

UNIVERSITE DE LIMOGES
FACULTE DE PHARMACIE



Année 2010

THESE N° 3308 / 1

MEMOIRE

Pour le DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
DE PHARMACIE HOSPITALIERE ET DES COLLECTIVITES

CONFORMEMENT AUX DISPOSITIONS DE L'ARRETE DU 23 JANVIER 2003 TENANT LIEU DE

THESE

Pour le DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présenté et soutenu publiquement le 23 Avril 2010

Par

Véronique MAILLOT-PYSZCZEK

Née le 13 février 1981 à Montluçon (03)



PREPARATIONS OPHTALMIQUES

A LA VANCOMYCINE :

INTERET THERAPEUTIQUE ET ETUDE DE STABILITE

SCD UNIV.LIMOGES



D 035 238649 2

JURY

Président : Monsieur C.Brossard, Professeur, UFR Pharmacie, Limoges

Juges : Monsieur F.Chiambaretta, Professeur, UFR Médecine, Clermont-Ferrand

Monsieur J.Chopineau, Professeur, UFR Pharmacie, Clermont-Ferrand

Madame M.Jouannet, Pharmacien, Praticien Hospitalier, Clermont-Ferrand

Madame V.Sautou, Maître de Conférences, UFR Pharmacie, Clermont-Ferrand



UNIVERSITE DE LIMOGES
FACULTE DE PHARMACIE

Année 2010

THESE N°

3308/1

MEMOIRE

Pour le DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
DE PHARMACIE HOSPITALIERE ET DES COLLECTIVITES

CONFORMEMENT AUX DISPOSITIONS DE L'ARRETE DU 23 JANVIER 2003 TENANT LIEU DE

THESE

Pour le DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présenté et soutenu publiquement le 23 Avril 2010

Par

Véronique MAILLOT-PYSZCZEK

Née le 13 février 1981 à Montluçon (03)



**PREPARATIONS OPHTALMIQUES
A LA VANCOMYCINE :
INTERET THERAPEUTIQUE ET ETUDE DE STABILITE**

JURY

Président : Monsieur C.Brossard, Professeur, UFR Pharmacie, Limoges

Juges : Monsieur F.Chiambaretta, Professeur, UFR Médecine, Clermont-Ferrand

Monsieur J.Chopineau, Professeur, UFR Pharmacie, Clermont-Ferrand

Madame M.Jouannet, Pharmacien, Praticien Hospitalier, Clermont-Ferrand

Madame V.Sautou, Maître de Conférences, UFR Pharmacie, Clermont-Ferrand

DOYEN DE LA FACULTE Monsieur **COMBY** Francis, Maître de Conférences

VICE-DOYEN Monsieur le Professeur **CARDOT** Philippe

VICE-DOYEN Madame **FAGNERE** Catherine, Maître de Conférences

PROFESSEURS

BENEYTOU Jean-Louis	BIOCHIMIE - BIOLOGIE MOLECULAIRE
BOTINEAU Michel	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
BROSSARD Claude	PHARMACOTECHNIE
BUXERAUD Jacques	CHIMIE ORGANIQUE - CHIMIE THERAPEUTIQUE
CARDOT Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE
CHULIA Albert	PHARMACOGNOSIE
CHULIA Dominique	PHARMACOTECHNIE
DELAGÉ Christiane	CHIMIE GENERALE ET MINERALE
DESMOULIERE Alexis	PHYSIOLOGIE
DREYFUSS Gilles	PARASITOLOGIE - MYCOLOGIE
DUROUX Jean-Luc	PHYSIQUE - BIOPHYSIQUE
LOUDART Nicole	PHARMACOLOGIE

**PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS DES
DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES :**

LACHATRE Gérard	TOXICOLOGIE
MOESCH Christian	HYGIENE - HYDROLOGIE - ENVIRONNEMENT
ROGEZ Sylvie	BACTERIOLOGIE - VIROLOGIE

MAITRES DE CONFERENCES

BASLY Jean-Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE
BATTU Serge	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
BEAUBRUN GIRY Karine	PHARMACIE GALENIQUE
BILLET Fabrice	PHYSIOLOGIE
CALLISTE Claude	BIOPHYSIQUE, MATHEMATIQUES, INFORMATIQUE
CLEDAT Dominique	CHIMIE ANALYTIQUE
COMBY Francis	CHIMIE THERAPEUTIQUE
DELEBASSEE Sylvie	BACTERIOLOGIE - VIROLOGIE
DEMIOT Claire-Elise	PHARMACOLOGIE
DREYFUSS Marie-Françoise	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
FAGNERE Catherine	CHIMIE ORGANIQUE
FROISSARD Didier	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
JAMBUT Anne-Catherine	CHIMIE THERAPEUTIQUE
LABROUSSE Pascal	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
LEGER David	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
LIAGRE Bertrand	SCIENCES BIOLOGIQUES
LOTFI Hayat	TOXICOLOGIE
MARION-THORE Sandrine	CHIMIE THERAPEUTIQUE
MARRE-FOURNIER Françoise	BIOCHIMIE
MILLOT Marion	PHARMACOGNOSIE
MOREAU Jeanne	IMMUNOLOGIE
POUGET Christelle	CHIMIE ORGANIQUE APPLIQUEE A LA THERAPEUTIQUE
ROUSSEAU Annick	BIOMATHEMATIQUES
SIMON Alain	CHIMIE PHYSIQUE ET CHIMIE MINERALE
TROUILLAS Patrick	BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE PHARMACEUTIQUE
VIANA Marylène	PHARMACOTECHNIQUE
VIGNOLES Philippe	BIOMATHEMATIQUES

PROFESSEUR CERTIFIE

MARBOUTY Jean-Michel	ANGLAIS
-----------------------------	---------

SOMMAIRE

SOMMAIRE	4
REMERCIEMENTS	6
INTRODUCTION	9
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	11
<i>I. ANATOMIE DE L'ŒIL</i>	<i>12</i>
<i>II. PATHOLOGIES OCCULAIRES BACTERIENNES.....</i>	<i>14</i>
<i>III. COLLYRES ET SOLUTIONS INTRAVITREENNES FORTIFIES AUX ANTIBIOTIQUES.....</i>	<i>24</i>
<i>IV. COLLYRES ET SOLUTIONS INTRAVITREENNES A LA VANCOMYCINE.....</i>	<i>33</i>
<i>V. ETUDES DE STABILITE DES PREPARATIONS OPHTALMIQUES DE VANCOMYCINE : REVUE CRITIQUE.....</i>	<i>46</i>
PARTIE EXPERIMENTALE : STABILITE APRES CONGELATION DES INTRAVITREENNES A 10MG-ML ET DES COLLYRES A 25MG-ML DE VANCOMYCINE.	49
<i>I. MATERIEL</i>	<i>50</i>
<i>II. METHODOLOGIE DE L'ETUDE</i>	<i>52</i>
<i>III. RESULTATS ET DISCUSSION</i>	<i>63</i>
CONCLUSION	98
BIBLIOGRAPHIE.....	100
ANNEXES.....	106
GLOSSAIRE DES ABREVIATIONS.....	116
TABLE DES FIGURES.....	117
TABLE DES TABLEAUX	118
TABLE DES MATIERES	119

REMERCIEMENTS

A Mr le Professeur Claude Brossard

*Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de présider ce jury de thèse.
Veuillez trouver ici l'expression de ma gratitude et de mon profond respect.*

A Mr le Professeur Jean Chopineau

*Pour avoir accepté de juger cette thèse et pour son accueil au sein de son service.
Veuillez trouver ici le témoignage de ma plus haute considération
et mes plus sincères remerciements.*

A Mme le Docteur Valérie Sautou

*Pour m'avoir proposé ce sujet et m'avoir encadrée pendant cette année enrichissante.
Merci pour ton énergie communicative, ta rigueur scientifique,
mais aussi pour ta disponibilité, ton soutien et tes conseils avisés.*

A Mme le Docteur Mireille Jouannet

*Pour avoir accepté de juger ce travail.
Sois assurée de ma gratitude et de ma plus grande sympathie.*

A Mr le Professeur Chiambaretta

*Pour m'avoir fait l'honneur de participer à ce jury.
Veuillez accepter mes sincères remerciements pour m'avoir permis d'illustrer cette thèse,
ainsi que pour vos conseils.*

A Daniel

*Tu m'as beaucoup aidée pour mener à bien ce projet.
Merci pour ta disponibilité, pour les cours de chromatographie les plus vivants du monde,
pour ta bonne humeur en toutes circonstances,
ainsi que pour les « double 0 » et « exécuter calc » qui m'ont été maintes fois utiles.*

A mon Mari et mon Lutin

Mes deux amours.

A ma Famille

Pour son soutien tout au long de ces années.

A Véra, Sandrine, Vincent, Anne, Martine et Catherine

*J'ai beaucoup aimé travailler avec vous durant ces années d'internat.
Merci pour tout ce que vous m'avez enseigné, ainsi que pour tous vos conseils.*

A tous les internes, anciens et nouveaux

Pour les tous les bons moments passés au fil de ces années.

A tous ceux que j'ai côtoyés durant cet internat

*Particulièrement à Hélène, Marithé et Françoise : Merci de m'avoir aidée à dompter la
chaîne de chromatographie.*

Et à Catherine, Béa et Chantal : Merci pour votre sympathie.

INTRODUCTION

Les solutions intravitréennes de vancomycine à 10 mg/mL et les collyres renforcés à 25 mg/mL sont des solutions antibiotiques utilisées lors du traitement des kératites et des endophtalmies bactériennes. Ces pathologies, qui menacent le pronostic visuel, doivent être prises en charge rapidement par le service d'ophtalmologie, y compris lors des horaires de garde à la pharmacie.

La pharmacie à usage intérieur (PUI) du CHU de Clermont-Ferrand prépare annuellement environ 220 solutions intravitréennes et 660 collyres (dont environ 150 sont délivrés aux patients sortant d'hospitalisation). Ces préparations sont réalisées extemporanément, sous le statut de préparation magistrale. La péremption actuellement retenue est de 8 jours à 4°C. Le solvant de dilution utilisé lors de la fabrication est le chlorure de sodium.

Afin d'optimiser la prise en charge des urgences thérapeutiques que sont les kératites et les endophtalmies bactériennes, notre PUI souhaite déclarer les préparations ophtalmiques à la vancomycine sous le statut de préparation hospitalière, et disposer d'un stock permanent. La congélation semble un mode de conservation intéressant, mais les données de stabilité décrites dans la littérature ne sont pas adaptées à notre mode de fabrication et manquent d'informations sur le mode de décongélation, et la durée de conservation après décongélation.

Après de brefs rappels sur la structure oculaire, la partie bibliographique de ce travail expose l'intérêt thérapeutique des collyres renforcés et des solutions intravitréennes de vancomycine, ainsi les particularités de ces deux formes galéniques spécifiquement hospitalières. Le chapitre suivant est consacré au principe actif de ces préparations : la vancomycine. Une revue critique des études de stabilité concernant les collyres et les intravitréennes à la vancomycine, et relatées par la littérature a ensuite été réalisée.

La partie expérimentale de ce travail a consisté à évaluer l'impact du mode de décongélation sur la stabilité des solutions à 10 mg/ml et 25 mg/mL de vancomycine, et à déterminer leur durée de conservation après décongélation.

Nous avons pour cela commencé par mettre au point une méthode de dosage de la vancomycine qui soit « stability indicating ». Différentes modalités de décongélation et de conservation ont alors pu être étudiées.

L'étude de la stabilité physicochimique et microbiologique des solutions de vancomycine nous a permis de déterminer une date de péremption pour ces préparations ophtalmiques.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

I. ANATOMIE DE L'ŒIL

Le diamètre du globe oculaire est de 2,5 cm, sa masse de 7 grammes et son volume de 6,5 cm³. L'œil est composé de trois parois renfermant des milieux transparents (1) (2), (Figure 1).

A. LES PAROIS OCULAIRES

La paroi du globe oculaire est formée de trois couches concentriques : la tunique fibreuse (externe), la tunique vasculaire (médiane) et la tunique nerveuse (interne).

La tunique fibreuse est composée de la sclérotique en arrière et de la cornée en avant.

La sclérotique est une membrane rigide et opaque qui donne sa forme à l'œil, et en recouvre les cinq sixièmes.

La cornée constitue la lentille principale du système optique oculaire. Transparente, elle est privée de vaisseaux sanguins, mais est « alimentée » par l'humeur aqueuse.

La tunique vasculaire est composée de l'iris en avant, du corps ciliaire et de la choroïde en arrière.

L'iris, qui donne sa couleur à l'œil est percé d'un trou, la pupille. Sa contraction ou sa dilatation réflexes, règlent la quantité de lumière pénétrant dans l'œil. Il est situé dans l'humeur aqueuse entre la cornée et le cristallin, séparant ainsi la chambre antérieure de la chambre postérieure de l'œil.

Le corps ciliaire est un anneau de tissu musculaire qui produit l'humeur aqueuse. Il maintient le cristallin, et en modifie la forme.

La choroïde est une couche vasculaire, tapissant les deux tiers postérieurs du globe oculaire. Elle fournit des nutriments à la rétine et absorbe les rayons lumineux inutiles pour la vision.

La tunique nerveuse est constituée par la rétine, qui est la couche sensible à la lumière. Elle est composée par de 2 types de photorécepteurs. Les bâtonnets ont une très grande sensibilité à la lumière, et permettent de voir dans la pénombre. Les cônes présentent une faible sensibilité à la lumière mais assurent une fine perception des couleurs.

B. LES MILIEUX TRANSPARENTS

Les tuniques renferment trois milieux transparents qui forment une lentille convergente.

L'humeur aqueuse est un liquide remplissant l'espace entre la cornée et le cristallin. Son renouvellement est continu. Elle participe au maintien de la pression oculaire avec le corps vitré.

Le cristallin est une lentille qui permet la mise au point de l'œil. Il focalise la lumière sur la rétine en modifiant ses courbures lors de l'accommodation sous l'action des muscles ciliaires.

Le corps vitré est une masse gélatineuse et transparente, contenant 99% d'eau et représentant 60% du volume oculaire. Il maintient la rétine contre les parois de l'œil.

Le globe oculaire peut être divisé en deux régions. Le segment antérieur comprend la cornée, l'iris, l'humeur aqueuse, le cristallin et le corps ciliaire. Le segment postérieur comprend la sclérotique, la choroïde, la rétine et le corps vitré.

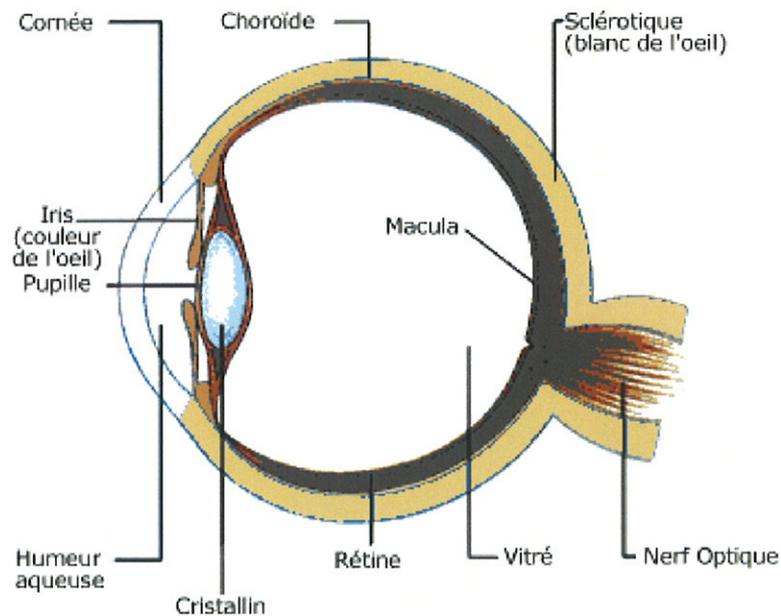


Figure 1: Anatomie de l'œil (3)

II. PATHOLOGIES OCCULAIRES BACTERIENNES

Nous nous intéresserons à deux pathologies oculaires bactériennes sévères lors desquelles des solutions antibiotiques de vancomycine sont utilisées : les kératites et les endophtalmies bactériennes.

A. LES KERATITES BACTERIENNES (4)

La kératite est une atteinte de la cornée souvent accompagnée d'ulcérations, imposant un examen ophtalmologique en urgence, car elle met en jeu le pronostic visuel. Elle se traduit par un œil rouge, douloureux, larmoyant accompagné d'une photophobie et d'un blépharospasme.

L'instillation d'un collyre à la fluorescéine permet de caractériser les ulcérations cornéennes et de déterminer l'étiologie de la kératite. Ainsi les kératites peuvent avoir différentes origines infectieuses : bactérienne, virale, parasitaire ou mycosique. Elles peuvent aussi être la conséquence d'une sécheresse oculaire intense ou d'une insuffisance cornéenne endothéliale (kératites bulleuses).

Il existe trois sortes de kératites bactériennes de gravité croissante : la kératite simple, l'ulcère de cornée où l'épithélium cornéen est érodé, et enfin l'abcès de cornée qui est la forme suppurative (5). Elles sont assez fréquentes, 500 000 cas annuels surviennent dans le monde (6).

1) Etiologie

Les kératites bactériennes sont provoquées le plus souvent par la surinfection d'une ulcération traumatique (coup d'ongle, branche d'arbre). Elles peuvent également survenir suite à l'utilisation des lentilles de contact dans de mauvaises conditions d'hygiène.

2) Critères de gravité

Les critères de gravité d'une kératite bactérienne sont un abcès de taille supérieure à 3 mm de diamètre, une situation à moins de 3 mm de l'axe optique, une infiltration stromale, une réaction inflammatoire en chambre antérieure et une aggravation malgré un traitement antibiotique topique adapté de 24 heures (7).

3) Germes impliqués

90% des kératites infectieuses sont provoquées par quatre types de germes : les staphylocoques (26 à 60%), les streptocoques (16%), les pseudomonas et les entérobactéries.

Les porteurs de lentilles de contact souffrent plus souvent (30,5 % des cas) d'infections à Bactéries Gram Négatif (BGN) comme le pseudomonas et les entérobactéries (*Klebsiella*, *Serratia*), que les non porteurs de lentilles qui sont touchés dans 80% des cas par des bactéries Gram positif (BGP), majoritairement des staphylocoques (60%) et des streptocoques.

Chez les enfants il faut prendre en compte *Haemophilus influenzae*, en plus des streptocoques (5).

4) Evolution

L'évolution peut être favorable si un traitement est mis en route très rapidement, soit avec des collyres commercialisés pour les kératites peu sévères, soit avec des collyres fortifiés dans des formes plus graves (5).

Cependant le pronostic visuel sera menacé si l'infection s'étend (endophtalmie, perforation cornéenne) ou si la plaie touche le centre de la cornée et entraîne une baisse d'acuité visuelle définitive.

5) Stratégie thérapeutique

La kératite bactérienne est une urgence thérapeutique imposant un traitement antibiotique par une spécialité ou un collyre fortifié (5). Un prélèvement cornéen pour analyse microbiologique doit être réalisé préalablement à l'antibiothérapie. Il permettra un examen direct, une mise en culture et l'obtention de l'antibiogramme.

a) Kératite peu sévère

Chez des patients consultant précocement et souffrant de kératite peu sévère, la kératite peut être traitée en ambulatoire par des collyres antibiotiques du commerce. Ils sont administrés toutes les heures, seuls ou en bithérapie (5).

Les antibiotiques recommandés par l'AFSSAPS sont les tétracyclines, les aminosides, les fluoroquinolones, la bacitracine, la polymyxine b, l'acide fusidique et la rifamycine (5).

La progression de la kératite est stoppée en 48 à 72 heures par une antibiothérapie efficace.

b) Kératite sévère

Le patient est hospitalisé en moyenne une semaine pour un traitement à fortes doses impliquant ou non des collyres fortifiés.

L'association d'un antibiotique fortifié peut se faire avec un collyre non fortifié, notamment une fluoroquinolone comme la ciprofloxacine.

Lorsqu'il est nécessaire d'utiliser des collyres renforcés, ils sont utilisés en bithérapie ou trithérapie, synergiques, à large spectre, avec des instillations répétées, tout en respectant un délai de 5 minutes entre chaque instillation.

Le schéma posologique comporte une dose de charge toutes 30 minutes les premières heures d'hospitalisation, puis toutes les heures les 24 à 48 premières heures (6). Lorsque les signes cliniques s'améliorent, la posologie est réduite à 8 instillations par jour. Le patient poursuit en général le traitement une semaine après sa sortie d'hospitalisation.

Les associations d'antibiotiques fortifiés suivantes sont classiquement employées (6) : trithérapie (ticarcilline + gentamicine + vancomycine) ou bithérapie (ticarcilline ou céfazoline + tobramycine; ou vancomycine + ceftazidime).

B. ENDOPHTALMIES BACTERIENNES

1) Définition

Une endophtalmie est l'inflammation du contenu oculaire (Figure 2). Lorsque toutes les structures oculaires y compris la sclère et l'espace sous-ténonien sont inflammatoires, on parle de panophtalmie.

Ces infections risquent d'entraîner la destruction des membranes visuelles (rétine, choroïde) et du vitré (7).

L'endophtalmie infectieuse peut survenir de manière aiguë suite à une plaie du globe, ou de manière retardée après un traumatisme, une chirurgie ou une septicémie.

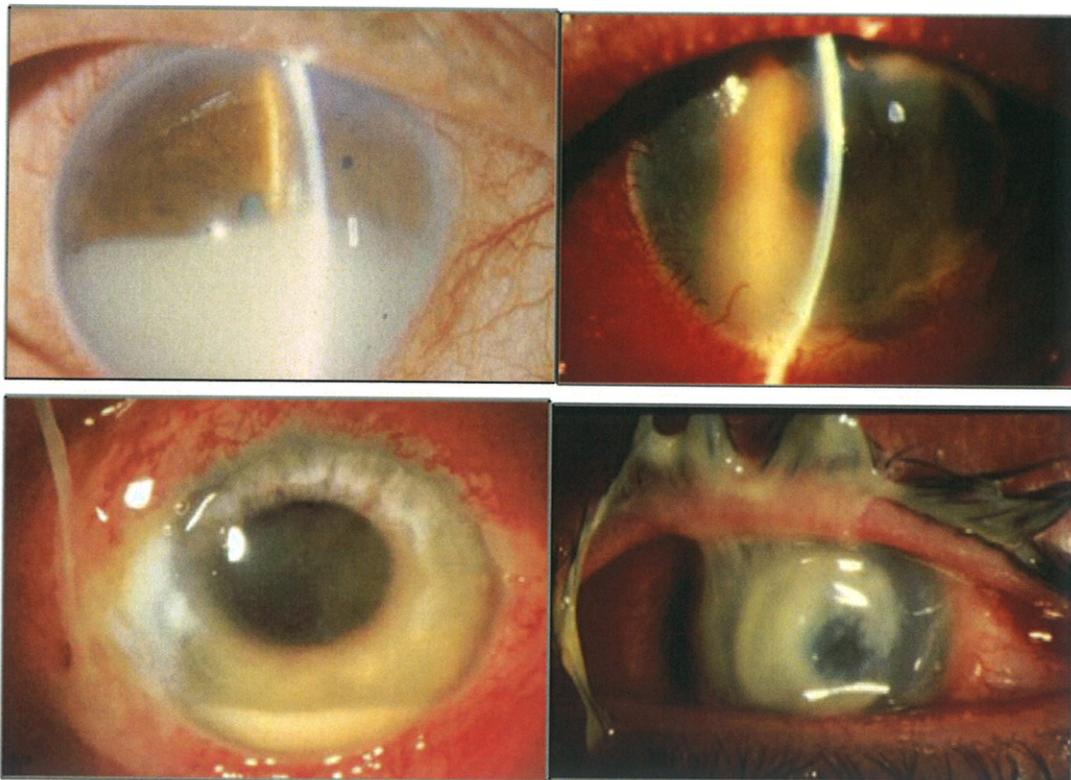


Figure 2 : Endophtalmies (Photographies Pr Chiambaretta)

2) Endophtalmie infectieuse aigue (7)

a) Etiologie

Les endophtalmies aigues surviennent le plus souvent suite à une chirurgie endoculaire ou à une plaie du globe. La plupart des endophtalmies postopératoires sont des complications liées à une chirurgie de la cataracte, car c'est la plus fréquente des interventions ophtalmologiques. Elles surviennent en général dans les 10 jours suivant l'opération.

b) Germes responsables

Deux études multicentriques prospectives, le G.E.E.P. (Groupement d'Etudes Epidémiologiques et Prophylactiques) (8) et l'EVS (Endophthalmitis Vitrectomy Study) (9) ont montré que les BGP représentent 85 à 95% des causes d'infection, alors que les BGN ne sont mis en cause que dans 5 à 15% des cas. *Staphylococcus epidermidis* (Figure 3) est l'une des BGP les plus fréquentes (50 % à 70%). Viennent ensuite *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sp*, et *Enterococcus sp*.

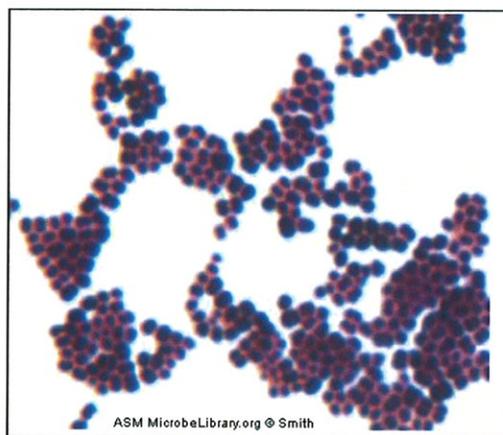


Figure 3 : *Staphylococcus epidermidis* observé en coloration de Gram (10)

L'origine des germes est variée. La contamination peut être liée à l'air ou au matériel du bloc opératoire, aux tissus environnants le patient, aux solutés ayant irrigué l'œil, à la présence de germes opportunistes ou pathogènes dans le cul-de-sac conjonctival.

c) Stratégie thérapeutique de l'endophtalmie post chirurgicale (7) (11) (12) (15)

(1) Prélèvement endoculaire

Les prélèvements endoculaires sont indispensables avant toute antibiothérapie. Ils sont réalisés par ponction de la chambre antérieure, associée ou non à une ponction ou à une biopsie du vitré.

(2) Bi antibiothérapie intravitréenne

L'antibiothérapie est tout d'abord probabiliste. Elle est ensuite adaptée aux résultats des prélèvements microbiologiques, dont les résultats devront être contrôlés avant chaque nouvelle injection intravitréenne.

Le schéma thérapeutique actuel vise à couvrir BGP et les BGN par une bi-antibiothérapie intravitréenne.

La majorité des germes responsables d'endophtalmies étant des BGP, l'injection intravitréenne doit obligatoirement comporter la vancomycine (1 mg/0,1 mL).

L'existence d'endophtalmies à BGN, plus rares mais ayant un pronostic plus sévère, conduit à préconiser l'injection d'une céphalosprine de troisième génération (C3G), la ceftazidime, qui est active sur la plupart des BGN (dont *Pseudomonas aeruginosa* et *Haemophilus influenzae*).

Les aminosides sont rarement utilisés en remplacement de la ceftazidime en raison de leur faible marge thérapeutique. Ils sont réservés aux germes résistants aux céphalosporines et aux patients allergiques aux céphalosporines. Dans ce cas, l'amikacine est l'aminoside présentant la plus faible toxicité intraoculaire.

La toxicité rétinienne des antibiotiques limite la répétition des injections. Cependant, cette bithérapie peut être répétée après 48 heures, puis réitérée une fois par semaine pendant deux semaines (12).

(3) Antibiothérapie systémique

Un traitement par voie générale par des antibiotiques à bonne diffusion intraoculaire est mis systématiquement en place. Une fluoroquinolone (ciprofloxacine 500 mg VO, 2 fois par jour) est généralement associée avec une β -lactamine à large spectre à comme une uréidopénicilline ou carbapénème (imipenem 500 mg IV, 2 fois par jour), afin d'éviter l'émergence de mutants résistants. Après 5 à 6 jours de traitement IV, le relais est pris per os, en général avec une fluoroquinolone.

(4) Traitement local

La prescription de collyre atropinique permet une mise au repos des structures oculaires, ce qui a un effet antalgique et anti-inflammatoire. Après quelques jours, le relais est pris avec un collyre associant antibiotique et corticoïdes.

(5) Corticothérapie

Une corticothérapie locale permet de lutter contre l'inflammation aiguë associée à l'endophtalmie, sauf en cas de suspicion d'endophtalmie fongique. Ainsi, une injection de dexaméthasone® (200 μ g soit 0,05 ml ou = 400 μ g soit 0,1 ml) peut réalisée conjointement à l'injection d'antibiotiques, en général lors de la troisième injection intravitréenne.

En fonction de l'importance clinique de l'inflammation, elle peut être associée à des corticoïdes par voie systémique (250 à 500 mg de Solumédrol pendant trois jours), dès le deuxième jour du traitement antibiotique.

(6) Collyre fortifié

Les collyres fortifiés peuvent être utilisés comme traitement adjuvant dans l'endophtalmie aiguë en cas d'infection de surface associée. Ils ne permettent pas une pénétration suffisante des antibiotiques dans le vitré pour traiter l'endophtalmie à eux seuls.

Après quelques jours, ces antibiotiques fortifiés sont remplacés par un collyre classique associant dexaméthasone et antibiotique (11).

(7) Vitrectomie

La réalisation d'une vitrectomie est discutée en fonction de l'acuité visuelle du patient qui témoigne de la virulence du germe, de la durée de l'infection et de la réponse immunitaire du patient. Elle présente l'intérêt de fournir un échantillon vitréen pour analyse bactériologique, d'éliminer directement les germes et leurs toxines et de supprimer le cloisonnement de certains abcès vitréens. Cependant il s'agit d'un geste difficile techniquement et exposant à un risque de décollement de rétine (11).

Les yeux vitrectomisés ont trois fois plus de chances (33 % vs 11 %) d'obtenir une acuité visuelle finale supérieure ou égale à 5/10 et deux fois moins de risque d'évoluer vers une acuité inférieure à 2/10 (56 % versus 30 %) que ceux n'ayant eu qu'une ponction de vitré.

