fois), ce milieu créant un flux électro-osmotique. L'amphotéricine B, composé apolaire est emprisonné par un surfactant pour former des micelles chargées négativement. Celles-ci sont transportées vers la cathode et séparées en différentes zones qui sont détectées en absorption UV. Dans le capillaire, l'amphotéricine B est bien séparée des autres antifongiques administrés en même temps. La détermination des concentrations est rapide -en quelques minutes- avec calibration complète.

Cette technique permet de doser la molécule dans le sérum mais aussi dans les formes pharmaceutiques comme la solution injectable d'amphotéricine B (Fungizone®) dans une poche de glucose 5% (62).

### **IV.A.3. Méthode chromatographique**

La CLHP est fondée sur le principe de partage des solutés entre la phase stationnaire et la phase mobile, toutes les deux liquides. La phase stationnaire est constituée d'un support, qui est soit imprégné par un liquide, soit greffé de motifs organiques variés (très souvent des hydrocarbures en C8 ou C18). La phase mobile est un liquide pur ou un mélange de liquides dont les interactions avec la phase stationnaire doivent être la plus faible possible (liquide non miscible de polarité différente). Les méthodes chromatographiques peuvent mettre en œuvre :

- une phase stationnaire polaire et une phase mobile apolaire : c'est la chromatographie de partage à phase stationnaire polaire. Elle est actuellement peu utilisée.
- une phase stationnaire apolaire et une phase mobile polaire, c'est la chromatographie de partage à polarité de phase inversée.

Pour le dosage de l'amphotéricine B, la CLHP la plus utilisée est une méthode séparative avec une phase mobile à polarité de phase inversée. Le dosage peut se faire :

- soit par étalonnage externe. Le chromatogramme de l'amphotéricine B dosée est comparé à celui de l'amphotéricine B de référence (63).
- soit par étalonnage interne. Cette technique utilise des étalons internes comme le piroxicam (64) , le 1-amino-4-nitronaphtalène (65) ou la natamycine (66). Dosé dans le sérum, aucune interférence n'est détectée avec d'autres médicaments (vancomycine, oméprazole...) (67).

Certains auteurs ont dosé l'amphotéricine B dans des formes pharmaceutiques (65, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76).

Elle nécessite une préparation préalable plus ou moins poussée de l'échantillon à analyser (déprotéinisation ou extraction par des solvants organiques) et demande un volume suffisant d'échantillon biologique (0,5 à 1 mL) (77).

## **IV.B. Colistine**

### **IV.B.1. Méthode microbiologique**

Le titrage de la colistine est réalisé soit par diffusion en gélose, soit par turbidimétrie (mesure de l'opacité du milieu de culture). Pour chaque technique, les micro-organismes de référence et les milieux utilisés sont différents :

- titrage par diffusion : *Bordetella bronchiseptica* ATCC 8344 et le milieu B sont utilisés,
- titrage par turbidimétrie : *Escherichia coli* ATCC 9637 dans le milieu C. Les milieux B et C sont décrits dans la Pharmacopée Européenne dans le paragraphe 2.7.2 « titrage microbiologique des antibiotiques ».

Les inconvénients majeurs de cette méthode sont le délai de réponse qui est très long, une précision relative et le manque de spécificité en cas d'association de plusieurs antibiotiques.

### **IV.B.2. Méthodes électrophorétiques**

La colistine peut être dosée par électrophorèse capillaire de zone en solution libre. Le principe de la méthode consiste en une séparation des molécules chargées dans un champ électrique. Au préalable, l'échantillon est mis en solution tampon riche en électrolytes (composé de méthyle-béta-cyclodextrine, triéthanolamine et 2 propanol) qui améliore la sélectivité (78) en créant un flux électro-osmotique.

### **IV.B.3. Méthodes chromatographiques**

#### **IV.B.3.1. Chromatographie ionique**

La chromatographie ionique est utilisée pour le dosage de la colistine. Le principe de séparation repose sur l'échange d'ions entre les deux phases. La phase stationnaire comporte des sites ioniques afin qu'il se crée des interactions dipolaires avec les différents analytes de l'échantillon. Plus grande est la charge portée par un soluté, plus ce dernier est retenu par la phase stationnaire.

La colistine dosée en chromatographie ionique, est une molécule ionisée soluble dans l'eau.

Cette technique peut être parfois couplée à la spectrométrie de masse qui permet l'identification des colistines par détermination des masses moléculaires (79).

### **IV.B.3.2. CLHP**

Après séparation en polarité de phase inversée, la détection de la colistine peut être réalisée :

- ✓ par photométrie dans l'UV en raison de l'absorption naturelle de cet analyte (80),
- ✓ une autre détection peut être réalisée par fluorimétrie, après formation du dérivé fluorescent :
  - fixation de l'orthophtaldéhyde : la quantification se réalise par la somme des aires des dérivés de la polymyxine E1 et E2, le seuil de quantification est de 28 µg/L (81),
  - fixation de l'orthophtaldéhyde et du 2-mercaptoéthanol dans un tampon borate à pH 10,5. La sélectivité de la méthode vis à vis de la colistine est obtenue en mélangeant la colistine et d'autres antibiotiques comme la vancomycine. La quantification est obtenue par la somme des aires des dérivés des polymyxines E1 et E2 (51),
  - fixation de l'acide orthophosphorique à 85% (80),
  - fixation du 9-fluoreméthyl chloroformate, la quantification se réalise par le ratio de la somme des aires des dérivés de la polymyxine E1 et E2 par la nétilmicine qui est l'étalon interne, les concentrations de colistine sont de 0,1 à 4 mg/L (82).

En dehors des dosages dans les milieux biologiques cités ci-dessus, seul Orwa J.A. (50) a étudié le dosage de la colistine en solution aqueuse par CLHP.

## **IV.C. Gentamicine**

### **IV.C.1. Méthode microbiologique**

La gentamicine est dosée soit par diffusion en gélose, soit par turbidimétrie du milieu de culture, ces deux techniques utilisent des micro-organismes et des milieux différents :

- titrage par diffusion : *Bacillus pumilus* ou *Staphylococcus epidermidis* ATCC 8241 avec le milieu A sont utilisés,
- titrage par turbidimétrie : *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 dans le milieu C.

### **IV.C.2. Méthodes immunologiques**

#### **IV.C.2.1. ELISA**

Le principe de la technique ELISA (Enzyme-linked ImmunoSorbent Assay) est le suivant : c'est un immunodosage en phase hétérogène utilisant un marqueur enzymatique. L'enzyme est le marqueur de l'antigène ou de l'anticorps qui permet la quantification de la réaction immunologique en présence d'un substrat approprié. Après incubation, la phase liquide est éliminée et la phase fixée est lavée. L'activité enzymatique est révélée par le substrat lumineux, la lumière émise est mesurée soit par un signal d'absorption lumineuse soit par un signal d'émission lumineuse (chimiluminescence, intensité de fluorescence). Deux types de méthodes ELISA existent : la méthode ELISA par compétition et la méthode ELISA sandwich.

La méthode ELISA par compétition est décrite dans la littérature pour l'analyse quantitative de la gentamicine dans les milieux biologiques (83, 84). Elle est toute aussi fiable que la CLHP ou le dosage microbiologique. Aucune interférence en présence d'antibiotiques ou d'antifongiques azolés n'est observée.

#### **IV.C.2.2. EMIT**

Le dosage immuno-enzymatique EMIT (Enzyme Multiplied Immunoassay) repose sur la détermination photométrique de l'activité d'une enzyme fixée sur la gentamicine ; elle s'inactive par liaison à un anticorps spécifique de la gentamicine. En présence de l'anticorps, on observe une compétition entre la gentamicine à doser et la gentamicine marquée par l'enzyme. C'est l'activité enzymatique résultante qui est directement liée à la quantité de gentamicine à doser.

Cette méthode a une sensibilité correcte et une bonne reproductibilité. Elle est automatisée et facile à mettre en œuvre. Cependant, le dosage EMIT est moins performant que le dosage FPIA au niveau de la sensibilité et de la spécificité (77, 85).

#### ***IV.C.2.3. FPIA***

La polarisation de fluorescence FPIA (Fluorescence Polarization ImmunoAssay) est une méthode immunologique de compétition en phase homogène. Elle est très utilisée pour la détermination de la gentamicine dans le sérum et dans les milieux biologiques (86, 87). EMIT et FPIA sont les deux méthodes de dosage de la gentamicine les plus répandues dans les laboratoires hospitaliers.

Le principe du dosage repose sur l'émission d'un signal fluorescent provenant de la gentamicine marquée à l'état libre ou bien liée à son anticorps. Le taux de polarisation d'un antigène (gentamicine) marqué par une sonde fluorescente et libre en solution est faible : la gentamicine tourne rapidement sur elle-même en raison des mouvements browniens, sa lumière de fluorescence sera très dépolarisée. Au contraire, si la gentamicine marquée est liée à l'anticorps correspondant, le taux de polarisation du complexe sera très élevé. Lorsqu'on ajoute, à des concentrations fixées de gentamicine marquée et d'anticorps, des doses croissantes de gentamicine non marquée, on observe une diminution de la polarisation de fluorescence. Une courbe de calibration réalisée à l'aide d'une gamme de concentrations différentes d'antigène permet de déterminer la concentration de gentamicine en fonction du taux de polarisation.

Les appareils utilisés pour doser la gentamicine sont : Abbott TDX, Biostat FPIA, Roche FPIA, Sigma FPIA (85).

#### ***IV.C.3. Electrophorèse capillaire***

L'électrophorèse capillaire est une bonne méthode alternative aux méthodes microbiologiques décrites dans les Pharmacopées Européenne et Américaine pour le dosage de la gentamicine.

Une dérivation préliminaire avec du 1,2-phthalic dicarboxaldéhyde et de l'acide mercaptoacétique est réalisée. La molécule issue de cette manipulation est un thio-iso-indole qui sera détecté à 330 nm dans l'UV. La solution d'électrolytes comprend de la bétacyclodextrine, du tétraborate de sodium et du méthanol. La séparation de la gentamicine est très résolutive, souvent meilleure qu'en CLHP : on retrouve les gentamicines C1, C1a, C2, C2a, C2b et d'autres composants mineurs de la gentamicine dont la sisomicine (88).

#### ***IV.C.4. méthode chromatographique***

La technique à polarité de phase inversée est la plus utilisée. La molécule de gentamicine ne possède pas de spectre d'absorption exploitable dans l'UV-visible (entre 190 et 800 nm), elle doit subir une dérivation pour ainsi être détectée en fluorescence :

- par le 9-fluoriméthyle chloroformate (89),
- ou par le 1-fluoro-2,4-dinitrobenzène (90, 91).

Aucun article bibliographique relate le dosage chromatographique de la gentamicine dans les formes pharmaceutiques.



## **IV.D. Vancomycine**

### **IV.D.1. Méthode microbiologique**

Les conditions opératoires du titrage de la vancomycine sont décrites à la Pharmacopée Européenne :

- titrage par diffusion (*Bacillus subtilis* ATCC 6633 dans le milieu A),
- ou bien titrage par turbidimétrie (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538 dans le milieu C).

### **IV.D.2. Méthodes immunologiques**

#### **IV.D.2.1. RIA**

La RIA (RadiImmunoAssay) est l'une des premières méthodes utilisées pour le dosage de la vancomycine (92). Ce dosage utilise la compétition entre la vancomycine marquée à l'iode  $I^{125}$  et la vancomycine froide à doser pour la liaison avec une quantité fixe d'anticorps anti-vancomycine. La radioactivité du précipité est inversement proportionnelle à la quantité de vancomycine froide de l'échantillon.

Cette méthode est actuellement peu employée de nos jours en routine car elle a été remplacée largement par une technique de marquage utilisant les enzymes (voir ci-dessous).

#### **IV.D.2.2. EMIT**

La technique EMIT est très utilisée en routine (appareil Dade Behring), de plus elle est très fiable (85, 93).

#### **IV.D.2.3. FPIA**

Elle utilise des fluorophores classiques dont le signal est peu spécifique, la technique est moins juste que la technique EMIT pour un dosage en milieu biologique mais elle est rapide et simple à utiliser car elle ne nécessite pas de séparer les antigènes libres et liés à l'anticorps (93).

Avec la technique EMIT, c'est la méthode la plus utilisée dans les laboratoires en routine (94, 95).

### **IV.D.3. Méthodes électrophorétiques**

#### **IV.D.3.1. Electrophorèse capillaire standard**

L'électrophorèse capillaire standard peut être utilisée pour le dosage de la vancomycine à la fois dans le sérum (96) et dans une solution aqueuse injectable (97).

#### **IV.D.3.2. MECC**

Le principe de cette méthode a déjà été décrit pour le dosage de l'amphotéricine B (p. 32). Le tampon électrophorétique, composé de borate à pH basique et de surfactant en micelles (Sodium Dodécyl Sulfate SDS ou Chlorure de TriméthylCéthylAmmonium CTAC), se comporte comme une phase pseudo-stationnaire. Ce tampon favorise la sélectivité de la méthode. Une différence de potentiel est appliquée dans le capillaire. La MECC permet de séparer un mélange de glycopeptides de faibles concentrations de l'ordre de quelques  $\mu\text{g/mL}$  (78,98).

La vancomycine est une molécule chirale et elle possède plusieurs stéréoisomères qui sont séparés et détectés à 220 nm dans l'UV. Sa migration se fait en sept minutes environ, on n'observe aucune interférence avec d'autres antibiotiques (99). Cette technique ne consomme qu'une faible quantité de tampon électrophorétique et de prise d'échantillon, elle convient pour les analyses en routine.

#### **IV.D.4. CLHP**

La vancomycine est dosée en CLHP à polarité de phase inversée. Das Gupta V., en 1986 (100), est le premier à présenter un dosage avec cette technique pour l'étude de la stabilité de la vancomycine dans une forme pharmaceutique (dextrose 5% et sérum physiologique en solution injectable). La phase mobile constituée de phosphate monopotassique ajustée à pH 3,5 avec de l'acide phosphorique. La détection est réalisée à 282 nm.

Puis quelques auteurs (101, 102, 103) ont décrit des variantes à cette technique pour le dosage de la vancomycine dans des formes pharmaceutiques (solutés de dialyse, solution injectable mise en seringue). Ces variantes ont été conçues en changeant à la fois :

- la longueur d'onde (210, 214 ou 281 nm),
- et la nature de la phase mobile (acétonitrile-acétate d'ammonium, acétonitrile-phosphate ou acétonitrile-eau).

*DEUXIEME CHAPITRE*

*TRAVAIL PERSONNEL*

## I. Objectifs du travail personnel

### I.A. Présentation du service d'Hématologie de l'hôpital Nord de St Etienne

Le service d'Hématologie, dirigé par le Professeur Guyotat, accueille en majorité des patients ayant une LA, ils sont hospitalisés pour aplasie prolongée.

Dans l'année 2001, 110 traitements ont été donnés répartis ci-dessous :

- 65 chimiothérapies,
- 40 autogreffes de moelle osseuse,
- 5 allogreffes de moelle osseuse, soit une greffe sur 9. En 2003, 12 allogreffes ont été réalisées contre 39 autogreffes, soit un peu plus d'un quart sur l'ensemble des greffes.

Les durées médianes d'aplasie dans le service, selon le degré de neutropénie et le traitement, sont citées ci-dessous :

	< 0,5 G/L	< 0,1 G/L
Chimiothérapie	22 jours	17 jours
Autogreffe	11 jours	8 jours
Allogreffe	16 jours	10 jours

Ces neutropénies prolongées provoquent des infections cliniquement perçues par un épisode fébrile. La fièvre est non documentée dans 2/3 des cas. Seulement un tiers des neutropénies fébriles sont microbiologiquement documentées : parmi ce pourcentage, trois types de germes se partagent le pourcentage :

- un premier tiers est représenté par le Streptocoque provenant essentiellement de la gorge (37%),
- un deuxième tiers par le Staphylocoque, majoritairement *Staphylococcus non aureus* provenant de la peau (32%),
- et un troisième tiers par des bacilles Gram négatif (29%). Le reste de la documentation (2%) correspond aux champignons et autres germes.

Ces germes sont retrouvés dans plus de la moitié des cas dans le sang (bactériémie), la coproculture n'est positive que dans 6% des cas.

Ces bacilles Gram négatif responsables d'infection proviennent majoritairement du TD, une décontamination est réalisée pour chaque patient présentant une neutropénie inférieure à 0,5 G/L pendant sept jours, à raison de huit gélules par jour de l'association colistine-gentamicine. Ces gélules sont réalisées à la Pharmacie de l'hôpital.

## ***I.B. Objectifs***

Selon le décret du 26 décembre 2000, les BPPrH (104) et sous les recommandations des inspecteurs de l'Afssaps (Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé), les Pharmacies à usage intérieur réalisant des préparations pharmaceutiques doivent mettre en œuvre les moyens nécessaires pour en assurer les contrôles. Dans ce cadre, nous avons été sollicités pour le dosage de trois préparations réalisées à la Pharmacie de l'Hôpital Nord de S<sup>t</sup> Etienne. Notons la simplicité des formulations, car aucune ne contient d'excipient (tableau I). Ces préparations sont utilisées dans les services d'Oncologie pédiatrique et d'Hématologie du même Hôpital, elles permettent une décontamination digestive chez les neutropéniques pour la prévention des infections.