La vitrectomie peut être réalisée d'emblée ou suite à l'aggravation des signes cliniques.

d) Evolution

L'évolution est fonction de différents facteurs. Le délai de prise en charge, la virulence et le type du germe, la taille de l'inoculum, les complications chirurgicales, et l'affaiblissement des défenses du patient assombrissent le pronostic.

Selon les études, 22% à 77 % des patients retrouvent une acuité visuelle égale ou supérieure à 1/10 (11).

3) Les endophtalmies retardées ou chroniques (13)

a) Etiologie

Les endophtalmies retardées sont beaucoup moins fréquentes que les endophtalmies aiguës.

Elles sont le plus souvent décrites suite à des chirurgies de la cataracte, lors desquelles il y a contamination par des germes faiblement virulents, présents sur la prothèse intraoculaire ou dans le sac cristallinien.

Elles peuvent également être dues à la pénétration tardive d'un micro-organisme dans l'œil via une cicatrice, ou lors du retrait de sutures d'une opération intervenue parfois des années auparavant.

b) Germes responsables

L'agent responsable est principalement le *Propione bacterium acnes*, (ou *Corynebacterium*).

La littérature décrit quelques rares cas à staphylocoque coagulase négatif, au *Nocardia astéroïdes*, au *Rhodococcus* ou à l'*Alcaligenes xyloSIDans*.

c) Stratégie thérapeutique de l'endophtalmie chronique

Ce n'est souvent qu'après plusieurs tentatives thérapeutiques infructueuses que le diagnostic d'endophtalmie chronique est envisagé.

Un prélèvement vitréen est alors pratiqué et le diagnostic est établi par culture prolongée faisant appel à des milieux spécifiques, et/ou par analyse au microscope électronique.

L'endophtalmie à *Propione bacterium acnes* est traitée par une bithérapie antibiotique intravitréenne associant la vancomycine (1 mg) et la ceftazidime (2,25 mg), ce qui permet de diminuer fortement l'inflammation. Ces injections peuvent éventuellement être répétées.

Un traitement local par de la vancomycine en sous conjonctivale et des collyres corticoïdes peut y être associé.

Les antibiotiques par voie générale ne sont pas indiqués.

Les récurrences sont fréquentes et sont traitées de la même manière. La guérison définitive n'est pas toujours possible. Cependant afin de diminuer les récurrences, une vitrectomie peut être réalisée.

Le pronostic visuel à long terme est meilleur que celui des endophtalmies aiguës avec 78 % des patients récupérant plus d'1/20 et 50 % des patients récupérant 5/10.

III. COLLYRES ET SOLUTIONS INTRAVITREENNES FORTIFIES AUX ANTIBIOTIQUES

La pénétration intraoculaire des antibiotiques administrés par voie générale est faible, même si elle augmente en cas d'inflammation, car les barrières hémato-oculaires s'opposent à la diffusion intraoculaire des grosses molécules. Par exemple, la concentration intraoculaire des pénicillines est de 1% de la concentration sérique, celle des aminosides est de 10 % et celle de la vancomycine est de 20 % (12).

Les particularités cinétiques des antibiotiques au niveau oculaire ont rendu indispensable l'utilisation de deux formes particulières pour la prise en charge en urgence des infections oculaires sévères : les collyres fortifiés et les solutions intravitréennes.

Seules ces formes galéniques exclusivement réalisées en milieu hospitalier, en dehors du cadre de l'AMM, permettent d'obtenir rapidement des concentrations efficaces en antibiotique au niveau oculaire.

A. LES COLLYRES FORTIFIES AUX ANTIBIOTIQUES

1) Définition

Les collyres sont des solutions, des émulsions ou des suspensions stériles aqueuses ou huileuses destinées à l'instillation oculaire (14).

Les collyres fortifiés aux antibiotiques ont été développés à la fin des années 70, afin que les cliniciens puissent disposer de collyres dont la concentration est supérieure à celle des collyres commercialisés. Ils sont généralement préparés partir d'un antibiotique commercialisé, dilué dans du sérum physiologique, de l'eau pour préparations injectables, du BSS (Balanced Salt Solution) ou des larmes artificielles. Ils ne sont préparés et délivrés qu'en milieu hospitalier (6).

Ces collyres permettent d'obtenir d'importantes concentrations cornéennes d'antibiotiques.

Leur indication principale est le traitement des kératites bactériennes graves, qui sont traitées par l'association de deux ou trois collyres antibiotiques synergiques afin de couvrir un spectre bactérien très large.

2) Pharmacocinétique

La cinétique d'un antibiotique en collyre dépend de trois paramètres principaux

Le premier est la concentration de l'antibiotique dans les larmes. Cette concentration décroît au cours du temps du fait de la dilution dans le film lacrymal, de la résorption au niveau de la conjonctive, de l'élimination par les canaux lacrymaux, de la pénétration dans la cornée, voire dans la chambre antérieure.

Le deuxième paramètre est la pénétration à travers la cornée vers la chambre antérieure. Ce phénomène augmente si l'antibiotique est lipophile, de poids moléculaire assez bas, s'il est dans un support visqueux allongeant son temps de rémanence, ou s'il existe des altérations de l'épithélium cornéen.

Le troisième paramètre est le passage systémique.

Le but recherché est d'obtenir localement des concentrations efficaces supérieures aux concentrations minimales inhibitrices (CMI) et inférieures aux concentrations toxiques pendant un temps de contact maximal, qui dépend de la viscosité (supériorité des formes pommades et gels), du pH, de l'osmolalité, du type de molécule et des adjuvants contenus dans la préparation.

3) Facteurs de tolérance

Pour être toléré à la surface oculaire, un collyre antibiotique doit être stérile, isotonique aux larmes, exempt de particules traumatisantes et présenter un pH proche de la neutralité.

L'osmolalité de la solution est responsable du degré d'évaporation de la solution et de la tolérance clinique du produit, alors que le pH est associé à la stabilité de la solution, sa tolérance et son degré de pénétration tissulaire. En pratique l'œil tolère des variations de pH de 3 à 10 et supporte sans douleur ni dommage cellulaire des osmolalités de 240 à 550 mOsmol/kg.

L'administration des collyres fortifiés est contraignante. En effet, des bithérapies ou des trithérapies synergiques sont souvent utilisées. Des instillations répétées sont nécessaires, comportant une dose de charge toutes 30 minutes les premières heures d'hospitalisation, puis toutes les heures les 24 premières heures. Il convient de respecter un délai de 5 minutes entre chaque instillation (6).

B. SOLUTIONS INTRAVITREENNES

1) Définition

Une solution intravitréenne est une solution injectable stérile (14), destinée à être injectée directement dans l'œil, afin d'agir au plus près de la rétine et du vitré.

Cette voie d'administration est utilisée depuis les travaux de Peyman et Sanders dans les années 70 (15). Elle est le seul moyen d'obtenir rapidement des concentrations antibiotiques efficaces, c'est-à-dire supérieures à plusieurs fois la CMI des germes infectants (11) (12).

L'injection est réalisée au bloc opératoire ou en salle de petite chirurgie (Figure 4).

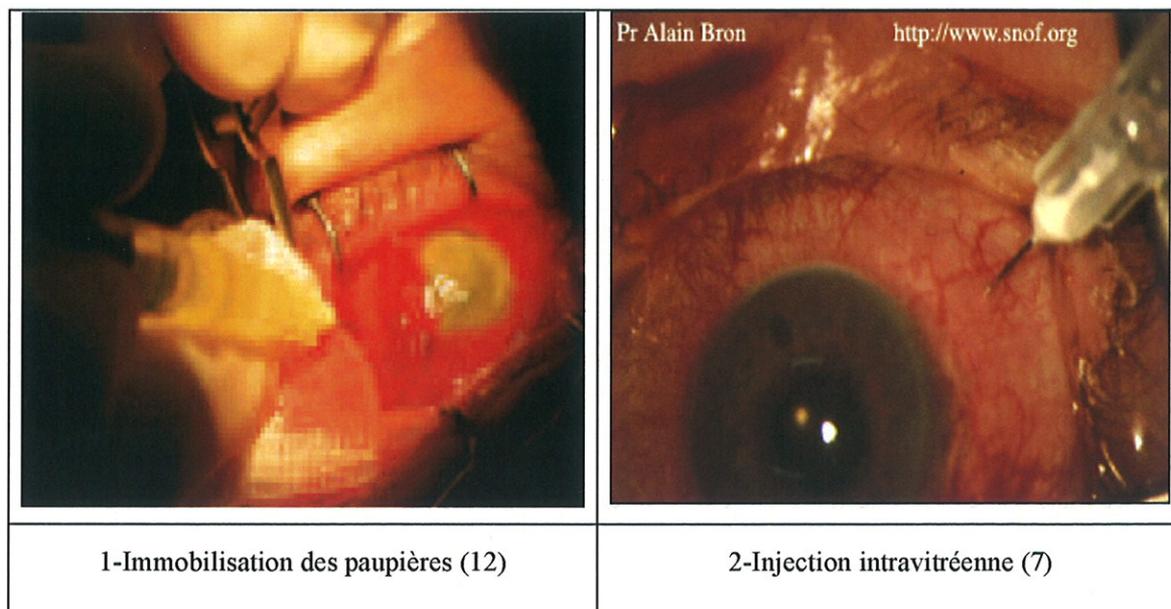


Figure 4 : Préparation du patient et injection intravitréenne

2) Pharmacocinétique (12)

L'administration intravitréenne permet de s'affranchir des barrières pariétales et hémato-oculaires en délivrant directement et immédiatement le principe actif à concentration efficace dans le vitré. C'est la voie d'administration de choix pour le traitement des infections intraoculaires.

La modélisation de la cinétique d'un antibiotique ainsi administré est difficile, car elle dépend de sa capacité à diffuser au sein du gel vitréen, puis à sortir de la cavité vitréenne en traversant les barrières oculaires.

Il faut donc tout d'abord prendre en compte les caractéristiques pharmacologiques classiques. Ainsi, plus le principe actif est hydrosoluble et de faible poids moléculaire plus sa demi-vie est courte.

Ensuite l'état de l'œil intervient. Plus les barrières hémato-oculaires sont altérées par l'inflammation, plus l'élimination de l'antibiotique est rapide. Le statut cristallinien et l'état vitréen (degré de liquéfaction, antécédent de vitrectomie) influent également. Ainsi les poches vitréennes constituées en cas d'abcès vitréen ne permettent pas une bonne diffusion des antibiotiques (11).

Enfin les caractéristiques de l'antibiotique utilisé influent sur le site d'élimination. Une molécule de poids moléculaire élevé et chargée positivement est éliminée préférentiellement par voie trabéculaire antérieure, alors qu'une molécule de faible poids moléculaire chargée négativement est éliminée par voie trans-rétinienne postérieure.

Ces différentes propriétés expliquent que les antibiotiques à bonne pénétration intraoculaire par voie systémique ne soient pas ceux qui ont les demi-vies d'élimination les plus longues après administration par voie intravitréenne. En effet les molécules qui pénètrent facilement à l'intérieur de l'œil sont celles qui franchissent facilement les barrières hémato-oculaires, et qui donc en ressortent assez aisément.

3) Facteurs de tolérance (12)

La tolérance d'une injection intravitréenne est fonction du volume injecté, de la toxicité intrinsèque de la molécule et des actes chirurgicaux associés.

L'injection doit être réalisée avec une aiguille très fine (30G). Le volume total injecté ne doit pas dépasser 0.2 mL, si une ponction de la chambre antérieure ou du vitré a été réalisée. Dans le cas contraire il ne doit pas être supérieur à 0.1 mL. Au delà il existe un risque d'hypertonie oculaire. Le geste pouvant être relativement douloureux dans un contexte inflammatoire, il est réalisé sous anesthésie locale et sous antalgiques (morphine ou nalbuphine en association au paracétamol). En cas de tableau algique majeur, une anesthésie générale peut être envisagée.

Le principal risque d'une injection intravitréenne est la toxicité rétinienne qui augmente en cas de vitrectomie et dépend de la molécule utilisée.

Ainsi les aminosides ont un fort risque de toxicité (nécrose de la rétine et cicatrisation atrophique maculaire), car les dose toxiques sont proches des doses thérapeutiques. Ils sont donc souvent remplacés par des C3G dont la marge thérapeutique est supérieure. La vancomycine est également bien tolérée aux doses thérapeutiques.

Les risques cristalliniens sont le plus souvent nuls, puisque dans la grande majorité des cas, les patients sont aphaques ou pseudophaques (11).

C. DEUX FORMES GALENIQUES HOSPITALIERES

Les collyres fortifiés et les intravitréennes doivent être réalisés dans les pharmacies à usage intérieur (PUI) afin que leur qualité soit optimale (11).

Ils doivent être réalisés dans le respect des BPP (16) et des BPPH (17).

1) Modalités de fabrication

Une PUI n'est autorisée à réaliser une préparation que si elle possède les moyens appropriés pour la réaliser et la contrôler.

La préparation des médicaments stériles répond à des exigences particulières afin de réduire les risques de contamination microbienne, particulaire et pyrogène. La qualité des médicaments stériles dépend des contrôles réalisés, de la qualité des matières premières et des articles de conditionnement, mais aussi de la validation et la maîtrise des procédés de préparation et des contrôles microbiologiques et particulières de l'environnement, ainsi que de la qualification du personnel (16).

La stérilisation terminale par autoclavage est la méthode de choix pour assurer la stérilité d'une préparation, si cette dernière supporte des températures élevées.

Certains principes actifs, comme la vancomycine qui est dégradée par la chaleur (18), peuvent être traités par filtration stérilisante. La filtration stérilisante est dite en « système clos » si le produit transféré n'est jamais en contact avec l'environnement. Dans le cas contraire, le système est dit « ouvert ».

Ainsi, la réalisation de collyres ou intravitréennes et leur conditionnement en flacon utilise une technique de stérilisation par filtration stérilisante en système ouvert, et un mode de manipulation aseptique.

Les préparations stériles sont réalisées en zone à atmosphère contrôlée, dont le niveau de propreté est adapté au type d'opération. Une filtration stérilisante en système ouvert associée à une manipulation aseptique doit être réalisée en zone de classe A, soit sous hotte à flux laminaire horizontal soit dans un isolateur. L'environnement immédiat doit également être contrôlé.

2) Statut de la préparation

Les pharmacies à usage intérieur peuvent choisir de fabriquer les collyres et les intravitréennes sous le statut de préparation magistrale ou de préparation hospitalière.

a) Préparations magistrales

Une préparation magistrale est un médicament préparé extemporanément suite à une prescription et destinée à un malade déterminé (19).

La réalisation des préparations magistrales est une mission obligatoire des PUI (20).

b) Préparations hospitalières

Une préparation hospitalière est un médicament préparé selon les indications de la Pharmacopée et en conformité avec les bonnes pratiques en raison de l'absence de spécialité pharmaceutique disponible ou adaptée dans une pharmacie à usage intérieur d'un établissement de santé. Les préparations hospitalières sont dispensées sur prescription médicale à un ou plusieurs patients (19).

La réalisation des préparations hospitalière est une mission optionnelle des PUI, qui doivent pour cela obtenir une autorisation de l'AFSSAPS (21).

Un des grands intérêts des préparations hospitalières réside dans le fait qu'elles peuvent être préparées à l'avance. La PUI dispose ainsi d'un stock de préparations dont la qualité est validée. Ce statut est particulièrement adapté à la prise en charge en urgence des infections oculaires sévères par des collyres fortifiés ou des intravitréennes, notamment lors des horaires de garde de la PUI.

3) Exigence de la pharmacopée

Les préparations doivent réalisées conformément aux BPP. Ainsi, elles doivent faire l'objet de dossier de lot, et leur durée de péremption est établie en fonction de données de stabilité.

La Pharmacopée Européenne définit également des exigences complémentaires, auxquelles les collyres et les solutions pour intravitréennes doivent répondre (Tableau 1).

	Solution de collyre fortifié : Monographie des Préparations ophtalmiques « collyre »	Solution intravitréenne : Monographie des Préparations Injectables
Qualité du récipient	Satisfait les exigences des matériaux pour Récipients (3.1 et 3.2)	Satisfait les exigences des matériaux pour Récipients (3.1 et 3.2)
Méthode de préparation	Satisfait les Méthodes de préparation des produits stériles (5.1.1)	Satisfait les Méthodes de préparation des produits stériles (5.1.1)
Contamination particulaire et limpidité	Pratiquement limpide et pratiquement exempt de particules	Limpide Pratiquement exempte de particules : satisfait l'essai de Contamination particulaire : particules non visibles (2.9.19)
Stérilité	Satisfait l'essai de stérilité (2.6.1)	Satisfait l'essai de stérilité (2.6.1) Satisfait l'essai des endotoxines bactériennes (2.6.14) ou l'essai des pyrogènes (2.6.8).
Conditionnement	Récipient stérile à fermeture inviolable	Récipient étanche stérile à fermeture inviolable
	Multidose : Volume maximum = 10 mL et permet l'administration d'une goutte plusieurs fois Unidose: satisfait le prélèvement du contenu nominal 2.9.17	Unidose uniquement car voie intraoculaire
Conservateurs	Présents sauf si le collyre possède des propriétés antibactériennes adéquates	Non autorisés par voie intra oculaire
	Si absents, le conditionnement est en unidose ou en système multidose empêchant la contamination après ouverture	
Péremption	4 semaines maximum sauf autorisation pour les multidoses	

Tableau 1 : Exigences de la Pharmacopée Européenne relatives aux solutions pour collyres ou pour injection intravitréennes (14)

IV. COLLYRES ET SOLUTIONS INTRAVITREENNES A LA VANCOMYCINE

A. STRUCTURE DE LA VANCOMYCINE

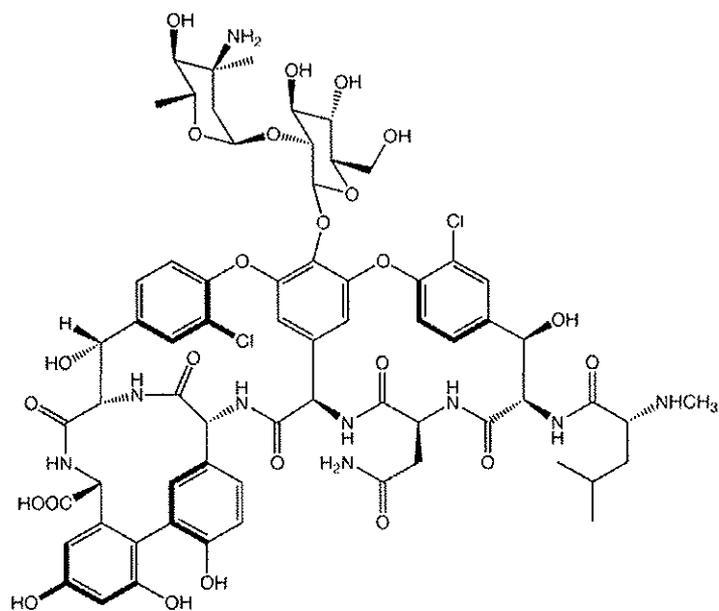


Figure 5 : Structure moléculaire de la vancomycine

La vancomycine est un antibiotique naturel de la famille des glycopeptides tricycliques (22). Elle est obtenue par la fermentation d'un actinomycète, *Streptomyces orientalis* (23). Le composant majoritaire est la vancomycine B, mais du fait du mode de production la présence d'autres glycopeptides est inévitable (24).

C'est une molécule volumineuse et complexe de formule chimique (C₆₆ H₇₅ Cl₂ N₉ O₂₄) et de masse molaire M = 1 449,254 g/mol (Figure 5).

B. MECANISME D'ACTION DE LA VANCOMYCINE

La vancomycine agit en inhibant la synthèse du peptidoglycane de la paroi bactérienne. Elle bloque l'undécaprényl-phosphate, qui transporte les précurseurs de la chaîne de peptidoglycane en formation, ce qui stoppe la division de la bactérie.

Du fait de son poids moléculaire élevé, elle ne peut emprunter les porines de la capsule qui protège le peptidoglycane des BGN. Elle n'est donc active que sur les BGP (Figure 6).

Il existe un mécanisme d'action complémentaire par altération de la membrane cytoplasmique et inhibition de la synthèse de l'ARN (22).

La vancomycine est un antibiotique bactéricide temps dépendant.

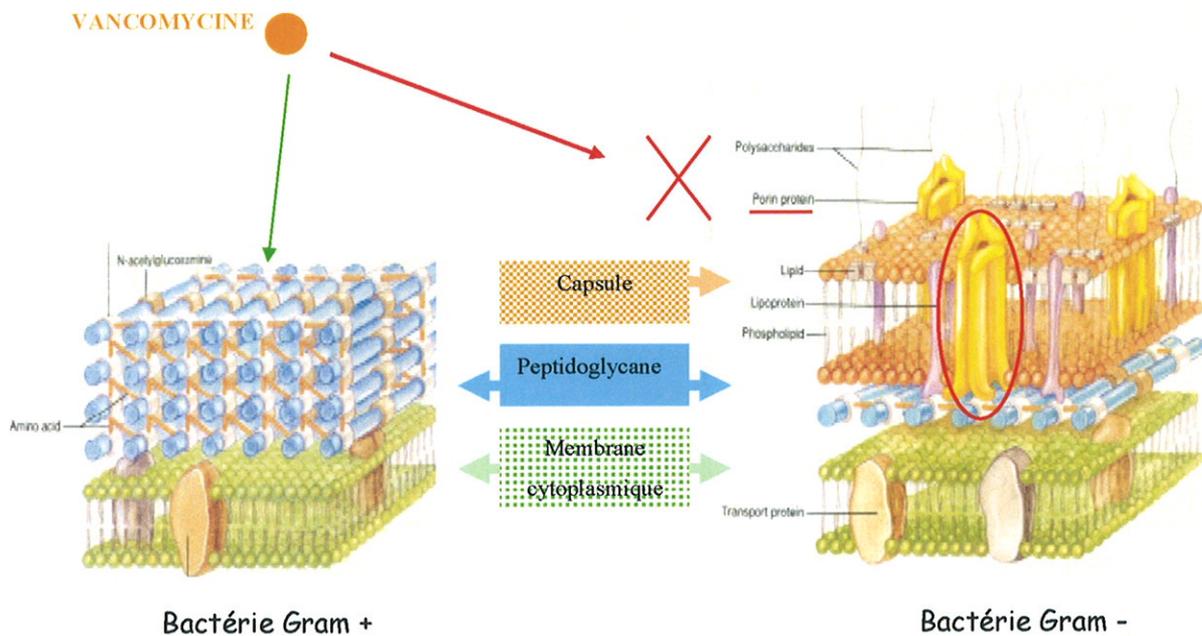


Figure 6: Action de la vancomycine au niveau de la paroi bactérienne

C. SPECTRE BACTERIEN DE LA VANCOMYCINE

Du fait de son mode d'action la vancomycine n'est active que sur les BGP.

Elle est particulièrement intéressante pour les infections liées aux staphylocoques, notamment les *S. Aureus* méticilline résistants ; et aux streptocoques, dont l'entérocoque. En effet bien que l'émergence d'entérocoque résistants à la vancomycine soit bien documentée (25), elle n'a jamais été rapportée dans le cadre de l'endophtalmie exogène (26).

La vancomycine en collyres fortifiés permet de traiter des kératites à *Streptococcus pneumoniae* résistantes aux pénicillines lorsqu'elle est associée à la gentamycine (6).

Tous les BGP retrouvés lors de l'EVS (Endophthalmitis Vitrectomy Study) étaient sensibles à la vancomycine (4) (12).

D. PROPRIETES PHYSICOCHEMIQUES DE LA VANCOMYCINE

1) Solubilité

La vancomycine est une poudre blanche, hygroscopique, facilement soluble dans l'eau, mais peu soluble dans l'alcool. Le pH d'une solution à 50 mg/mL dans l'eau varie entre 2.5 et 4.5 (14).

La solubilité de la vancomycine est maximale à pH 4 et diminue au fur à mesure que l'on s'approche de la neutralité (18). Pourtant son activité serait maximale en pH alcalin (22).

2) Compatibilité

La vancomycine en solution est compatible avec l'amikacine.

Ainsi, certains auteurs proposent de réaliser des collyres associant à dose fixe la vancomycine et l'amikacine (6). De même, lorsqu'une injection conjointe de ces deux molécules en intravitréenne est nécessaire une seringue unique pourra être utilisée (12).

3) Incompatibilités

La vancomycine n'est pas compatible avec la ceftazidime dont elle provoque la précipitation (27). Ce phénomène est majoré lorsque la ceftazidime est diluée dans du BSS plutôt que dans du chlorure de sodium (28). Lors de l'association de ces deux antibiotiques par voie intravitréenne, qui est fréquente, deux seringues différentes doivent être utilisées et permettre l'injection en deux sites distincts (12).

Ces considérations doivent amener à respecter un temps d'attente lors de l'instillation conjointe de collyres à la vancomycine et de ceftazidime.

La vancomycine est également incompatible avec d'autres C3G dont la ceftriaxone (29).

Les données de stabilité concernant le mélange de vancomycine avec la dexaméthasone sont hétérogènes.

L'examen physique du mélange tend à montrer qu'il est incompatible (30) (31). Cependant le dosage de la vancomycine en association à la dexaméthasone dans le vitré de patients atteints d'endophtalmie, ne montre pas de diminution de la concentration de vancomycine (32).

E. PHARMACOCINETIQUE DE LA VANCOMYCINE

Les voies d'administration usuelles de la vancomycine sont les voies orale, intraveineuse et intrathécale. Les voies locale et intravitréenne sont utilisées en dehors de l'AMM (12).

1) Administration orale

La vancomycine est très peu absorbée par voie orale sauf en cas d'entérocolite.

2) Administration intraveineuse

Après administration parentérale, la vancomycine diffuse bien dans les séreuses. Des concentrations inhibitrices sont atteintes dans les liquides péricardique, pleural, ascitique, synovial et dans les urines (22).

La concentration intraoculaire de la vancomycine est de 20 % de la concentration sérique.

L'administration d'un gramme en intraveineuse permet d'obtenir un taux sérique d'environ 25 µg/mL en 2h chez un patient ayant une fonction rénale normale (33).

La demie vie est variable (environ 6h chez le sujet sain). Elle est très augmentée chez l'insuffisant rénal et la personne âgée. Le métabolisme de la vancomycine n'est pas connu et a priori faible. En effet 90% de la dose injectée est éliminée sous forme active par le rein.

La pharmacocinétique de la vancomycine est soumise à une grande variabilité inter et intra individuelle. En conséquence il faut :

- Réduire la posologie et surveiller la fonction rénale et auditive chez le sujet âgé l'insuffisant rénal, et l'insuffisant hépatique sévère. La fonction auditive doit particulièrement être surveillée lorsque la clairance de la créatinine est < 5 ml/min.
- Calculer la posologie sur le poids total chez l'obèse, car chez ces patients le volume de distribution est augmenté. De plus, ils éliminent plus rapidement l'antibiotique, donc les prises doivent être rapprochées.
- Adapter la posologie chez les grands brûlés, chez qui la clairance est plus importante (33).

3) Administration topique de collyres

Les collyres renforcés à la vancomycine diffusent principalement au niveau de la cornée et de l'humeur aqueuse.

Ainsi l'utilisation de collyres à la vancomycine à 33 mg /mL permet d'obtenir des concentrations cornéennes de vancomycine 4 à 20 fois supérieures aux CMI 90 de *Staphylococcus aureus* (2-10 µg/ml) (34). De même une étude chez le rat a montré que l'administration de collyres à la vancomycine de 10 mg /mL permet de la détecter dans la cornée et dans l'humeur aqueuse, mais ni dans le vitré ni dans le sérum (35).

Kao JC a montré que seulement 20% de la dose de vancomycine diffuse à travers la sclère du fait de la taille de la molécule, mais conclut qu'elle peut ainsi constituer un traitement d'appoint des infections intraoculaires (36).

4) Administration intravitréenne

L'injection intravitréenne permet de s'affranchir des barrières hémato-oculaire et d'obtenir des concentrations localement très élevées. Différents paramètres influent alors sur la demi-vie intraoculaire de la vancomycine.

L'élimination de la vancomycine est beaucoup rapide par un œil infecté où la demie vie est de 14 heures, que par un œil sain où elle est de 69 heures (37).

L'élimination est également plus rapide dans un œil vitrectomisé et aphaque (38).

L'association de dexaméthasone à la vancomycine semble ralentir l'élimination de la vancomycine et donc potentialiser le traitement dans un œil infecté, alors que le phénomène inverse se produit dans l'œil sain (39).

Une étude chez le rat montre que la demi-vie de la vancomycine ne semble pas modifiée par un schéma mono injection ou multi injections toutes les 36h (40). La demi-vie de la vancomycine après injection intravitréenne reste cependant assez courte, imposant de réinjecter régulièrement l'antibiotique dans l'œil toutes les 48 ou 72 h (12).

F. POSOLOGIES DE LA VANCOMYCINE

1) Voie Intraveineuse

La posologie usuelle chez l'adulte est de 2 g/jour (soit environ 30 mg/kg/jour), administrés en quatre perfusions ou en continu pendant 7 à 10 jours. Elle est adaptée afin d'obtenir des taux sériques dans les marges thérapeutiques.

Si l'administration est fractionnée, la concentration minimale doit être comprise entre 10 µg/mL et 12 µg/mL, et la concentration maximale entre 20 et 40 µg/mL. En cas de perfusion continue, la concentration circulante doit être comprise entre 20 et 30 µg/mL.

Chez l'insuffisant rénal et l'insuffisant hépatique sévère la prise unitaire est la même que chez le sujet normal, mais l'intervalle thérapeutique est augmenté en fonction des concentrations sériques. Dans l'attente de ces résultats, la dose à administrer est déterminée à l'aide de la formule suivante :

$$\text{dose journalière (mg/jour)} = \frac{(\text{clairance de la créatinine [ml/min]} \times 15) + 150}{\text{intervalle (jours)}}$$

Ainsi, chez l'anurique ou l'insuffisant rénal au stade terminal, la posologie initiale est de 1 g puis 500 mg ou 1 g tous les 7 à 10 jours, selon le résultat des contrôles de la concentration sérique (41), qui ne doit pas dépasser 20 µg/mL (33).

2) Intravitréennes

Le dosage des intravitréennes à la vancomycine à 10 mg/mL fait l'objet d'un large consensus. Deux injections sont en général réalisées à 48 ou 72 heures d'intervalle. Une nouvelle injection peut ensuite être proposée une fois par semaine pendant deux semaines (12).

L'injection de doses plus faibles que celle recommandées par les schémas thérapeutiques actuels pourrait être discutée, car la rémanence du produit après deux injections de 0.2 mg à 3 jours d'intervalle permet d'obtenir des concentrations supérieures aux CMI des germes les plus fréquents et permet de négativer les prélèvements vitréens après une semaine (42).

3) Collyres

Les collyres à la vancomycine sont utilisés à différentes concentrations : 25 mg/mL (43), 31 mg/mL (44) (45), et 50 mg/mL (46).

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) sont calculées pour des concentrations plasmatiques d'antibiotiques mais elles doivent être interprétées en fonction de la concentration réelle au sein de la cornée. Les collyres fortifiés permettent d'obtenir des concentrations intratissulaires nettement supérieures aux CMI des bactéries incriminées. Ainsi l'utilisation de collyres à la vancomycine à 33 mg/mL permet d'obtenir des concentrations cornéennes de vancomycine 4 à 20 fois supérieures aux CMI 90 de *Staphylococcus aureus* (2-10 µg/ml) (34).

Le schéma posologique comporte une dose de charge administrée toutes les 30 minutes les premières heures d'hospitalisation, puis toutes les heures les 24 premières heures, puis une goutte 8 fois par jour (11). Un délai de cinq minutes doit être respecté entre chaque instillation (6).

G.TOXICITE DE LA VANCOMYCINE

1) Toxicité par voie générale

La toxicité de la vancomycine par voie générale est très documentée.

Deux effets indésirables sont liés à l'administration. Le syndrome de la nuque rouge survient si d'injection parentérale est trop rapide et il y a risque de veinite si la vancomycine n'est pas diluée entre 2,5 et 5 g/L.

Les deux effets toxiques principaux de la vancomycine sont la néphrotoxicité et l'ototoxicité, qui sont majorés en cas d'insuffisance rénale suite à l'accumulation de l'antibiotique.

Ces risques sont évaluables et maîtrisables grâce aux taux sériques de vancomycine. La néphrotoxicité est avérée au delà de 40 µg/mL. Il faut craindre la toxicité auditive au delà de 80 µg/mL chez les patient ayant une fonction rénale normale, et au delà de 20 µg /mL si la clairance à la créatinine est inférieure à 5 mL /min (33).

La toxicité systémique de la vancomycine doit elle être redoutée par voie locale ? La bibliographie à ce sujet est très pauvre. Les doses reçues via ces deux voies peuvent cependant être comparées.

L'injection intravitréenne de 0.1 mL de vancomycine à 10 mg/mL correspond à l'administration de 1 mg, soit 0.05% de la dose journalière classique en intraveineuse.

Si l'on administrait des collyres à 25 mg/mL en dose de charge (une goutte par demi-heure), pendant 24h ce qui est supérieur aux doses thérapeutiques, le patient recevrait 2.4 mL de collyre. En effet 20 gouttes d'un compte goutte codex pèsent environ un gramme et représentent donc un volume d'environ un mL. Cela correspondrait à l'administration de 60 mg de vancomycine soit 3% de la dose parentérale usuelle.

Si l'on extrapole le fait qu'un gramme de vancomycine en intraveineuse permet d'obtenir une concentration sérique de 25 µg/mL, et si l'on envisage que toute la dose administrée en local passe dans la circulation générale, une injection intravitréenne provoquerait un taux sérique de 0.025 µg/mL et 60 mg de vancomycine en collyres provoquerait une concentration sérique

de 1.5 µg/mL. Ces taux sont inférieurs aux doses toxiques et même aux doses thérapeutiques. Du fait de la demie vie relativement courte de la vancomycine, des effets locaux semblent donc peu probables.

2) Toxicité locale

L'administration de collyres fortifiés à la vancomycine provoque un retard de cicatrisation de la surface oculaire (6).

Chez l'animal, l'utilisation de la vancomycine par voie intravitréenne aux doses thérapeutiques (1 mg/0,1 mL) n'entraîne pas d'effets indésirables cliniques ou histopathologiques.

Des anomalies histologiques rétiniennes modérées apparaissent à partir de 2 à 5 mg. Au delà de 10 mg les lésions sont très sévères avec destruction totale de la rétine (12).

H. DEGRADATION DE LA VANCOMYCINE

Le métabolisme de la vancomycine est méconnu, mais des produits de dégradation sont décrits par la littérature analytique.

La vancomycine B est dégradée par la chaleur en un produit cristallin appelé CDP (crystalline degradation product). Ce composé est constitué du mélange du CDP1m (Crystalline Degradation Product 1 minor) et du CDP1M (Crystalline Degradation Product 1 Major)

Ces produits ne présentent aucune activité antibiotique. Leur toxicité éventuelle n'est pas rapportée par la littérature.

Les structures moléculaires de la vancomycine et du CDP sont très proches et ne sont pas différenciées par les méthodes UV et certaines techniques d'immunopolarisation de fluorescence. Cette réactivité croisée peut amener à surestimer les concentrations sériques jusqu'à 50-70%, entraînant des ajustements posologiques inadéquats et des échecs thérapeutiques.

Seul le dosage par CLHP (chromatographie liquide haute performance) permet de séparer la vancomycine de ses produits de dégradation (18) (47).

Une étude de stabilité sur des collyres à la vancomycine à 50 mg/mL a mis en évidence un troisième produit de dégradation non attendu. Les auteurs pensent qu'il s'agit d'un composé succimide intermédiaire entre le CDP1 m et CDP1 M (18), (Figure 7).

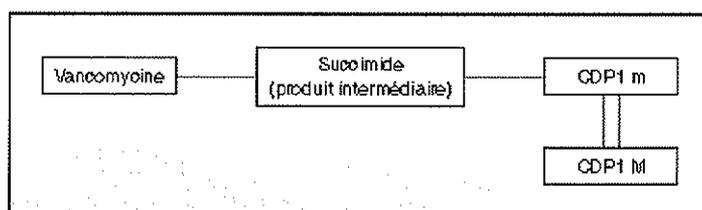


Figure 7 : Produits de dégradation de la vancomycine (18)

Une autre étude mentionne également un autre composé, l'Aglyucovancomycin B qui résulte de la perte d'un disaccharide.

I. FORMULATION DES COLLYRES ET DES SOLUTIONS INTRAVITREENNES A LA VANCOMYCINE

1) Solvants

L'eau pour préparation injectable (eau PPI) est le solvant de reconstitution indiqué par les résumés de caractéristiques du produit (RCP) des deux spécialités actuellement commercialisées, la Vancomycine Mylan® et la vancomycine Sandoz ® (41) (48).

Les solvants habituellement utilisés pour les intravitréennes sont l'eau PPI et le chlorure de sodium 0.9% (7) (12).

Les solvants utilisés pour les collyres doivent permettre une bonne tolérance oculaire sachant que l'œil tolère des pH de 3 à 10 et des osmolalités de 240 à 550 mOsmol/kg.

La littérature mentionne l'eau PPI, le chlorure de sodium 0.9%, le glucose 5% (18) et le BBS (6).

Ces quatre solvants permettent d'obtenir des pH acceptables pour l'œil (Tableau 2).

L'osmolalité d'une solution vancomycine à 25 mg/mL dans l'eau PPI est d'environ 30 mOsm/kg, ce qui est beaucoup trop faible. Le chlorure de sodium, le glucose 5% et le BSS permettent d'atteindre des osmolalités bien tolérées par l'œil (Tableau 2).

Cependant le glucose 5% présente l'inconvénient d'être un milieu propice à la croissance bactérienne. Le BSS est une spécialité pharmaceutique susceptible de subir un jour un arrêt de commercialisation. De plus il favoriserait la précipitation de la ceftazidime qui est souvent administrée conjointement à la vancomycine.

Le chlorure de sodium semble donc être le solvant le plus simple d'utilisation, tout en procurant un confort acceptable au patient. Une enquête auprès de 50 centres hospitaliers ayant une activité de pharmacotechnie à montré que sur 15 établissements fabriquant des collyres à la vancomycine, 53% utilisaient du NaCl et 40% de l'eau PPI (50) (52).

	Eau PPI		Nacl 0.9%		G5%		BSS	
	pH	Osmolalité	pH	Osmolalité	pH	Osmolalité	pH	Osmolalité
Vancomycine 10 mg/mL (49)	6.0 - 6.1	200 - 216						
Vancomycine 25 mg/mL (43)		30			3.8	318		
Vancomycine 50 mg/mL (14) (46) (18) (42) (42)	2.5 - 4.5		3.2-4.02	331	3.77	351	5.82	344

Tableau 2 : pH et osmolalité (mOsmol/kg) des solutions de vancomycine en fonction du solvant utilisé

2) Conditionnement

Les solutions intravitréennes peuvent être conditionnées en seringues préremplies (51) (53) ou en flacons de verre sertis (50).

Les collyres sont conditionnés en flacon mais les pratiques sont disparates (50).

En effet, une enquête réalisée auprès de 50 centres hospitaliers ayant une activité de pharmacotechnie, dont 15 établissements préparaient des collyres ou des intravitréennes à la vancomycine, montre que la nature du flacon de conditionnement est variable (Figure 8), (52).

Ainsi le flacon peut être en verre blanc ou teinté (de catégorie I II ou III), ou en polyéthylène.

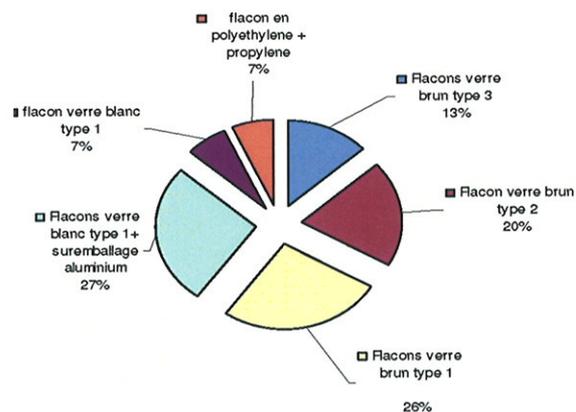


Figure 8 : Type de conditionnement des collyres dans 15 centres hospitaliers.

V. ETUDES DE STABILITE DES PREPARATIONS OPHTALMIQUES DE VANCOMYCINE : REVUE CRITIQUE

Notre PUI fabrique des collyres à 25 mg/mL et des solutions intravitréennes à 10 mg/mL dans du chlorure de sodium. Ces solutions sont conditionnées dans des flacons en verre brun de type I. La congélation nous semble un mode de conservation intéressant mais les données de stabilité décrites dans la littérature ne sont pas adaptées à notre mode de fabrication et manquent d'informations sur le mode de décongélation et la durée de conservation après décongélation.

Les études mentionnant un dosage du principe actif par HPLC sont recensées dans le Tableau 3.

Ainsi la stabilité de collyres à la vancomycine à 50 mg/mL dans du glucose 5% après congélation et décongélation à température ambiante a été établie à 75 jours (46). La validation de la méthode de chromatographie utilisée n'est cependant pas décrite et la durée de stabilité des collyres après décongélation n'a pas été étudiée

Une autre étude a conclu à la stabilité de la vancomycine 50 mg/mL dans du glucose 5% à 21 jours à + 4 °C et à 15 jours à + 25 °C. (18). Les auteurs relatent la présence de cristaux blancs dès 7 jours de conservation à 4°C et l'augmentation significative des produits de dégradation après 7 jours de conservation à 25°C.

La stabilité de collyres à 31 mg/mL dans les larmes artificielles a été établie à 45 jours à -10°C, 10 jours à 4°C, et à 7 jours à 25°C, bien que des particules apparaissent dès trois jours (44).

La stabilité des collyres à 25 mg /mL dans le glucose a été établie à 3 mois à -20°C, après décongélation à température ambiante ou à de l'eau chaude, par une méthode « stability indicating » (43).

La stabilité des intravitréennes de vancomycine à 10 mg/mL dans de l'eau PPI et conditionnées en seringue est rapportée par deux posters. Ces études ne mentionnent pas le contrôle des particules non visibles pour ces solutions injectables.

L'étude des Hôpitaux Universitaires de Genève montre une stabilité de 6 mois après congélation puis décongélation à température ambiante, en acceptant un taux de dégradation de 10% ; avec contrôle de l'osmolalité, du pH et de l'état stérile (51).

L'étude présentée à l'APHIF 2006 (53), établit la stabilité à 21 jours à température ambiante et 2-8°C et 60 jours après décongélation. Le taux de dégradation accepté est 5% du T0. La stérilité des solutions intravitréennes et leurs conditions de décongélation ne sont pas décrites.

D'autres études relatent des essais de stabilité sur des collyres à la vancomycine mais elles semblent moins pertinentes.

L'une d'elle propose 12 jours de stabilité à 4°C pour des collyres à 50 mg/mL dans NaCl 0.9%, mais la méthode de validation du dosage n'est pas précisée (54).

Des méthodes biologiques avec utilisation des critères CMI ou CMB ont également été utilisées pour étudier la stabilité de solutions de vancomycine à 50 mg/mL, 25 mg/mL ou 31 mg/mL (55) (56) (57). Le dosage de l'antibiotique n'est alors pas réalisé.

Préparation ophthalmique			Paramètres de stabilité étudiés	Paramètre chromatographiques						Validation de méthode			Conclusion
C°	Solvant	Cond		Conditions de conservation testées	Colonne	Phase mobile (v/v)	λ nm	Débit ml/min	Vinj (μL)	Tr (min)	méthode validée	gamme	
Collyres 50 mg/mL (46)	Glucose 5%	Verre blanc de type I	Congélation 75 jours à l'abri de la lumière. Décongélation à 1° amb puis conservation 3 jours au frigo	RP delect B 150*4,6mm	91% KH ₂ PO ₄ 0,05M 9% ACN	255	2	-	-	-	-	* Pas d'essai de dégradation forcée * Produits de dégradation non observés	Stable 75 jours à -20°C (perte en PA inférieure à 5%)
Collyre 50 mg/mL (18)	NaCl 0,9%	Verre blanc de type I (flacon de vaccinocine)	conservation 32 jours, à +4°C ou + 25°C, et à l'abri de la lumière	Lichrosorb ODS Rp 18 250 x 4,6 mm - 5 μm (Merck Clevenot)	Mélange (v/v) 10% acétonitrile + 90% eau + 500 μl diéthylamine par litre Ajusté pH=3,15 avec acide orthophosphorique 10 %	281	1	20	11,2	oui	*Points de gamme 0, 10, 20, 50, 100, 200 μg/mL *Point de contrôle 20 et 150μg- mL *dans NaCl	*Pas d'essai de dégradation forcée *3 produits de dégradation détectés après 7 jours à 25°C: 2 identifiés s (CD1M, Tr= 6 min et CD1m Tr=12,8min) + 1 pic non identifié Tr=7min	Stable 21 jours à +4°C NB : pas d'augmentation des produits de dégradation mais cristaux blancs dès 7j Stable 15 jours à +25°C NB : augmentation des produits de dégradation significative après 7j et cristaux dès 11j
Collyre 25 mg/mL (43)	Glucose 5%	Verre brun de type I	Congélation et conservation 3 mois	Lichrospher RP18 125*4mm - 5μm	25% méthanol 60% eau 15% tampon phosphate 0,01M à pH3	220	1,2	20	2,6	oui	50-100- 200- 400μg/mL dans la phase mobile	Essai de dégradation forcée avec NaOH 5N et ébullition 15 min: Les produits de dégradation n'interfèrent pas avec le pic de vancomycine	Stable 3 mois à -20°C et 48h au frigo après décongélation
Collyre 31 mg/mL (44)	Eau PPI + larmes artificielles		Conservation 60j à -10°C, 4, 25 et 40°C										Stable si 90% de la C° initiale Stable 45j à -10°C Stable 10j à 4°C Stable 7j à 25°C (particules des 3j) pas de variation de pH
Solution intravitréenne 10mg/mL (51)	Eau	Seringue	Congélation 90j et décongélation à 1° ambiante	Supelcosil LC18 50mm*3mm, 3μm dp	93% tampon phosphate pH 2,5 7% ACN	220	1,2		5,5	-		Stability indicating HPLC method	Stable 6 mois à -20°C (au moins 90% de la concentration initiale)
Solution intravitréenne 10 mg/mL (53)	Eau	Seringue de 1 mL	Conservation à 22°C 2-8°C et - 22°C	C18 Hypersil	89% eau 10% acétonitrile 0,5% diéthylamine	281	1						Stable 21j à 1 ambiante Stable 21j à 2-8°C: Stable 60j à -25°C (Acceptabilité si teneur = 95%-105% du T0)

Tableau 3 : Synthèse des études de stabilité réalisées sur les solutions ophthalmiques de vancomycine intégrant une méthode de dosage par HPLC

**PARTIE EXPERIMENTALE : STABILITE APRES
CONGELATION DES INTRAVITREENNES A 10MG-ML ET DES
COLLYRES A 25MG-ML DE VANCOMYCINE**

I. MATERIEL

A. MATIERES PREMIERES

1) Vancomycine

Vancomycine Sandoz® 250mg de vancomycine chlorhydrate, poudre pour solution pour perfusion, lot NY0003 périmant le 05/2011.

2) Solvant de reconstitution de la vancomycine

Chlorure de sodium 0.9% Proamp® Aguettant, solution injectable lot 4400216 périmant le 06/2012.

3) Réactifs pour dosage chromatographique

- Acétonitrile hypersolv chromanorm for HPLC gradient grad® VWR ,
- Eau stérile Versylene ® Fresenius,
- Potassium phosphate monobasique substance tampon (KH₂PO₄) M =136.09g/mol Sigma-Aldrich.
- Acide chlorhydrique 1N Fixamal®, fluka analytical, Sigma-Aldrich.

4) Conditionnement

Les articles de conditionnement proviennent de la société FCL médic.

Le conditionnement est réalisé dans des flacons en verre brun de 8 mL type I (référence 13J00VET18) obturés par des bouchons en chlorobutyl (référence 22CHLOR20SRS), puis sertis avec des capsules en aluminium (référence 21CAPSADAO2031).

B. APPAREILLAGE

1) Examen visuel

Un examen visuel des collyres et des intravitréennes est réalisé à l'aide d'une lampe à lumière polarisée « spare lamp TL8W/33 », P.W.Allen and Co, Visual Inspection Engineers.

2) Mesure de la contamination particulaire

Les particules non visibles des solutions intravitréennes sont dénombrées à l'aide d'un compteur de particules « HIAC 9703 HACH Ultra® », Hach company.

3) Mesure de l'osmolalité

L'osmolalité est mesurée avec un biocryomètre, modèle « advanced microsmometer model 3MO plus », laboratoire Advanced Instrument.

4) Mesure du pH

Le pH est mesuré à l'aide d'un pHmètre « seven multi » (Mettler Toledo), et d'une microélectrode inlab Micro pRo ref 51343162 (Mettler toledo).

5) Analyse chromatographique

La vancomycine est dosée sur une chaîne pour chromatographie en phase liquide Jasco® composée d'une pompe "PU 980 intelligent HPLC pump", d'un passeur « AS 950 intelligent sampler » et d'un détecteur UV visible « UV-VISIBLE DETECTOR 975 ». La colonne choisie (Lichrospher 100 RP 18,5 µm CC 125*4.6 mm commercialisée par Macherey –Nagel) est maintenue à température dans un four « croco-cil cluzo® » du laboratoire Onjo Labo.

6) Enceinte climatique

Après décongélation, certains lots de solutions intravitréennes sont maintenus dans une enceinte climatique Binder KBF-ICH 240L à 25°C ± 0.3 °C et 60 ± 1 % d'humidité résiduelle

II. METHODOLOGIE DE L'ETUDE

La méthodologie de notre étude s'inspire de plusieurs référentiels. Ainsi nous avons pris en compte les recommandations de l'ICH (International Conference of Harmonisation (58) (60), ainsi que celles de la Pharmacopée Européenne et de Trissel, afin de déterminer les conditions et les durées de conservation des nos préparations.

A.PREPARATION DES COLLYRES ET DES SOLUTIONS INTRAVITREENNES

L'ICH recommande d'utiliser au moins trois lots de préparations pharmaceutiques pour réaliser les études de stabilité. Ainsi nous avons réalisé trois lots par condition de conservation testée. Les lots préparés doivent être réalisés dans les même conditions que les lots de fabrication future : même quantité d'unités produites, même formulation, mêmes articles de conditionnement, même procédé de fabrication (59).

Les collyres renforcés et les solutions intravitréennes sont préparés par filtration stérilisante sous une hotte à flux laminaire horizontale (Classe A) dans une zone non classée, mais contrôlée et à accès restreint dans la PUI. La qualité de nos équipements est donc inférieure à celle exigée par les BPPH.

Des flacons de Vancomycine Sandoz® 250 mg poudre injectable sont reconstitués avec 10 mL de chlorure de sodium 0.9% injectable Aguettant. La solution reconstituée à 25 mg/mL est transférée aseptiquement dans une poche de nutrition parentérale vide et stérile en Ethyl Vinyl Acétate (EVA), afin d'obtenir un lot homogène. Une dilution supplémentaire par du chlorure de sodium 0.9% est réalisé dans le cas des intravitréennes afin d'obtenir une solution à 10 mg/mL.

La solution à 10 mg/mL ou 25 mg/mL est ensuite répartie par filtration stérilisante sur un filtre Millipore® 0.22 µm dans des flacons en verre 8 mL ambré de type 1. Chaque flacon contient 5 mL de solution. Les flacons sont fermés à l'aide de bouchons en chlorobutyl puis sertis avec des capsules en aluminium.

B.CONDITIONS DE CONSERVATION TESTEES

1) Conditions de conservation des intravitréennes à 10 mg/mL

Trois séries de 3 lots de trente flacons sont réalisées et congelées à -20°C. Les conditions de décongélation des 3 séries sont différentes.

Les flacons de la Série 1 (lot 1, lot 2 et lot 3) sont décongelés dans un bain d'eau chaude (42 à 45°C), puis conservés pendant 8 jours à 25°C et 60 % d'humidité dans une enceinte tempérée.

Les flacons de la Série 2 (lot 4, lot 5 et lot 6) sont décongelés à 25°C et 60 % d'humidité dans une enceinte tempérée, puis conservés pendant 8 jours dans ces mêmes conditions.

Les flacons de la Série 3 (lot 7, lot 8 et lot 9) sont décongelés à 4°C, puis conservés pendant 8 jours dans ces mêmes conditions.

2) Conditions de conservation des collyres à 25 mg/mL

Trois lots de collyres à 25 mg/mL sont réalisés et congelés à -20°C. Les collyres sont décongelés à 4°C, et sont conservés 15 jours à cette température.

C.PRELEVEMENTS DES ECHANTILLONS

Des flacons sont prélevés à T0 (immédiatement avant congélation), puis après 7, 14, 28, 63 et 91 jours de congélation.

A chaque temps de prélèvement quatre flacons sont prélevés : un pour les analyses physicochimiques et trois pour le contrôle de stérilité.

D. ANALYSE DES ECHANTILLONS

L'ICH recommande d'étudier d'une part les paramètres susceptibles d'être modifiés au cours du temps et d'autre part les paramètres garantissant la qualité, la sécurité et l'efficacité du produit pharmaceutique (59).

Nous avons pris en compte ces considérations et celles de la Pharmacopée Européenne (14) pour décider de baser la durée de péremption des collyres et des intravitréennes sur des analyses physiques (limpidité, pH, osmolalité), chimiques (dosage du principe actif et recherche de produits de dégradation par chromatographie en phase liquide) et microbiologiques (contrôle de stérilité).

1) Contrôle visuel des solutions

Les solutions de vancomycine font l'objet d'un contrôle visuel versus une solution de référence à la même concentration préparée extemporanément. Une coloration, un précipité et la présence de particules en suspension sont recherchés par examen sur fond noir et fond blanc et sous lumière polarisée.

La solution est stable si aucun trouble, ni précipité ni particule n'est détecté.

2) Recherche des particules non visibles

Selon la Pharmacopée Européenne (Monographie 2.9.19), les solutions intravitréennes doivent satisfaire l'essai de contamination particulaire par les particules non visibles (14). Un comptage particulaire a donc été réalisé.

Les solutions intravitréennes que nous préparons sont conditionnées en volume inférieur à 100 mL. Elles doivent donc contenir moins de 6000 particules supérieures ou égales à 10 µm et moins de 600 particules supérieures ou égales à 25 µm par récipient.

3) Mesure du pH

Le pH des solutions de vancomycine est mesuré directement dans le flacon de collyre destiné à l'analyse chimique, à l'aide du pH-mètre et de la microélectrode.

La solution est stable si le pH reste dans les limites de 90,0 - 110,0% de la valeur initiale (prise en compte d'un intervalle de confiance de 95% autour de la ligne d'évolution du pH)

4) Mesure de l'osmolalité

L'osmolalité est mesurée avec le biocryometer. La solution est stable si le pH de la solution reste dans les limites de 90,0-110,0% de la valeur initiale (prise en compte d'un intervalle de confiance de 95% autour de la ligne d'évolution de l'osmolalité).

5) Analyse chromatographique

Nous avons utilisé la technique de chromatographie phase liquide dite « de partage à polarité inversée ». En chromatographie de partage, la séparation des composés dépend des différences de solubilité des solutés dans la phase mobile ainsi que des interactions des solutés avec les groupements organiques greffés sur la phase stationnaire.

Dans ce cas de « phase inverse » la colonne est apolaire et la phase mobile polaire. Les composants polaires ont une plus grande affinité pour la phase mobile et sont donc élués rapidement. Inversement les solutés peu polaires ont une plus grande affinité pour la phase stationnaire et sont élués lentement (61).

Notre méthode de dosage de la vancomycine par chromatographie de partage en phase inverse a nécessité une mise au point afin de garantir la sensibilité et la spécificité de la mesure.

Les chromatogrammes ne doivent pas mettre en évidence l'apparition de produits de dégradation conformément aux recommandations de l'ICH.

La concentration en principe actif est considérée stable si elle reste dans les limites de 90,0% - 110,0% de la valeur initiale (prise en compte d'un intervalle de confiance de 95% autour de la ligne de dégradation du médicament par rapport aux limites du produit).

Notre manière d'évaluer les résultats diffère des recommandations de l'ICH qui considère qu'« un élément de modification significatif est un dosage qui diffère de plus de 5% de la valeur initiale, ou l'apparition de produits de dégradation dépassant les critères d'acceptabilité ou une modification physique majeure du composé ». L'ICH ne prend donc pas en compte l'intervalle de confiance autour de la valeur moyenne (58).

Statistiquement, nous estimons néanmoins que la prise en compte de l'intervalle de confiance autour de la moyenne est importante, car elle témoigne de la variabilité des dosages. L'appréciation de cette variabilité étant un critère d'évaluation plus large que la seule évaluation de la valeur moyenne nous avons choisis comme valeur limites de stabilité 90% et 110% de la valeur initiale à TO, ce qui est conforme aux recommandations de Trissel.

a) Mise au point Chromatographique

(1) Choix de la colonne

Nous utilisons une colonne C18 Lichrospher® 100 RP 18,5 µm CC 125*4.6mm (Macherey –Nagel). Ce type de colonne apolaire constitué de silice greffée de chaînes carbonées sert à l'analyse d'un grand nombre de molécules médicamenteuses.

(2) Choix de la température de la colonne

La colonne est chauffée à 30°C dans un four afin de stabiliser le temps de rétention de la vancomycine.

(3) Choix de la longueur d'onde

La longueur d'onde est choisie après réalisation du spectre UV de la vancomycine à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible, afin de se placer à une longueur d'onde optimale d'absorption.

(4) Choix de la phase mobile

Nous avons utilisé une phase mobile isocratique composée d'un mélange de solvant apolaire et de tampon polaire dont les proportions sont adaptées pour obtenir d'une part, une rétention suffisante du principe actif sur la colonne et le séparer du front de solvant et de ses produits de dégradation et d'autre part un temps d'analyse suffisamment court pour permettre les dosages successifs aux différents temps de prélèvements.

L'utilisation du méthanol et l'acétonitrile étant rapportée par la bibliographie (43) (46), ces deux solvants apolaires ont donc été testés. Ils ont été mélangés dans des proportions variables à un tampon phosphate KH_2PO_4 . L'influence du pH a été évaluée.

(5) Choix du volume d'injection

Différents volumes d'injection sont testés afin d'obtenir un signal net, sans saturation du détecteur UV.

b) Validation chromatographique

La méthode est validée selon les recommandations de l'ICH (International Conférence on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. L'ICH permet entre autre d'harmoniser les techniques de mise au point de méthodes analytiques (58).

(1) Spécificité

La spécificité est déterminée par le temps de rétention du pic de vancomycine obtenu à l'aide d'une solution étalon.

Comme nous réalisons une étude de stabilité, nous devons vérifier que les produits de dégradation sont séparés de la molécule à analyser (« Stability-indicating method »). Ainsi nous avons procédé à une dégradation intentionnelle de la molécule selon les recommandations de Trissel (62).

La dégradation volontaire de la vancomycine a pour but de faire apparaître des produits de dégradation et d'identifier leurs temps de rétention (Tr) afin de démontrer que le signal des produits de dégradation n'interfère pas avec celui du produit initial. L'objectif n'est pas de quantifier les produits de dégradation mais de les visualiser, afin de pouvoir affirmer qu'une diminution de la concentration en vancomycine correspond à une dégradation du produit.

Nous avons dégradé la vancomycine selon quatre méthodes puis analysé les échantillons selon la méthode chromatographique mise au point :

- Dégradation par les rayonnements UV: le flacon de solution reconstituée à 25 mg/mL est disposé en dessous d'une lampe UV-visible Desaga® à l'abri de la lumière pendant 24 heures à 4 jours.
- Dégradation chimique en milieu basique par adjonction de soude IM.
- Dégradation chimique en milieu acide par adjonction d'acide chlorhydrique IM.
- Dégradation par la chaleur. La solution de vancomycine à 25 mg/ml est chauffée à 80°C dans un tube à hémolyse pendant 4 h à l'aide d'un évaporateur à sec Techne Dri-Block®

(2) Linéarité

La linéarité est recherchée sur la gamme moyenne d'étalonnage (n=9). Elle est évaluée par la détermination du coefficient de corrélation (r) qui doit être le plus proche possible de 1.