Les gélules de taille 0 et le sirop sont réservés pour les enfants, ce sont des préparations magistrales. En effet, elles sont préparées extemporanément à la demande du D<sup>r</sup> Stephan et sont consommées dans les jours qui suivent leur fabrication. Seules les gélules de taille 4 réservées aux adultes du service du Professeur Guyotat sont des préparations hospitalières, c'est à dire réalisées à l'avance et stockées à la fois à la Pharmacie et dans le service pour un éventuel besoin.

Un lot de gélules pour adultes contient entre 500 à 2000 gélules. Il est réalisé dans une salle propre (non classée en tant que zone à atmosphère contrôlée) de la Pharmacie avec des précautions particulières : surchausses, blouse propre, masque, gants stériles...pour assurer la qualité microbiologique des gélules destinées à des patients en immunodépression sévère. Ces gélules sont conditionnées par centaine dans des flacons-tubes à prélèvement stériles de 40 mL en polystyrène transparent avec cape à vis rouge. Ce conditionnement sera dénommé pilulier dans notre travail. Chaque pilulier est étiqueté avec une date de péremption arbitraire de 4 mois.

Les objectifs de notre étude se divisent en deux grandes étapes :

- Tout d'abord, de choisir une méthode de dosage appropriée pour les quatre composants des gélules et sirop, de fixer les conditions opératoires qui permettront la séparation et le dosage de ces molécules à partir de la forme galénique,
- Ensuite, de réaliser une étude de stabilité sur les gélules destinées aux adultes, afin de connaître leur durée de conservation.

*Tableau I : Composition des préparations*

Formules	Gélule n°4 adulte	Gélule n° 0 enfant	Sirop 120 mL
Amphotéricine B	--	85 mg	6 000 mg
Colistine	64,4 mg	20 mg	595 mg
Gentamicine	20 mg	90 mg	2 160 mg
Vancomycine	--	60 mg	1 500 mg

## **II. Matériels et méthodes**

Le but de ce paragraphe est de fixer les conditions opératoires qui permettront la séparation et le dosage de la colistine, de la gentamicine, de la vancomycine et de l'amphotéricine B, quatre molécules retrouvées dans les gélules et le sirop de décontamination digestive, que nous devons contrôler après leur fabrication.

Les quatre molécules sont séparées par CLHP de polarité en phase inversée sur des supports en silice greffée de chaîne alkyl en C18 (Symmetry ou Inertsil). Nous avons sélectionné parmi plusieurs techniques de CLHP à polarité de phase inversée trouvées dans la littérature, celle qui convenait le mieux à nos appareils (élution isocratique à température ambiante, détecteur : spectrophotomètre UV-visible) et qui donnait une bonne résolution des pics. Ce travail a été très long à réaliser, environ une dizaine de mois de travail, car plusieurs techniques ont dû être essayées pour les quatre molécules, des difficultés diverses ont été rencontrées et sont citées au début de chaque description des techniques.

Nous avons filtré toutes les phases mobiles avec des filtres Millipore type HVLP 0,45 µm avant utilisation.

### **II.A. Description des techniques CLHP**

#### **II.A.1. Dosage de l'amphotéricine B**

La mise au point de cette technique de dosage a été la plus difficile et la plus longue. En effet, la solubilisation de la molécule dans le DMSO est difficile à réaliser, les techniques de Wilkinson et Margosis n'ont rien donné. Nous nous sommes donc basés sur la méthode CLHP de Dentinger P.J. (2001).

##### **II.A.1.1. Matériel utilisé**

Le matériel chromatographique utilisé est constitué par :

- ✓ Une pompe « HPLC Isochrom »
- ✓ Un dégazeur Alltech
- ✓ Un injecteur manuel Rhéodyne avec une boucle de 20µL
- ✓ Une précolonne Upchurch (20x2 mm remplie à sec avec du Bondapak C18 Corasil 40 µm Waters)
- ✓ Une colonne Symmetry C18, 150x4,6 mm (Waters)
- ✓ Un détecteur : spectrophotomètre UV-visible modèle Spectra Series UV 150
- ✓ Un intégrateur Chrom Jet de Spectra-Physics.

Les réactifs utilisés sont :

- ✓ Acétonitrile pour CLHP (Merck référence 1.14291.1000)
- ✓ Méthanol pour CLHP (Merck référence 1.06007.1000)
- ✓ Acétate de sodium CH<sub>3</sub>COONa (Merck référence 718 TA 333168)
- ✓ EDTA (Prolabo référence 20 309.296)
- ✓ Diméthylsulfoxyde DMSO pour CLHP (Riedel De Haen référence 34869)
- ✓ Eau stérile (Fresenius)
- ✓ Acide acétique glacial (Carlo Erba référence 401422).

Les produits de référence sont :

- L'amphotéricine B Bufa importée par Inresa (lot 02C20FP, péremption 03.2004),
- 1-amino-4-nitronaphtalène, l'étalon interne (Sigma lot S05541-022).

### **II.A.1.2. Mode opératoire**

Phase mobile :

Préparation du mélange aqueux : dans 1 litre d'eau, nous mélangeons 0,9306 g d'EDTA et 4,1015 g de CH<sub>3</sub>COONa. Ce mélange est ajusté à pH 5 avec de l'acide acétique glacial.

Préparation de la phase mobile : nous mélangeons 225 mL du mélange aqueux, 200 mL d'acétonitrile et 75 mL de méthanol.

Préparations des solutions pour la gamme d'étalonnage :

Nous réalisons des solutions de concentrations croissantes d'amphotéricine B à partir de la poudre. Ces solutions sont indépendantes et sont réalisées à partir de pesées différentes de poudre (amphotéricine B Bufa), selon le schéma suivant :

Points de la gamme	1	2	3	4	5
amphotéricine B Bufa	30 mg	40 mg	50 mg	60 mg	70 mg
DMSO	15 mL	15 mL	15 mL	15 mL	15 mL
Qsp méthanol	50 mL	50 mL	50 mL	50 mL	50 mL
Dilution de cette solution au 1/200 <sup>ème</sup> en présence de 0,5 mL de 1-amino-4-nitronaphtalène					
Concentrations des solutions d'étalonnage	3 µg/mL	4 µg/mL	5 µg/mL	6 µg/mL	7 µg/mL

### Préparation des échantillons :

Gélule enfant 85 mg : nous solubilisons le contenu d'une gélule entière avec 30 mL de DMSO dans une fiole de 100 mL puis nous ajustons la fiole avec du méthanol. Nous faisons ensuite une dilution de cette solution au 1/1000<sup>ème</sup> dans le méthanol avec ajout de 0,5 mL d'étalon interne. La concentration finale attendue est de l'ordre de 4 µg/mL.

Sirop 6 g/120 mL : nous solubilisons 2 mL du sirop avec 15 mL de DMSO dans une fiole de 50 mL ajustée avec du méthanol. Nous faisons ensuite une dilution de cette solution au 1/1000<sup>ème</sup> dans le méthanol avec ajout de 0,5 mL d'étalon interne. La concentration finale attendue est voisine de 5 µg/mL.

### Conditions chromatographiques :

Le débit de la phase mobile est maintenu à 1 mL/min (ce débit est suffisant pour obtenir une bonne résolution des pics).

La longueur d'onde du spectrophotomètre UV est fixée à 405 nm.

L'échelle maximale d'absorbance est égale à 0,1 et la vitesse du papier à 10 mm/min.

Le temps d'analyse est de 10 minutes.

### Résultats :

La figure 4 (p.57) ci-dessous représente le chromatogramme obtenu après injection d'un point de la gamme d'étalonnage. Nous obtenons deux pics, le premier correspond à l'amphotéricine B (temps de rétention  $t_R$  de 5 minutes environ) et le second au 1-amino-4-nitronaphtalène ( $t_R$  de 6 minutes environ).

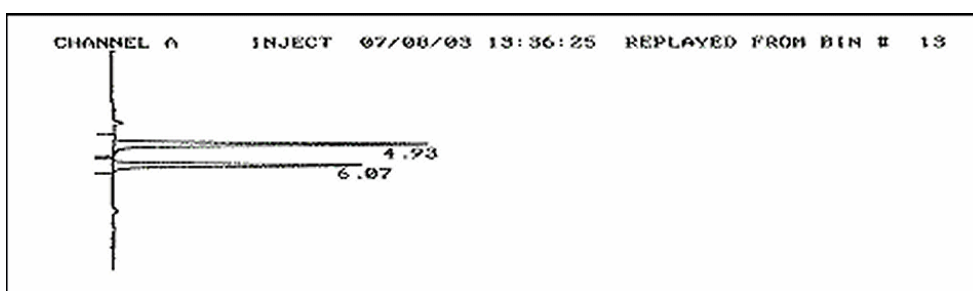


Figure 6 : chromatogramme de l'amphotéricine B ( $t_R = 4,93$  min) et 1-amino-4-nitronaphtalène ( $t_R = 6,07$  min)

Nous établissons le rapport aires des pics d'amphotéricine B sur 1-amino-4-nitronaphtalène pour chaque chromatogramme. La droite d'étalonnage est tracée avec les cinq points de la gamme, chaque chromatogramme provenant des points de la gamme donne le rapport des pics en fonction de la masse de poudre pesée. Pour un chromatogramme donné correspondant au dosage d'une gélule ou du sirop de décontamination digestive, nous avons le rapport des aires des pics, nous pouvons donc calculer la masse d'amphotéricine B contenu dans la gélule ou dans 2 mL de sirop.



## **II.A.2. Dosage de la colistine**

Nous avons tenté de doser en premier lieu la colistine par la technique de Le Brun (81) sans dérivation de la molécule, la séparation était incomplète car les pics obtenus ne revenaient pas à la ligne de base. Nous nous sommes donc basés sur la méthode CLHP de Whall T.J. (80).

### **II.A.2.1. Matériel utilisé**

Le matériel chromatographique utilisé est constitué par :

- ✓ Une pompe « HPLC P1000XR » (TSP)
- ✓ Un dégazeur (TSP)
- ✓ Un injecteur automatique Kontron 360 avec une boucle de 50µL
- ✓ Une précolonne Interchrom, Inertsil 5µ ODS2 référence CH 174800
- ✓ Une colonne Inertsil ODS2 (IN5OD2-15M, 150x4,6mm référence 709211 Interchrom)
- ✓ Un spectrophotomètre UV-visible modèle UV2000 (TSP) servant de détecteur
- ✓ Un logiciel Chromoquest (TSP) pour le traitement des données.

Les réactifs utilisés sont :

- ✓ Acétonitrile pour CLHP (Merck référence 1.14291.1000)
- ✓ Acide phosphorique H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (Merck)
- ✓ Eau stérile (Fresenius)
- ✓ Acide orthophosphorique 85% (SDS).

Le produit de référence est le sulfate de colistine Bufa importé par Inresa (lot 02L03G0, péremption 12.2004).

### **II.A.2.2. Mode opératoire**

Phase mobile :

Nous avons dissout 38,0 grammes de phosphate de sodium tribasique dans un mélange de 700 mL d'eau et 230 mL d'acétonitrile. Nous avons ajusté à pH 3 avec H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, puis complété à 1000 mL avec de l'eau distillée.

### Préparations des solutions pour la gamme d'étalonnage :

Nous réalisons des solutions de concentrations croissantes de colistine à partir de la poudre. Ces solutions sont indépendantes et sont réalisées à partir de pesées différentes de poudre (colistine Bufa), selon le schéma suivant :

Points de la gamme	1	2	3	4	5
Colistine Bufa	30 mg	40 mg	50 mg	60 mg	70 mg
Qsp eau	50 mL	50 mL	50 mL	50 mL	50 mL
Dilution de cette solution : 3 mL dans 50 mL de phase mobile					
Concentrations des solutions d'étalonnage	36 µg/mL	48 µg/mL	60 µg/mL	72 µg/mL	84 µg/mL

### Préparation des échantillons :

Gélule enfant 20 mg : nous solubilisons le contenu d'une gélule entière dans 20 mL d'eau. Puis nous effectuons une dilution au  $3/50^{\text{ème}}$  dans la phase mobile. La concentration finale attendue est de l'ordre de 60 µg/mL.

Sirop 0.595 g/120 mL : 1 mL du sirop est mis dans une fiole de 100 mL ajustée avec la phase mobile. La concentration attendue est alors voisine de 49,58 µg/mL.

Gélule adulte 64,4 mg : nous solubilisons le contenu d'une gélule entière dans 50 mL d'eau. Puis nous effectuons une dilution au  $1/25^{\text{ème}}$  dans la phase mobile. La concentration finale attendue est de l'ordre de 51,5 µg/mL.

### Conditions chromatographiques :

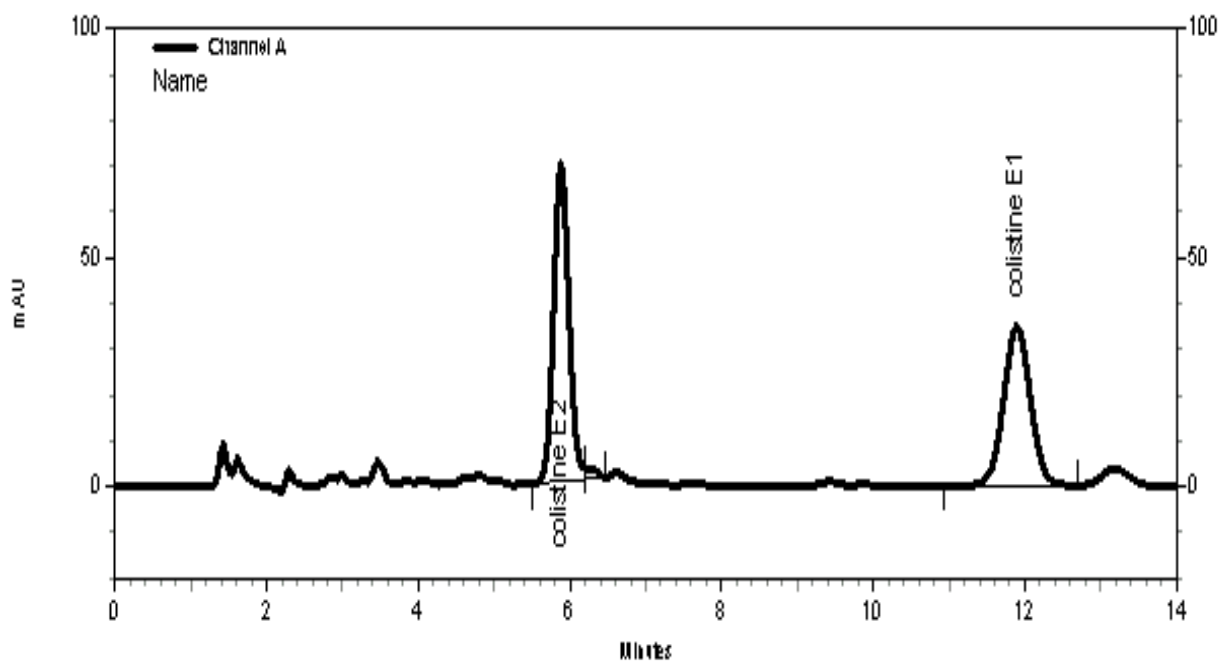
Le débit de la phase mobile est maintenu à 1 mL/min.

La longueur d'onde du spectrophotomètre UV est fixée à 210 nm.

Le temps d'analyse est de 14 minutes.

### Résultats :

La figure 6 ci-dessous représente le chromatogramme obtenu après injection d'un point de la gamme d'étalonnage. Nous obtenons deux pics, le premier correspond à la polymyxine E2 (temps de rétention  $t_R$  de 6 minutes environ) et le second à la polymyxine E1 ( $t_R$  de 12 minutes environ).



*Figure 7 : Chromatogramme de la colistine (polymyxine E2  $t_R = 5,95$  min et polymyxine E1  $t_R = 11,97$  min)*

Les aires des pics E1 et E2 sont additionnées dans chaque chromatogramme. La droite d'étalonnage est tracée avec les cinq points de la gamme, chaque chromatogramme provenant des points de la gamme donne la somme des pics en fonction de la masse de poudre pesée. Pour un chromatogramme donné correspondant au dosage d'une gélule ou du sirop de décontamination digestive, nous avons la somme des aires des pics, nous pouvons donc calculer la masse de colistine contenue dans la gélule ou dans 1 mL de sirop.

### **II.A.3. Dosage de la gentamicine**

La méthode d'identification CLHP de la Pharmacopée Européenne IV<sup>ème</sup> édition nous a permis de l'appliquer au dosage. La séparation des pics a été satisfaisante, ainsi nous avons choisi de garder cette technique décrite ci-dessous.