(3) Précision

La précision (répétabilité et reproductibilité) est évaluée par le dosage de trois points de contrôle, dont la valeur est différente des points de gamme.

La répétabilité de la méthode est calculée en analysant six fois dans une même journée les trois points de contrôle (n=18). Les concentrations moyennes, les écarts-type et les coefficients de variation (CV) sont calculés. Le coefficient de variation ne doit pas être supérieur à 5%.

La reproductibilité de la méthode est calculée en dosant 6 fois chaque point de contrôle, trois jours différents (n=18). Les concentrations moyennes, les écarts-type et les coefficients de variation (CV) sont calculés. Le coefficient de variation ne doit pas être supérieur à 5%.

(4) Exactitude

L'exactitude mesure l'écart entre la valeur théorique et la valeur mesurée pour chaque concentration de contrôle. Le biais accepté est de 5% autour de la concentration théorique.

(5) Limite de quantification

Il n'est pas nécessaire de déterminer la limite de quantification car les concentrations analysées dans cette étude sont très élevées et nécessitent même une dilution.

c) Choix de la gamme d'étalonnage

Nous avons choisi de réaliser un étalonnage externe, car nous travaillons sur des solutions pures de vancomycine, de concentration connue et non issues de milieux biologiques.

L'ICH recommande d'utiliser au moins cinq points de gamme étalon pour valider une méthode de dosage. Ces points de gamme sont choisis de façon à ce que :

- la concentration de la solution à doser après dilution se situe au milieu des concentrations des points de la gamme.
- La concentration à doser soit encadrée à plus ou moins 40%.
- La concentration la plus élevée de la gamme corresponde à une absorbance lisible par le spectrophotomètre UV visible, sans phénomène de saturation au niveau du détecteur.

d) Quantification des échantillons

Les échantillons sont quantifiés après dilution, de sorte que la concentration de la solution à doser après dilution se situe environ au milieu de la gamme d'étalonnage.

6) Contrôle de stérilité

Les collyres et les solutions intravitréennes doivent être stériles.

Le test de stérilité utilisé est l'un des test recommandé par la Pharmacopée Européenne : le test de filtration sur membrane. Cet essai de stérilité est décrit à la monographie 2.6.1, (14).

Le contrôle de stérilité est réalisé sous une hotte à flux laminaire horizontal à l'aide d'un kit de filtration Nalgène®. La solution de vancomycine est déposée sur une membrane filtrante en nitrate de cellulose 0.45 µm et filtrée sous vide. Le diamètre des pores de cette membrane permet de retenir d'éventuels microorganismes tout en laissant passer les antibiotiques. La membrane est ensuite rincée avec de l'eau stérile (Versylene® Fresenius) pour éliminer les résidus d'antibiotique qui risqueraient d'inhiber la croissance des germes ayant contaminé le collyre lors de sa fabrication. Elle est ensuite mise en culture sur une gélose R2A (référence 43551 Biomérieux)

La gélose R2A est incubée dans une étuve à température ambiante et à l'abri de la lumière. La croissance bactérienne est recherchée huit jours après, à la loupe binoculaire Olympus SZ61®.

Le résultat est rendu négatif (absence de colonie) ou positif (une unité formant colonie ou plus).

7) Synthèse des contrôles réalisés

a) Contrôles des solutions intravitréennes

A chaque temps de prélèvement, les contrôles résumés dans le tableau 4 sont réalisés sur les solutions intravitréennes.

	T=0H	T=2H	T= 6H	T= 24H	T= 48H	T= 8 jours
Dosage	X	X	X	X	X	X
pH	X	X	X	X	X	X
Osmolalité	X	X	X	X	X	X
Stérilité	X			X		X
Mirage						X

Tableau 4 : Synthèse des contrôles réalisés sur les solutions intravitréennes

b) Contrôles des Collyres

A chaque temps de prélèvement, les contrôles résumés dans le tableau 5 sont réalisés sur les collyres.

	T=0H	T= 24H	T= 48H	T= 8 jours	T = 15 jours
Dosage	X	X	X	X	X
pH	X	X	X	X	X
Osmolalité	X	X	X	X	X
Stérilité	X			X	X
Mirage					X

Tableau 5 : Synthèse des contrôles réalisés sur les collyres

III. RESULTATS ET DISCUSSION

A. MISE AU POINT DE LA METHODE CHROMATOGRAPHIQUE

1) Optimisation des paramètres chromatographiques

a) Choix de la longueur d'onde

Le spectre UV de la vancomycine montre une absorption importante à 220 nm (Figure 9). Cette longueur d'onde est peu spécifique, mais nous n'avons pas à prendre en compte d'éventuels problèmes d'interférence. En effet, nous analysons des solutions de vancomycine pure dans son solvant. La longueur d'onde à 220 nm est donc retenue pour les analyses.

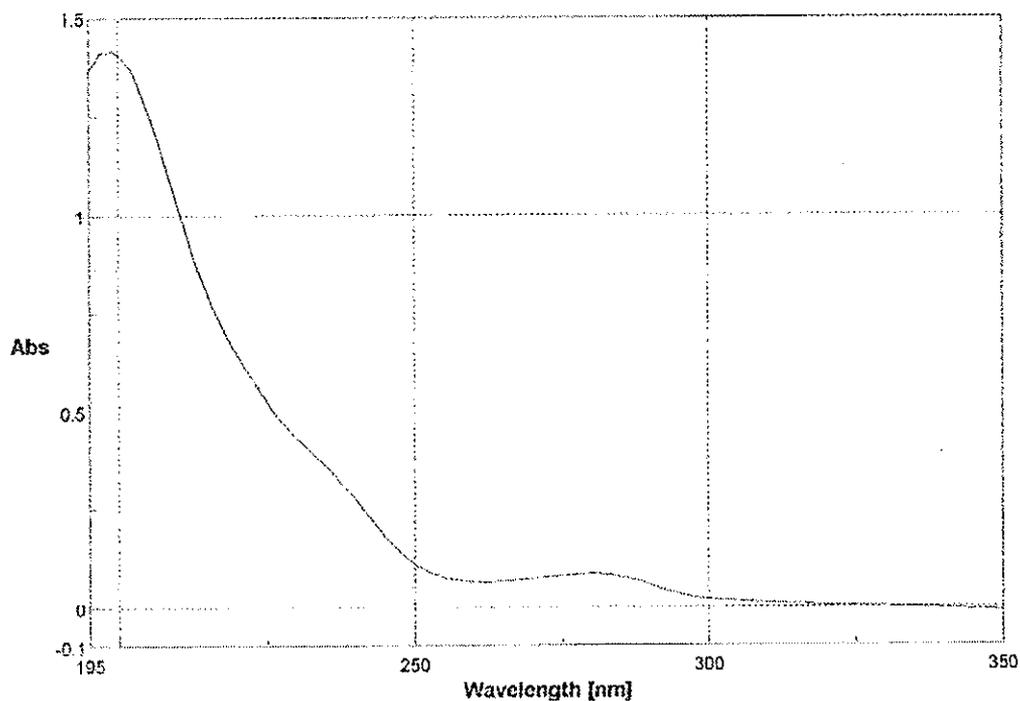


Figure 9 : Spectre d'absorption UV Visible d'une solution de vancomycine à 12.5 µg/mL

b) Choix de la Phase Mobile

- Influence du pH de la phase mobile

L'influence décisive du pH de la phase mobile sur la symétrie des pics chromatographiques s'impose rapidement. En effet, à pH « natif », soit environ 5.2 pour les mélanges Méthanol-Tampon et « 4.6 » pour les mélanges Acétonitrile-Tampon, le signal est traînant (Figure 10).

Comme certains auteurs nous acidifions donc notre phase mobile (18) (43). Nous retenons l'ajustement à pH = 3.5, car il s'agit de la valeur minimale recommandée par le laboratoire Macherey –Nagel afin de garantir la longévité de la phase stationnaire. A ce pH, le pic de vancomycine est symétrique (Figure 10).

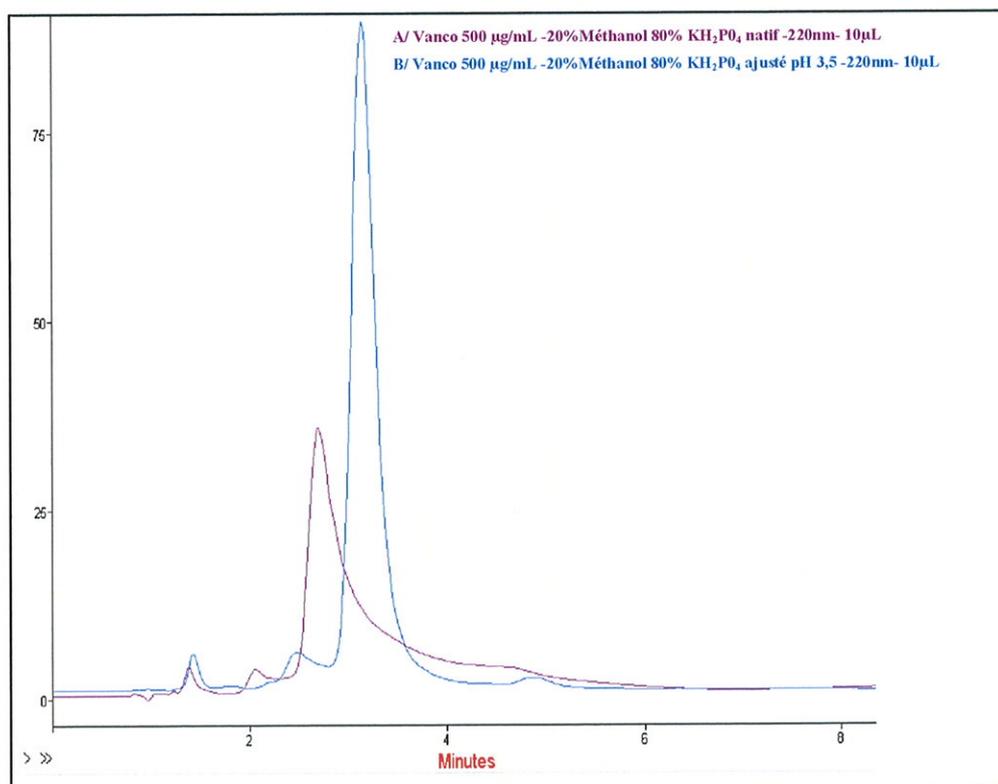


Figure 10 : Influence du pH de la phase mobile sur la symétrie du pic

- Séparation du pic de vancomycine.

Le pic de vancomycine est légèrement mieux séparé des impuretés lorsque la phase mobile comporte de l'acétonitrile. De plus, à concentration identique, le signal est légèrement plus marqué avec l'acétonitrile (Figure 11). Pour ces raisons, comme d'autres auteurs, nous retenons l'acétonitrile comme solvant apolaire, bien que le méthanol semble également utilisable.

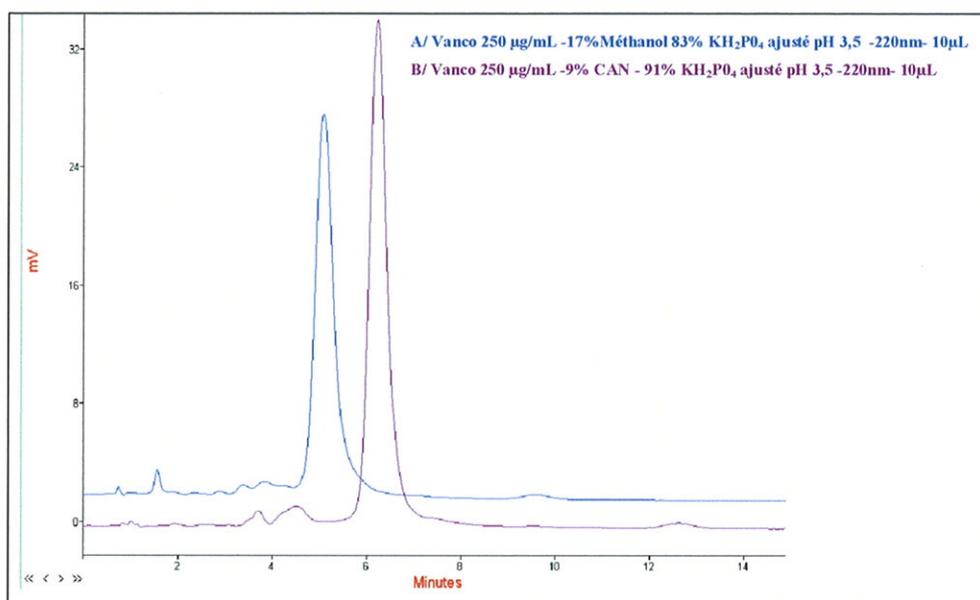


Figure 11 : Influence de la nature du solvant apolaire sur le pic chromatographique

- Influence de la composition de la phase mobile sur le temps de rétention.

Plus la proportion de solvant apolaire est importante, plus le temps de rétention de la vancomycine est court.

L'influence de la proportion de méthanol sur les temps de rétention de la vancomycine est référencée en Annexe 1.

L'influence de la proportion d'acétonitrile sur le temps de rétention de la vancomycine est résumée en Annexe 2.

- Phase mobile retenue

La phase mobile retenue est un mélange d'acétonitrile et de tampon phosphate H_2KPO_4 0.1M (8-92%, V/V) ajustée à pH =3.5 par ajout d'HCL 1N. Elle est dégazée aux ultrasons pendant 10 min (Annexe 3).

Cette phase mobile permet de séparer la vancomycine des produits de dégradation obtenus par dégradation forcée tout en permettant d'avoir un temps d'analyse (15 min) compatible avec la fréquence des prélèvements.

c) Choix du volume injecté

Le volume injecté est de 10 μ L, ce qui permet d'obtenir un pic symétrique sans saturation du détecteur.

d) Choix de la température

La colonne est chauffée dans un four à 30°C afin de stabiliser le temps de rétention de la vancomycine.

e) Choix du solvant de dilution des solutions de vancomycine.

Lorsque l'échantillon de vancomycine est dilué dans de l'eau PPI acidifiée plutôt que dans de l'eau PPI non modifiée, le signal augmente puis sature lorsque le pH du milieu est inférieur ou égal à pH 3, (Figure 12). Ainsi le signal est le même à pH 0.3, à pH 2 et pH 3 (Figure 13).

A/ Vanco 125 µg/mL dans eau non modifiée - 8%ACN 92% KH₂P0₄ pH 3,5 -220nm- 10µL
 B/ Vanco 125 µg/mL dans eau pH3 - 8%ACN 92% KH₂P0₄ pH 3,5 -220nm- 10µL

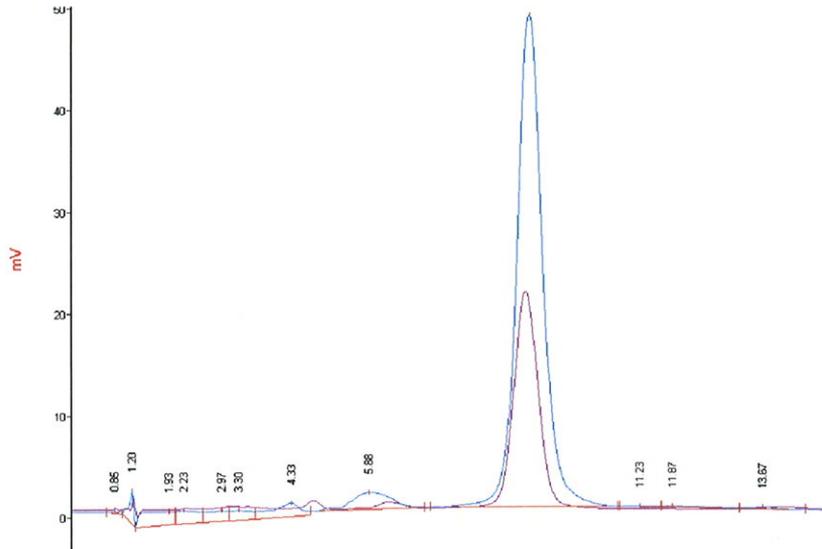


Figure 12 : Influence du pH du solvant de dilution des échantillons sur le signal

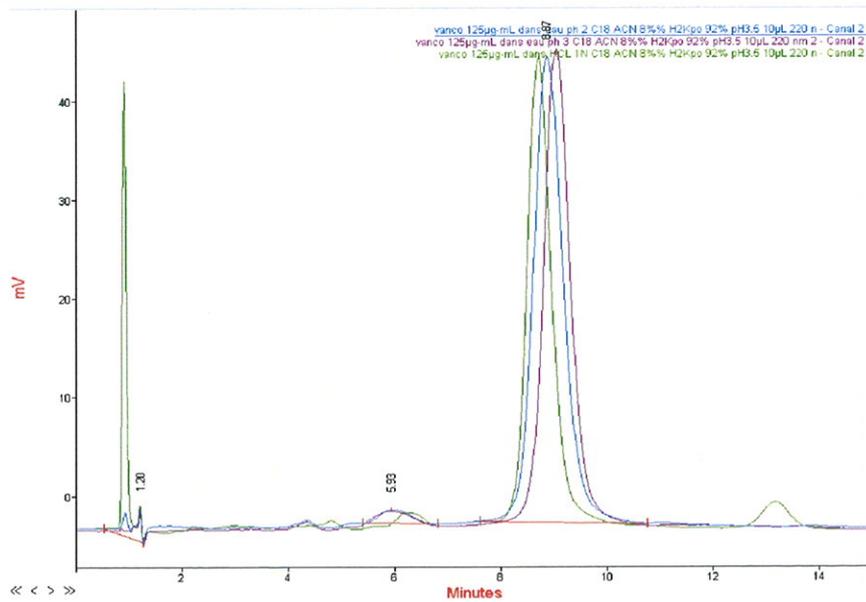


Figure 13 : Saturation du signal lors de la dilution de la vancomycine dans des solvants de pH inférieurs ou égal à 3

Notre première hypothèse est qu'un produit de dégradation ayant le même temps de rétention que la vancomycine se forme en milieu acide.

Un essai de séparation des deux composés est réalisé avec une phase mobile plus polaire (96 % tampon H_2KPO_4 et 4 % d'acétonitrile ajusté à pH 3.5).

Dans ces conditions, le temps de rétention de la vancomycine diluée dans l'eau est de 90 min. Celui de la vancomycine diluée dans HCL 1N est également de 90 min (Figure 14).

En superposant les 2 chromatogrammes, il apparaît que le pic correspondant à la vancomycine diluée à 250 $\mu g/mL$ dans HCL 1N est toujours plus important que celui dilué à la même concentration dans de l'eau.

Nous en déduisons que l'augmentation du signal est liée à une meilleure solubilisation de la vancomycine en milieu acide et non à la détection d'un produit de dégradation.

Les solutions ophtalmiques de vancomycine seront donc diluées dans de l'eau à pH 3 avant d'être analysées par CPL.

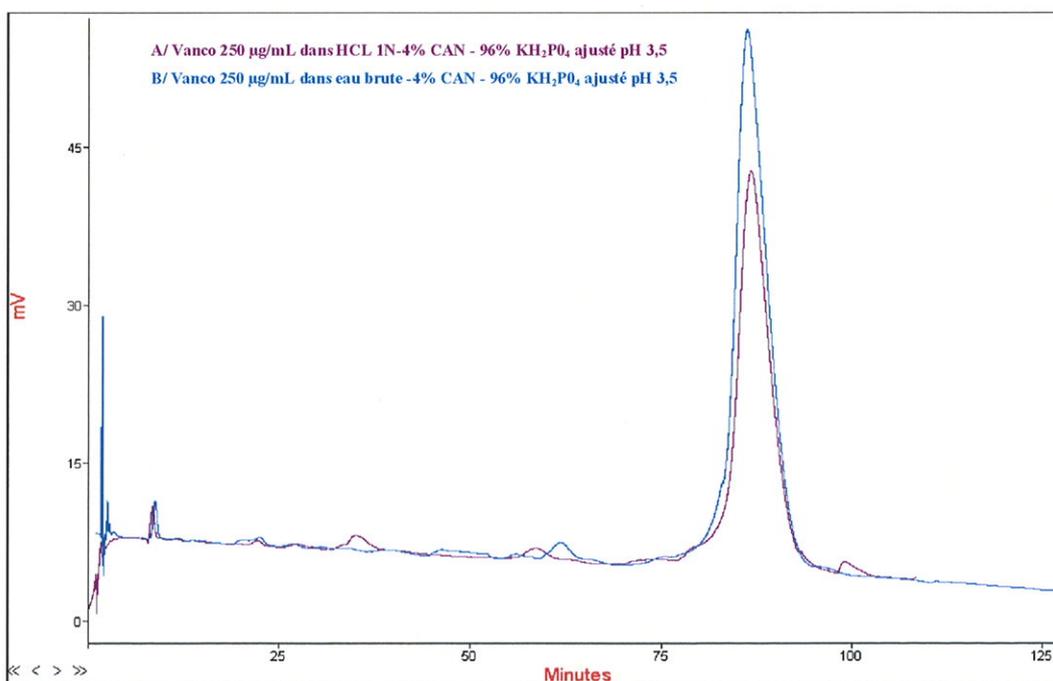


Figure 14 : Vancomycine diluée dans l'eau ou HCL 1N, éluée par une phase mobile polaire

f) Bilan des conditions retenues

Les conditions retenues sont résumées dans le tableau 6.

Phase mobile	8% acétonitrile + 92% tampon H ₂ KPO ₄ 0.1M (V/V) ajusté à pH =3.5 avec HCL 1N
Débit de la phase mobile	1.5 mL/min
Température colonne	30°C
Volume injecté	10 µL
Solvant de dilution des échantillons	Eau pH 3

Tableau 6 : Synthèse des paramètres chromatographiques retenus

Dans ces conditions, le temps de rétention de la vancomycine est d'environ 8.6 min (Figure 15).

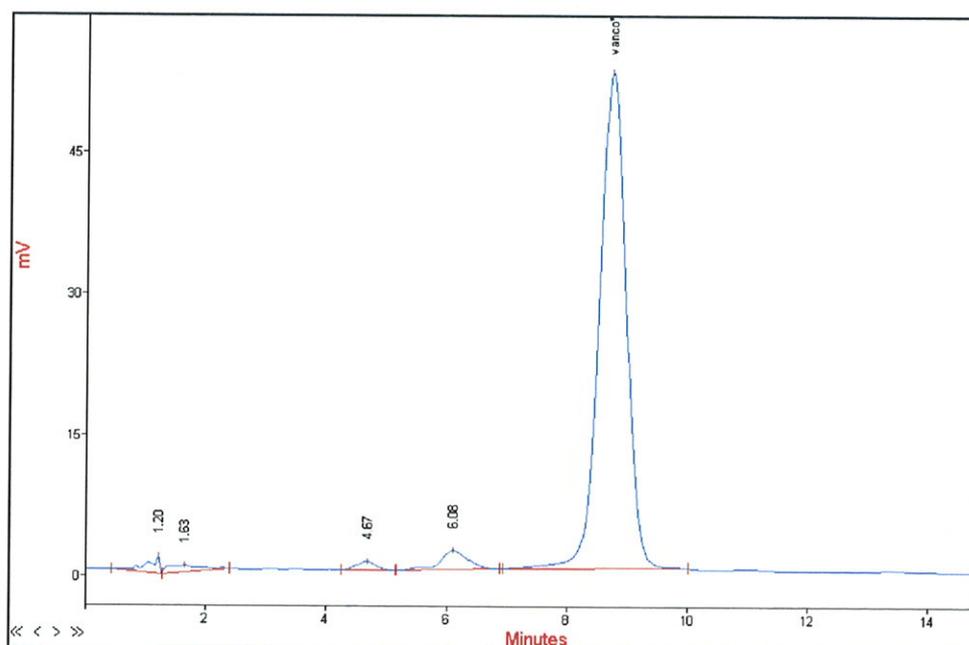


Figure 15 : Chromatogramme d'une solution de vancomycine à 125 µg/mL

2) Validation de la méthode d'analyse

a) Spécificité

Les essais de dégradation réalisés mettent en évidence l'apparition de produits qui sont nettement séparés du pic de vancomycine.

En milieu acide, l'aspect visuel de la solution de vancomycine n'est pas modifié après 24 heures. Des produits de dégradation apparaissent vers 2.5 min, 3.5 min, 4.5 min et 11 min. Le pic de la vancomycine disparaît complètement après 24h de contact avec HCL 1N. (Figure16-A)

En milieu basique, l'aspect de la solution de vancomycine n'est pas modifié après 24 heures. Des produits de dégradation apparaissent vers 2.5 min, 3.5 min, et 14 min et une diminution du pic de la vancomycine est également observée dès une heure de contact avec NaOH 1N. (Figure16-B)

Après chauffage à 80°C pendant 4 heures, l'aspect visuel de la solution de vancomycine n'est pas modifié. Cependant des produits de dégradation apparaissent vers 3.5min, 4.5 min, et 12 min et une diminution du pic de la vancomycine est également observée. (Figure16-C)

Après exposition aux UV à 254 nm et 366 nm l'aspect visuel de la solution de vancomycine n'est pas modifié après 24 heures. Une faible quantité de produit de dégradation apparaît vers 4.5 min. Le pic de vancomycine ne décroît pas.

En prolongeant cette exposition pendant 4 jours, la solution de vancomycine prend une couleur jaunâtre. La dégradation de la vancomycine est minime, avec apparition d'une faible quantité de produits de dégradation vers 4.5 min, et 12 min (Figure16-D).

Lors de l'étude de stabilité d'un collyre à la vancomycine à 50 mg/ml dans du G5% (18), les auteurs identifient trois composés de dégradation liés à la température, le CDIM (Tr= 6 min) le CDIm (Tr=12,8min) et une forme succimide (Tr=7min) distincts du pic de vancomycine (Tr=11.2 min). La polarité de leur système d'analyse chromatographique étant proche de la nôtre nous pouvons supposer que sur le chromatogramme obtenu après dégradation par la chaleur, le composé à 12 min est le CDIm, celui à 4.5 min est le succimide et celui à 3.5 min est le CDIM.

Les produits que nous observons à 2.5 et 14 min ne sont pas évoqués par la littérature.

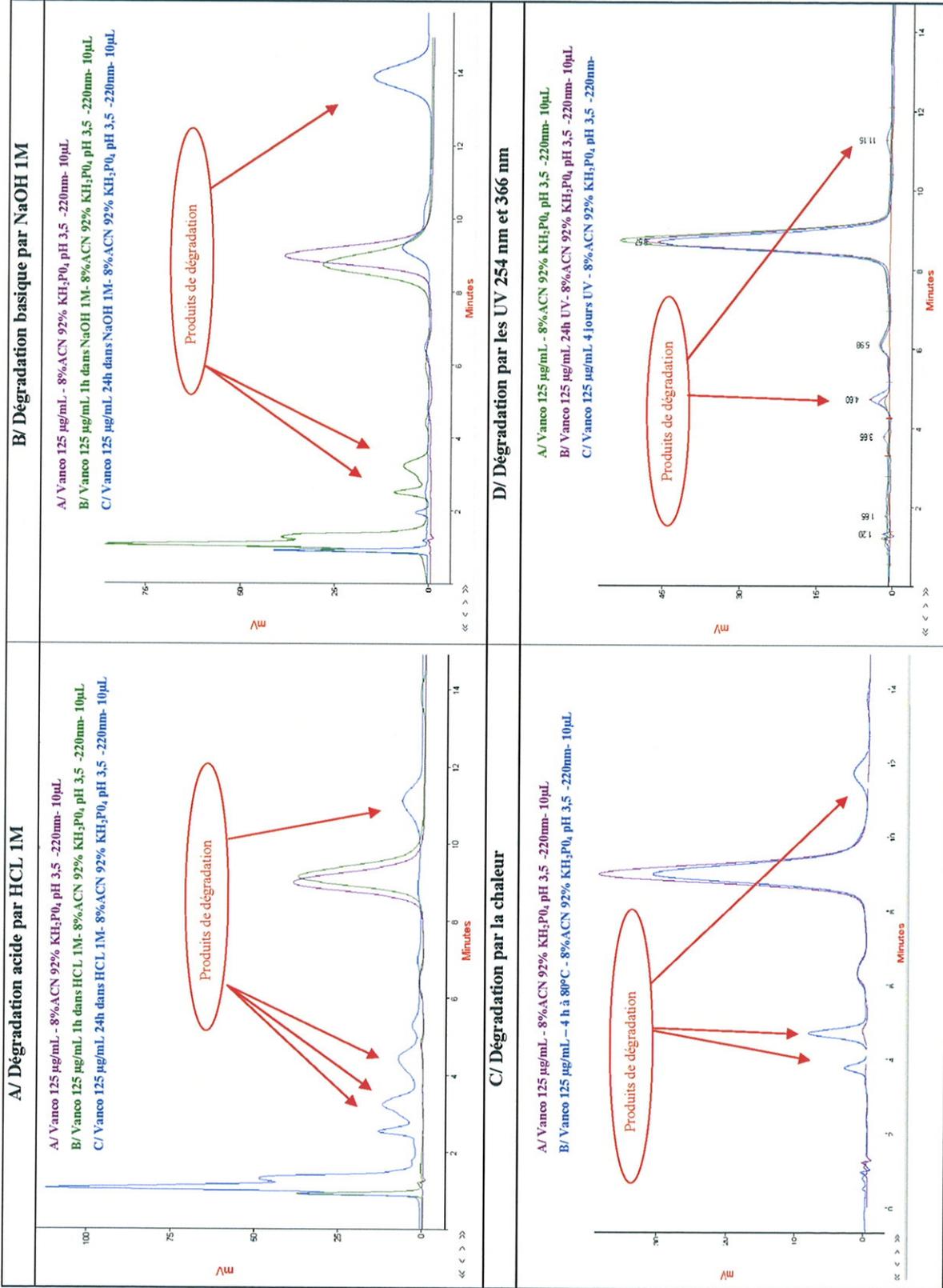


Figure 16 (A-B-C-D) : Essais de dégradation de la vancomycine

b) Choix des points de gamme et de contrôle

Les points de gamme choisis sont les suivants : 75 µg/mL, 100 µg/mL, 125 µg/mL, 150 µg/mL et 175 µg/mL.