#### **II.A.3.1. Matériel utilisé**

Le matériel chromatographique utilisé est constitué par :

- ✓ Une pompe « HPLC P1000XR » (TSP)
- ✓ Un dégazeur (TSP)
- ✓ Un injecteur automatique Kontron 360 avec une boucle de 50µL
- ✓ Une précolonne Upchurch (20x2 mm remplie à sec avec du Bondapak C18 Corasil 40 µm Waters)
- ✓ Une colonne Symmetry C18, 150x3,9 mm (Waters)
- ✓ Un spectrophotomètre UV-visible modèle UV2000 (TSP) servant de détecteur
- ✓ Un logiciel Chromoquest (TSP) pour le traitement des données.

Les réactifs utilisés sont :

- ✓ Heptane sulfonate de sodium (Sigma référence H-2766)
- ✓ Acide acétique glacial (Carlo Erba code 401422)
- ✓ Eau stérile (Fresenius)
- ✓ Acide borique (Carlo Erba code 402766)
- ✓ Méthanol pour CLHP (SDS référence 0933716)
- ✓ Phtalaldéhyde (Sigma référence P1378)
- ✓ Hydroxyde de potassium (Prolabo code 26.657.298)
- ✓ Acide thioglycolique (Prolabo code 20.495.265)

Le produit de référence est le sulfate de gentamicine Panpharma conforme à la Pharmacopée Européenne.

#### **II.A.3.2. Mode opératoire**

Réactif au phtalaldéhyde :

Préparation de la solution d'acide borique : nous mettons 2,47 grammes d'acide borique dans une fiole de 100 mL, puis nous ajoutons 75 mL d'eau. Nous ajustons à pH 10,4 avec une solution d'hydroxyde de potassium à 450 g/L et finissons de compléter la fiole avec de l'eau.

Préparation du réactif au phtalaldéhyde : nous dissolvons 1 gramme de phatalaldéhyde dans 5 mL de méthanol, puis nous y ajoutons 95 mL de la solution d'acide borique réalisée précédemment et 2 mL d'acide thioglycolique. Nous ajustons le pH à 10,4 avec la solution d'hydroxyde de potassium à 450 g/L. Ce réactif se conserve à l'abri de la lumière et il doit être utilisé dans les trois jours qui suivent sa préparation.

Dérivation de la gentamicine :

A 10 mL des solutions d'étalonnage et des échantillons, nous avons ajouté 4 mL de réactif au phtalaldéhyde dans une fiole de 25 mL ajustée avec du méthanol. Puis nous avons mis la fiole dans un bain-marie à 60° pendant 15 min et refroidie à température ambiante. La solution obtenue n'est pas stable et elle doit être utilisée immédiatement, sinon nous devons la refroidir à 0°C et l'utiliser dans les 4 heures qui suivent.

Phase mobile :

Pour un litre, nous mélangeons 50 mL d'acide acétique, 250 mL d'eau stérile, 700 mL de méthanol et on ajoute 5,5 grammes d'heptane sulfonate de sodium.

Préparations des solutions pour la gamme d'étalonnage :

Nous réalisons des solutions de concentrations croissantes de gentamicine à partir de la poudre. Ces solutions sont indépendantes et sont réalisées à partir de pesées différentes de poudre (gentamicine Panpharma), selon le schéma suivant :

Points de la gamme	1	2	3	4	5
Gentamicine Panpharma	15 mg	20 mg	25 mg	30 mg	35 mg
Qsp eau	25 mL	25 mL	25 mL	25 mL	25 mL
Concentrations des solutions d'étalonnage	0,6 mg/mL	0,8 mg/mL	1 mg/mL	1,2 mg/mL	1,4 mg/mL

Préparation des échantillons :

Gélule enfant 90 mg : nous solubilisons le contenu d'une gélule entière dans 100 mL d'eau. La concentration finale attendue est de l'ordre de 0,9 mg/mL.

Sirap 2,160 g/120 mL : 2,7 mL du sirap est mis dans une fiole de 50 mL ajustée avec de l'eau stérile. La concentration finale attendue est alors voisine de 0,972 mg/mL.

Gélule adulte 20 mg : nous solubilisons le contenu d'une gélule entière dans 20 mL d'eau. La concentration finale attendue est de l'ordre de 1 mg/mL.

### Conditions chromatographiques :

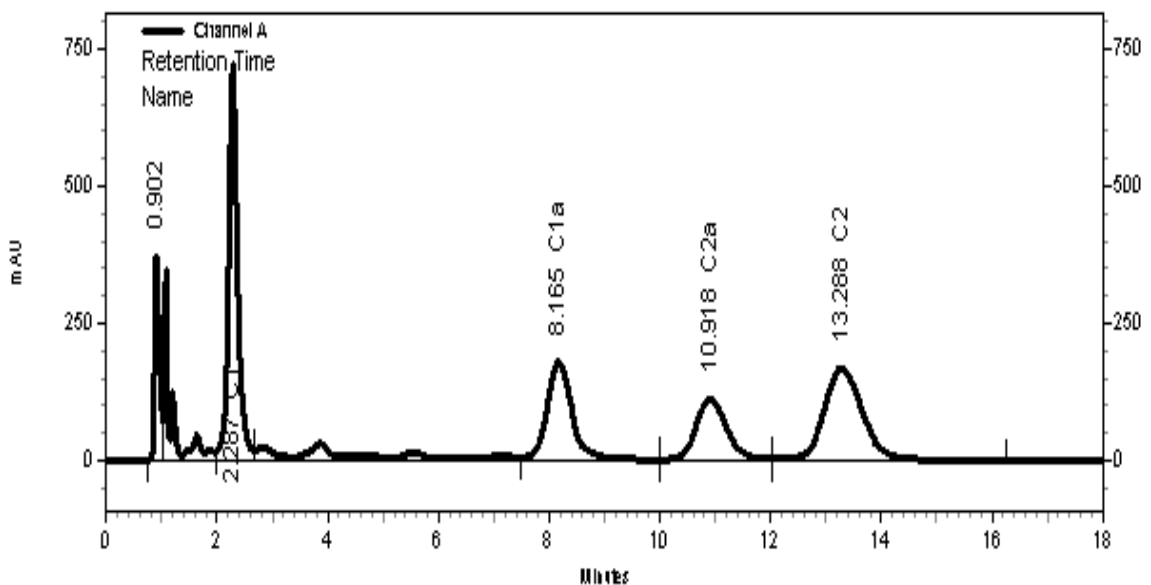
Le débit de la phase mobile est maintenu à 1,5 mL/min.

La longueur d'onde du spectrophotomètre UV est fixée à 330 nm.

Le temps d'analyse est de 18 minutes.

### Résultats :

La figure 2 (p.51) représente le chromatogramme obtenu après injection d'un point de la gamme d'étalonnage. Nous obtenons quatre pics de gentamicine, le premier correspond à la C1 (temps de rétention  $t_R$  de 2 minutes environ), le deuxième à C1a ( $t_R$  de 8 minutes environ), le troisième à C2a (temps de rétention  $t_R$  de 11 minutes environ) et le dernier à C2 (temps de rétention  $t_R$  de 13 minutes environ).



**Figure 8 :** Chromatogramme de la gentamicine (gentamicine C1  $t_R = 2,2$  min ; gentamicine C1a  $t_R = 8,2$  min ; gentamicine C2a  $t_R = 10,8$  min ; gentamicine C2  $t_R = 13,3$  min )

Les aires des quatre pics sont additionnées dans chaque chromatogramme. La droite d'étalonnage est tracée avec les cinq points de la gamme, chaque chromatogramme provenant des points de la gamme donne la somme des pics en fonction de la masse de poudre pesée. Pour un chromatogramme donné correspondant au dosage d'une gélule ou du sirop de décontamination digestive, nous avons la somme des aires des pics, nous pouvons donc calculer la masse de gentamicine contenu dans la gélule ou dans 2,7 mL de sirop.

## **II.A.4. Dosage de la vancomycine**

Nous avons commencé le dosage sur la chaîne chromatographique à injection manuelle utilisée pour le dosage de l'amphotéricine B. Nous nous sommes basés sur la méthode CLHP de Wood M.J. (103).

### **II.A.4.1. Matériel utilisé**

Le matériel chromatographique utilisé pour la séparation et le dosage de la vancomycine est le même que celui utilisé pour la colistine :

- ✓ Une pompe « HPLC P1000XR » (TSP)
- ✓ Un dégazeur (TSP)
- ✓ Un injecteur automatique Kontron 360 avec une boucle de 50µL
- ✓ Une précolonne Interchrom, Inertsil 5µ ODS2 référence CH 174800
- ✓ Une colonne Inertsil ODS2 (IN5OD2-15M, 150x4,6mm référence 709211 Interchrom)
- ✓ Un spectrophotomètre UV-visible modèle UV2000 (TSP) servant de détecteur
- ✓ Un logiciel Chromoquest (TSP) pour le traitement des données.

Malgré cela, le dosage de la colistine et de la vancomycine se feront séparément car les phases mobiles sont différentes.

Les réactifs utilisés sont :

- ✓ Acétonitrile pour CLHP (Merck référence 1.14291.1000)
- ✓ Diéthylamine (Prolabo référence 23.378.261)
- ✓ Eau stérile (Fresenius)
- ✓ Acide phosphorique H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 10%

Le produit de référence est le chlorhydrate de vancomycine Fahraus Pharma importée par Inresa (lot FP02255V, péremption 09.2005).

### **II.A.4.2. Mode opératoire**

Phase mobile :

Nous avons préparé un mélange de 85 mL d'eau et 15 mL d'acétonitrile. Nous avons ajouté 0,5 mL de diéthylamine, puis ajusté à pH 3,5 avec H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 10%.

Préparations des solutions pour la gamme d'étalonnage :

Nous réalisons des solutions de concentrations croissantes de vancomycine à partir de la poudre. Ces solutions sont indépendantes et réalisées à partir de pesées différentes de poudre (vancomycine Fahraus Pharma), selon le schéma suivant :

Points de la gamme	1	2	3	4	5
vancomycine Fahraus Pharma	36 mg	48 mg	60 mg	72 mg	84 mg
Qsp eau	50 mL	50 mL	50 mL	50 mL	50 mL
Dilution de cette solution au 1/50 <sup>ème</sup> dans la phase mobile					
Concentrations des solutions d'étalonnage	14,4 µg/mL	19,2 µg/mL	24 µg/mL	28,8 µg/mL	33,6 µg/mL

Préparation des échantillons :

Gélule enfant 60 mg : nous solubilisons le contenu d'une gélule entière dans 50 mL d'eau. Puis nous effectuons une dilution au 1/50<sup>ème</sup> dans la phase mobile. La concentration finale attendue est voisine de 24 µg/mL.

Sirop enfant 1,5 g/120 mL : 2 mL du sirop est mis dans une fiole de 20 mL ajustée avec de l'eau. Puis nous effectuons une dilution au 1/50<sup>ème</sup> dans la phase mobile. La concentration finale attendue est proche de 25 µg/mL.

Conditions chromatographiques :

Contrairement à la technique de Wood qui fixe le débit de la phase mobile à 1,5 mL/min, nous retenons un débit à 1 mL/min, suffisant pour obtenir un pic de bonne qualité.

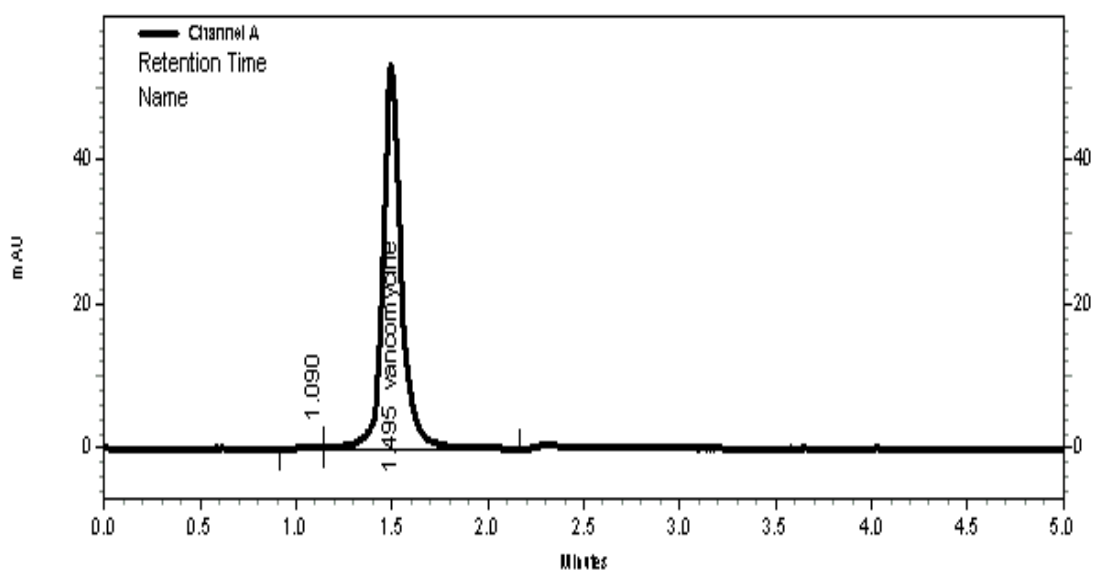
La longueur d'onde du spectrophotomètre UV est fixée à 281 nm.

Le temps d'analyse est de 5 minutes.

Résultats :

La figure 8 (p.54) représente le chromatogramme obtenu après injection d'un point de la gamme d'étalonnage. Nous obtenons un seul pic correspondant à la vancomycine (temps de rétention  $t_R$  de 1,5 minutes environ).





*Figure 9 : chromatogramme de la vancomycine ( $t_R = 1,5 \text{ min}$ )*

L'aire du pic est mesurée dans chaque chromatogramme. La droite d'étalonnage est tracée avec les cinq points de la gamme, chaque chromatogramme provenant des points de la gamme donne la aire du pic en fonction de la masse de poudre pesée. Pour un chromatogramme donné correspondant au dosage d'une gélule ou du sirop de décontamination digestive, nous avons la aire du pic, nous pouvons donc calculer la masse de vancomycine contenu dans la gélule ou dans 2 mL de sirop.

## **II.B. Plan expérimental**

### **II.B.1. Validation des techniques de séparation CLHP**

La SFSTP a publié un protocole de validation de techniques d'analyse [SFSTP], celui-ci ayant servi de référence pour la validation des techniques de séparation CLHP : chaque quantité de la poudre de colistine (ou de gentamicine) est pesée individuellement, chaque résultat issu de cette quantité de poudre est donc indépendant.

Le protocole de validation présenté pour le dosage des gélules et du sirop comporte deux étapes :

– Evaluation de la linéarité :

La linéarité d'une procédure d'analyse est sa capacité (à l'intérieur d'un certain intervalle) d'obtenir des résultats directement proportionnels à la concentration (quantité) en substance à examiner dans l'échantillon (SFSTP).

L'intervalle de concentration à valider est couvert par une série de cinq concentrations, régulièrement espacées et positionnées autour de 60, 80, 100, 120 et 140% de la concentration théorique de la poudre de référence choisie. Nous avons effectué trois séries indépendantes de ces cinq concentrations à raison d'une série par jour et par molécule. Pour les quatre molécules, ces concentrations correspondent à la gamme d'étalonnage présentée plus haut.

– Evaluation de la fidélité (essai de répétabilité et de reproductibilité) :

La fidélité de la procédure d'analyse exprime l'étroitesse de l'accord (degré de dispersion) entre une série de mesures provenant de multiples prises d'un même échantillon homogène dans des conditions prescrites (SFSTP) : nous avons effectué trois séries de six pesées de la poudre de référence choisie, à 100% de la concentration théorique.

### **II.B.2. Etude de stabilité**

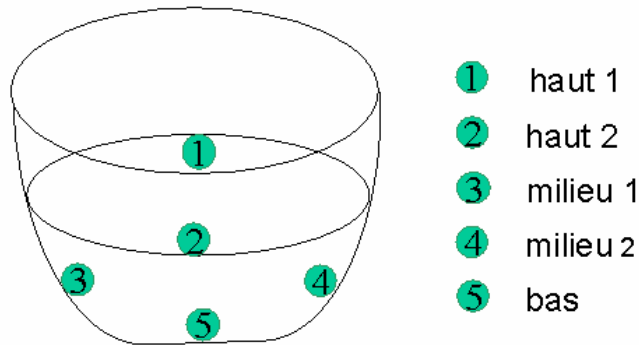
L'étude de stabilité des gélules pour adultes nécessite un prérequis : l'étude de l'homogénéité de la poudre dans le mortier avant remplissage.

#### **II.B.2.1. Homogénéité de teneur dans le mortier**

L'étude de l'homogénéité dans le mortier permet d'éviter d'imputer un mauvais mélange des poudres de gentamicine et de colistine avant le remplissage lors de l'interprétation des résultats.

Le plan d'échantillonnage est le suivant :

prélèvement d'une masse de poudre correspondant environ à 84,4 mg (soit à la masse du contenu d'une gélule adulte) à cinq endroits différents du mortier :



Un prélèvement permet de ne réaliser qu'un seul dosage de colistine et de gentamicine.

La notion de teneur correspond à une concentration massique (masse/masse) ; selon la Pharmacopée Européenne, la teneur est la masse de poudre dosée sur la masse de poudre totale, elle est exprimée en pourcentage. Celle ci précise les limites inférieure et supérieure à ne pas dépasser pour l'homogénéité de teneur, au delà desquelles le lot fabriqué ne serait pas accepté, ces limites sont 85 et 115% de la teneur moyenne.

Nous effectuons une pesée de chaque prélèvement (masse de poudre totale pesée). avant de doser la colistine et la gentamicine (résultat obtenu en masse de colistine ou gentamicine à doser). Nous calculons le rapport R' qui est ensuite rapporté au rapport R théorique, nous obtenons enfin la teneur en colistine ou en gentamicine exprimée en pourcentage :

$$R = \frac{\text{Masse colistine (ou gentamicine) théorique}}{\text{Masse théorique de poudre totale}} \times 100 = \frac{64,4 \text{ mg (20 mg)}}{84,4 \text{ mg}} \times 100 = 76,3\% \text{ (ou } 23,7\%)$$

$$R' = \frac{\text{Masse colistine (ou gentamicine) dosée}}{\text{Masse de poudre totale pesée}} \times 100$$

$$\text{Teneur en colistine (ou gentamicine) en \%} = \frac{R'}{R} \times 100$$

## II.B.2.2. Dosage dans le temps des constituants des gélules

Le plan d'échantillonnage pour la réalisation de l'étude de stabilité est le suivant : sur une production de 2000 gélules réalisées à la Pharmacie de l'Hôpital Nord de St Etienne fin janvier 2004, nous avons réalisé, pendant tout le cours de la production, un échantillonnage au hasard de 190 gélules, qui ont été réparti selon les modalités de stockage suivant :

- soixante gélules sont placées dans un pilulier et mises au réfrigérateur pour une conservation à l'obscurité et à température de 4°C,
- soixante gélules sont placées dans un pilulier et mises à l'étuve pour une conservation à l'obscurité et à température de 40°C,
- soixante gélules sont placées dans un pilulier et laissées sur la paillasse du laboratoire de contrôle pour une conservation à la lumière/obscurité et à température ambiante,
- les dix gélules restantes ont été étudiées dans la semaine pour commencer l'étude de stabilité (mois M0).

Le schéma suivant décrit le plan d'échantillonnage réalisé pour doser les principes actifs des gélules dans l'étude de stabilité (colistine et gentamicine). Après prélèvement, à M0, on a dosé dix gélules, puis un mois après à M1, on a pris dix gélules du pilulier à 4°C, dix gélules du pilulier de la paillasse et dix gélules du pilulier de l'étuve...on a dosé les constituants de trente gélules tous les mois pendant trois mois, puis trente gélules le sixième mois. Au total, 13 échantillons de dix gélules sont prélevés tout au long de l'étude de stabilité.

		Nombre de gélules prélevées				
		MO	M1	M2	M3	M6
Mois						
4°C			10	10	10	10
T amb.		10	10	10	10	10
40°C			10	10	10	10

Avant leur dosage, chaque gélule est pesée. En parallèle, une trentaine de gélules vides n°4 est pesée pour obtenir une masse moyenne de gélule vide, celle ci va permettre de connaître la masse de poudre de chaque gélule pleine pesée (qui correspond au dénominateur du rapport R'). Ce chiffre de trente a été choisi car il correspond statistiquement au nombre n (effectif de l'échantillon) minimal des grands échantillons, ainsi nous obtiendrons une moyenne la plus proche possible de la moyenne théorique du fournisseur.

Les résultats sont exprimés similairement à l'homogénéité de teneur avant remplissage en calculant les rapports R et R' (voir paragraphe précédent).

### III. Résultats

#### III.A. Validation des méthodes CLHP

##### III.A.1. Linéarité

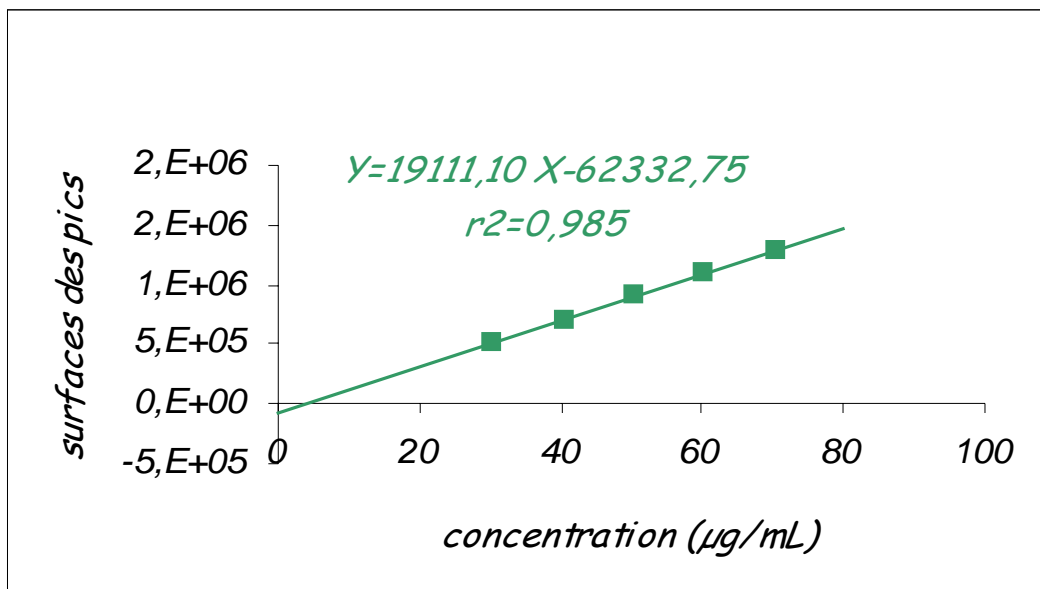


Figure 10 : Dosage en CLHP de la colistine : linéarité de la méthode de dosage

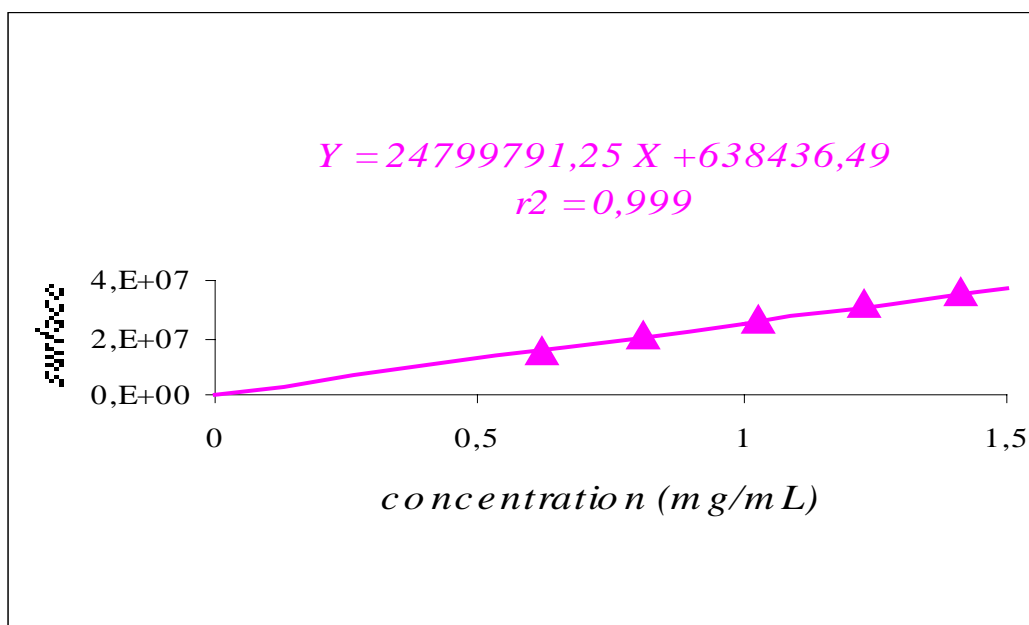


Figure 11 : Dosage en CLHP de la gentamicine : linéarité de la méthode de dosage

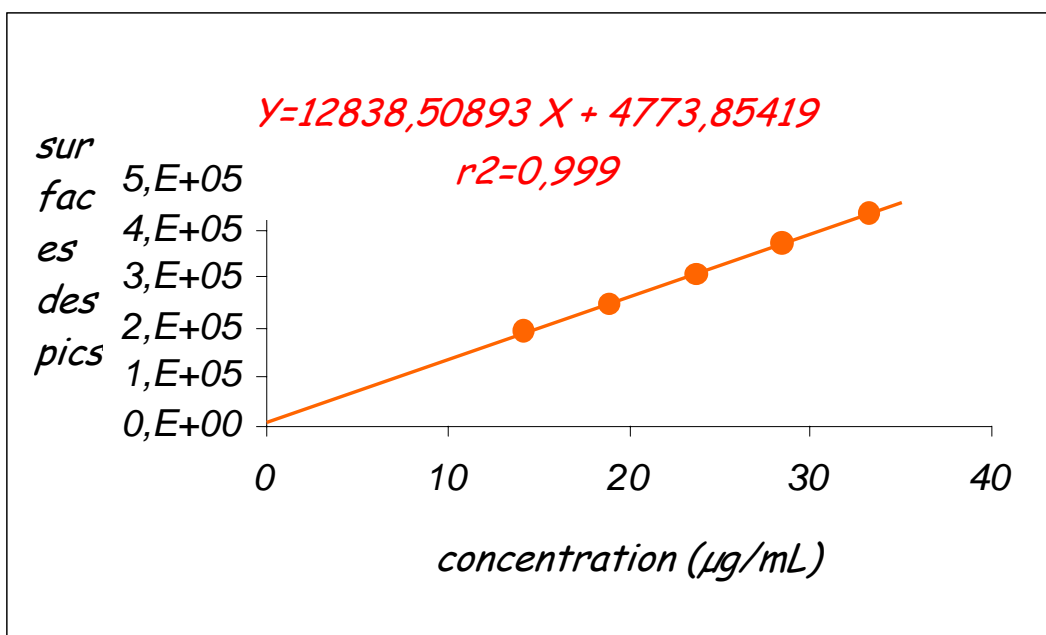


Figure 12 : dosage en CLHP de la vancomycine : linéarité de la méthode de dosage

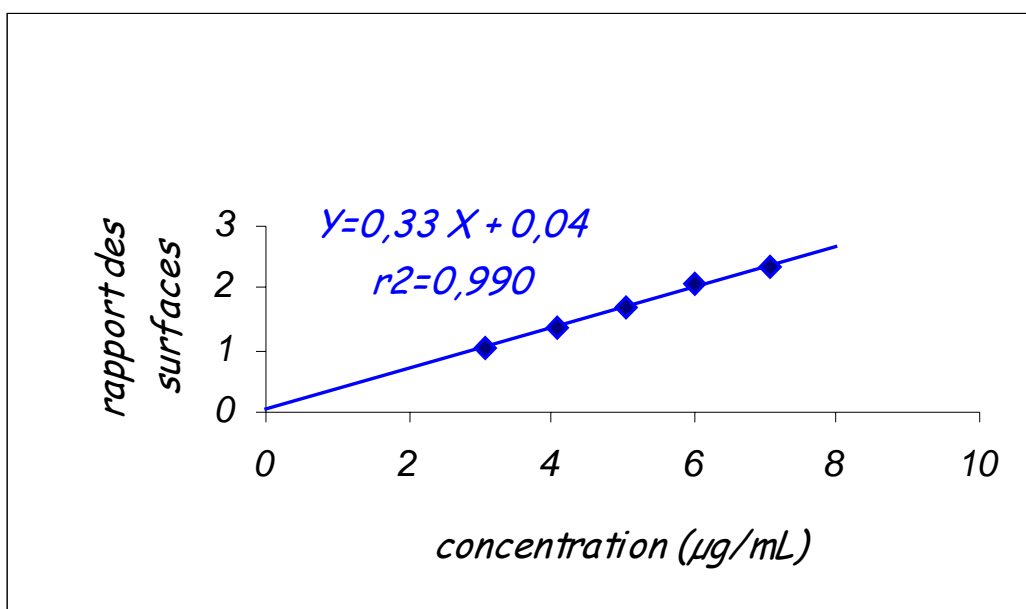


Figure 13 : dosage en CLHP de l'amphotéricine B : linéarité de la méthode de dosage

### **III.A.2. Fidélité**

Nous avons calculés, selon les recommandations de validation de la SFSTP, les coefficients de reproductibilité et de reproductibilité. Ces résultats sont décrits dans le tableau III ci-dessous.

Tableau III :

Fidélité	Répétabilité (%)	Reproductibilité (%)
Amphotéricine B	3,29	3,66
Colistine	0,73	1,22
Gentamicine	2,64	3,24
Vancomycine	0,81	1,48

### **III.B. Etude de stabilité des gélules adultes**

#### **III.B.1. Homogénéité de teneur dans le mortier**

Dans l'essai d'uniformité de teneur des gélules, la Pharmacopée Européenne exige de ne pas dépasser les limites seuil de plus ou moins 15% de la moyenne des teneurs. Ces valeurs seuils seront utilisées comme normes à ne pas dépasser dans notre étude sur l'homogénéité de teneur de la poudre dans le mortier.

Les résultats sont décrits pour la colistine dans le tableau VIII et la figure 9 (p.64), ceux de la gentamicine dans le tableau IX et la figure 10 (p. 65).

Tableau III : Homogénéité de teneur de la colistine dans le mortier avant remplissage

COLISTINE					
endroit du mortier	haut 1	haut 2	milieu 1	milieu 2	fond
masse de poudre totale pesée (mg)	84,5	84,5	84,7	84,5	84,5
masse colistine dosée (mg)	63,6	64,0	63,9	61,2	63,8
<b>teneur %</b>	<b>98,6</b>	<b>99,3</b>	<b>98,8</b>	<b>94,9</b>	<b>99,1</b>

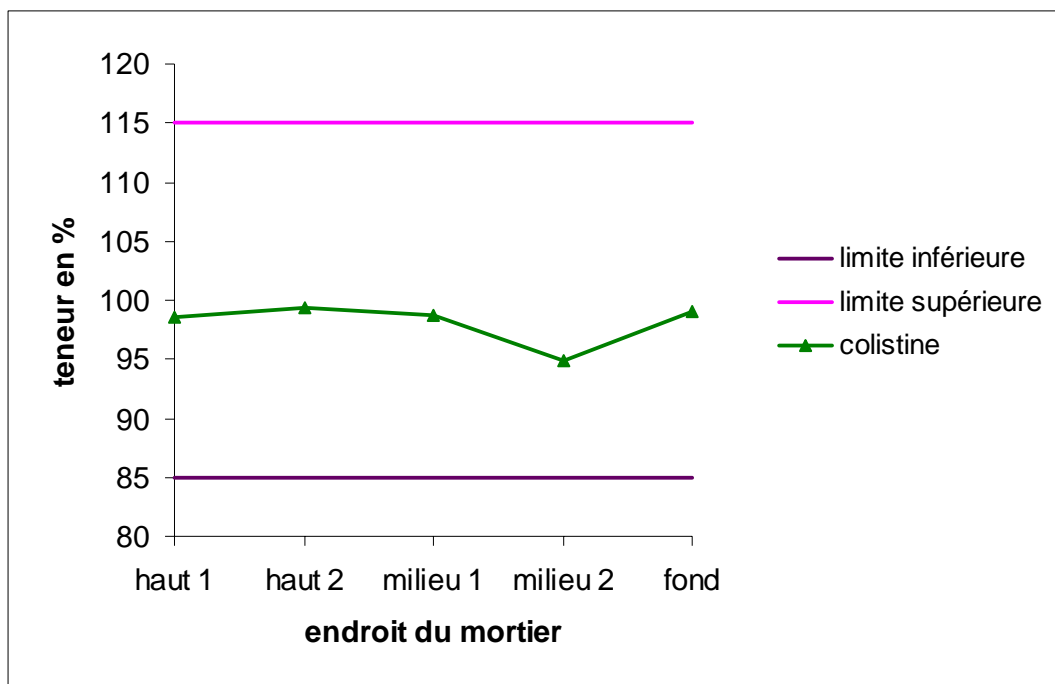


Figure 14 : Représentation graphique de l'homogénéité de teneur de la colistine dans le mortier.