Les valeurs des points de contrôle (87.5 µg/mL, 112.5 µg/mL et 162.5 µg/mL) sont sélectionnées afin d'encadrer au mieux le centre de la gamme (125 µg/mL).

Les dilutions nécessaires pour obtenir les points de gamme et de contrôle sont mentionnées le Tableau 7.

Concentration du point de Gamme (µg/mL)	75		100		125	150		175
Concentration du point Contrôle (µg/mL)		87,5		112,5			162,5	
Volume de vancomycine à 25 mg/mL à prélever (µL)	30	35	40	45	50	60	65	70
Eau pH 3	QSP 10 mL							

Tableau 7 : Modalités de dilution pour obtenir les points de gamme et de contrôle

c) Linéarité

La relation entre la concentration en vancomycine et la surface des pics chromatographiques est linéaire pour des concentrations en principe actif de 75 à 175 µg/mL.

L'équation de la droite de régression moyenne est $y=12.823X-39.61$, et son coefficient de corrélation ($r=0,9999$) est proche de 1. Le coefficient de détermination r^2 est égal à 0.9998.

Le schéma illustrant la linéarité de la méthode est placé en annexe 4.

d) Précision et exactitude

Le Tableau 8 met en évidence que la méthode de dosage de la vancomycine est exacte et précise (répétable et reproductible).

En effet d'une part, l'écart entre la valeur théorique et la valeur mesurée pour chaque concentration contrôle de la gamme est inférieur à 5% la méthode est donc exacte.

D'autre part, les coefficients de variation des dosages des points de contrôle servant à établir la répétabilité sont inférieurs à 5% donc la méthode est répétable. Les coefficients de variation des dosages des points de contrôle sur trois jours sont inférieurs à 5% donc la méthode est reproductible.

La méthode étant répétable et reproductible, elle est donc précise.

[c] théorique (mg/l)	Reproductibilité			Exactitude (%)		Répétabilité	
	[c] moyenne (mg/l)	écart-type	CV (%)	exactitude (%)	écart-type	CV (%)	écart-type
87.5	86.59	1.98	2.29	2.04	1.38	2.20	0.89
112.5	111.37	2.60	2.34	1.86	1.65	1.74	0.70
162.5	164.98	5.21	3.16	2.58	2.39	2.95	1.30

Tableau 8 : Précision et exactitude de la méthode chromatographique

Le détail des résultats de dosage des points de contrôle est référencé en annexe 5.

Notre méthode est donc spécifique, linéaire, précise et exacte, ce qui la rend apte à être utilisée pour évaluer la stabilité d'un médicament (« stability indicating method »).

B. RESULTATS DE L'ETUDE DE STABILITE

1) Solutions intravitréennes

a) Contrôle visuel des solutions

Immédiatement après décongélation à l'eau chaude, un dépôt est observé au fond des flacons (Figure 17). Ce dépôt se dissout intégralement après agitation du flacon, la solution redevenant limpide. Ce phénomène ne se produit pas après décongélation à température ambiante ou au réfrigérateur.



Figure 17 : Solution intravitréenne après décongélation à l'eau chaude

Après décongélation et conservation 8 jours à 25°C ou à 4°C, il n'est observé ni trouble, ni changement de couleur des solutions intravitréennes.

b) Comptage particulaire des solutions intravitréennes

Le nombre de particules dans les solutions intravitréennes après congélation à -20°C et décongélation par l'eau chaude (conditions les plus défavorables) est conforme aux recommandations de la Pharmacopée Européenne (Tableau 9).

	T0	Après congélation à -20°C
Nombre de particules supérieures ou égales à 10 µm par récipient. (n=3) (Norme pharmacopée < 6000)	230	120
Nombre de particules supérieures ou égales à 25 µm par récipient. (n=3) (Norme pharmacopée < 600)	4	3
Conforme Pharmacopée Européenne	OUI	OUI

Tableau 9 : Résultats du comptage particulaire dans les solutions intravitréennes de vancomycine

c) Evolution du pH

A T0, le pH des solutions intravitréennes est compris entre 3.71 et 3.8 (Tableau 10).

Le pH a tendance à augmenter légèrement (de 0.1 à 0.2 unités pH), après 8 jours de conservation à 25°C (Annexe 6A et 7A). L'augmentation est moindre (0.04 unités pH en moyenne) lorsque les solutions intravitréennes sont conservées 8 jours au réfrigérateur (Annexe 8A).

Quel que soit le mode de décongélation (eau chaude, 25°C ou au réfrigérateur à 4°C) et le mode de conservation (à 25°C ou au réfrigérateur à 4°C), le pH des solutions intravitréennes ne varie pas de plus de 10% par rapport à la valeur initiale à T0 avant congélation en prenant en compte un intervalle de confiance à 95% autour de la moyenne. (Annexes 6A, 7A et 8A). L'écart à la valeur initiale à T0 est au maximum égal à 104.92% + 4.92%.

Le pH des solutions intravitréennes est donc stable après 3 mois de congélation à -20°C puis 8 jours de conservation à 4°C ou 25°C.

		SERIE 1 Décongélation dans l'eau chaude (42-45°C) Conservation 8 jours à 25°C			SERIE 2 Décongélation à 25°C Conservation 8 jours à 25°C			SERIE 3 Décongélation à 4°C Conservation 8 jours à 4°C		
Temps		pH moyen ± Ecart-type	CV (%)	% du pH initial à T0	pH moyen ± Ecart-type	CV (%)	% du pH initial à T0	pH moyen ± Ecart-type	CV (%)	% du pH initial à T0
JO (Avant congélation)	TO	3.81 ± 0.03	0.66	100.00	3.8 ± 0.01	0.12	100.00	3.71 ± 0.04	1.02	100.00
	2 h	3.81 ± 0.03	0.76	100.09	3.8 ± 0.03	0.27	100.09	3.72 ± 0.03	0.71	100.18
	6 h	3.82 ± 0.03	0.66	100.27	3.87 ± 0.09	0.93	102.02	3.73 ± 0.04	1.08	100.54
	24 h	3.82 ± 0.04	0.94	100.35	3.93 ± 0.11	1.08	103.60	3.78 ± 0.08	2.12	101.79
	48 h	3.85 ± 0.07	1.84	101.14	3.95 ± 0.06	0.55	104.30	3.75 ± 0.05	1.32	100.90
	8 j	3.93 ± 0.10	2.51	103.24	3.98 ± 0.05	1.24	104.74	3.74 ± 0.09	2.45	100.71
Décongélation à J7	0 h	3.80 ± 0.03	0.70	99.83	3.73 ± 0.08	0.82	98.24	3.72 ± 0.16	4.31	100.25
	2 h	3.83 ± 0.03	0.69	100.70	3.73 ± 0.08	0.81	98.24	3.72 ± 0.16	4.31	100.25
	6 h	3.84 ± 0.05	1.17	100.88	3.76 ± 0.05	0.51	98.94	3.75 ± 0.08	2.00	100.89
	24 h	3.85 ± 0.05	1.17	101.05	3.73 ± 0.1	0.97	98.33	3.78 ± 0.15	4.01	101.87
	48 h	3.87 ± 0.02	0.40	101.57	3.76 ± 0.11	1.15	98.94	3.82 ± 0.02	0.55	102.79
	8 j	3.95 ± 0.11	2.68	103.77	3.91 ± 0.06	0.56	102.98	3.76 ± 0.08	2.14	101.19
Décongélation à J14	0 h	3.76 ± 0.10	2.58	98.88	3.68 ± 0.08	0.75	96.92	3.75 ± 0.07	1.77	101.10
	2 h	3.76 ± 0.10	2.58	98.88	3.78 ± 0.13	1.28	99.65	3.75 ± 0.07	1.77	101.10
	6 h	3.74 ± 0.07	1.87	98.26	3.77 ± 0.13	1.28	99.21	3.74 ± 0.09	2.49	100.65
	24 h	3.81 ± 0.14	3.70	100.20	3.81 ± 0.14	1.37	100.44	3.73 ± 0.08	2.19	100.47
	48 h	3.80 ± 0.11	2.76	99.93	3.84 ± 0.1	0.95	101.05	3.73 ± 0.13	3.40	100.57
	8 j	3.80 ± 0.02	0.46	99.83	3.88 ± 0.14	1.47	102.19	3.73 ± 0.16	4.36	100.57
Décongélation à J28	0 h	3.62 ± 0.16	4.54	95.11	3.81 ± 0.03	0.26	100.35	3.81 ± 0.04	1.05	102.61
	2 h	3.73 ± 0.02	0.41	97.91	3.81 ± 0.02	0.23	100.44	3.81 ± 0.04	1.05	102.61
	6 h	3.73 ± 0.02	0.41	97.91	3.82 ± 0.02	0.23	100.70	3.81 ± 0.04	1.06	102.70
	24 h	3.77 ± 0.06	1.51	98.97	3.81 ± 0.06	0.61	100.27	3.79 ± 0.06	1.45	102.16
	48 h	3.88 ± 0.03	0.83	101.84	3.82 ± 0.06	0.66	100.71	3.83 ± 0.01	0.15	103.24
	8 j	3.92 ± 0.07	1.67	103.07	3.93 ± 0.06	0.60	103.43	3.82 ± 0.14	3.58	102.76
Décongélation à J63	0 h	3.66 ± 0.09	2.32	96.24	3.68 ± 0.03	0.26	96.93	3.68 ± 0.02	0.58	98.39
	2 h	3.74 ± 0.08	2.01	98.25	3.67 ± 0.03	0.27	96.66	3.68 ± 0.02	0.58	98.39
	6 h	3.75 ± 0.06	1.70	98.43	3.67 ± 0.03	0.26	96.66	3.68 ± 0.02	0.58	98.39
	24 h	3.74 ± 0.06	1.63	98.16	3.69 ± 0.04	0.36	97.19	3.73 ± 0.07	1.88	100.56
	48 h	3.74 ± 0.06	1.57	98.25	3.76 ± 0.09	0.89	98.94	3.75 ± 0.05	1.23	100.91
	8 j	3.81 ± 0.03	0.69	100.09	3.98 ± 0.01	0.06	104.92	3.80 ± 0.06	1.45	102.24
Décongélation à J91	0 h	3.71 ± 0.06	1.65	97.38	3.75 ± 0.11	1.05	98.68	3.79 ± 0.03	0.66	101.98
	2 h	3.71 ± 0.06	1.65	97.38	3.75 ± 0.11	1.05	98.68	3.79 ± 0.03	0.66	101.98
	6 h	3.69 ± 0.08	2.04	96.85	3.75 ± 0.11	1.02	98.68	3.75 ± 0.09	2.48	100.91
	24 h	3.73 ± 0.05	1.39	97.90	3.82 ± 0.08	0.78	100.52	3.79 ± 0.03	0.76	102.16
	48 h	3.72 ± 0.05	1.32	97.82	3.79 ± 0.1	0.94	99.92	3.81 ± 0.03	0.69	102.61
	8 j	3.90 ± 0.04	1.07	102.37	3.94 ± 0.07	0.64	103.86	3.84 ± 0.00	0.00	103.42

Tableau 10 : Evolution du pH des solutions intravitréennes après décongélation, en fonction des modalités de décongélation et de conservation

d) Evolution de l'osmolalité

A T0, l'osmolalité des solutions intravitréennes est compris entre 293,7 mOsm/kg et 299,4 mOsm/kg (Tableau 11).

Quel que soit le mode de décongélation (eau chaude, 25°C ou au réfrigérateur à 4°C) et le mode de conservation (à 25°C ou au réfrigérateur à 4°C), l'osmolalité des solutions intravitréennes ne varie pas de plus de 10% par rapport à la valeur initiale à T0 avant congélation en prenant en compte un intervalle de confiance à 95% autour de la moyenne. (Annexes 7B, 7B et 8B).

L'osmolalité est même très stable puisque la valeur moyenne ne varie pas de plus de 1,45 % par rapport à la valeur initiale à T0.

INTRAVITREENNES : VANCOMYCINE A 10MG/ML										
		SERIE 1 Décongélation dans l'eau chaude (42-45°C) Conservation 8 jours à 25°C			SERIE 2 Décongélation à 25°C Conservation 8 jours à 25°C			SERIE 3 Décongélation à 4°C Conservation 8 jours à 4°C		
Temps		Osmolalité moyenne (mOsm/kg) ± Ecart-type	CV (%)	% de l'osmolalité initiale à TO	Osmolalité moyenne (mOsm/kg) ± Ecart-type	CV (%)	% de l'osmolalité initiale à TO	Osmolalité moyenne (mOsm/kg) ± Ecart-type	CV (%)	% de l'osmolalité initiale à TO
JO (Avant congélation)	TO	299.3 ± 0.6	0.19	100.00	296.3 ± 2.9	0.97	100.00	293.7 ± 1.5	0.52	100.00
	2 h	298.0 ± 1.7	0.58	99.56	296.0 ± 2.6	0.89	99.89	293.3 ± 0.6	0.20	99.89
	6 h	297.3 ± 1.2	0.39	99.33	296.3 ± 2.9	0.97	100.00	293.3 ± 0.6	0.20	99.89
	24 h	297.3 ± 0.6	0.19	99.33	296.3 ± 1.5	0.52	100.00	293.7 ± 1.5	0.52	100.00
	48 h	298.3 ± 1.5	0.51	99.67	298.3 ± 3.8	1.27	100.67	293.0 ± 0.0	0.00	99.77
	8 j	297.7 ± 1.2	0.39	99.44	299.0 ± 3.5	1.16	100.90	292.3 ± 1.5	0.52	99.55
Décongélation à J7	0 h	296.7 ± 1.2	0.39	99.11	295.3 ± 4.0	1.37	99.66	291.3 ± 0.6	0.20	99.21
	2 h	297.0 ± 1.0	0.34	99.22	295.3 ± 4.0	1.37	99.66	291.3 ± 0.6	0.20	99.21
	6 h	297.0 ± 0.0	0.00	99.22	296.0 ± 1.7	0.59	99.89	291.3 ± 0.6	0.20	99.21
	24 h	299.3 ± 1.5	0.51	100.00	296.3 ± 2.1	0.70	100.00	292.3 ± 1.2	0.39	99.55
	48 h	298.3 ± 2.5	0.84	99.67	297.0 ± 3.0	1.01	100.23	292.7 ± 0.6	0.20	99.66
	8 j	299.7 ± 2.1	0.69	100.11	297.7 ± 2.5	0.85	100.45	293.7 ± 1.2	0.39	100.00
Décongélation à J14	0 h	296.3 ± 1.5	0.52	99.00	295.0 ± 3.0	1.02	99.55	292.0 ± 1.0	0.34	99.44
	2 h	297.3 ± 1.2	0.39	99.33	296.0 ± 1.7	0.59	99.89	292.0 ± 1.0	0.34	99.44
	6 h	298.0 ± 2.0	0.67	99.55	295.0 ± 3.6	1.22	99.55	293.0 ± 1.0	0.34	99.77
	24 h	297.3 ± 3.1	1.03	99.33	295.3 ± 3.8	1.28	99.66	294.7 ± 3.1	1.04	100.35
	48 h	296.7 ± 3.2	1.08	99.11	297.3 ± 0.6	0.19	100.34	292.7 ± 1.2	0.39	99.66
	8 j	299.3 ± 0.6	0.19	100.00	296.7 ± 1.2	0.39	100.12	294.3 ± 0.6	0.20	100.23
Décongélation à J28	0 h	295.0 ± 1.0	0.34	98.55	293.7 ± 0.6	0.20	99.11	291.3 ± 0.6	0.20	99.21
	2 h	295.3 ± 0.6	0.20	98.66	294.0 ± 1.0	0.34	99.22	291.7 ± 0.6	0.20	99.32
	6 h	295.3 ± 1.2	0.39	98.66	294.0 ± 1.0	0.34	99.22	292.3 ± 0.6	0.20	99.55
	24 h	296.3 ± 1.2	0.39	99.00	294.7 ± 3.1	1.04	99.44	292.7 ± 2.1	0.71	99.66
	48 h	300.0 ± 1.0	0.33	100.22	296.0 ± 3.6	1.22	99.89	293.3 ± 0.6	0.20	99.89
	8 j	298.7 ± 0.6	0.19	99.78	296.7 ± 4.0	1.36	100.11	293.0 ± 1.7	0.59	99.78
Décongélation à J63	0 h	296.3 ± 4.6	1.56	99.00	297.7 ± 1.2	0.39	100.46	294.7 ± 2.1	0.71	100.34
	2 h	297.3 ± 2.1	0.70	99.33	296.7 ± 1.5	0.51	100.12	294.3 ± 2.3	0.78	100.23
	6 h	297.0 ± 1.7	0.58	99.22	297.7 ± 2.5	0.85	100.46	292.7 ± 0.6	0.20	99.66
	24 h	297.3 ± 1.5	0.51	99.33	294.3 ± 2.3	0.78	99.33	293.7 ± 1.5	0.52	100.00
	48 h	298.3 ± 1.2	0.39	99.67	295.0 ± 3.5	1.17	99.55	293.3 ± 1.5	0.52	99.89
	8 j	299.7 ± 1.5	0.51	100.11	295.3 ± 2.9	0.98	99.66	293.7 ± 1.5	0.52	100.00
Décongélation à J91	0 h	296.7 ± 0.6	0.19	99.11	299.7 ± 2.5	0.84	101.13	292.7 ± 0.6	0.20	99.66
	2 h	296.3 ± 0.6	0.19	99.00	299.7 ± 2.5	0.84	101.13	292.3 ± 1.2	0.39	99.55
	6 h	298.0 ± 2	0.67	99.56	299.0 ± 3.6	1.21	100.90	295.7 ± 5.7	1.92	100.68
	24 h	294.7 ± 4.2	1.41	98.44	298.0 ± 4.4	1.46	100.56	295.7 ± 3.8	1.28	100.69
	48 h	297.0 ± 1.0	0.34	99.22	299.3 ± 3.1	1.02	101.01	294.3 ± 4.2	1.41	100.23
	8 j	301.3 ± 5.1	1.70	100.67	296.0 ± 2.6	0.89	99.89	293.3 ± 0.6	0.20	99.89

Tableau 11 : Evolution de l'osmolalité des solutions intravitréennes après décongélation, en fonction des modalités de décongélation et de conservation

e) Analyse chromatographique

(1) Evolution des concentrations

A T0, la concentration mesurée moyenne en vancomycine est de 9,88 mg/mL pour la série 1, 9,92 mg /mL pour la série 2 et 9,99 mg /mL pour la série 3, pour une concentration théorique de 10 mg /mL (Tableau 12).

Quel que soit le mode de décongélation (eau chaude, 25°C ou au réfrigérateur à 4°C) et le mode de conservation (à 25°C ou au réfrigérateur à 4°C), la concentration des solutions intravitréennes ne varie pas de plus de 10% par à rapport à la valeur initiale à T0 avant congélation, en prenant en compte un intervalle de confiance à 95% autour de la moyenne (Annexes 5C, 6C et 7C).

La concentration des solutions intravitréennes est donc stable pendant 3 mois de congélation puis 8 jours de conservation à 25°C ou au réfrigérateur.

		INTRA-VITRENNES : VANCOMYCINE A 10MG/ML								
		SERIE 1 Décongélation dans l'eau chaude (42-45°C) Conservation 8 jours à 25°C			SERIE 2 Décongélation à 25°C Conservation 8 jours à 25°C			SERIE 3 Décongélation à 4°C Conservation 8 jours à 4°C		
Temps		C moyenne (mg/mL) ± Ecart Type	CV (%)	% de la C initiale à TO	C moyenne (mg/mL) ± Ecart Type	CV (%)	% de la C initiale à TO	C moyenne (mg/mL) ± Ecart Type	CV (%)	% de la C initiale à TO
Décongélation à JO	T0	9.88 ± 0.12	1.25	100.00	9.92 ± 0.10	1.04	100.00	9.99 ± 0.24	2.38	100.00
	2 h	9.95 ± 0.14	1.39	100.70	9.95 ± 0.33	3.31	100.32	9.92 ± 0.19	1.90	99.38
	6 h	10.02 ± 0,1	0.99	101.36	9.90 ± 0.18	1.85	99.80	9.88 ± 0.36	3.60	98.93
	24 h	9.91 ± 0.02	0.18	100.31	9.92 ± 0.38	3.81	99.97	10.00 ± 0.31	3.13	100.13
	48 h	9.86 ± 0.36	3.65	99.76	10.01 ± 0.24	2.38	100.90	9.90 ± 0.13	1.36	99.18
	8 j	9.88 ± 0.27	2.78	99.97	9.76 ± 0.34	3.52	98.34	10.01 ± 0.07	0.67	100.26
Décongélation à J7	0 h	9.87 ± 0.47	4.73	99.87	10.00 ± 0.05	0.52	100.78	9.98 ± 0.24	2.38	99.96
	2 h	9.61 ± 0.10	1.08	97.26	10.09 ± 0.24	2.38	101.70	10.10 ± 0.08	0.76	101.19
	6 h	9.85 ± 0.20	2.03	99.64	9.87 ± 0.25	2.56	99.50	10.25 ± 0.14	1.38	102.68
	24 h	9.76 ± 0.10	1.00	98.72	9.94 ± 0.05	0.54	100.27	10.12 ± 0.07	0.71	101.37
	48 h	9.64 ± 0.25	2.56	97.56	9.88 ± 0.24	2.43	99.66	10.13 ± 0.16	1.57	101.51
	8 j	9.57 ± 0.06	0.61	96.83	9.86 ± 0.07	0.73	99.40	10.05 ± 0.25	2.52	100.63
Décongélation à J14	0 h	10.01 ± 0.02	0.21	101.30	10.08 ± 0.13	1.25	101.60	10.26 ± 0.17	1.69	102.81
	2 h	10.06 ± 0.17	1.70	101.80	9.89 ± 0.05	0.48	99.72	10.16 ± 0.10	0.98	101.81
	6 h	9.96 ± 0.19	1.87	100.75	9.90 ± 0.34	3.43	99.85	9.96 ± 0.36	3.65	99.76
	24 h	9.95 ± 0.13	1.33	100.67	9.91 ± 0.19	1.91	99.89	10.15 ± 0.27	2.63	101.70
	48 h	9.94 ± 0.16	1.65	100.63	9.98 ± 0.11	1.14	100.62	10.13 ± 0.16	1.62	101.45
	8 j	9.71 ± 0.24	2.46	98.23	9.67 ± 0.14	1.46	97.49	10.17 ± 0.06	0.55	101.92
Décongélation à J28	0 h	9.81 ± 0.16	1.59	99.21	10.17 ± 0.36	3.55	102.48	10.25 ± 0.11	1.09	102.72
	2 h	9.82 ± 0.13	1.33	99.37	9.92 ± 0.05	0.46	100.59	10.02 ± 0.18	1.79	100.39
	6 h	9.94 ± 0.02	0.21	100.58	9.88 ± 0.18	1.85	99.57	9.97 ± 0.37	3.72	99.80
	24 h	10.01 ± 0,2	2.00	101.28	10.09 ± 0.13	1.28	101.75	10.04 ± 0.28	2.83	100.57
	48 h	9.94 ± 0.14	1.46	100.56	9.81 ± 0.06	0.64	98.86	10.28 ± 0.06	0.55	103.04
	8 j	9.94 ± 0.46	4.62	100.60	9.69 ± 0.17	1.75	97.75	10.37 ± 0.26	2.47	103.92
Décongélation à J63	0 h	9.80 ± 0.07	0.66	99.16	10.10 ± 0.09	0.93	101.83	10.12 ± 0.27	2.68	101.37
	2 h	9.92 ± 0.21	2.10	100.38	9.89 ± 0.28	2.81	99.77	10.12 ± 0.19	1.90	101.39
	6 h	9.92 ± 0.23	2.35	100.35	10.13 ± 0.18	1.76	102.14	10.19 ± 0.14	1.39	102.09
	24 h	9.80 ± 0.07	0.69	99.17	10.06 ± 0.18	1.82	101.41	10.25 ± 0.47	4.58	102.57
	48 h	9.85 ± 0.14	1.44	99.66	10.36 ± 0.17	1.63	104.44	10.31 ± 0.36	3.52	103.26
	8 j	9.84 ± 0.29	2.91	99.56	9.69 ± 0.22	2.25	97.66	10.30 ± 0.16	1.51	103.24
Décongélation à J91	0 h	10.15 ± 0.12	1.16	102.74	10.05 ± 0.16	1.64	101.34	10.26 ± 0.15	1.48	102.81
	2 h	10.09 ± 0.05	0.46	102.13	9.97 ± 0.27	2.72	100.49	10.34 ± 0.20	1.90	103.64
	6 h	10.17 ± 0.16	1.53	102.87	10.30 ± 0.10	1.00	103.82	10.38 ± 0.10	1.01	104.00
	24 h	10.29 ± 0.25	2.47	104.15	9.80 ± 0.25	2.60	98.76	10.55 ± 0.07	0.69	105.70
	48 h	10.05 ± 0.17	1.67	101.66	10.08 ± 0.37	3.68	101.64	10.30 ± 0.21	2.05	103.16
	8 j	9.61 ± 0.08	0.79	97.22	10.13 ± 0.43	4.26	102.07	10.13 ± 0.29	2.89	101.48

Tableau 12 : Evolution de la concentration en vancomycine des solutions intravitréennes après décongélation, en fonction des modalités de décongélation et de conservation

(2) Recherche des produits de dégradation

- Série 1 : Décongélation dans l'eau chaude (42-45°C) et conservation 8 jours à 25°C

La comparaison des chromatogramme obtenus à T0 avec ceux obtenus immédiatement après décongélation à J7, J14, J21, J28, J63 et J91 ne montre pas l'apparition de produits de dégradation (Figure 18). La décongélation par l'eau chaude ne dégrade donc pas la molécule.

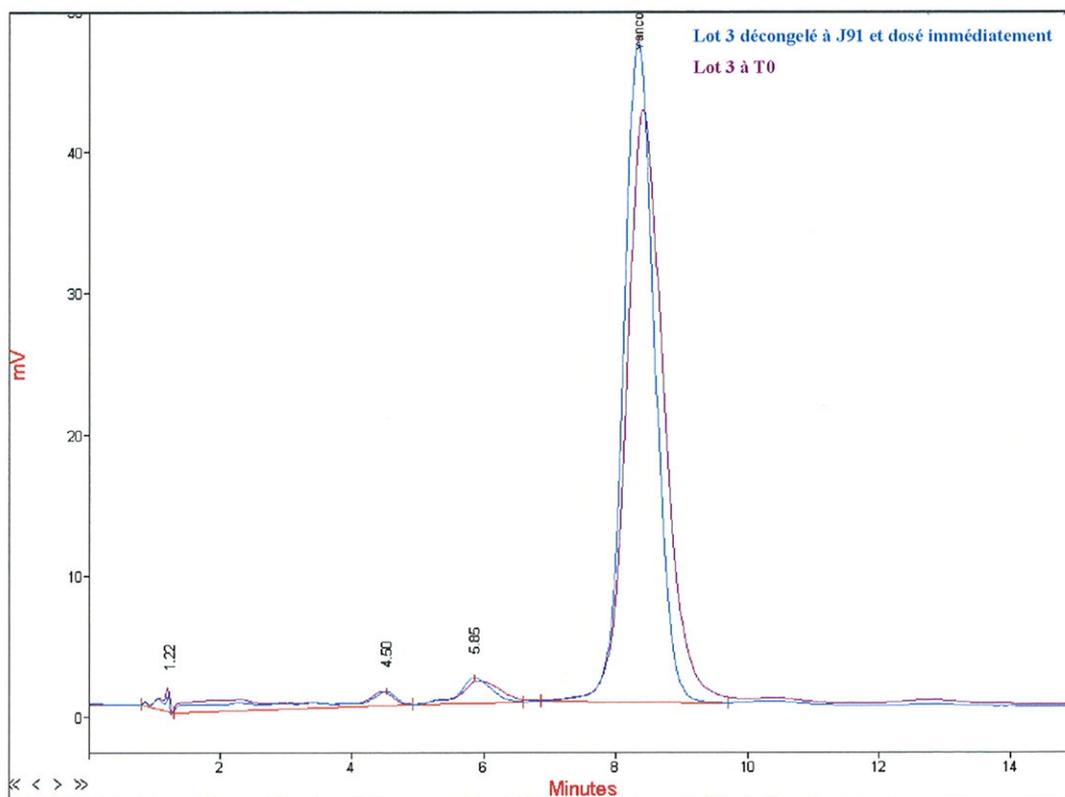


Figure 18 : Recherche des produits de dégradation après décongélation à l'eau chaude (Série 1)

Après décongélation et conservation 48h à 25°C il n'est pas observé de produits de dégradation (Figure 19).

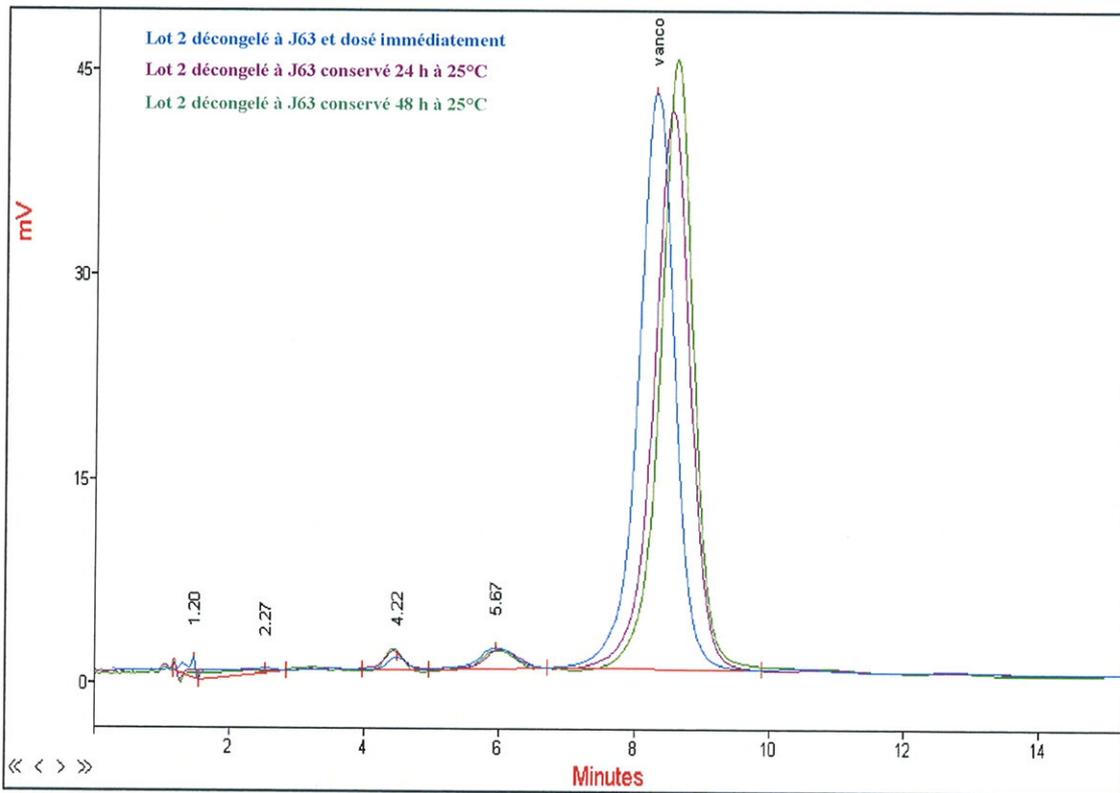


Figure 19 : Recherche des produits de dégradation après décongélation à l'eau chaude et conservation 48 heures à 25°C (Série 1)

Cependant après 8 jours de conservation à 25°C, une faible quantité de produits de dégradation est détectée à 4,5 et 12 min (Figure 20).

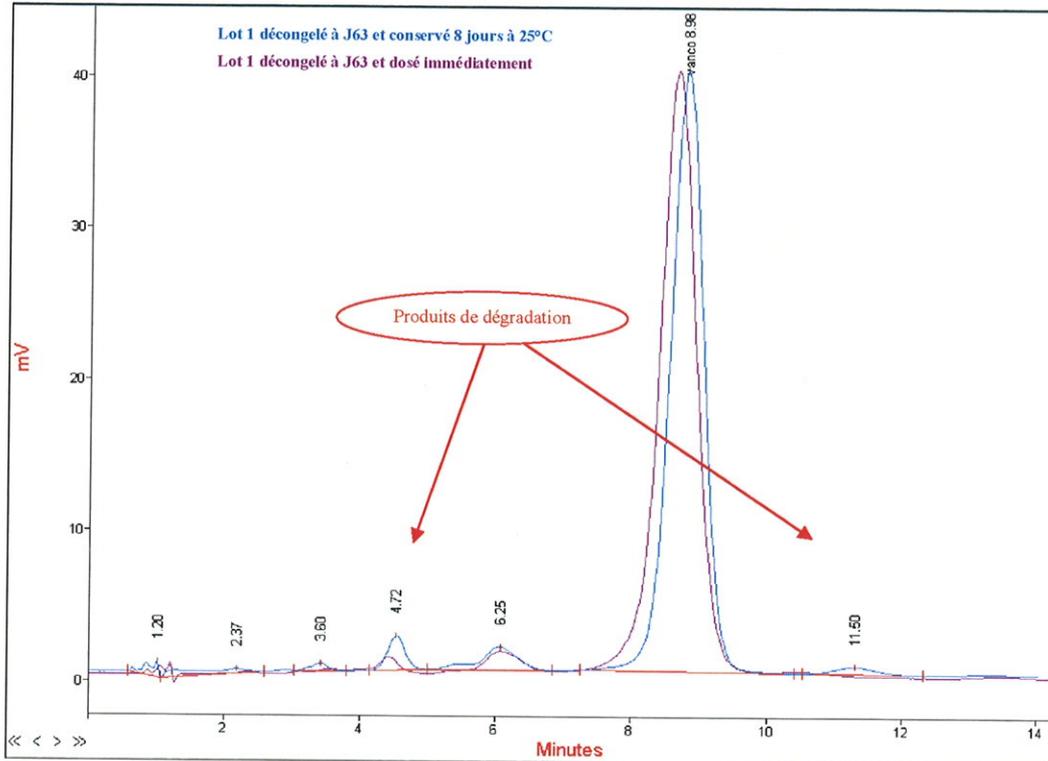


Figure 20 : Recherche des produits de dégradation après décongélation à l'eau chaude et conservation 8 jours à 25°C (Série 1)

La vancomycine se dégrade donc légèrement entre 3 et 8 jours de conservation à 25°C.

- Série 2 : Décongélation à 25°C et conservation 8 jours à 25°C.

Comme dans la série 1, la comparaison du chromatogramme obtenu à T0 avec ceux obtenus après décongélation ne montre pas l'apparition de produits de dégradation. La décongélation à 25°C ne dégrade donc pas la molécule.

Après décongélation et conservation 48h à 25°C, il n'est pas observé de produits de dégradation (Figure 21).

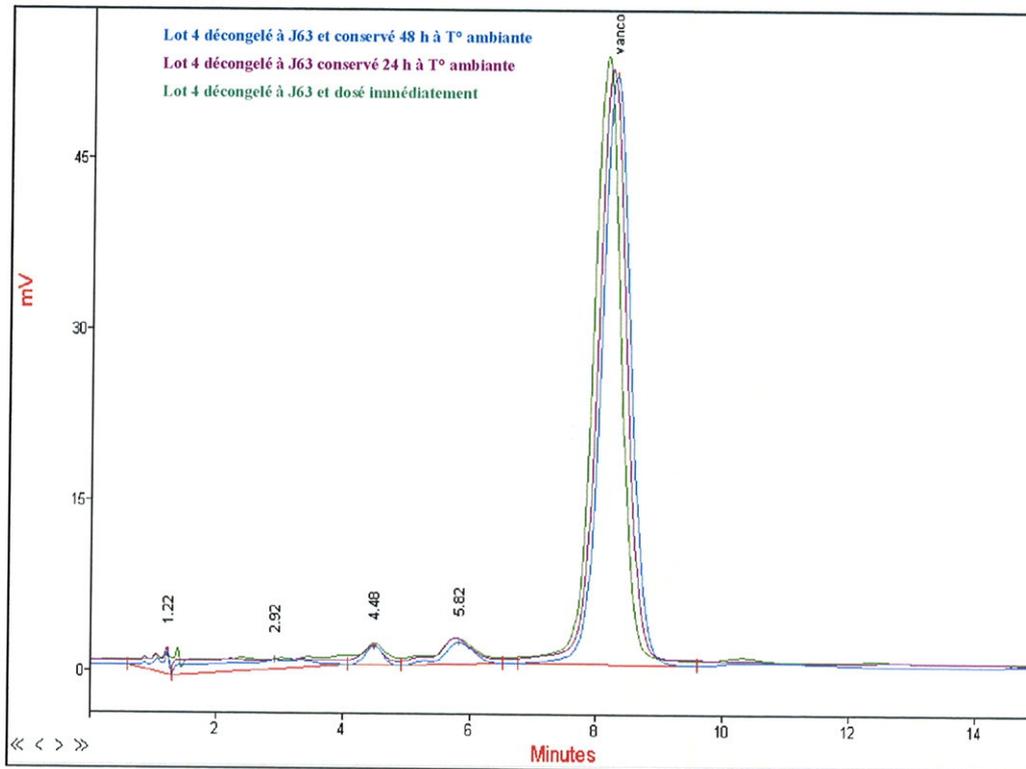


Figure 21 : Recherche des produits de dégradation après décongélation à 25 °C, et conservation 48 heures à 25°C (Série 2)

Cependant après 8 jours de conservation à 25°C, comme dans la série 1, une faible quantité de produits de dégradation est détectée à 4,5 min et 11 min (Figure 22).

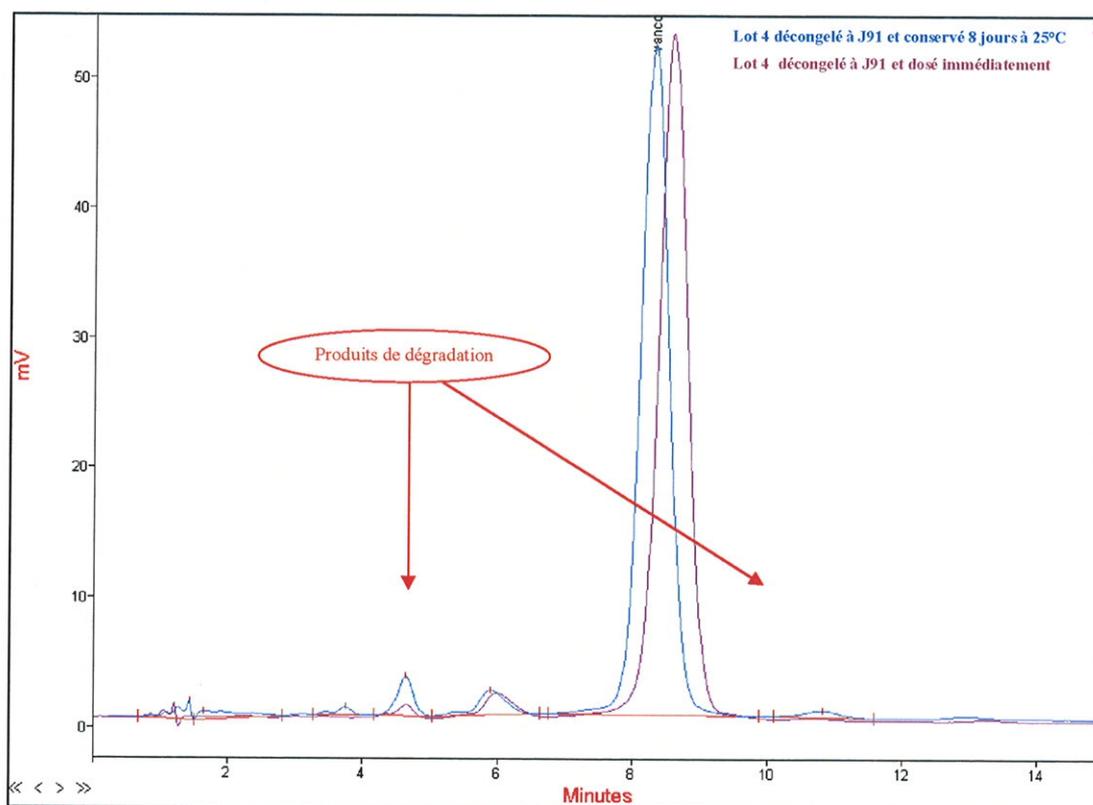


Figure 22 : Recherche des produits de dégradation après décongélation à 25°C et conservation 8 jours à 25°C (Série 2)

- Série 3 : Décongélation à 4°C et conservation 8 jours à 4°C.

Aucun produit de dégradation n'est détecté après 90 jours de congélation et 8 jours de conservation à 4 °C après décongélation à 4°C (Figure 23).

La congélation à -20°C, la décongélation à 4°C et la conservation 8 jours à 4°C ne dégrade pas la vancomycine.

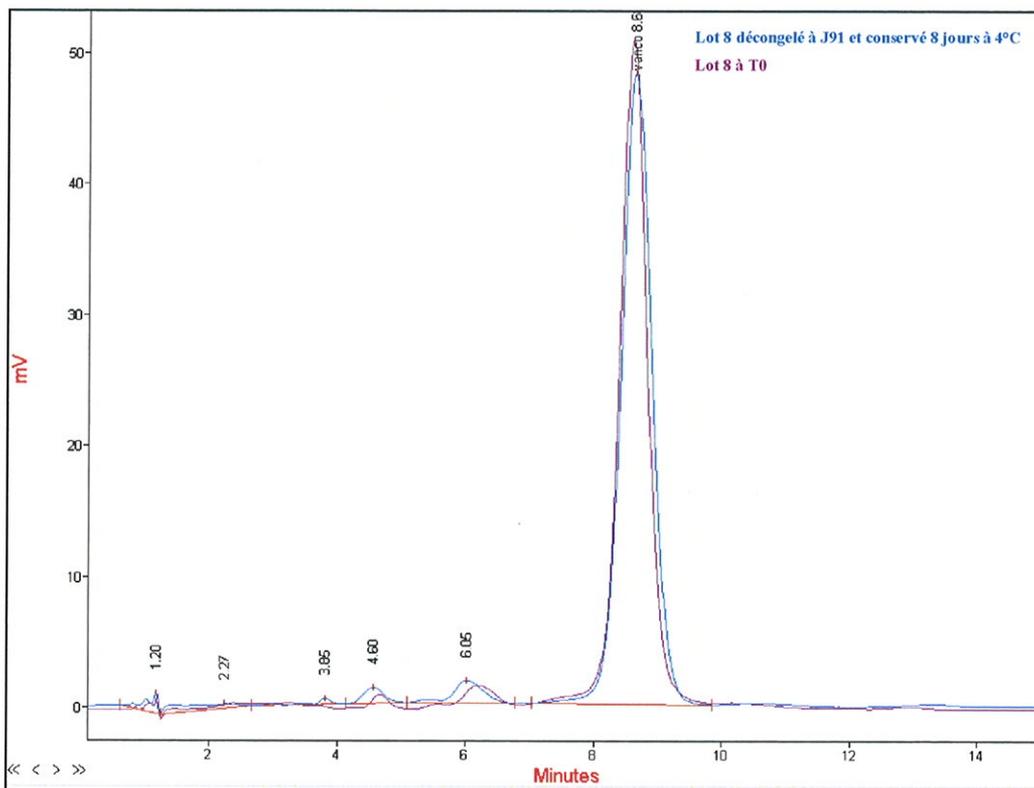


Figure 23 : Recherche des produits de dégradation après décongélation à 4°C et conservation 8 jours à 4°C (Série 3)

Pour chacune des séries, quel que soit le mode de décongélation, aucun produit de dégradation n'est détecté immédiatement après décongélation. La congélation ne dégrade donc pas la vancomycine.

Aucun produit de dégradation n'est observé après 48h de conservation à 25°C ou 4°C.

Cependant de faibles quantités de produits de dégradation sont détectables après 8 jours de conservation à 25°C, alors que ce n'est pas le cas lorsque les solutions intravitréennes sont conservées à 4°C. Seule la conservation au réfrigérateur préserve l'intégrité du principe actif.

f) Stérilité

Aucune croissance microbienne n'a été détectée dans l'ensemble des prélèvements analysés. Cela confirme que notre système de conditionnement est hermétiquement clos et permet de maintenir la stérilité de la préparation initiale.

La stérilité des intravitréennes est donc préservée malgré les étapes successives de congélation, décongélation et conservation à 4°C ou 25°C.

2) Collyres

a) Contrôle visuel des collyres

Il n'est observé ni précipité, ni trouble ni changement de couleur, après décongélation des collyres de vancomycine à 4°C et conservation 15 jours à 4°C.

b) Evolution du pH des collyres

A T0, les collyres à 25 mg/mL présentent un pH moyen de 3.58 (Tableau 13).

Le pH des collyres décongelés au réfrigérateur à 4°C et conservés 15 jours à 4°C de vancomycine ne varie pas de plus de plus de 0.13 unité pH après 3 mois de congélation puis décongélation et conservation au réfrigérateur. Cela est inférieur aux 10% par à rapport à la valeur initiale à T0 avant congélation, en prenant en compte un intervalle de confiance à 95% autour de la moyenne (Annexe 9A). Le pH des collyres est donc stable pendant 3 mois de congélation puis 15 jours de conservation à 4°C.

Jour de décongélation	Temps d'analyse (j)	pH moyen ± Ecart-type	CV (%)	% du pH initial à T0
J0	T0	3.58 ± 0.1	2.83	100.00
	1	3.58 ± 0.1	2.66	100.10
	2	3.55 ± 0.13	3.60	99.24
	8	3.65 ± 0.02	0.47	102.11
	15	3.63 ± 0.06	1.57	101.61
J7	0	3.68 ± 0.1	2.82	102.92
	1	3.64 ± 0.03	0.79	101.75
	2	3.63 ± 0.03	0.79	101.65
	8	3.66 ± 0.02	0.63	102.47
	15	3.71 ± 0.06	1.72	104.40
J14	0	3.63 ± 0.05	1.39	101.62
	1	3.59 ± 0.04	1.16	100.51
	2	3.57 ± 0.08	2.10	99.79
	8	3.6 ± 0.09	2.36	100.63
	15	3.62 ± 0.11	3.05	101.21
J28	0	3.48 ± 0.02	0.57	97.35
	1	3.54 ± 0.12	3.37	99.08
	2	3.49 ± 0.05	1.44	97.70
	8	3.66 ± 0.04	0.97	103.01
	15	3.56 ± 0.03	0.71	99.68
J63	0	3.6 ± 0.01	0.39	99.04
	1	3.61 ± 0.02	0.59	99.18
	2	3.6 ± 0.04	1.18	99.04
	8	3.64 ± 0.02	0.55	101.83
	15	3.65 ± 0.01	0.32	102.01
J91	0	3.65 ± 0.01	0.27	102.11
	1	3.64 ± 0.03	0.95	101.82
	2	3.64 ± 0.01	0.27	101.83
	8	3.67 ± 0.04	0.98	102.65
	15	3.69 ± 0.03	0.78	103.30

Tableau 13 : Evolution du pH des collyres après décongélation 4°C, puis conservation 15 jours 4°C

c) Evolution de l'osmolalité

A T0, l'osmolalité des collyres est en moyenne de 308 mOsm/kg (Tableau 14).

Après 90 jours de conservation à -20°C puis 15 jours de conservation à 4°C, l'osmolalité des collyres ne varie pas de plus de 10% par à rapport à la valeur initiale à T0 avant congélation en prenant en compte un intervalle de confiance à 95% autour de la moyenne (Annexe 9B).

Comme pour les solutions intravitréennes, l'osmolalité reste extrêmement stable durant l'étude puisqu'elle ne varie pas de plus de 1.3 % par à rapport à la valeur initiale à T0.

Jour de décongélation	Temps d'analyse (j)	Osmolalité moyenne (mOsm/kg) ± Ecart-type	CV (%)	% de l'osmolalité initiale à T0
JO	T0	308.0 ± 0.0	0.00	100.00
	1	308.3 ± 0.6	0.19	100.11
	2	309.0 ± 4.4	1.41	100.32
	8	304.0 ± 5.3	1.74	98.70
	15	309.7 ± 2.5	0.81	100.54
J7	0	306.7 ± 0.6	0.19	99.57
	1	305.3 ± 0.6	0.19	99.13
	2	309.0 ± 2.0	0.65	100.32
	8	309.7 ± 1.2	0.37	100.54
	15	309.0 ± 4.2	1.37	100.32
J14	0	307.0 ± 1.0	0.33	99.68
	1	306.3 ± 1.2	0.38	99.46
	2	308.0 ± 1.0	0.32	100.00
	8	308.7 ± 0.6	0.19	100.22
	15	311.3 ± 0.6	0.19	101.08
J28	0	307.3 ± 0.6	0.19	99.78
	1	307.7 ± 1.5	0.50	99.89
	2	305.7 ± 1.2	0.38	99.24
	8	308.3 ± 2.3	0.75	100.11
	15	310.7 ± 2.1	0.67	100.87
J63	0	307.3 ± 0.6	0.19	99.78
	1	306.3 ± 3.8	1.24	99.46
	2	307.3 ± 3.1	0.99	99.78
	8	308.7 ± 0.6	0.19	100.22
	15	308.7 ± 1.2	0.37	100.22
J91	0	310.3 ± 3.1	0.98	100.76
	1	306.7 ± 2.1	0.68	99.57
	2	308.3 ± 2.5	0.82	100.11
	8	308.7 ± 0.6	0.19	100.22
	15	308.7 ± 2.1	0.67	100.22

Tableau 14 : Evolution de l'osmolalité des collyres après décongélation 4°C, puis conservation 15 jours 4°C

d) Analyse chromatographique

(1) Résultats des dosages

A T0 la concentration mesurée moyenne en vancomycine est de 25,11 mg/mL \pm 0.46, pour une valeur théorique de 25 mg/mL (Tableau 15).

Durant l'étude, la concentration des collyres ne varie pas de plus de 10% par à rapport à la valeur initiale à T0 avant congélation en prenant en compte un intervalle de confiance à 95% autour de la moyenne. (Annexes 9C). La concentration en vancomycine des collyres est donc stable pendant 3 mois de congélation puis 15 jours de conservation à 4 °C.

Jour de décongélation	Temps d'analyse (j)	Concentration moyenne (mg/mL) ± Ecart-type	CV (%)	% de la concentration initiale à TO
JO	T0	25.11 ± 0.46	1.83	100.00
	1	25.60 ± 0.50	1.94	101.94
	2	25.73 ± 0.51	2.00	102.49
	8	25.44 ± 0.28	1.09	101.33
	15	25.33 ± 0.24	0.94	100.86
J7	0	25.70 ± 0.38	1.50	102.37
	1	25.24 ± 0.59	2.32	100.56
	2	25.41 ± 0.32	1.25	101.21
	8	25.24 ± 0.91	3.59	100.55
	15	26.24 ± 0.12	0.45	105.51
J14	0	25.49 ± 0.28	1.11	101.52
	1	25.36 ± 0.10	0.39	101.01
	2	25.83 ± 0.28	1.09	102.89
	8	25.38 ± 0.46	1.81	101.08
	15	25.40 ± 0.46	1.82	101.13
J28	0	25.28 ± 0.68	2.69	100.68
	1	25.33 ± 0.55	2.16	100.86
	2	25.32 ± 1.10	4.35	100.86
	8	25.71 ± 0.60	2.33	102.38
	15	25.31 ± 0.37	1.47	100.80
J63	0	25.81 ± 0.31	1.19	102.81
	1	26.43 ± 0.19	0.73	105.25
	2	26.27 ± 0.74	2.83	104.67
	8	25.82 ± 0.74	2.87	102.85
	15	25.92 ± 0.43	1.65	103.23
J91	0	25.59 ± 0.30	1.15	101.92
	1	26.10 ± 0.12	0.44	103.93
	2	25.90 ± 0.31	1.19	103.15
	8	25.25 ± 0.25	0.98	100.59
	15	25.23 ± 0.75	2.99	100.50

Tableau 15 : Evolution de la concentration en vancomycine des collyres, après décongélation 4°C, puis conservation 15 jours 4°C

(2) Recherche des produits de dégradation

La comparaison des chromatogrammes obtenus à T0 et après 90 jours de congélation et 15 jours de conservation à +4°C montre l'absence de produits de dégradation (Figure 24). La décongélation et la conservation au réfrigérateur respectent donc la stabilité physicochimique des collyres à la vancomycine.

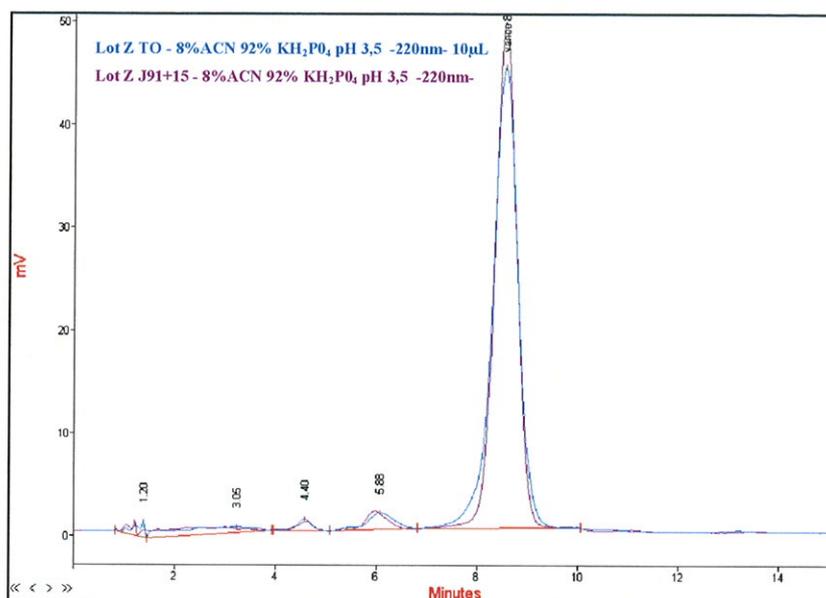


Figure 24 : Recherche des produits de dégradation dans les collyres

e) Analyse microbiologique

Aucune croissance microbienne n'a été détectée dans l'ensemble des prélèvements analysés. Les contrôles microbiologiques réalisés confirment donc que notre préparation est stérile après fabrication et que l'intégrité des flacons de conditionnement est maintenue, malgré les étapes de congélation, décongélation et stockage.

La stérilité des collyres est donc maintenue après 3 mois de congélation à -20°C. Après décongélation, les flacons non ouverts de collyres à 25 mg/mL restent stériles 15 jours à 4°C.

C. DISCUSSION

Notre étude a permis d'évaluer la stabilité des solutions ophtalmiques immédiatement après décongélation, et après des durées et des conditions de conservation variables.

Ainsi nous avons montré pour la première fois que les solutions de vancomycine à 10 mg/mL ou 25 mg/mL dans du chlorure de sodium 0.9%, sont stables après 3 mois de congélation à -20°C. Nos résultats valident également la stabilité des préparations quel que soit leur mode de décongélation (eau chaude, 25°C ou 4°C).

En effet, immédiatement après décongélation, la teneur en principe actif ne varie pas plus de 10% par à rapport à la valeur initiale à T0 avant congélation en prenant en compte un intervalle de confiance à 95%. Pour toutes les solutions, le plus grand écart observé par rapport à la valeur initiale à T0 est 102.72%±4.09%.

Ces résultats vont dans le même sens que deux études de congélation de collyres réalisés un autre solvant, le glucose 5%, qui présente le désavantage d'être un milieu propice à la croissance bactérienne. Dans ces études les auteurs n'ont pas pris en compte un intervalle de confiance à 5% autour de la valeur moyenne.

Ainsi Chédru-Legros V. et al, trouve que la perte en principe actif dans des collyres à 50 mg/mL immédiatement après décongélation à température ambiante, est inférieure à 5% (46).

De même, lors de la décongélation de collyres à 25 mg/mL dans le glucose 5% (43), le mode de décongélation ne semble pas avoir d'influence sur la stabilité du principe actif. Les concentrations en vancomycine sont stables immédiatement après décongélation, que celle-ci soit effectuée sous eau chaude, à température ambiante ou au réfrigérateur (perte en principe actif inférieure à 5%).

Notre étude présente l'originalité d'être la seule à avoir étudié les solutions de vancomycine jusqu'à 15 jours après décongélation.

Ainsi, la teneur en principe actif ne varie pas plus de 10% par à rapport à la valeur initiale à T0 avant congélation en prenant en compte un intervalle de confiance à 95%, durant 8 jours de conservation pour les intravitréennes et 15 jours pour les collyres. La concentration en vancomycine est donc stable.

Cependant la recherche des produits de dégradation met en évidence que le mode de conservation après décongélation influence la cinétique de dégradation de la vancomycine.

Ainsi notre étude ne détecte aucun produit de dégradation après 48h à 4°C ou à 25°C, ni dans les solutions intravitréennes, ni dans les collyres. La recherche des produits de dégradation ultérieurement à la décongélation n'est rapportée que par une seule autre étude, après conservation 48h à 4°C de collyres glucosés décongelés (43). Nous montrons donc qu'une solution de vancomycine à 10 mg/mL dans le chlorure de sodium, est quand à elle stable 48h à 4°C et à température ambiante.

Après décongélation et conservation à 4°C, aucun produit de dégradation n'est détecté après 8 jours pour les solutions intravitréennes à 10 mg/mL, ni après 15 jours pour les collyres 25 mg/mL. La dégradation de la vancomycine est donc très ralentie à 4°C.

Après décongélation et conservation 8 jours à 25 °C, nous détectons de très faibles quantités de produits de dégradation des solutions intravitréennes, sans que cela ne soit corrélé à une perte significative de principe actif.

Ces résultats se rapprochent de ceux obtenus avec des collyres plus concentrés (50 mg /mL dans du chlorure de sodium) mais n'ayant pas subi de congélation. Après conservation à 4°C, des produits de dégradation avaient été mis en évidence après 20 jours de conservation à 4°C et 7 jours à 25°C (18).

Les produits cristallins de dégradation de la vancomycine n'ont pas d'activité antibiotique, mais leur toxicité est inconnue. Il faut cependant noter que le produit détecté vers 4 min 50 est présent dans toutes les solutions de vancomycine reconstituées extemporanément utilisées dans l'étude. Il s'agit donc d'un produit présent dans le lyophilisat de poudre pour injection, en quantités tolérées par le laboratoire Sandoz. L'utilisation de vancomycine Mylan® montre également la présence de ce composé dans les mêmes proportions.

Faut il redouter une action délétère de ces produits ? La prudence semble de mise, en particulier pour les solutions intravitréennes. En effet la nature cristalline de ces produits fait craindre un risque de précipité dans le vitré.

L'ensemble des solutions analysées sont restées limpides après décongélation, soit 8 jours à 4°C ou 25°C pour les solutions intravitréennes à 10 mg/mL, et 15 jours à 4°C pour les collyres à 25 mg/mL. Ces résultats sont confirmés par la recherche des particules non visibles dans nos solutions intravitréennes, qui sont détectées en quantités très inférieures aux recommandations de la pharmacopée (14).

Ils diffèrent cependant de ceux obtenus par S. Barbault qui notait la présence d'un trouble puis de cristaux blancs dès 7 jours à 4°C et 25°C, dans les flacons de collyres à 50 mg/mL. Les auteurs évoquent une possible cristallisation de la vancomycine ou de ses produits de dégradation (18).

La différence observée dans notre étude peut être liée au fait que les concentrations de nos préparations sont plus faibles. Ainsi des solutions à 5 mg/mL dans du chlorure de sodium sont limpides 17 jours à 25°C et 63 jours à 5°C (63). De même des solutions à 10 mg/mL dans du glucose sont limpides deux mois à 4°C (64). Le pH des solutions à 50 mg/mL (pH = 3.2 à 3.4) est de plus légèrement inférieur à celui de nos solutions qui sont en moyenne à pH = 3.6. Ce facteur pourrait avoir influencé l'apparition de cristaux.

Le pH des solutions de vancomycine décongelées reste stable dans le temps.

Pour éviter toute douleur ou irritation de la cornée, le pH d'un collyre doit être compris entre 3 et 9 (46), l'œil possédant une capacité tampon. Les collyres à 25 mg/mL, donc le pH est voisin de 3.6 seront donc bien tolérés.