Tableau IV : Homogénéité de teneur de la gentamicine dans le mortier avant remplissage

<b>GENTAMICINE</b>					
<b>endroit du mortier</b>	<b>haut 1</b>	<b>haut 2</b>	<b>milieu 1</b>	<b>milieu 2</b>	<b>fond</b>
masse de poudre totale pesée (mg)	84,5	84,5	84,7	84,5	84,5
masse gentamicine dosée (mg)	18,9	19,4	19,5	18,9	18,9
<b>teneur %</b>	<b>94,6</b>	<b>96,9</b>	<b>97,1</b>	<b>94,5</b>	<b>94,6</b>

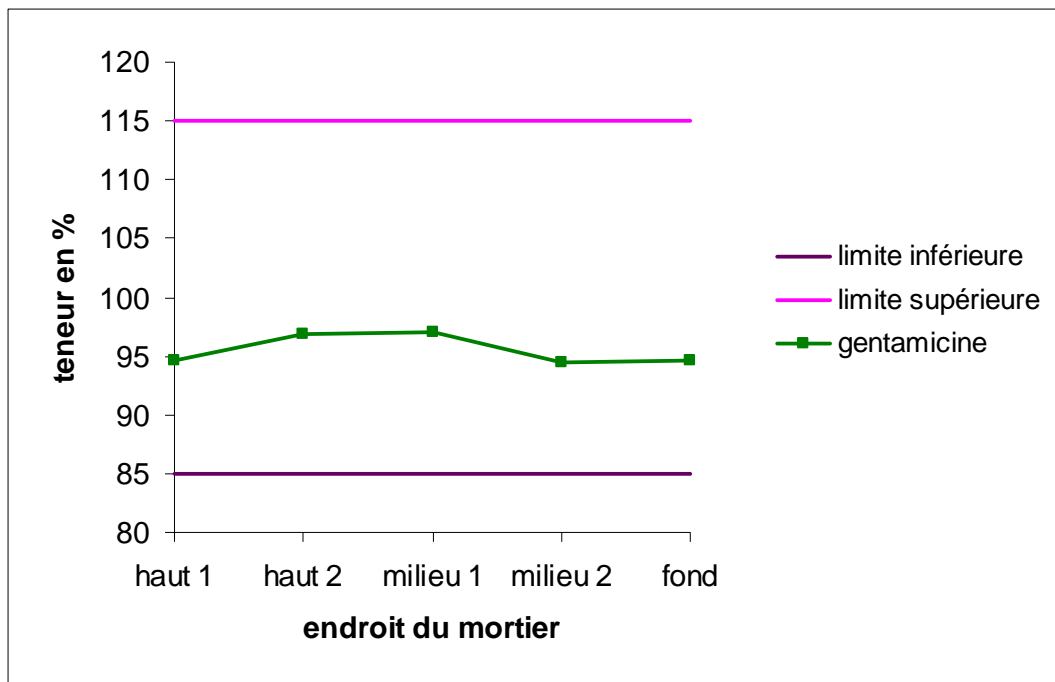


Figure 15 : Représentation graphique de l'homogénéité de teneur de la gentamicine dans le mortier.

### **III.B.2. Dosage dans le temps des principes actifs des gélules**

Une uniformité de masse sur chaque échantillon de dix gélules a été réalisée selon la Pharmacopée Européenne. Dans le cas des gélules de moins de 300 mg (cas de nos gélules), la masse individuelle de deux au plus des 10 gélules par échantillon au plus peut s'écarter de la masse moyenne de 10%, mais la masse d'aucune gélule ne peut s'écarter de plus de 20%. Les calculs ont montré une uniformité de masse pour la colistine et la gentamicine : seule une masse de gélule est supérieure à 10% de la masse moyenne de l'échantillon M1 température ambiante, cette masse n'excède pas toutefois les 20% au delà duquel l'essai d'uniformité de masse est non conforme.

De même, une uniformité de teneur sur chaque échantillon de dix gélules a été réalisée selon la Pharmacopée Européenne. Dans le cas des gélules (essai B), la teneur individuelle d'une gélule au plus de situe en dehors des limites de 85 à 115% de la teneur moyenne des dix gélules. Les calculs ont montré une uniformité de teneur pour la colistine et la gentamicine sur tous les échantillons car toutes les gélules se situent dans l'intervalle ci dessous.

Une pesée de trente gélules vides n°4 est préalablement réalisée, la moyenne des masses est de 38,2 mg (écart type de 0,8 mg et coefficient de variation CV de 2,1%).

Il est à noter que les gélules ont gardé un aspect normal (enveloppe des gélules souple, pas de coloration anormale de la poudre) tout au long de l'étude.

Le tableau 3 montre les moyennes des masse des gélules dosées tout au long de l'étude de stabilité.

Le tableau 4 montre les résultats bruts de la masse de colistine et de gentamicine dosée dans les gélules sur les six mois d'étude.

Les tableaux et les figures numérotés de 5 à 10 présentent les résultats de stabilité sur les six mois des gélules conservées à température ambiante, au réfrigérateur et à l'étuve.

*Tableau V : Masse des gélules dosées au cours de l'étude de stabilité*

		MO			M1			M2			M3			M6		
		moyenne (mg)	écart type (mg)	CV (%)	moyenne (mg)	écart type (mg)	CV (%)	moyenne (mg)	écart type (mg)	CV (%)	moyenne (mg)	écart type (mg)	CV (%)	moyenne (mg)	écart type (mg)	CV (%)
COLISTINE	T ambiante	123,5	3,0	2,4	120,0	8,7	7,3	125,0	2,1	1,7	123,9	4,0	3,2	125,0	3,1	2,5
	T 4°C				122,0	3,9	3,2	127,6	4,1	3,2	126,1	4,2	3,4	127,5	2,7	2,1
	T 40°C				122,0	6,5	5,3	117,6	3,9	3,3	120,0	2,6	2,1	122,2	1,5	1,3
GENTAMICINE	T ambiante	123,5	3,0	2,4	120,0	8,7	7,3	125,0	2,1	1,7	123,9	4,0	3,2	125,0	3,1	2,5
	T 4°C				122,0	3,9	3,2	127,6	4,1	3,2	126,1	4,2	3,4	127,5	2,7	2,1
	T 40°C				122,0	6,5	5,3	117,6	3,9	3,3	120,0	2,6	2,1	122,2	1,5	1,3

*Tableau VI : Résultats bruts de la masse de colistine et de gentamicine retrouvée par CLHP dans les gélules au cours de l'étude de stabilité*

		<b>M0</b>			<b>M1</b>			<b>M2</b>			<b>M3</b>			<b>M6</b>		
		<b>moyenne (mg)</b>	<b>écart type (mg)</b>	<b>CV (%)</b>	<b>moyenne (mg)</b>	<b>écart type (mg)</b>	<b>CV (%)</b>	<b>moyenne (mg)</b>	<b>écart type (mg)</b>	<b>CV (%)</b>	<b>moyenne (mg)</b>	<b>écart type (mg)</b>	<b>CV (%)</b>	<b>moyenne (mg)</b>	<b>écart type (mg)</b>	<b>CV (%)</b>
<b>COLISTINE</b>	<b>T ambiante</b>	<b>63,6</b>	<b>2,6</b>	<b>4,1</b>	<b>63,1</b>	<b>6,1</b>	<b>9,7</b>	<b>67,9</b>	<b>1,6</b>	<b>2,3</b>	<b>67,4</b>	<b>2,9</b>	<b>4,4</b>	<b>66,8</b>	<b>2,8</b>	<b>4,2</b>
	<b>T 4°C</b>				<b>63,1</b>	<b>2,8</b>	<b>4,4</b>	<b>70,0</b>	<b>3,2</b>	<b>4,6</b>	<b>68,7</b>	<b>3,5</b>	<b>5,0</b>	<b>67,8</b>	<b>1,8</b>	<b>2,6</b>
	<b>T 40°C</b>				<b>65,8</b>	<b>4,4</b>	<b>6,7</b>	<b>64,9</b>	<b>2,6</b>	<b>4,1</b>	<b>68,8</b>	<b>2,1</b>	<b>3,1</b>	<b>69,5</b>	<b>1,4</b>	<b>2,0</b>
<b>GENTAMICINE</b>	<b>T ambiante</b>	<b>19,5</b>	<b>0,9</b>	<b>4,6</b>	<b>19,5</b>	<b>1,2</b>	<b>6,2</b>	<b>19,8</b>	<b>0,5</b>	<b>2,6</b>	<b>20,4</b>	<b>0,8</b>	<b>4,0</b>	<b>19,8</b>	<b>0,8</b>	<b>4,1</b>
	<b>T 4°C</b>				<b>19,6</b>	<b>0,9</b>	<b>4,6</b>	<b>20,1</b>	<b>0,9</b>	<b>4,4</b>	<b>21,0</b>	<b>1,2</b>	<b>5,5</b>	<b>19,3</b>	<b>0,6</b>	<b>3,0</b>
	<b>T 40°C</b>				<b>19,8</b>	<b>1,6</b>	<b>8,1</b>	<b>19,5</b>	<b>1,0</b>	<b>5,1</b>	<b>19,2</b>	<b>0,5</b>	<b>2,7</b>	<b>20,3</b>	<b>0,3</b>	<b>1,7</b>

Tableau VII : Teneur en colistine des gélules stockées à température ambiante

mois	0	1	2	3	4	5	6
limite supérieure	108	108	108	108	108	108	108
limite inférieure	88	88	88	88	88	88	88
colistine en %	98	101	103	103	102,5	101,9	101

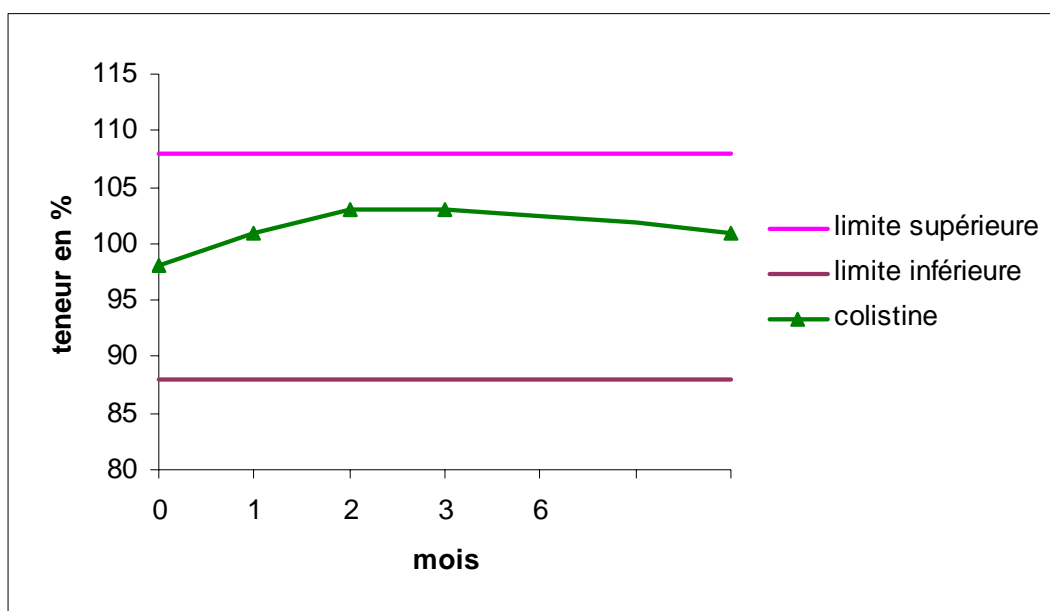


Figure 16 : Représentation graphique de la teneur en colistine des gélules stockées à température ambiante

Tableau VIII : Teneur en colistine des gélules stockées à +4°C

mois	0	1	2	3	4	5	6
limite supérieure	108	108	108	108	108	108	108
limite inférieure	88	88	88	88	88	88	88
colistine en %	98	99	103	102	101,3	100,7	100

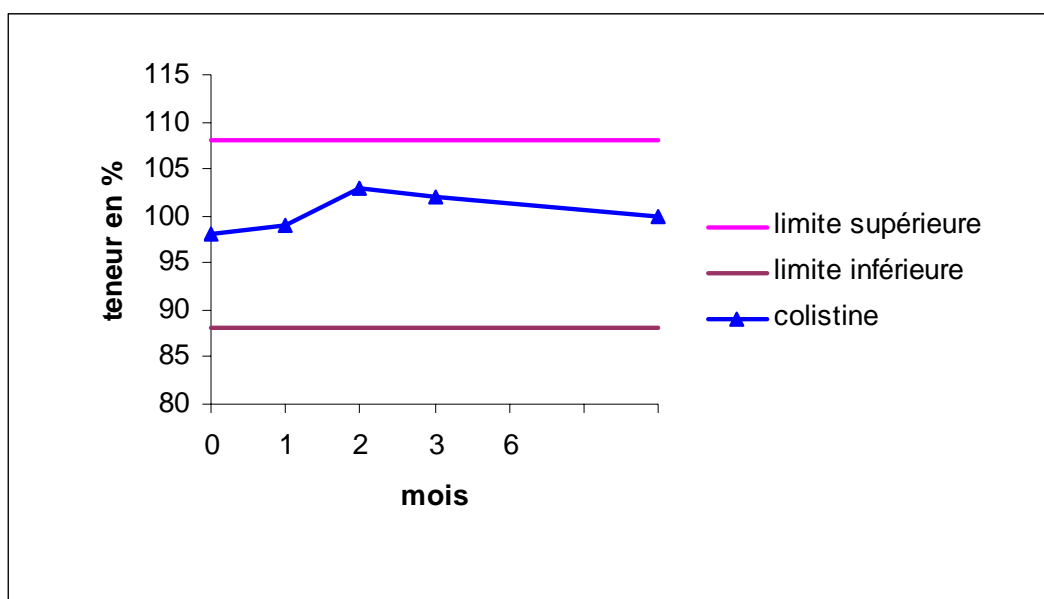


Figure 17 : Représentation graphique de la teneur en colistine des gélules stockées à +4°C

Tableau IX : Teneur en colistine des gélules stockées à +40°C

mois	0	1	2	3	4	5	6
limite supérieure	108	108	108	108	108	108	108
limite inférieure	88	88	88	88	88	88	88
colistine en %	98	103	107	110	109,3	108,7	108

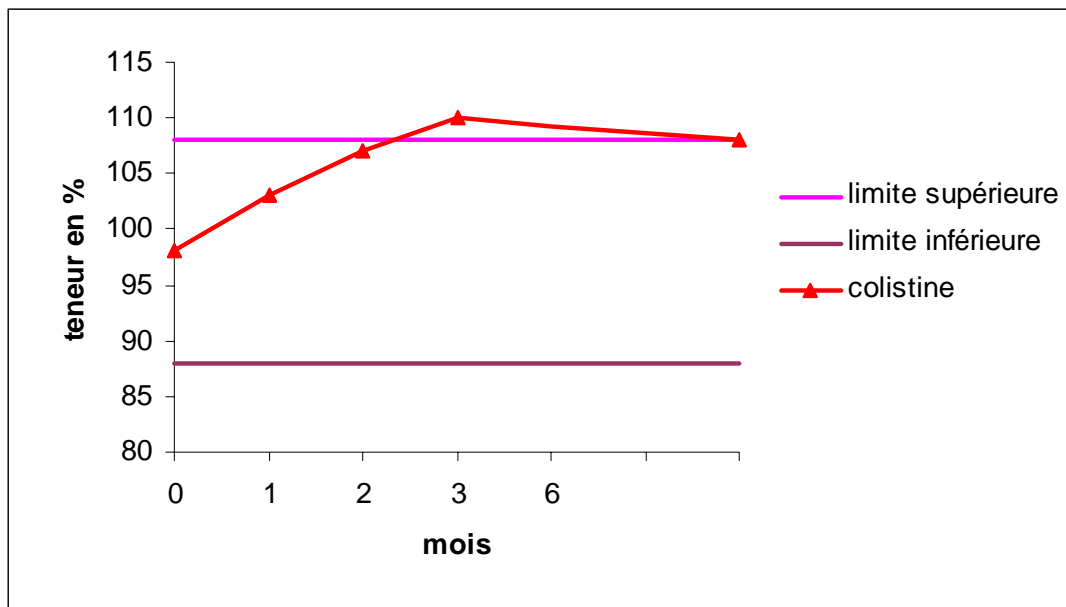


Figure 18 : Représentation graphique de la teneur en colistine des gélules stockées à +40°C

Tableau X : Teneur en gentamicine des gélules stockées à température ambiante

mois	0	1	2	3	4	5	6
limite supérieure	106	106	106	106	106	106	106
limite inférieure	86	86	86	86	86	86	86
gentamicine en %	96	101	96	101	99,5	97,7	96

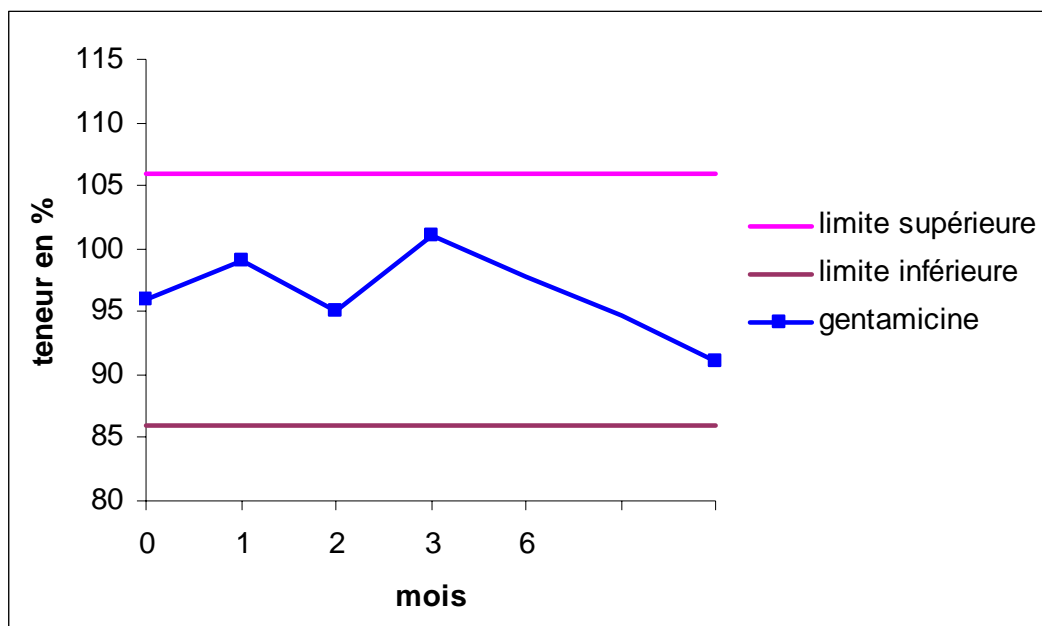


Figure 19 : Représentation graphique de la teneur en gentamicine des gélules stockées à température ambiante