La littérature ne propose pas de pH idéal pour les solutions intravitréennes. Par analogie avec les solutions d'irrigation oculaires dont le pH doit être proche de celui de l'humeur aqueuse soit 7.4 ± 0.6 . (65), le pH des intravitréennes (voisin de pH 4), est relativement acide. Cependant, les volumes utilisés sont très différents : 0.1mL pour une injection intravitréenne, contre des volumes parfois très importants de solution d'irrigation oculaire. Enfin du fait de ses propriétés chimiques et quel que soit son solvant de dissolution, une solution de la vancomycine possède toujours un pH acide.

La solubilité de la vancomycine étant par ailleurs maximale à pH 4, y aurait il un risque de précipitation et donc de corps flottant dans le vitré à pH supérieur ? La question est légitime.

La formulation d'une solution intravitréenne à pH 7 semble difficile et même non souhaitable.

L'osmolalité des collyres et des intravitréennes est extrêmement stable.

L'œil supporte sans douleur ni dommage cellulaire des collyres dont l'osmolalité est comprise entre 240 mOsm/kg et 550 mOsm/kg (46). Nos collyres à 25 mg/mL dont l'osmolalité est en moyenne de 295 mOsm/kg seront donc bien tolérés.

Il n'existe pas de recommandations concernant l'osmolalité des solutions pour injection intravitréenne. L'osmolalité des solutions pour irrigation intraoculaire qui sont isoosmotiques à l'humeur aqueuse soit 310 ± 30 mOsm/kg, peut être prise comme référence. Il semble raisonnable d'éviter l'usage de solution hypo osmotique faisant gonfler les cellules endothéliales du fait du gradient osmotique (65) (66).

Nous en déduisons que nos solutions intravitréennes à 10 mg/mL, dont l'osmolalité est en moyenne de 295 mOsm/kg, seront bien tolérées.

Notre étude de stérilité permet d'affirmer que nos préparations ophtalmiques de vancomycine sont réalisées dans des conditions aseptiques, et que la décongélation et la conservation à 4°C ou à température ambiante n'influent pas sur la croissance microbiologique.

Notre conditionnement en flacons étanches est donc adapté au maintien de l'état stérile, pendant 3 mois à -20°C puis 8 à 15 jours à 4°C ou 25°C.

La pharmacopée n'impose pas de conditionner les collyres en unidoses, si le collyre possède des propriétés antibactériennes adéquates. Une simulation d'utilisation a montré que des collyres à 50 mg/mL dans le glucose 5% (qui est un milieu propice à la croissance bactérienne), conditionnés en flacons munis d'un bouchon souple compte goutte, restent stériles 4 jours après ouverture. Bien que le compte goutte ne soit adapté sur nos collyres à 25 mg/mL qu'après décongélation, ces derniers sont susceptibles de présenter les mêmes propriétés.

Cependant notre pratique nous conduit à fournir un flacon par jour et par œil infecté aux patients, dont les yeux sont déjà très fragilisés, du fait du risque de contamination du contenu du flacon de collyre par contact du compte goutte avec l'œil. En effet certains germes se développent facilement à 4°C (*Pseudomonas aeruginosa*, *acinetobacter*, *aeromonas*, *cytophaga*...) (46).

Les essais de dégradation par les UV confirment notre pratique de conditionnement des intravitréennes et des collyres en verre brun à l'abri de la lumière, car la coloration observée après exposition aux UV est corrélée à l'apparition de produits de dégradation.

Quelle durée de péremption pouvons nous recommander pour nos collyres et nos intravitréennes au vu de tous ces résultats ?

L'aspect visuel, le comptage particulaire, l'évolution du pH et l'osmolalité sont en faveur de la stabilité de la préparation.

D'un point de vue pratique, la décongélation des solutions ophtalmiques prend cinq minutes à l'eau chaude, trente minutes à 25°C mais 4 heures à 4°C.

L'utilisation des intravitréennes au bloc opératoire se faisant dans un contexte d'urgence nous préconisons leur décongélation à l'eau chaude ou à 25°C pour une utilisation immédiate et par précaution au plus tard dans les 48h. En effet au delà, la balance bénéfico-risque peut sembler défavorable du fait de la présence éventuelle des produits de dégradation, même en quantité très faible. Il est cependant important de prévenir l'équipe soignante de la possibilité d'apparition d'un précipité, sans incidence sur la qualité du produit, lors de la décongélation à l'eau chaude. Ce précipité se dissout rapidement suite à l'agitation du flacon.

Dans le cas où notre PUI souhaiterait sous traiter la fabrication de solutions intravitréennes pour un autre établissement de santé, elle pourrait organiser un transport frigorifique, sans avoir à organiser un transport spécifique de produits congelés. La conservation 8 jours à 4°C garantit l'absence de produit de dégradation.

Nous proposons 15 jours de conservation à 4°C après décongélation dans le cas des collyres. Cette durée de péremption permettra notamment une prise en charge rapide en cession aux ambulatoires. Le traitement complet des patients sortant d'hospitalisation pourra être dispensé, et ce même le week-end.

CONCLUSION

Ce travail a montré l'intérêt thérapeutique des solutions intravitréennes et des collyres renforcés à la vancomycine, dans la prise en charge des kératites et des endophtalmies bactériennes.

Notre étude de stabilité nous a permis d'établir le profil de dégradation des solutions de vancomycine après congélation, en fonction des conditions de décongélation et de conservation. Ces résultats nous autorisent à prolonger la date de péremption des intravitréennes et des collyres préparés dans notre PUI, qui était jusqu'alors de 8 jours à 4°C.

Ainsi pour les solutions intravitréennes à 10 mg/mL, nous proposons une durée de péremption composée de la manière suivante : 3 mois de congélation suivie de 48h de conservation à 25°C en cas de décongélation à l'eau chaude ou à 25°C. La durée de conservation après décongélation est allongée à 8 jours lorsque l'intravitréenne est conservée à 4°C.

Pour les collyres à 25 mg/mL, nous proposons une durée de péremption de 3 mois au congélateur, suivie de 15 jours de conservation à 4°C.

Dans les deux cas, une période de quarantaine d'une semaine après fabrication doit être respectée, dans l'attente des résultats microbiologiques.

Les collyres et les solutions intravitréennes pourront être préparés par notre PUI sous le statut de préparation hospitalière. Des lots importants seront réalisés à l'avance, durant les horaires d'ouverture de la pharmacie. Leur qualité physicochimique et microbiologique sera contrôlée avant dispensation. Il s'agit d'un progrès majeur, notamment pour le contrôle de stérilité qui était jusqu'à maintenant réalisé à posteriori sur les préparations magistrales.

Ces données de stabilité vont de plus permettre de lisser l'activité lors des horaires d'ouverture de la pharmacie, et de simplifier la prise en charge des kératites et des endophtalmies lors des horaires de garde.

BIBLIOGRAPHIE

1. Encyclopédie corps humain. Les Editions Atlas. (En ligne). Site disponible sur <http://www.lecorpshumain.fr/corpshumain/1-oeil.html> (Page consultée le 03 février 2010)
2. Gerard J, Tortora, Reynolds.S, Grabowski « et al. ». *Principes d'anatomie et de physiologie. 3e éd. Française* adaptation française par Imbach.A et Ferron.A . Paris : De Boeck université, 2001, p545-548
3. *Structure oculaire* (En ligne). Site disponible sur : <http://ophtasurf.free.fr/oeil.htm> (Page consultée en novembre 2009)
4. CHU Pitié Salpêtrière. *Oeil rouge douloureux avec baisse d'acuité visuelle : kératite aigue.* (En ligne). Site disponible sur : <http://www.chups.jussieu.fr/polys/ophtalmo/POLY.Chp.15.3.2.html>. (Page consultée en octobre 2009)
5. Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments et des Produits de Santé. *Collyres et autres topiques antibiotiques dans les infections oculaires superficielles.* 2004. (En ligne). Site disponible sur : http://www.afssaps.fr/var/afssaps_site/storage/original/application/d41597fabb7ab5cdf16e2c870397bf13.pdf (Page consultée en Novembre 2010)
6. Chiquet C, Romanet JP. *Prescrire les collyres fortifiés.* J Fr Ophtalmol. 2007; 30, (4), 423-430
7. Observatoire National Des Endophtalmies. *Prévention et clinique de l'endophtalmie.* (En ligne) Site disponible sur : http://www.snof.org/chirurgie/endophtalmie_2.html
8. Salvanet-Bouccara A, Forestier F, Coscas G, « et al. ». Groupe d'Etude Multicentrique des Endophtalmies. *Endophtalmies bactériennes. Résultats ophtalmologiques d'une enquête prospective multicentrique nationale.* J Fr Ophtalmologie. 1992, 15, (12) : 669-678.
9. Endophthalmitis Vitrectomy Study Group. *Results of the Endophthalmitis Vitrectomy Study A randomized trial of immediate vitrectomy and of intravenous antibiotics for the treatment of postoperative bacterial endophthalmitis.* Arch Ophthalmol. 1995 ; 113 : 1479-96.
10. Smith A. *Staphylococcus epidermidis.* (En ligne) American society for microbiology. Site disponible sur : <http://www.microbelibrary.org/Gram%20Stain/details.asp?id=2029> (Page consultée en novembre 2009)
11. Bron A. *Le traitement curatif des endophtalmies aiguës post chirurgicales.* J Fr Ophtalmologie. 1999; 22, (10), 1076-1083
12. Cornut PL, Chiquet C, *Injections intravitréennes d'antibiotiques et endophtalmies.* J Fr. Ophtalmologie, 2008; 31, (8), 815-823
13. Libert J, *Les endophtalmies chroniques.* Bull Soc Belge Ophtalmologie. 2001, 279, 61-65
14. Conseil de l'Europe. *Pharmacopée européenne 6.10.* Sixième édition 2010

15. Peyman GA, Sanders DR. *Management of endophthalmitis*. Trans Ophthalmol Soc N Z. 1977; 29 : 95-100
16. Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments et des Produits de Santé. *Bonnes Pratiques de Préparation* – 2007 Mars
17. Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments et des Produits de Santé *Bonnes Pratiques de Pharmacie Hospitalière*. 2001 Juin
18. Barbault S, Aymard G, Feldman D, « et al. ». *Etude de stabilité d'un collyre à la vancomycine à 50 mg/ml*, J Phar Clin. 1999, 18, (2), 183-9,
19. Article L5121-1 du Code de la Santé Publique, version en vigueur au 18 mars 2010. Site disponible sur : www.legifrance.gouv.fr (Page consultée en mars 2010)
20. Article R5126-8 du Code de la Santé Publique version en vigueur au 18 mars 2010. Site disponible sur : www.legifrance.gouv.fr (Page consultée en mars 2010)
21. Article R5126-9 du Code de la Santé Publique version en vigueur au 18 mars 2010. Site disponible sur : www.legifrance.gouv.fr (Page consultée en mars 2010)
22. Banque de Données Automatisée sur les Médicaments. *Vancomycine Chlorhydrate*. Site disponible sur : <http://www.biam2.org/www/Sub1954.html#is> (Page consultée en novembre 2009)
23. Davani S, Muret P, Royer B, « et al. ». *Intérêt du suivi thérapeutique pharmacologique des principaux antibiotiques*, Annales de Biologie Clinique. 2002, 60 (6), 655-61.
24. Kang J, Van Schepdael A, Roets E, « et al. ». *Analysis of vancomycin and related impurities by micellar electrokinetic capillary chromatography. Method development and validation*. Electrophoresis, 22 (12), 2588-2592
25. McGeer AJ, Low DE, *Vancomycin-resistant enterococci*. Semin Respir Infect 2000, 15, 314-26.
26. Esmaeli B, Holz ER, Ahmadi MA, « et al. ». *Endogenous endophthalmitis secondary to vancomycin-resistant enterococci infection*. Retina 2003; 23, 118-9
27. Trissel LA, Martinez JF, Gilbert D, *Data on file, Pharmaceutical Analysis Laboratory*. 1995 Aug.
28. Kwok AK, Hui M, Pang CP, « et al. ». *An in vitro study of ceftazidime and vancomycin concentrations in various fluid media: implications for use in treating endophthalmitis*. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2002; 43, (4), 1182-8
29. Pritts D, Hancock D. *Incompatibility of ceftriaxone with vancomycin*. Am J Hosp Pharm. 1991, 48, 77

30. Banque de données sur le médicament thériaque. Site disponible sur : http://www.theriaque.org/InfoMedicaments/home.cfm?menu_info_medicaments (Page consultée en novembre 2009)
31. Patel JA, Phillips GL. *Guide to physical compatibility of intravenous drug admixtures*. Am J Hosp Pharm 1966 ; 23, 409-11
32. Gan IM, Ugahary LC, Van Dissel JT , « et al. ». *Effect of intravitreal dexamethasone on vitreous vancomycin concentrations in patients with suspected postoperative bacterial endophthalmitis*. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2005 Nov; 243 (11), 1186-9
33. Laquarelle B, Balasat A, Bouquet S, Paris : 2004, Elsevier. *Suivi thérapeutique pharmacologique pour l'adaptation de posologie des médicaments*. p76-82
34. Cahane M, Ben Simon GJ, Barequet IS, « and al. ». *Human corneal stromal tissue concentration after consecutive doses of topically applied 3.3% vancomycin*. Br J Ophthalmol. 2004 Jan ; 88 (1), 22-4.
35. Fukuda M, Hanazome I, Sasaki K. *The intraocular dynamics of vancomycin hydrochloride ophthalmic ointment (TN-011) in rabbits*, J Infect Chemother. 2003 Mar; 9, (1), 93-6.
36. Kao JC, Geroski DH, Edelhauser HF. *Transscleral permeability of fluorescent-labeled antibiotics*, J Ocul Pharmacol Ther. 2005 Feb, 21,(1), 1-10
37. Coco RM, López MI, Pastor JC, « and al. ». *Pharmacokinetics of intravitreal vancomycin in normal and infected rabbit eyes*, J Ocul Pharmacol Ther. 1998 Dec, 14, (6), 555-63
38. Aguilar HE, Meredith TA, el-Massry A, « and al. ». *Vancomycin levels after intravitreal injection. Effects of inflammation and surgery*, Retina. 1995, 15, (5), 428-32
39. Park SS, Vallar RV, Hong CH, « and al. ». *Intravitreal dexamethasone effect on intravitreal vancomycin elimination in endophthalmitis*, Arch Ophthalmol. 1999 Aug, 117, (8), 1058-62
40. Coco RM, Lopez MI, Pastor JC. *Pharmacokinetics of 0.5 mg of a single and a multiple dose of intravitreal vancomycin in infected rabbit eyes*. J Ocul Pharmacol Ther. 2000 Aug, 16, (4), 373-81
41. Dictionnaire Vidal® 2010, Vancomycine Sandoz® 250 mg poudre pour solution pour perfusion.
42. Gan IM, van Dissel JT, Beekhuis WH, « and al. ». *Intravitreal vancomycin and gentamicin concentrations in patients with postoperative endophthalmitis*. Br J Ophthalmol. 2001 Nov, 85, (11), 1289-93.
43. Sautou-Miranda V, Libert F, Grand-Boyer A, « and al. ». *Impact of deep freezing on the stability of 25 mg/ml vancomycin ophthalmic solutions*, International Journal of Pharmaceutics 2002, 234, (1-2), 205-212

44. Fuhrman LC Jr, Stroman RT. *Stability of vancomycin in an extemporaneously compounded ophthalmic solution*, Am J Health Syst Pharm. 1998 Jul 1, 55, (13), 1386-8.
45. Arici MK, Sümer Z, Güler C « and al. ». *In vitro potency and stability of fortified ophthalmic antibiotics*, Aust N Z J Ophthalmol. 1999 Dec, 27, (6), 426-30
46. Chédru-Legros V, Fines-Guyon M, Chérel A, « and al. ». *Fortified antibiotic (vancomycin, amikacin and ceftazidime) eye drop stability assessment at -20 degrees C*, J Fr. Ophthalmol., 2007; 30 (8), 807-813
47. Itaru Furuta, Toshihiro Kitahashia « and al. ». *Rapid serum vancomycin assay by high-performance liquid chromatography using a semipermeable surface packing material column*, Clinica Chimica Acta, 2000 Nov, 301, (1-2), 31-39
48. Dictionnaire Vidal® 2010, Vancomycine Mylan® 250 mg poudre pour solution pour perfusion.
49. Dictionnaire Vidal® 2010, Balanced Salt Solution
50. Demir-Bas M. *Préparation des collyres en milieu hospitalier : évaluation des pratiques et étude de stabilité des collyres à l'amikacine*, Thèse d'exercice en pharmacie. Clermont-Ferrand : Université de Clermont-Ferrand, 2009, 95 p
51. Dobrinas M, Fleury-Souverain S, Sadeghipour F, « et al. ». *Stability of ophthalmic injections of ceftazidime vancomycin and dexamethasone in aqueous humor after freezing, storage and thawing*, university hospitals of geneva (Communication affichée)
52. Demi-bas M, Sautou-Miranda S, Montagner A, Chopineau J. *Enquête nationale sur les préparations ophtalmiques fabriquées dans les pharmacies à usage intérieur*. Hopipharm 2009, Communication affichée
53. MA.Yousfi, K.Morand, ML.Brandely, « and al. ». *Etude de stabilité des seringues de vancomycine et de ceftazidime destinées à la voie intravitréenne*, Communication affichée, APHIF 2006, XXVIII èmes journées d'études de pharmacie hospitalières
54. Achach K, Peroux E, *Solutions ophtalmiques renforcées en antibiotiques : étude de stabilité*, J Pharm Clin, 1999, 18, (1), 65-6
55. Lin JM, Tsai YY, Fu YL. *The Fixed Combination of Fortified Vancomycin and Amikacin Ophthalmic Solution-VA Solution: In Vitro Study of the Potency and Stability*. Cornea. 2005 Aug, 24, (6), 717-21
56. Lin CP, Tsai MC, Sun CY« and al. ». *Stability of self-prepared fortified antibiotic eyedrops* Kaohsiung J Med Sci. 1999 Feb, 15, (2), 80-6
57. Karampatakis V, Papanikolaou T, Giannousis M. « and al. ». *Stability and antibacterial potency of ceftazidime and vancomycin eyedrops reconstituted in BSS against Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus*. Acta Ophthalmol. 2009 Aug, 87, (5), 555-8

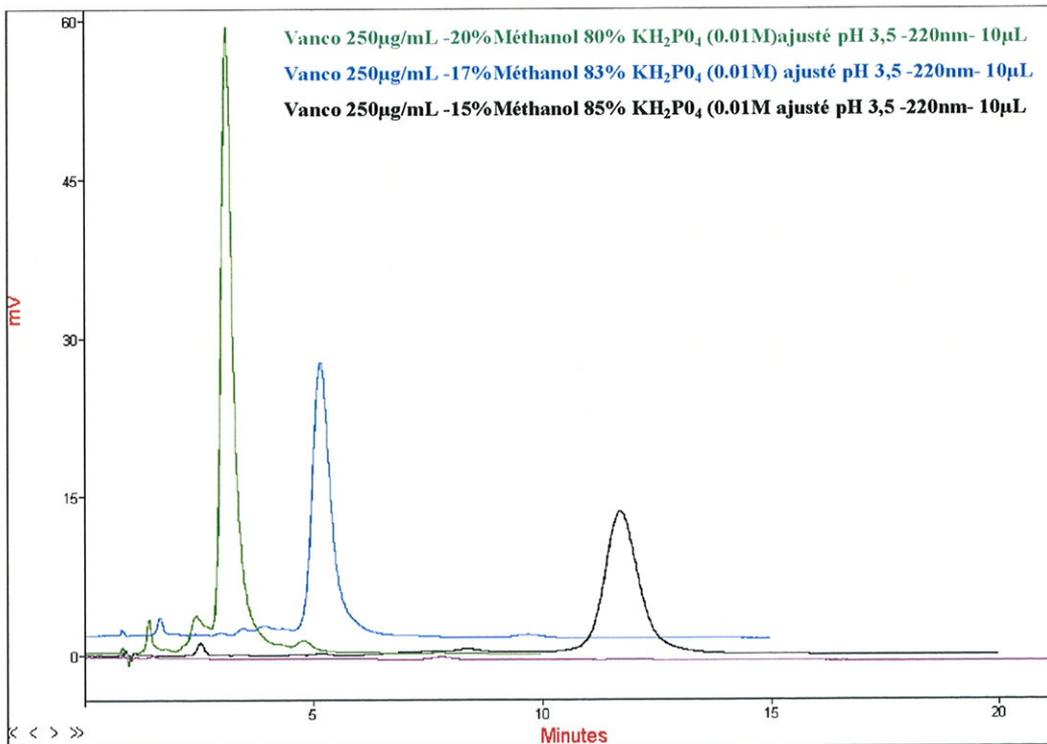
58. ICH Harmonised Tripartite Guideline. *Validation of analytical procedure. Text and methodology, Q2(R1)*, Nov 2005. (En ligne). Site disponible sur : www.ICH.org (Page consultée en février 2010)
59. International Conference on Harmonisation. *Guidance for Industry Q1A Stability Testing of New Drug Substances and Products*. 2004. Site disponible sur : www.ICH.org (Page consultée en février 2010)
60. International Conference on Harmonisation. *Guidance for Industry Q1E Evaluation of Stability Data*. 2004. Site disponible sur : www.ICH.org (Page consultée en février 2010)
61. Briere T. *Cours de chromatographie liquide* (En ligne). Site disponible sur : http://personnel.univ-reunion.fr/briere/CHROMATO/Cours_1/Cours%201.pdf (Page consultée en décembre 2009)
62. Trissel LA. *Drug stability and compatibility issues in drug delivery*. Handbook of injectable drugs, ASHP, 10th édition, 1998
63. 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 Jul, 43, (7), 1729-31
64. Galanti LM , Hecq JD, Vanbeckbergen D , « et al. ». *Long-term stability of vancomycin hydrochloride in intravenous infusions*, J Clin Pharm Ther. 1997 Oct-Dec, 22, (5-6), 353-6
65. Laroche L, Debuisson A, Montard M. *Chirurgie de la cataracte, solutions à usage intraoculaire*, Paris : Masson, 1996, p.130
66. Arné JL, Turut P, Amzallag T. *Chirurgie de la cataracte*. Paris: Masson, 2005, p.32-34

ANNEXES

ANNEXE 1: Mise au point de la méthode

Influence de la proportion de méthanol dans la phase mobile sur le temps de rétention de la vancomycine

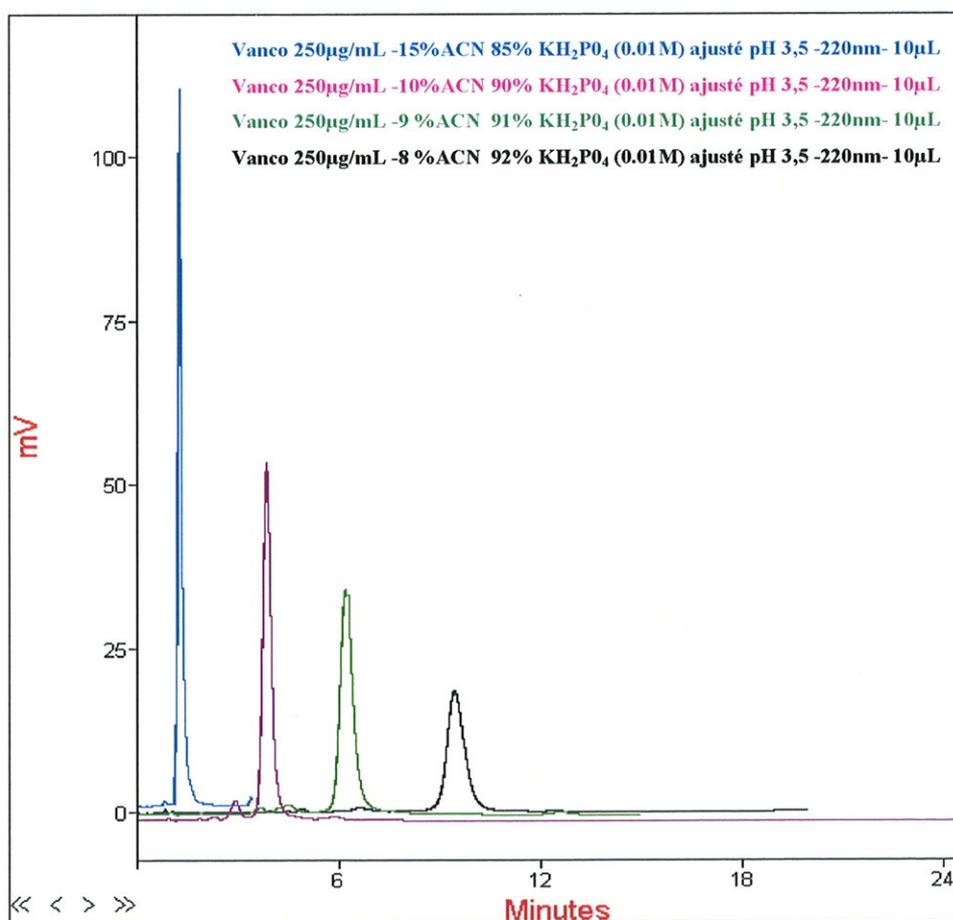
CONDITIONS OPERATOIRES :	
pH phase mobile ajusté à 3.5 Vancomycine diluée à 250 µg/mL dans de l'eau PPI au pH non modifié V. Injecté= 10µL	
20% méthanol + 80% H2KPO4 ajusté pH = 3.	Tr (vancomycine) = 3.2 min
17% méthanol + 23% H2KPO4 ajusté pH = 3.5	Tr (vancomycine) = 5.2 min
15 % méthanol + 85 % H2KPO4 ajusté pH =3.5	Tr (vancomycine) = 12 min



ANNEXE 2 : Mise au point de la méthode

Influence de la proportion d'acétonitrile dans la phase mobile sur le temps de rétention de la vancomycine

CONDITIONS OPERATOIRES :	
pH phase mobile ajusté à 3.5	
Vancomycine diluée à 250 µg/mL dans de l'eau PPI au pH non modifié	
V. Injecté= 10µL	
15 % acétonitrile + 85 % H2KPO4 ajusté pH = 3.5	Tr (vancomycine) = 1 min
10 % acétonitrile + 90 % H2KPO4 ajusté pH = 3.5	Tr (vancomycine) = 4min
9 % acétonitrile + 91 % H2KPO4 ajusté pH = 3.5	Tr (vancomycine) = 6 min
8 % acétonitrile + 92 % H2KPO4 ajusté pH = 3.5	Tr (vancomycine) = 10 min



ANNEXE 3 :

Préparation la phase mobile

La phase mobile utilisée en CPL est un mélange d'acétonitrile et de tampon phosphate H_2KPO_4 à 0.1M (8-92%, V/V) ajustée à pH =3.5.

La solution de tampon phosphate (KH_2P_04), est réalisée en ajoutant 1.36 g de KH_2P_04 dans un litre d'eau stérile (Fresenius®).

Le tampon phosphate est mélangé à l'acétonitrile suivant le rapport de proportion suivant : 92% de tampon et 8 % d'acétonitrile.

Le pH du mélange est ajusté à pH = 3.5 avec de l'acide chlorhydrique 1N sous contrôle du pH mètre Mettler Toledo.

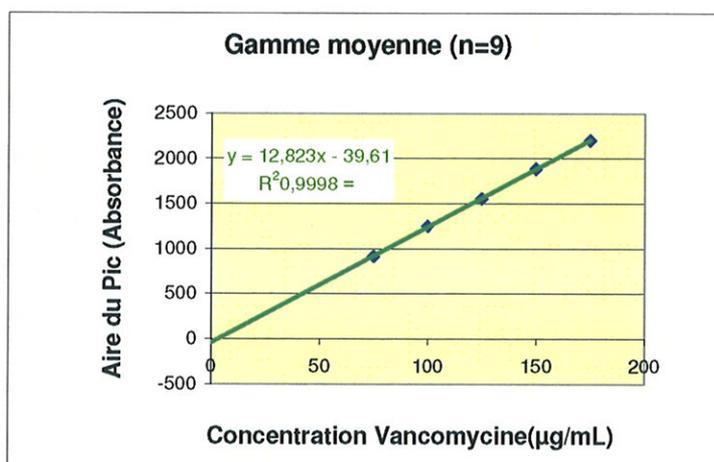
La solution est ensuite dégazée 10 minutes à l'aide d'un appareil à ultrason Bioblock®.