Tableau XI : Teneur en gentamicine des gélules stockées à +4°C

mois	0	1	2	3	4	5	6
limite supérieure	106	106	106	106	106	106	106
limite inférieure	86	86	86	86	86	86	86
gentamicine en %	96	99	95	101	97,8	94,6	91

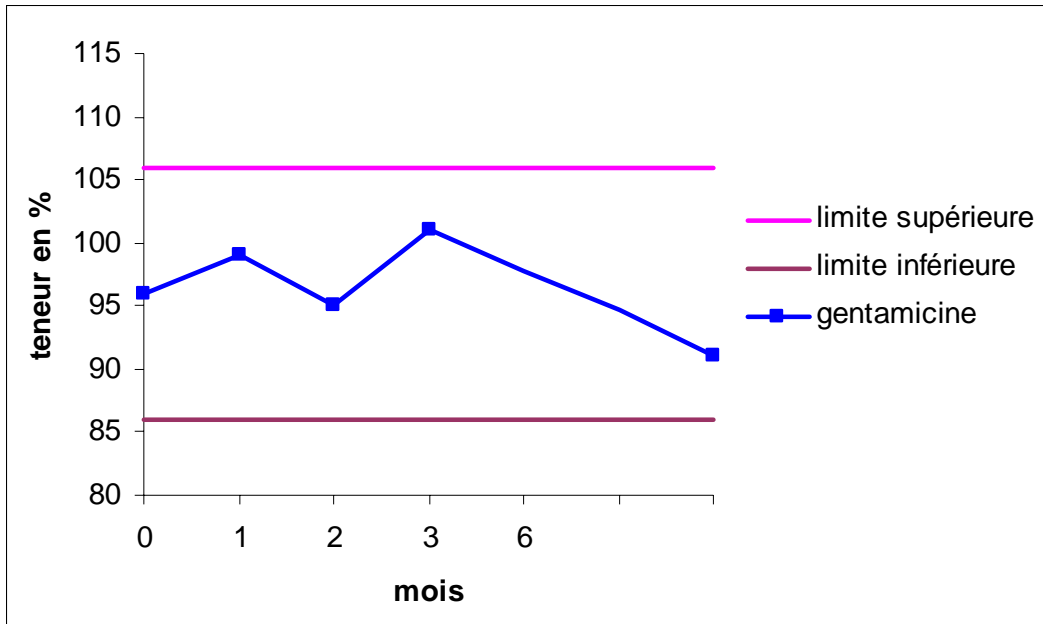


Figure 20 : Représentation graphique de la teneur en gentamicine des gélules stockées à +4°C

Tableau XII : Teneur en gentamicine des gélules stockées à +40°C

mois	0	1	2	3	4	5	6
limite supérieure	106	106	106	106	106	106	106
limite inférieure	86	86	86	86	86	86	86
gentamicine en %	96	99	104	99	100	101	102

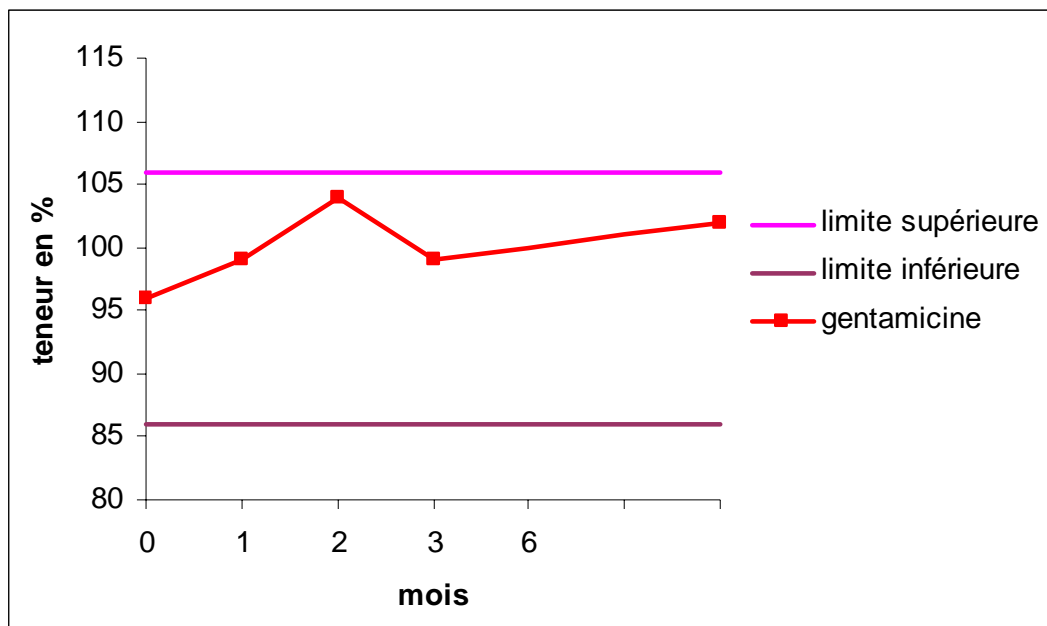


Figure 21 : Représentation graphique de la teneur en gentamicine des gélules stockées à +40°C

## **IV. Discussion**

### **IV.A. Méthodes de dosage**

Les méthodes chromatographiques utilisées dans le dosage des quatre molécules sont toutes issues de la littérature (biblio), le développement de techniques de dosage en CLHP propre au laboratoire de contrôle de la Pharmacie Centrale des Hospices civils de Lyon serait une tâche nécessitant beaucoup trop de temps et d'argent. De plus, le laboratoire de contrôle n'a pas le même équipement en matériel qu'un laboratoire de recherche. Notre première démarche a été de rechercher dans la Pharmacopée Européenne des méthodes CLHP mais tous les antibiotiques sont dosés par méthode microbiologique. Seule l'identification de la gentamicine dosée en CLHP selon la Pharmacopée a été retenue et appliquée à un dosage quantitatif. Elle présente l'avantage d'identifier et de doser le sulfate de gentamicine en même temps. La recherche d'impureté est également supportée par ce système. De plus, cette technique a donné de bons résultats car les gélules étudiées ne possèdent pas d'excipients susceptibles d'entraver l'extraction de la gentamicine par cette technique.

Quatre grandes familles de méthodes existent pour le dosage des molécules étudiées.

#### **IV.A.1. Méthode microbiologique**

Elle reste la méthode de référence inscrite à la Pharmacopée Européenne, seule méthode de dosage qui nous donne l'activité antimicrobienne de l'antibiotique en unités internationales. Malheureusement, cette technique est longue car elle nécessite d'attendre la pousse bactérienne, et contraignante car les gestes de précautions bactériologiques pour le dosage doivent être respectés pour une bonne interprétation des résultats.

#### **IV.A.2. Méthodes immunologiques**

Très nombreuses, la polarisation de fluorescence est la plus utilisée. La sensibilité de ces méthodes est bonne (de l'ordre de  $10^{-12}$  mol/L) [Hervann, 2000], la spécificité est une qualité du dosage antigène-anticorps mais elles restent des méthodes délicates avec plusieurs étapes critiques (pippetage, lavage et lecture) nécessitant de s'équiper d'automates coûteux.

### **IV.A.3. méthodes électrophorétiques**

Ce sont des méthodes de plus en plus utilisées en routine car ce sont de très bonnes méthodes séparatives. La Pharmacie Centrale n'étant pas équipé d'appareillages pour l'électrophorèse (support, cuves électrophorétiques, système de révélation), cette méthode sera abandonnée au profit d'une méthode chromatographique.

### **IV.A.4. Méthodes chromatographiques**

Pour réaliser le contrôle des gélules et du sirop de décontamination digestive, nous avons utilisé une technique CLHP, le but étant de doser les gélules en teneur (masse de poudre de colistine ou de gentamicine sur la masse de poudre totale) et non en activité microbiologique déjà garantie par le bulletin d'analyse du fournisseur de matières premières. De ce fait, la comparaison de nos résultats avec ceux du fournisseur ne peut pas être réalisée.

La CLHP est une bonne méthode séparative pour un mélange de molécules de poids moléculaire inférieur à  $2000 \text{ g.mol}^{-1}$ , ce qui est le cas dans notre étude. De plus, elle est assez rapide (18 minutes par analyse au maximum), et n'engendre pas de coûts prohibitifs pour s'équiper en réactifs et en matériel (colonne chromatographique...).

C'est naturellement une chromatographie de partage en phase inversée qui a été choisie pour les raisons suivantes :

- la colistine, la gentamicine et la vancomycine sont des molécules solubles dans l'eau, donc soluble dans une phase mobile polaire,
- les quatre molécules sont stables mais non ioniques et non volatiles, ce qui exclu une chromatographie par échange d'ions ou en phase gazeuse,
- la CLHP en phase inverse est la plus classique et la plus utilisée. De nombreuses conditions chromatographiques pour le dosage de ces quatre molécules sont décrites dans la littérature, essentiellement dans les milieux biologiques, seuls quelques articles font référence aux dosages dans une forme pharmaceutique [Egger, 2001 ; Eldem T, 2001 ; Lue, 2002 ; Le Brun, 2000 ; Li 2001].

#### **IV.B. Etude de stabilité**

La stabilité des préparations pharmaceutiques dépend de paramètres extrinsèques (température, humidité et lumière) et intrinsèques (interactions matières premières - excipients, conditionnement...). La colistine et la gentamicine sont des antibiotiques connus depuis longtemps (mécanismes de dégradation), de plus, la préparation étudiée ne possède pas d'excipients contribuant à changer la stabilité connue des deux antibiotiques (tableau I, p.44), il a donc été choisi de se limiter à l'étude de stabilité du produit fini.

Nous nous sommes intéressés aux conséquences des fluctuations possibles de la température, de l'humidité et de la lumière :

- la paillasse du laboratoire de contrôle (intermittence lumière – obscurité, température ambiante) est le mode de conservation le moins contraignant, il peut par exemple correspondre au pilulier resté sur la table de chevet du patient ou dans le tiroir des médicaments de la salle de soins.
- le réfrigérateur (obscurité, température de 4°C) représente un mode de conservation possible si les gélules s'avèrent instables aux conditions précédentes. Ces deux premières conditions de conservation étudiées se rapprochent de celles rencontrées fréquemment à l'hôpital.
- l'étuve (obscurité, température de 40°C) représente un mode de conservation qui peut accélérer l'instabilité des molécules par la chaleur. Malheureusement, l'absence de monitoring des conditions d'humidité dans l'enceinte de l'étuve ne permet pas d'étudier ce paramètre, de ce fait, ce mode de conservation ne peut se rapprocher des recommandations d'étude de stabilité accélérée ICH (Conférence Internationale d'Harmonisation) préconisant  $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  avec un taux d'humidité à  $75\% \text{ HR} \pm 5\% \text{ HR}$  [ICH]. Les essais en condition d'humidité relative élevée sont très intéressants pour les conditionnements semi-perméables car le risque de dégradation est plus élevé :
  - la gélatine de l'enveloppe de la gélule est un matériau organique perméable à l'eau,
  - les piluliers utilisés pour le stockage des gélules se ferment par un pas de vis non étanche.

Les Pharmacopées Européenne et française regroupent des méthodes de contrôle des matières premières et non des produits finis. Seules les Pharmacopées Britannique et américaine (USP) décrivent des méthodes d'analyse pour les produits finis. En ce qui concerne les études de stabilité, l'USP reprend les normes ICH qui sont, pour nos techniques chromatographiques validées, trop exigeantes vis à vis des valeurs seuils au delà de laquelle on observe une modification de la stabilité ( $\pm 5\%$ ). En effet, rappelons que le CV de reproductibilité de la technique de dosage de l'amphotéricine B est déjà de 3,66% (tableau , p. ). Ainsi, des normes propres au laboratoire de contrôle est fixé : on entend par modification importante de la stabilité :

- Une baisse de 10% de la teneur en principe actif par rapport à la teneur initiale, avec pour conséquence un sous dosage pouvant entraîner des résistances, cette baisse n'est pas significative pour la colistine et la gentamicine dans les trois modes de conservation.
- La présence de produits de dégradation signalés par un ou plusieurs pics. Ces deux phénomènes sont souvent très liés et visibles sur le chromatogramme pour une même longueur d'onde car les produits de dégradation et les principes actifs se ressemblent beaucoup, ils ne diffèrent entre eux que par un ou deux groupements [biblio].

#### ***IV.B.1. Pré-requis à l'interprétation des résultats***

Une uniformité de masse sur chaque échantillon de dix gélules a été réalisée selon la Pharmacopée Européenne. La valeur de l'écart type permet le calcul du coefficient de variation (CV) qui renseigne sur l'homogénéité des pesées par rapport à la moyenne (tableau 4). Ce CV confirme les résultats d'uniformité de masse puisque le plus mauvais CV (7,3%) correspond à l'échantillon M1 température ambiante dans lequel une gélule a une masse supérieure à 10% de la masse moyenne. Toutefois, les résultats sont conformes. Cette uniformité de masse montrent une bonne répartition de la poudre lors du remplissage.

De même, une uniformité de teneur sur chaque échantillon de dix gélules a été réalisée selon la Pharmacopée Européenne. Le calcul de l'écart type puis du coefficient de variation (CV) renseigne sur l'homogénéité des teneurs par rapport à la moyenne (tableau V, p. ). Les CV sont corrects (<10%) et confirment les résultats d'uniformité de teneur. L'uniformité de teneur montre à la fois une bonne homogénéité de la poudre dans le mortier et une bonne répartition de celle ci dans les gélules. Ceci dit, nous pouvons envisager sereinement d'interpréter les résultats de l'étude de stabilité.

## **IV.B.2. Interprétation des résultats**

### **IV.B.2.1. Colistine**

#### Température ambiante :

Les résultats obtenus par CLHP ont montré que la colistine était stable tout au long des six mois. La courbe obtenue est presque une droite horizontale. Les teneurs sont situées entre 98 et 103% (tableau VI, figure 12, p. ).

#### Température +4°C :

Les résultats sont similaires à ceux obtenus à température ambiante. Les teneurs sont situées entre 98 et 103% (tableau VII, figure 13, p.).

#### Température + 40°C :

Une augmentation franche et linéaire est apparue jusqu'à trois mois puis la teneur s'est stabilisée sur le dosage à six mois (tableau VIII, figure14, p.). Cette augmentation serait due aux propriétés mêmes de la colistine ; elle est très hygroscopique et lors de la fabrication des gélules, la poudre devait être chargée d'eau, une eau que les préparateurs ont pesé avec la poudre. Dans l'étuve, l'eau s'est évaporée et la teneur (rapport entre la masse de colistine sur la masse de poudre dans la gélule) a donc augmentée pour obtenir un plateau qui correspond à la déshydratation complète de la poudre dans les gélules. A trois mois, l'écart obtenu atteint les 10% de la teneur initiale (110%) ; à six mois, nous observons une stabilisation de la teneur à 108%, cette valeur correspondant à la valeur seuil. Une éventuelle dégradation de la colistine n'est pas mise en évidence dans nos conditions opératoires. Il est à noter qu'un dépassement des 110% est possible pour un nouveau lot de gélules si, lors de sa fabrication, la poudre de colistine est encore plus chargée en eau.

### **IV.B.2.2. Gentamicine**

#### Température ambiante :

Les résultats obtenus par CLHP ont montré que la gentamicine était stable tout au long des six mois. La courbe obtenue a une évolution en dent de scie dont la moyenne tourne autour des 99% de la teneur initiale avec des vallées à 98% et des pics à 103% (tableau 9, figure 15, p.).

#### Température +4°C :

Les résultats sont similaires à ceux obtenus à température ambiante. Les teneurs sont situées entre 95 et 101% (tableau 10, figure 16, p.).

### Température + 40°C :

La courbe de résultats reste dans les limites des 10% de la teneur initiale (tableau XI, figure 16, p.). La poudre de gentamicine est elle aussi hygroscopique mais apparemment moins que la colistine. En effet, la courbe a tendance à monter tout au long des deux premiers mois (pic à 104%), puis comme la colistine, nous constatons un équilibre de la teneur pour atteindre 102% à six mois. Cet équilibre correspond à la fin de la déshydratation de la poudre, celle-ci est devenue anhydre. Ce phénomène est donc le même que celui de la colistine. Nous n'avons pas dépassé les limites seuil car lors de la fabrication des gélules, la gentamicine était moins chargée d'eau donc la perte d'eau à l'équilibre est moins importante et la teneur R' est moins élevée.

Aucune différence existe entre la conservation au réfrigérateur et à température ambiante, les habitudes de conservation des piluliers de gélules à la Pharmacie et dans le service d'hématologie sont satisfaisantes ( tiroir à température ambiante).

Les 190 gélules prises au cours de la fabrication du lot de gélules adultes permet de prolonger l'étude de stabilité à un an : le dosage des gélules se feront à 9 mois (fin octobre 2004) puis à 12 mois pour finir l'étude fin janvier 2005.

En conclusion, la stabilité de la colistine et de la gentamicine dans les gélules de décontamination digestive n'est pas un facteur limitant de l'utilisation de ces gélules. Ces contrôles restent une sécurité vis à vis d'un patient déjà très fragilisé par leur pathologie et les traitements infligés, il permet d'éviter les conséquences thérapeutiques liées aux erreurs de fabrication.



## ***IV.C. Améliorations éventuelles à apporter***

Malgré une réflexion préalable, des lacunes nous ont apparues tout au long de cette étude, elles ne remettent pas en cause la totalité du travail mais les réponses permettront d'améliorer à la fois le contrôle de ces gélules, l'organisation fabrication / contrôle entre deux établissements assez loin l'un de l'autre et surtout la sécurité du patient.

### ***IV.C.1. Technique de dosage de l'amphotéricine B***

La technique CLHP du dosage de l'amphotéricine B a sollicité un étalonnage interne. Comme l'avait réalisé Dentinger (biblio), l'étalon interne (1-amino 4-nitronaphtalène à 1mg/mL) est introduit juste avant l'injection dans le chromatographe, ainsi, il permet de réduire les incertitudes introduites par l'injection de l'échantillon, la vitesse de la phase mobile et les variations d'état de la colonne. Cependant, il aurait été préférable de l'introduire dès le début du traitement des échantillons, en effet, il sera soumis aux mêmes traitements précédents les chromatographies (pesée, mise en solution, puis dilution) et devient ainsi le témoin de leur bonne réalisation. Cette manipulation a été réalisée sans succès : pour obtenir une même concentration de l'étalon interne, il a fallu dissoudre 25 mg du produit dans 15 mL de DMSO (1,67 mg/mL), concentration trop élevée, sûrement supérieure à la solubilité du 1-amino 4-nitronaphtalène dans le DMSO, car le pic correspondant sort avec une aire trop petite par rapport à celle attendue. Il serait donc nécessaire à court terme de changer d'étalon interne car d'autres molécules ont été proposées (biblio) et de refaire une validation analytique sur cette technique.

### ***IV.C.2. Contrôles pharmaco-techniques***

Le dosage des antibiotiques (colistine et gentamicine) permet de savoir exactement la quantité de principes actifs administrés aux patients, et pourtant, après ingestion, la pharmacocinétique de la gélule va être considérablement changée en fonction de l'état de la gélatine (par exemple, à la chaleur, la gélatine a tendance à durcir, le temps de délitement est agrandi, les molécules seront libérées plus tardivement et pourront avoir peu d'effet sur la partie haute du TD). Il nous est apparu aucun défaut visuel ou tactile des enveloppes des gélules tout au long des six mois, cependant, des microfractures indétectables à l'œil nu ou au toucher peuvent survenir. Des contrôles pharmacotechniques (essais de dissolution et de désagrégation) seraient un moyen complémentaire pour une bonne connaissance de la mise à disposition du principe actif dans le TD.

### **IV.C.3. Fabrication et conservation des gélules**

Le phénomène d'hygroscopie de la colistine nous amène à proposer de changer les habitudes de fabrication des gélules et de leur conservation sans excès de coûts.

#### En ce qui concerne la fabrication :

Il est préférable d'éviter de fabriquer les gélules par temps de pluie (humidification non négligeable de l'air), pour que les poudres se gorgent le moins possible d'eau pendant la préparation.

#### En ce qui concerne le conditionnement :

- ✓ Conditionnement des pots de poudre de colistine matière première : un déshydratant doit être mis dans le pot, ainsi lors de la fabrication, la poudre reste anhydre et l'eau n'influence pas sur la pesée.
- ✓ Conditionnement des gélules après fabrication : le pilulier est rempli avec environ 50 gélules (soit environ une semaine de traitement à 8 gélules par jour) pour éviter l'ouverture répétée du pot trop longtemps. De plus, il est conseillé de garder le pilulier au réfrigérateur pour les raisons suivantes :
  - l'étude de stabilité réalisée au réfrigérateur montre une meilleure stabilité des principes actifs qu'à température ambiante,
  - l'atmosphère du réfrigérateur est plutôt sèche. (humidité absolue faible)

### **IV.C.4. Précision des balances**

Nous constatons néanmoins une faible teneur dans les résultats avant remplissage et à Mo, pour la colistine (98%) et la gentamicine (96%). Ceci peut être dû à une accumulation de petites erreurs :

- il existe indéniablement une perte naturelle lors du remplissage qui ne se retrouve pas dans les gélules (poudre dans le mortier et sur le gélulier),
- imprécision possible de la balance pour les pesées des matières premières. Les balances ne sont contrôlées qu'une fois par an par un laboratoire spécialisé. De ce fait, il serait intéressant de planifier plus régulièrement une vérification des qualités des balances par les utilisateurs (justesse, précision...). Par exemple, tous les matins après chaque démarrage, une vérification en un point sera réalisée par un poids étalon standard conforme au poids international de référence. Toutes les semaines, une vérification en trois points (avec trois poids standard différents) sera plus complète.

Le dosage des quatre molécules reste un travail ambitieux pour le laboratoire de contrôle de la Pharmacie Centrale : en effet, une série de gélules pour adultes à doser nécessite deux jours de travail pour un poste à temps plein, le contrôle en routine de ces gélules doit s'inscrire dans le planning des activités du laboratoire. Il est à noter que cette nouvelle activité engendre un coût supplémentaire surtout au niveau des équipements (achat de matériel chromatographique et des réactifs). Une convention entre les HCL et le Centre Hospitalo-Universitaire de S<sup>t</sup> Etienne est en cours de réalisation pour réaliser les contrôles de ces gélules en routine. Dans cette perspective, le respect des Bonnes Pratiques de Préparations à l'Hôpital (contrôle qualité des résultats, formation du personnel qualifié) et le développement de l'assurance qualité devront rester les objectifs du laboratoire de contrôle, afin de répondre à notre objectif final qui est d'assurer la qualité des médicaments délivrés au patient.

## **I. CONCLUSIONS**

### **MEMOIRE SOUTENU PAR M<sup>me</sup> Elise BOUCHARD**

La demande de dosage des principes actifs des gélules et du sirop de décontamination digestive par la pharmacie de l'Hôpital Nord de S<sup>t</sup> Etienne a été l'origine d'une réflexion sur l'état actuel des méthodes de dosage des quatre molécules contenues dans ces préparations (amphotéricine B, colistine, gentamicine et vancomycine). Notre choix s'est porté sur une technique de chromatographie liquide haute performance (CLHP) en phase inverse. L'objectif de notre travail a consisté :

- à mettre en routine le dosage de ces préparations à la Pharmacie Centrale des Hospices Civils de Lyon,
- à étudier la stabilité des principes actifs dans la forme gélule pour adulte (colistine et gentamicine) et dans des conditions de conservation différentes.

Nous avons, dans un premier temps, recensé la bibliographie précisant l'utilisation de ces préparations et les méthodes actuellement utilisées pour le dosage des quatre molécules. Ce travail préliminaire nous a permis de choisir la méthode de dosage la plus appropriée pour un dosage analytique en tenant compte des équipements du laboratoire de contrôle.

Nous avons, dans un deuxième temps, validé les techniques séparatives utilisées pour les quatre principes actifs avant d'étudier la stabilité des principes actifs des gélules pour adultes. Cette étude permet de rationaliser la fabrication et planifier les contrôles. Les résultats à six mois montrent :

- une très bonne stabilité des principes actifs à 4°C,
- une bonne stabilité des principes actifs à température ambiante,
- une déshydratation des principes actifs à 40°C, variable selon le degré d'hydratation du principe actif au moment de la préparation.

Le projet des Bonnes Pratiques de Préparations à l'Hôpital, rédigé depuis juillet 2002, exige en particulier un contrôle de chaque préparation réalisée. Notre travail s'intègre parfaitement dans cette démarche. Cependant, il n'est pas toujours facile de coordonner :

- la demande de préparation du prescripteur,
- la mise en œuvre de la préparation,
- le contrôle en terme de mise au point de techniques de dosage et sous-traitance éventuelle.

---

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- (1) Pittet D, Eggimann P. Prevention of ventilator-associated pneumonia by oral decontamination. Just another SDD study? *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164 : 338-339.
- (2) Hagiage M. La flore intestinale, de l'équilibre au déséquilibre. Paris : éd. Vigot ;1994.
- (3) Marieb EN. Biologie humaine : anatomie et physiologie. Paris : éd. De Boeck ; 2000.
- (4) Steffen EK, Berg RD, Deith EA. Comparison of translocation rates of various indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph node. *J Infect Dis.* 1988; 157 (5): 1032-37.
- (5) Pappo I, Polacheck I, Zmora O, Feigin E, Freund HR. Altered gut barrier function to candida during parenteral nutrition. *Nutrition* 1994; 10(2): 151-4.
- (6) Acar J, Armengaud M, Modai J, Lortholary O. Décision en maladies infectieuses. Paris : éd. Vigot ; 1995.
- (7) Hygiènes. Revues officielle de la société française d'hygiène hospitalière. PG Promotion, Paris , 2000 ; 8 (6) : 305-508.
- (8) Gorin NG, Najman A. Les leucémies aigüe. In : Najman A, Verdy Z, Potron G, Isnard F, editors. Hématologie Tome II. Ed. Marketing ; 1994.
- (9) Anonyme. Infection et cancer. Standards, options et recommandations. Fédération nationale des centres de lutte contre le cancer FNCLCC . Ed. John Libbey Eurotext ; 1999.
- (10) Hughes TW, Amstrong D, Bodey GP, Brown AE, Edwards JE, Feld R, et al. Guidelines for the use of antimicrobial agents in neutropenic patients with unexplained fever. *Clin Infect Dis.* 1997 ; 25 : 551-73.
- (11) Bouakline A, Lacroix C, Roux N, Gangneux JP, Derouin F. Fungal contamination of food distributed to neutropenic patients. *J Clin Microbiol* 2000 ; 38 (11) : 4272-3.

- (12) Bergmans D, Bonten M, Gaillard C, Paling J, Van Der Geest S, Van Tiel F et al. Prevention of ventilator-associated pneumonia by oral decontamination. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: 382-88.
- (13) Poyart C, Morand P, Buzyn A. Etiology of bacterial infections in febrile neutropenic patients : the role of the laboratory in the diagnosis. *Presse Med* 2004 ; 33(7) : 460-6.
- (14) Gaytan-Martinez J, Mateos-Garcia E, Sanchez-Cortes E, Gonzalez-Llaven J, Casanova-Cardiel L, Fuentes-Allen JL. Microbiological findings in febrile neutropenia. *Arch Med Res* 2000 ; 31(4) : 388-92.
- (15) Offidani M, Corvatta L, Malerba L, Marconi M, Leoni P. Infectious complications in adult acute lymphoblastic leukemia (ALL) : experience at one single center. *Leuk Lymphoma* 2004 ; 45(8) : 1617-21.
- (16) Ebner W, Kropec-Hübner A, Daschner FD. Bacterial resistance and overgrowth due to selective decontamination of the digestive tract. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000; 19: 243-247.
- (17) Vannetzel JM. Infections nosocomiales en cancérologie. *Pathol Biol* 2000; 48 :721-4.
- (18) Rousselot P. Prise en charge des épisodes de neutropénie fébrile en ambulatoire : pour quel patient et selon quelles modalités ? In : Bergmann JF, Decazes JM, Schlemmer B, editors. *Médicaments antibiotiques, nouveautés dans l'évaluation et l'utilisation*. Paris, Springer-Verlag France ; 2001. p. 111-118.
- (19) Martin C, Gouin F. Infections et antibiothérapie en réanimation aux urgences et en chirurgie. Paris : éd. Arnette ; 2000.
- (20) Warnock DW. Fungal infections in neutropenia : current problems and chemotherapeutic control. *J Antimicrob Chemother* 1998; 41 : 95-105.
- (21) Vernant JP. Mesures préventives. Prévention de l'infection chez le malade aplasique. In : Nitenberg G, Cordonnier C. *Les infections graves en onco-hématologie*. Paris, Masson ; 1990, p.261-274.
- (22) Snoeck R, De Clercq E. Herpes virus infections in immunocompromised patients. *Cancer Treat Res*. 1995; 79: 149-71.
- (23) Perronne C. *Maladies infectieuses*. Paris: Ed Doin; 1999.

- (24) Schimpff SC. Infection in neutropenic cancer patient : three decades of progress. Support Care Cancer 1997 ; 5(5) : 343-5.
- (25) Bonten MJM, Kullgerg BJ, Van Dalen R, Girbes ARJ, Hoepelman IM, Hustinx W et al. Selective digestive decontamination in patients in intensive care. J Antimicrob Chemother 2000; 46 (3): 351-73.
- (26) Emre S, Sebastian A, Chodoff L, Boccagni P, Meyers B, Sheiner PA, et al. Selective decontamination of the digestive tract helps prevent bacterial infections in the early postoperative period after liver transplant. Mt Sinai J Med. 1999; 66 (5): 310-313.
- (27) Van Saene H, Silvestri L, Bams JL, Van Der Voort P. Selective contamination of the digestive tract: use in a liver transplantation is evidence based. Crit Care Med 2003; 31 (5): 1600-1.
- (28) Leone M, Bourgoïn A, Giuly E, Antonini F, Dubuc M, Viviani X et al. Influence on outcome of ventilator-associated pneumonia in multiple trauma patients with head trauma treated with selected digestive decontamination. Crit Care Med 2002 ; 30 : 1741-1746.
- (29) De Waele J, Vogelaers D, Decruyenaere J, De vos M, Colardyn F. Infectious complications of acute pancreatitis. Acta Clin Belg 2004 ; 59(2) : 90-6.
- (30) Zwaveling JH, Maring JK, Klompmaker IJ, Haagsma EB, Bottema JT, Laseur M, et al. Selective decontamination of the digestive tract to prevent postoperative infection: a randomized placebo-controlled trial in liver transplant patients. Crit Care Med 2002; 30(6): 1204-1209.
- (31) D'Amico R, Pifferi S, Leonetti C, Torri V, Tinazzi A, Liberati A. Effectiveness of antibiotic prophylaxis in critically ill adult patients : systematic review of randomised controlled trials. BMJ 1998 ; 316 : 1275-85.
- (32) Kollef MH. Opinion : the clinical use of selective digestive decontamination. Critical Care 2000 ; 4 : 327-332.

- (33) Prentice HG, Hann IM, Nazareth B, Paterson P, Bhamra A, Kibbler CC. Oral ciprofloxacin plus colistin : prophylaxis against bacterial infection in neutropenic patients. A strategy for the prevention of emergence of antimicrobial resistance. *Br J Haematol* 2001 ; 115 (1) : 46-52.
- (34) Avery RK, Pohlman BL, Mossad SB, Goormastic M, Longworth DL, Kalaycio ME, et al. The efficacy of prophylactic-outpatient antibiotics for the prevention of neutropenic fever associated with high-dose etoposide (VP-16) for stem cell mobilization. *Bone Marrow Transplant* 2002; 30 (5): 311-4.
- (35) Koh A, Pizzo PA. Empirical oral antibiotic therapy for low risk febrile cancer patients with neutropenia. *Cancer Invest* 2002 ; 20 (3) : 420-33.
- (36) Myoken Y, Sugata T, Kyo T, Fujihara M, Mikami Y. Itraconazole prophylaxis for invasive gingival aspergillosis in neutropenic patients with acute leukemia. *J Periodontol* 2002; 73 (1): 33-8.
- (37) Lass-Flörl C, Gunsilius E, Gasti G, English M, Koch G, Ulmer H, et al. Fungal colonization in neutropenic patients: a randomized study comparing itraconazole solution and amphotericin B solution. *Ann Hematol* 2003; 82 (9): 565-9.
- (38) Ellis ME, Clink H, Ernst P, Halim MA, Padmos A, Spence D, et al. Controlled study of fluconazole in the prevention of fungal infections in neutropenic patients with haematological malignancies and bone marrow transplant recipients. *Europ J Clin Microb Infec Dis*. 1994; 13: 3-11.
- (39) Slavin MA, Osborne B, Adams R, Levenstein MJ, Schoch HG, Feldman AR, et al. Efficacy and safety of fluconazole prophylaxis for fungal infections after marrow transplantation: a prospective randomized double-blind study. *J Infect Dis*. 1995; 171: 1545-52.
- (40) Cornely OA, Ullmann AJ, Karthaus M. Evidence-based assessment of primary antifungal prophylaxis in patients with hematologic malignancies. *Blood* 2003 ; 101 (9) : 3365-72.
- (41) Kaptan K, Ural AU, Cetin T, Avcu F, Beyan C, Yalcin A. Itraconazole is not effective for the prophylaxis of fungal infections in patients with neutropenia. *J Infect Chemother* 2003 ; 9 (1) : 40-5.
- (42) De Jonge E, Schultz MJ, Spanjaard L, Bossuyt PM, Vroom MB, Dankert J, Kesecioglu J. Effects of selective decontamination of digestive tract on mortality and acquisition of resistant bacteria in intensive care : a randomised controlled trial. *Lancet* 2003 ; 362 (9389) : 1011-6.