ANNEXE 4:

Linéarité de la méthode

Concentration théorique (ug/mL)		75	100	125	150	175
Aire du Pic	Gamme 1	916	1221	1515	1916	2200
	Gamme 2	906	1331	1564	1887	2063
	Gamme 3	929	1243	1518	1801	2214
	Gamme 4	887	1196	1518	1801	2176
	Gamme 5	863	1256	1552	1907	2259
	Gamme 6	931	1253	1655	1909	2203
	Gamme 7	933	1252	1552	1883	2180
	Gamme 8	955	1301	1569	1890	2296
	Gamme 9	928	1231	1568	1977	2241
Moyenne		916	1253	1556	1885	2203

Tableau de synthèse des gammes d'étalonnage



Droite moyenne de calibration

ANNEXE 5

Dosage des points de contrôle afin de déterminer la reproductible, la répétabilité et l'exactitude

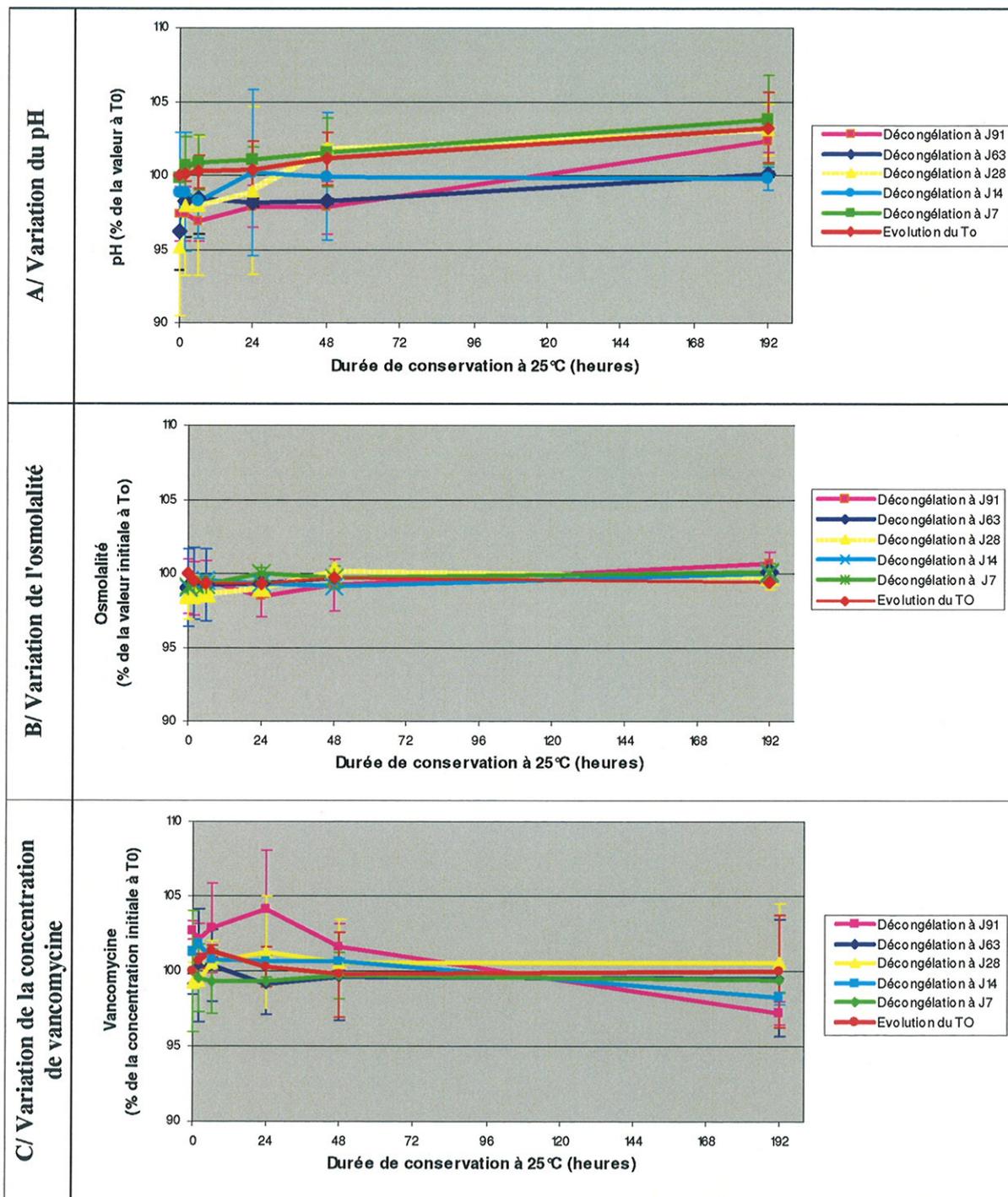
	[c] théorique µg/mL	aire	[c] / gamme moyenne (µg/mL)	exactitude (%)	moyenne [µg/mL]	écart-type	CV (%)	justesse (%)	moyenne exactitudes (%)	écart-type exactitudes
J1 : CONTROLES	87.5	1048	85.09	2.75	87.13	2.33	2.67	-0.42	2.04	1.5211
		1057	85.86	1.88						
		1128	91.50	4.57						
		1069	86.78	0.83						
		1081	87.74	0.27						
	1057	85.81	1.93							
	112.5	1418	114.74	1.99	113.31	1.44	1.27	0.72	1.27	0.5783
		1411	114.18	1.49						
		1395	112.90	0.35						
		1367	110.65	1.64						
		1407	113.86	1.21						
	1403	113.54	0.92							
	162.5	2044	164.90	1.48	163.66	2.53	1.54	0.71	1.29	1.0159
		2020	162.98	0.29						
		2008	162.02	0.30						
1985		160.17	1.43							
2038		164.42	1.18							
2076	167.47	3.06								
J2 : CONTROLES	87.5	1062	84.44	3.49	85.76	1.01	1.18	-1.99	1.99	1.1516
		1084	86.18	1.50						
		1071	85.16	2.68						
		1099	87.37	0.15						
		1082	86.03	1.68						
	1074	85.39	2.41							
	112.5	1397	110.95	1.38	111.68	1.57	1.41	-0.73	1.32	0.7065
		1386	110.08	2.16						
		1411	112.05	0.40						
		1442	114.51	1.78						
		1393	110.63	1.66						
	1409	111.89	0.54							
	162.5	2169	172.02	5.86	167.59	5.34	3.19	3.13	3.13	3.2875
		2221	176.13	8.39						
		2050	162.60	0.06						
2087		165.53	1.87							
2059		163.32	0.50							
2092	165.93	2.11								
J3 : CONTROLES	87.5	1111	88.34	0.96	86.87	2.38	2.75	-0.72	2.09	1.6700
		1114	88.58	1.23						
		1108	88.11	0.69						
		1114	88.58	1.23						
		1057	84.09	3.90						
	1050	83.53	4.53							
	112.5	1382	109.71	2.48	109.12	2.78	2.55	-3.00	3.00	2.4723
		1309	103.95	7.60						
		1386	110.03	2.20						
		1405	111.52	0.87						
		1401	111.21	1.15						
	1364	108.29	3.74							
	162.5	2197	173.97	7.06	163.68	6.72	4.11	0.73	3.31	2.1497
		2101	166.40	2.40						
		2106	166.80	2.64						
2032		160.96	0.95							
1960		155.29	4.44							
2003	158.68	2.35								

3 jours	[c] théorique (µg/mL)	Reproductibilité			Exactitude (%)		Répétabilité		Justesse	
		[c] moy (µg/mL)	écart-type	CV (%)	exactitude (%)	écart-type	CV (%)	écart-type	justesse (%)	écart-type
	87.5	86.59	1.98	2.29	2.04	1.38	2.20	0.89	-1.04	0.8304
	112.5	111.37	2.60	2.34	1.86	1.65	1.74	0.70	-1.00	1.8786
	162.5	164.98	5.21	3.16	2.58	2.39	2.95	1.30	1.52	1.3918

ANNEXE 6: Résultats Série 1

Solutions Intravitréennes à 10mg/mL : décongélation à l'eau chaude à J7, J14, J28, J63 et J91 et conservation 8 jours à 25°C

Evolution du pH (A), de l'osmolalité (B) et de la teneur en vancomycine (C) des intravitréennes par rapport à T₀,
(moyenne +/- intervalle de confiance à 95%)

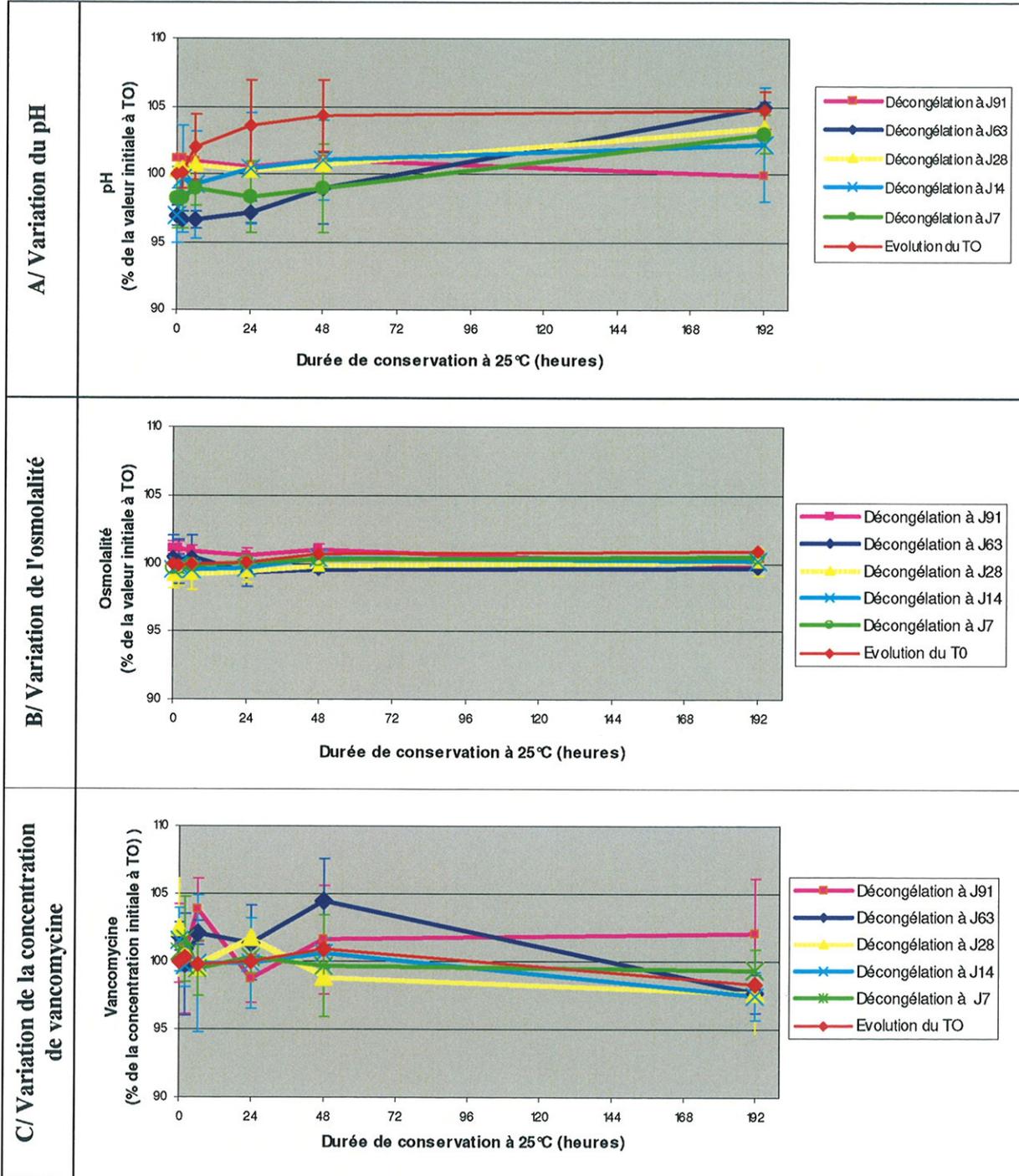


ANNEXE 7: Résultats Série 2

Solutions Intravitréennes à 10mg/mL : décongélation à 25°C à J7, J14, J28, J63 et J91 et conservation 8 jours à 25°C

Evolution du pH (A), de l'osmolalité (B) et de la teneur en vancomycine (C) des intravitréennes par rapport à T0,

(Moyenne +/- intervalle de confiance à 95%)

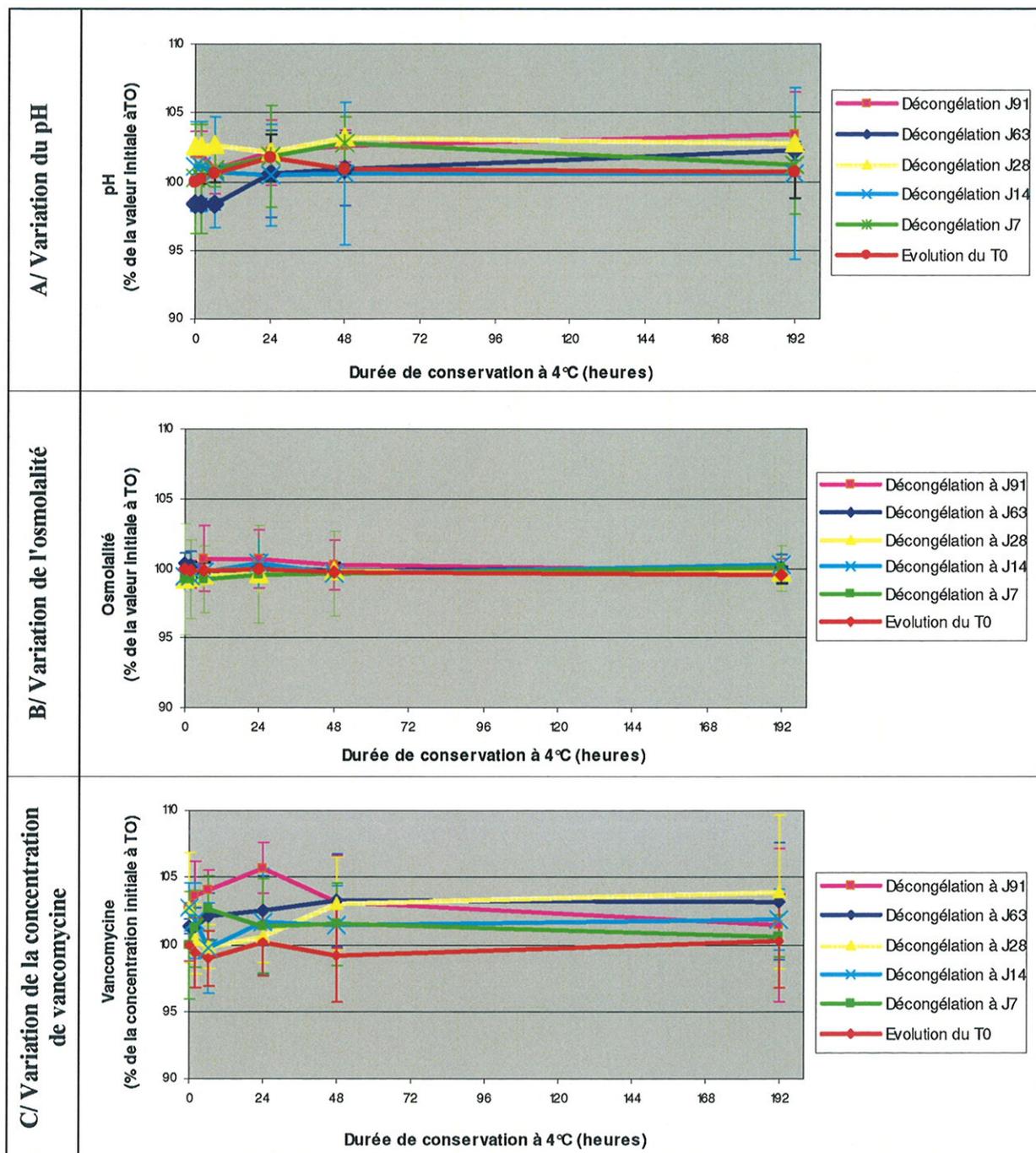


ANNEXE 8: Résultats Série 3

Solutions Intravitréennes à 10mg/mL : décongélation à 4°C à J7, J14, J28, J63 et J91 et conservation 8 jours à 4°C

Evolution du pH (A), de l'osmolalité (B) et de la teneur en vancomycine (C) des intravitréennes par rapport à T0, (moyenne

/- intervalle de confiance à 95%)

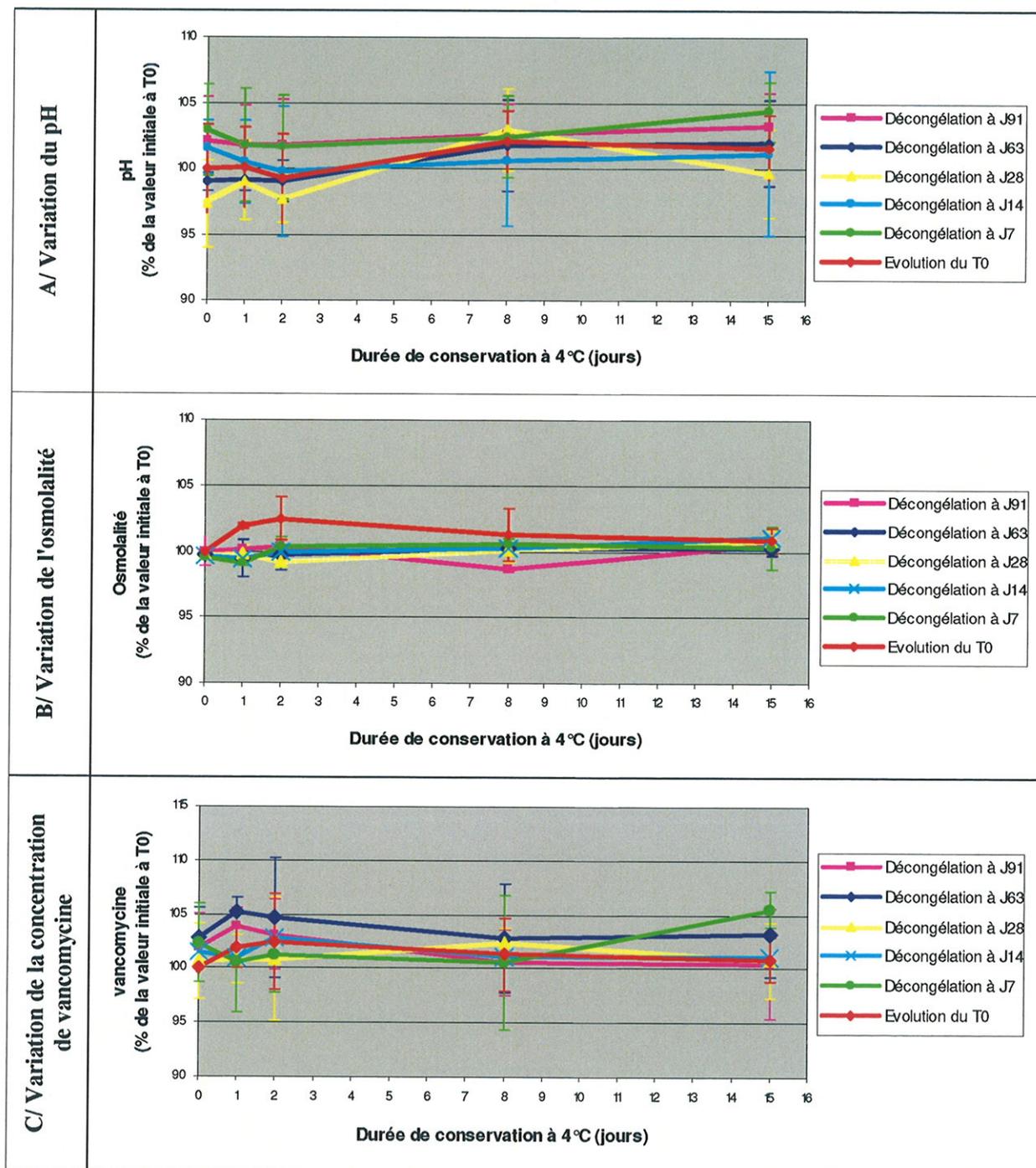


ANNEXE 9 : Résultats collyres

Collyres à 25 mg/mL : décongélation à 4°C à J7, J14, J28, J63 et J91 et conservation 15 jours à 4°C

Evolution du pH (A), de l'osmolalité (B) et de la teneur en vancomycine (C) des intravitréennes par rapport à T0, (moyenne

/- intervalle de confiance à 95%)



GLOSSAIRE DES ABREVIATIONS

BSS : Balanced Salt Solution

BGN : Bactérie Gram Négatif

BGP : Bactérie Gram Positif

C3G : Céphalosporine de troisième génération

CMB : Concentration Minimale Bactéricide

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CPL : Chromatographie en Phase Liquide

Eau PPI : Eau pour Préparation Injectable

PUI : Pharmacie à Usage Intérieur

RCP : Résumé des Caractéristiques du Produit

ZAC : Zone à Atmosphère Contrôlée

TABLE DES FIGURES

Figure 1 :	Anatomie de l'oeil	13
Figure 2 :	Endophtalmies (Photographies Pr Chiambaretta)	17
Figure 3 :	Staphylococcus epidermidis observé en coloration de Gram	18
Figure 4 :	Préparation du patient et injection intravitréenne	27
Figure 5 :	Structure moléculaire de la vancomycine	33
Figure 6 :	Action de la vancomycine au niveau de la paroi bactérienne	34
Figure 7 :	Produits de dégradation de la vancomycine	43
Figure 8 :	Type de conditionnement des collyres dans 15 centres hospitaliers.	45
Figure 9 :	Spectre d'absorption UV Visible d'une solution de vancomycine à 12.5 µg/mL	63
Figure 10 :	Influence du pH de la phase mobile sur la symétrie du pic	64
Figure 11 :	Influence de la nature du solvant apolaire sur le pic chromatographique	65
Figure 12 :	Influence du pH du solvant de dilution des échantillons sur le signal	67
Figure 13 :	Saturation du signal lors de la dilution de la vancomycine	67
Figure 14 :	Vancomycine diluée dans l'eau ou HCL 1N, éluée par une phase mobile polaire	68
Figure 15 :	Chromatogramme d'une solution de vancomycine à 125 µg/mL	69
Figure 16 (A-B-C-D) :	Essais de dégradation de la vancomycine	71
Figure 17 :	Solution intravitréenne après décongélation à l'eau chaude	74
Figure 18 :	Recherche des produits de dégradation après décongélation à l'eau chaude (Série 1)	81
Figure 19 :	Recherche des produits de dégradation après décongélation à l'eau chaude et conservation 48 heures à 25°C (Série 1)	82
Figure 20 :	Recherche des produits de dégradation après décongélation à l'eau chaude et conservation 8 jours à 25°C (Série 1)	83
Figure 21 :	Recherche des produits de dégradation après décongélation à 25 °C, et conservation 48 heures à 25°C (Série 2)	84
Figure 22 :	Recherche des produits de dégradation après décongélation à 25°C et conservation 8 jours à 25°C (Série 2)	85
Figure 23 :	Recherche des produits de dégradation après décongélation à 4°C et conservation 8 jours à 4°C (Série 3)	86
Figure 24 :	Recherche des produits de dégradation dans les collyres	92

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Exigences de la Pharmacopée Européenne relatives aux solutions pour collyres ou pour injection intravitréennes	32
Tableau 2 : pH et osmolalité (mOsmol/kg) des solutions de vancomycine	45
Tableau 3 : Synthèse des études de stabilité réalisées sur les solutions ophtalmiques de vancomycine	48
Tableau 4 : Synthèse des contrôles réalisés sur les solutions intravitréennes	62
Tableau 5 : Synthèse des contrôles réalisés sur les collyres	62
Tableau 6 : Synthèse des paramètres chromatographiques retenus	69
Tableau 7 : Modalités de dilution pour obtenir les points de gamme et de contrôle	72
Tableau 8 : Précision et exactitude de la méthode chromatographique	73
Tableau 9 : Résultats du comptage particulaire dans les solutions intravitréennes de vancomycine	75
Tableau 10 : Evolution du pH des solutions intravitréennes après décongélation, en fonction des modalités de décongélation et de conservation	76
Tableau 11 : Evolution de l'osmolalité des solutions intravitréennes après décongélation, en fonction des modalités de décongélation et de conservation	78
Tableau 12 : Evolution de la concentration en vancomycine des solutions intravitréennes après décongélation, en fonction des modalités de décongélation et de conservation	80
Tableau 13 : Evolution du pH des collyres après décongélation 4°C, puis conservation 15 jours 4°C	88
Tableau 14 : Evolution de l'osmolalité des collyres après décongélation 4°C, puis conservation 15 jours 4°C	89
Tableau 15 : Evolution de la concentration en vancomycine des collyres, après décongélation 4°C, puis conservation 15 jours 4°C	91

TABLE DES MATIERES

SOMMAIRE	4
REMERCIEMENTS	6
INTRODUCTION	9
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	11
<i>I. ANATOMIE DE L'OEIL</i>	12
A. Les parois oculaires.....	12
B. Les milieux transparents.....	13
<i>II. PATHOLOGIES OCCULAIRES BACTERIENNES</i>	14
A. Les kératites bactériennes.....	14
1) Etiologie.....	14
2) Critères de gravité.....	15
3) Germes impliqués.....	15
4) Evolution.....	15
5) Stratégie thérapeutique.....	16
B. Endophtalmies bactériennes.....	17
1) Définition.....	17
2) Endophtalmie infectieuse aiguë.....	18
3) Les endophtalmies retardées ou chroniques.....	22
<i>III. COLLYRES ET SOLUTIONS INTRAVITREENNES FORTIFIEES AUX ANTIBIOTIQUES</i>	24
A. Les collyres fortifiés aux antibiotiques.....	24
1) Définition.....	24
2) Pharmacocinétique.....	25
3) Facteurs de tolérance.....	26

B.	Solutions Intravitréennes	27
1)	Définition	27
2)	Pharmacocinétique.....	28
3)	Facteurs de tolérance	29
C.	Deux formes galéniques hospitalières.....	30
1)	Modalités de fabrication	30
2)	Statut de la préparation	31
3)	Exigence de la pharmacopée.....	32
IV.	<i>COLLYRES ET SOLUTIONS INTRAVITREENNES A LA VANCOMYCINE</i>	33
A.	Structure de la vancomycine	33
B.	Mécanisme d'action de la vancomycine	34
C.	Spectre bactérien de la vancomycine	35
D.	Propriétés physicochimiques de la vancomycine.....	35
1)	Solubilité.....	35
2)	Compatibilité	35
3)	Incompatibilités	36
E.	Pharmacocinétique de la vancomycine	37
1)	Administration orale	37
2)	Administration intraveineuse	37
3)	Administration topique de collyres	38
4)	Administration intravitréenne	38
F.	Posologies de la vancomycine	39
1)	Voie Intraveineuse	39
2)	Intravitréennes	39
3)	Collyres.....	40
G.	Toxicité de la vancomycine	41
1)	Toxicité par voie générale.....	41
2)	Toxicité locale.....	42
H.	Dégradation de la vancomycine.....	43
I.	Formulation des collyres et des solutions intravitréennes a la vancomycine	44
1)	Solvants.....	44
2)	Conditionnement.....	45
V.	<i>ETUDES DE STABILITE DES PREPARATIONS OPHTALMIQUES DE VANCOMYCINE : REVUE CRITIQUE</i>	46

**PARTIE EXPERIMENTALE : STABILITE APRES CONGELATION DES
INTRAVITREENNES A 10MG-ML ET DES COLLYRES A 25MG-ML DE
VANCOMYCINE. 49**

<i>I. MATERIEL</i>	50
A. Matières premières.....	50
1) Vancomycine	50
2) Solvant de reconstitution de la vancomycine.....	50
3) Réactifs pour dosage chromatographique	50
4) Conditionnement.....	50
B. Appareillage.....	51
1) Examen visuel.....	51
2) Mesure de la contamination particulaire	51
3) Mesure de l'osmolalité.....	51
4) Mesure du pH	51
5) Analyse chromatographique	51
6) Enceinte climatique.....	51
 <i>II. METHODOLOGIE DE L'ETUDE</i>	 52
A. Préparation des collyres et des solutions intravitréennes	52
B. Conditions de conservation testées	53
1) Conditions de conservation des intravitréennes à 10 mg/mL.....	53
2) Conditions de conservation des collyres à 25 mg/mL.....	53
C. Prélèvements des échantillons	53
D. Analyse des échantillons.....	54
1) Contrôle visuel des solutions	54
2) Recherche des particules non visibles.....	54
3) Mesure du pH	55
4) Mesure de l'osmolalité.....	55
5) Analyse chromatographique	55
6) Contrôle de stérilité.....	61
7) Synthèse des contrôles réalisés	62
 <i>III. RESULTATS ET DISCUSSION</i>	 63
A. Mise au point de la méthode chromatographique	63
1) Optimisation des paramètres chromatographiques	63
2) Validation de la méthode d'analyse	70

B. Résultats de l'étude de stabilité.....	74
1) Solutions intravitréennes.....	74
2) Collyres.....	87
C. Discussion.....	93
CONCLUSION.....	98
BIBLIOGRAPHIE.....	100
ANNEXES.....	106
GLOSSAIRE DES ABREVIATIONS.....	116
TABLE DES FIGURES.....	117
TABLE DES TABLEAUX.....	118
TABLE DES MATIERES.....	119

SERMENT DE GALIEN

Je jure en présence de mes Maîtres de la Faculté et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

De ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères, si j'y manque.

BON A IMPRIMER N° 3308

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE

Vu, le Doyen de la Faculté

VU et PERMIS D'IMPRIMER

LE PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ

**PREPARATIONS OPHTALMIQUES A LA VANCOMYCINE :
INTERET THERAPEUTIQUE ET ETUDE DE STABILITE**

RESUME

La pharmacie à usage intérieur du CHU de Clermont-Ferrand réalise, sous le statut de préparation magistrale, des solutions ophtalmiques à la vancomycine: collyres renforcés 25 mg/mL et solutions intravitréennes à 10 mg/mL. Ces solutions antibiotiques sont utilisées dans le traitement des kératites et des endophtalmies bactériennes. Afin d'optimiser la prise en charge de ces urgences ophtalmologiques qui menacent le pronostic visuel, la PUI souhaite déclarer les solutions ophtalmiques à la vancomycine sous le statut de préparation hospitalière et disposer d'un stock permanent.

La congélation semble un mode de conservation intéressant, mais les données de stabilité décrites dans la littérature ne sont pas adaptées à notre mode de fabrication et sont incomplètes.

Ce travail a consisté à évaluer l'impact des modalités de décongélation et de conservation sur la stabilité des solutions de vancomycine à 10 mg/ml et 25 mg/mL dans du chlorure de sodium. L'analyse de paramètres microbiologiques, physiques, et chimiques (mise au point d'une méthode de dosage de la vancomycine « stability indicating »), a permis de déterminer leur durée de péremption après décongélation.

Nous avons montré que les collyres et les solutions intravitréennes sont stables après 3 mois de congélation à -20°C. La durée de péremption des solutions intravitréennes après décongélation et conservation à 25°C est de 48 heures, et de 8 jours après décongélation et conservation à 4°C. La durée de péremption des collyres est de 15 jours après décongélation et conservation à 4°C.

La congélation des solutions de vancomycine en facilitera la dispensation en urgence, en particulier lors des horaires de garde de la pharmacie.

DISCIPLINE

PHARMACIE : DES PHARMACIE HOSPITALIERE ET DES COLLECTIVITES

MOTS CLES

- Vancomycine
- Collyres fortifiés
- Solutions intravitréennes,
- Préparation hospitalière
- Stabilité
- Conservation

INTITULE ET ADRESSE DE L'UFR OU DU LABORATOIRE

Laboratoire de Pharmacie Clinique et Biotechniques
UFR Pharmacie de Clermont-Ferrand
Place Henri Dunant, 63000 Clermont-Ferrand