- (43) Oudemans-Van Straaten HM, Van Saene HKF, Zandstra DF. Selective decontamination of the digestive tract : use of the correct antibiotics is crucial. Crit Care Med 2003; 31 (1) : 334-5.
- (44) Zandstra DF, Van Saene HK. Selective decontamination of the digestive tract infection prevention in the critically ill. Does it lead to resistance ?. Minerva anesthesiol 2001; 67 (4): 292-7.
- (45) Carratala J, Fernandez-Sevilla A, Tubau F, Callis M, Gudiol F. Emergence of quinolone-resistant *Escherichia coli* bacteremia in neutropenic patients with cancer who have received prophylactic norfloxacin. Clin Infect Dis 1995 ; 20 : 557-60.
- (46) Cometta A, Calandra T, Bille J, Glauser MP *Escherichia coli* resistant to fluoroquinolones in patients with cancer and neutropenia N Engl J Med 1994 ; 330 : 1240-1.
- (47) Jugo J, Kennedy R, Crowe MJ, Lamrock G, McClurg RB, Rooney PJ. Trends in bacteraemia on the haematology and oncology units of a UK tertiary referral hospital. J Hosp Infect 2002 ; 50 (1) : 48-55.
- (48) Thomas X, Troncy J, Belhabri A, Thiebaut A, Bouheddou N, Michallet M, et al. Intérêt d'associer la vancomycine à la péfloxacin en décontamination digestive pour la prévention des infections après chimiothérapie aplasante. Press Medi 2000; 29:1745-51.
- (49) Vandenbroucke-Grauls CMJE, Vandenbroucke JP. Effect of selective decontamination of the digestive tract on respiratory tract infections and mortality in the intensive care unit Lancet 1991; 338: 859-62.
- (50) Cruciani M. Antibactériale prophylaxis. Int J Antimicrob Agents 2000; 16 (2): 123-5.
- (51) Dubau B, Triboulet C, Winnock S. Utilisation pratique de l'index de colonisation. Ann Fr Anesth Réanim 2001; 20: 418-20.
- (52) Bryskier A. Antibiotiques, agents antibactériens et antifongiques. Paris : éd. Ellipses ; 1999.
- (53) Schorderet M. Pharmacologie : des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques. Genève : éd. Slatkine ; 1992.
- (54) Banque de données automatisées sur les médicaments. <http://www.biam2.org>. Consulté le 15.12.03.

- (55) Orwa JA, Govaerts C, Gevers K, Roets E, Van Schepdael, Hoogmartens J. Study of the stability of polymyxins B1, E1 and E2 in aqueous solution using liquid chromatography and mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* 2001; 29: 203-212.
- (56) Decolin D, Leroy P, Nicolas A, Archimbault P. Hyphenated liquid chromatographic method for the determination of colistin residues in bovine tissues. *J Chromatogr Sci.* 1997 ; 35 (12) 557-64.
- (57) Afssaps. Spectres d'activité antimicrobienne. Répertoire des spectres validés par la commission d'autorisation de mise sur le marché. 2004. <http://www.afssaps.sante.fr>. consulté le 22 septembre 2004.
- (58) Van Bambeke F, Van Laethem Y, Courvalin P, Tulkens PM. Glycopeptide antibiotics from conventional molecules to new derivatives. *Drugs* 2004; 64 (9) : 913-936.
- (59) Barret JP, Jeschke MG, Herndon DN. Selective decontamination of the digestive tract in severely burned pediatric patients. *Burns* 2001; 27 (5): 439-45.
- (60) Hendrick KF, Van Saene A, Petros J, Ramsay G, Baxby D. All great truths are iconoclastic: selective decontamination of the digestive tracts moves from heresy to level 1 truth. *Intensive Care Med* 2003; 29: 677-690.
- (61) Hammond JMJ, Potgieter PD. Long-term effects of selective decontamination on antimicrobial resistance. *Crit Care Med* 1995 ; 23 (4) : 637-45.
- (62) Blair P, Rowlands BJ, Lowry K, Webb H, Armstrong P, Smilie J. Selective decontamination of the digestive tract: a stratified randomized prospective study in a mixed intensive care unit *Surgery* 1991; 110: 303-10.
- (63) Krueger WA, Lenhart FP, Neeser G, Ruckdeshel G, Schreckhase H, Eissner HJ. Influence of combined intravenous and topical antibiotic prophylaxis on the incidence of infections organs dysfunctions and mortality in critically ill surgical patients. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166: 1029-1037.
- (64) Aarts MA, Marshall JC. In defense of evidence The continuing saga of selective decontamination of the digestive tract 2002 ; 166 : 1014-1015.
- (65) Freifeld A, Marchigiani D, Walsh T, Chanock S, Lewis L, Hiemenz J et al. A double blind comparison of empirical oral and intravenous antibiotic therapy for low-risk febrile patients with neutropenia during cancer chemotherapy. *N England J Med* 1999; 341(5):305-11.

- (66) Kern WV, Cometta A, De Bock R, Langenaeken J, Paesmans M, Gaya H. Oral versus intravenous empirical antimicrobial therapy for fever in patients with granulocytopenia who are receiving cancer chemotherapy. *N Engl J Med* 1999; 341(5): 312-8.
- (67) Makino K, Hirakawa M, Goto Y, Nakashima K, Kataoka Y, Oishi R. Quality evaluation by capillary electrophoresis of amphotericin B injection after filtration through various membrane filters. *Electrophoresis* 1998 ; 19 (16) : 2930-4.
- (68) Galera R, Pou-Clave L, Pascual-Mostaza C. Determination of amphotericin B in human serum by liquid chromatography. *Chromatogr B Biomed Appl* 1995; 674 (2) : 298-300.
- (69) Echevaria I, Barturen C, Renedo MJ, Dios-Vieitez MC. High-performance liquid chromatographic determination of amphotericin B in plasma and tissue. Application to pharmacokinetic and tissue distribution studies in rats. *J Chromatogr A* 1998; 819 (1) : 171-6.
- (70) Eldem T, Arican-Cellat N. Determination of amphotericin B in human plasma using solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. *J Pharm Biomed Anal* 2001 ; 25 (1) : 53-64.
- (71) Lambros MP, Abbas SA, Bourne DW. New high-performance liquid chromatographic method for amphotericin B analysis using an internal standard. *J Chromatogr B Biomed Appl* 1996 ; 685 (1) : 135-40.
- (72) Egger P, Bellmann R, Wiedermann CJ. Determination of amphotericin B, liposomal amphotericin B, and amphotericin B colloidal dispersion in plasma by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 2001 ;760 (2001) : 307-313.
- (73) Lue LP, Hadman ST, Vancura A. Liquid chromatographic determination of amphotericin B in different pharmaceuticals. *J AOAC* 2002 ; 85 (1) : 15-9.
- (74) Dentinger PJ, Swenson CF, Anaizi NH. Stability of amphotericin B in an extemporaneously compounded oral suspension. *Am J Health-Syst Pharm* 2001 ; 58 : 1021-4.
- (75) Owens D, Fleming RA, Restino MS, Cruz JM, Hurd DH. Stability of amphotericin B 0,05 and 0,5 mg/mL in 20% fat emulsion. *Am J Health-Syst Pharm* 1997 ; 54 : 683-6.
- (76) Wilkinson JM, Donald MC, Parkin JE, Sunderland VB. A high-performance liquid chromatographic assay for amphotericin B in a hydrophilic colloidal paste base. *J Pharm Biomed Anal* 1998; 17 : 751-5.

- (77) Lopez RM, Ayestaran A, Pou L, Montoro JB, Hernandez M, Caragol I. Stability of amphotericin B in an extemporaneously prepared IV fat emulsion. *Am J Health-Syst Pharm* 1996 ; 53 : 2724-7.
- (78) Kintzel PE, Kennedy PE. Stability of amphotericin B in 5% dextrose injection at concentrations used for administration through a central venous line. *Am J Hosp Pharm* 1991; 48 : 283-5
- (79) Mitrano FP, Outman WR, Baptista RJ, Palombo JD. Chemical and visual stability of amphotericin B in 5% dextrose injection stored at 4°C for 35 days. *Am J Hosp.Pharm* 1991; 48:2635-7.
- (80) Margosis M, Aszalos A. Quantitation of amphotericins by reverse-phase high-performance liquid chromatography 1984 ; 73 (6) 835-8.
- (81) Glynn GR, Robin LD. Physical compatibility and chemical stability of amphotericin B in combination with magnesium sulfate in 5% dextrose injection DICP *Ann Pharmacother* 1991 ; 25 : 123-6.
- (82) Garraffo R. Intérêt du dosage des antibiotiques en pratique clinique. In : Martin C, Gouin F, editors. *Infections et antibiothérapie en réanimation aux urgences et en chirurgie*. Rueil-Malmaison ;Groupe Liaisons S.A ; 2000. p. 395-408.
- (83) Kang J, Vankeirsbilck T, Van Schepdael A, Orwa J, Roets E, Hoogmartens J. Analysis of colistin sulfate by capillary zone electrophoresis with cyclodextrins as additive. *Electrophoresis* 2000 ; 21 (15) : 3199-204.
- (84) Govaerts C, Orwa J, Van Schepdael A, Roets E, Hoogmartens J. Liquid chromatography-ion trap tandem mass spectrometry for the characterisation of polypeptide antibiotics of the colistin series in commercial samples. *J Chromatogr A* 2002 ; 976 (1) :65-78.
- (85) Whall TJ. High-performance liquid chromatography of polymyxin B sulfate and colistin sulfate. *J. Chromatogr.* 1981 ; 208 : 118-123.
- (86) Le Brun PPH, I De Graaf A, AT.M. Vinks A. High-performance liquid chromatographic method for the determination of colistin in serum. *Therapeutic Drug Monitoring* 2000 ; 22 : 589-593.

- (87) Li J, Milne RW, Nation RL, Turnidge JD, Coulthard K, Johnson DW. A simple method for the assay of colistin in human plasma, using pre-column derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate in solid-phase extraction cartridges and reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2001 ; 76 (2) : 167-75.
- (88) Hanes SD, Herring VL. Gentamicin enzyme-linked immunosorbent assay for microdialysis samples. *Ther Drug Monit* 2001 ;23 :689-693.
- (89) Loomans EE, Van Wiltenburg J, Koets M, Van Amerongen A. Neamin as an immunogen for the development of a generic ELISA detecting gentamicin, kanamycin, and neomycin in milk. *Agric Food Chem* 2003 ; 51 (3) :587-93.
- (90) Wilson JF, Davis AC, Tobin CM. Evaluation of commercial assays for vancomycin and aminoglycosides in serum: a comparison of accuracy and precision based on external quality assessment. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52: 78-82.
- (91) White LO, Holt HA, Reeves DS, MacGowan AP. Evaluation of innofluor fluorescence polarization immunoassay kits for the determination of serum concentrations of gentamicin, tobramycin, amikacin and vancomycin. *J Antimicrob. Chemother* 1997; 39: 355-361.
- (92) Holt HA, White LO, Bedford KA, Bowker KE, Reeves DS, MacGowan AP. An evaluation of three new immunoassays for determination of serum gentamicin concentrations. *J Antimicrob Chemother* 1994 ; 34 : 747-754.
- (93) Kaale E, Leonard S, Van Shepdael A, Roets E, Hoogmartens J. Capillary electrophoresis analysis of gentamicin sulphate with UV detection after pre-capillary derivatization with 1,2-phthalic dicarboxaldehyde and mercaptoacetic acid. *J. Chromatogr A* 2000 ; 895 (1-2) : 67-79
- (94) Posyniak A, Zmudki J, Niedzielska J. Sample preparation for residue determination of gentamicin and neomycin by liquid chromatography. *J Chromatogr A* 2001; 914 (1-2): 59-66.
- (95) Arcelloni C, Comuzzi B, Vaiani R, Paroni R. Quantification of gentamicin in Mueller-Hinton agar by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B* 2001; 753: 151-156.
- (96) Isoherranen N, Soback S. Determination of gentamicins C<sub>1</sub>, C<sub>1A</sub>, and C<sub>2</sub> in plasma and urine by HPLC. *Clin Chem.* 2000 ; 46 (6) : 837-842.
- (97) Jehl F, Monteil H, Gallion C, Thierry RC. HPLC, RIA, FPIA Evaluation de trois méthodes de dosage de la vancomycine. *Path Biol* 1985 ;33 (5) : 511-516.

- (98) Follin SL, Mueller BA, Scott MK, Carfagna MA, Kraus MA. Falsely elevated serum vancomycin concentrations in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 1996; 27: 67-74
- (99) Hervann A. Principes des méthodes utilisant la réaction antigène-anticorps. In : éditions groupe liaisons SA, editors. Sciences mathématiques physiques et chimiques. Rueil-Malmaison ; 2000. P.373-411.
- (100) Tobin CM, Darville JM, Thomson AH, Sweeney G, Wilson JF, Mac Gowan AP et al. Vancomycin therapeutic drug monitoring : is there a consensus view ? the results of a UK National External Quality Assessment Scheme (UK NEQAS) for Antibiotic Assays questionnaire. *J. Antimicrob . Chemother* 2002 ; 50 (5) : 713-8.
- (101) Souli M, Kopsinis G, Kavouklis E, Gabriel L, Giamarellou Vancomycin levels in human aqueous humour after intravenous and subconjunctival administration. *Int J Antimicrob Agents* 2001; 239-243.
- (102) Lam MT, Le Chris X. Competitive immunoassay for vancomycin using capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Analyst*. 2002; 127 (12): 1633-7.
- (103) Bonicci PJ, Damen M, Waterval JC, Heck AJ. Formation and efficacy of vancomycin group glycopeptide antibiotic stereoisomers studied by capillary electrophoresis and bioaffinity mass spectrometry. *Anal Biochem* 2001; 290(2):292-301
- (104) Kang JW, Van Schepdael A, Roets E, Hoogmartens J. Analysis of vancomycin and related impurities by micellar electrokinetic capillary chromatography. Method development and validation. *Electrophoresis* 2001 ; 22 (12) :2588-92.
- (105) Lucas C, Foley JP, Ahuja ES. Analysis of glycopeptide antibiotics using micellar electrokinetic chromatography and borate complexation. *Biomed Chromatogr* 2003; 17 (2-3): 172-81.
- (106) Kitahashi T, Furuta I. Determination of vancomycin in human serum by micellar electrokinetic capillary chromatography with direct sample injection. *Clin Chim Acta* 2001 ; 312 (1-2) :221-5.
- (107) Das Gupta V, Stewart KR, Nohria S. Stability of vancomycin hydrochloride in 5% dextrose and 0,9% sodium chloride injections. *Am J Hosp Pharm* 1986 ; 43 :1729-31.

- (108) White LO, Edwards R, Holt HA, Lovering AM, Finch RG, Reeves DS. The in-vitro degradation at 37°C of vancomycin in serum, CAPD fluid and phosphate-buffered saline. J Antimicrob Chemother 1988; 22:739-745
- (109) Vaughan LM, Poon CY. Stability of ceftazidime and vancomycin alone and in combination in heparinized and nonheparinized peritoneal dialysis solution. Ann Pharmacother 1994; 28:314-864.
- (110) Wood MJ, Lund R, Beavan M. stability of vancomycin in plastic syringes measured by high-performance liquid chromatography. J Clin Pharm Ther. 1995 ; 20 : 319-325.
- (111) Décret n°2000-1316 du 26 décembre 2000 relatif aux pharmacies à usage intérieur et modifiant le code de la santé publique. Journal Officiel du 30 décembre 2000.
- (112) Les Bonnes Pratiques de Préparations à l'Hôpital BPPrH. Projet Juillet 2002. <http://www.afssaps.sante.fr/html/5/rbp/hosmag.pdf>. Consulté le 23/11/03.
- (113) Caporal-Gautier J, Nivet JM, Algrant P, Guilloteau M, Histe M, Lallier M et al. Guide de validation analytique. Rapport d'une commission SFSTP. Méthodologie et exemples d'application. STP Pharma Pratiques 1992 ; 2 (4) : 205-239.
- (114) ICH Topic Q1A. Note for guidance on stability testing : Stability testing of new drug substances and products (CPMP/ICH/308/95).1995.<http://www.emea.eu.int/pdfs/human/ich/273699en.pdf> consulté le 02/10/04.