

Année universitaire 2012-2013

THÈSE

pour le

DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

par

LAUNAY Aurélie

N e le 31 Octobre 1988   Mayenne

soutenue publiquement le 6 Mai 2013

**Médicaments et Oncopédiatrie : Amélioration des conditions de
conservation et de dispensation de la solution buvable de
méthotrexate dosée à 2 mg/mL réalisée au CHU d'Angers**

JURY :

Président :	Monsieur le Professeur Frédéric LAGARCE
Directeur :	Madame le Docteur Sandy VRIGNAUD
Co-Directeur :	Monsieur le Professeur Frédéric LAGARCE
Membres :	Madame le Docteur Marie KEMPF
	Madame le Docteur Brigitte PECH



ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussigné (e) Launay Aurélie,
déclare être pleinement conscient(e) que le plagiat de documents ou d'une partie d'un document publiés sur toutes formes de support, y compris l'internet, constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée. En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées pour écrire ce rapport ou mémoire.

Signature :

Cet engagement de non plagiat doit être inséré en première page de tous les rapports, dossiers, mémoires.

Liste des enseignants

Année Universitaire 2012-2013

PROFESSEURS

BENOIT Jean-Pierre

BOUET Gilles

BOURY Franck

CALENDA Alphonse

DUVAL Olivier

FOUSSARD Françoise

JARDEL Alain

MAHAZA Chetaou

MARCHAIS Véronique

MAURAS Geneviève

MAURAS Yves

PASSIRANI Catherine

RICHOMME Pascal

ROBERT Raymond

SAULNIER Patrick

SERAPHIN Denis

VENIER Marie-Claire

Disciplines

Pharmacotechnie

Chimie Physique Générale et Minérale

Biophysique

Biologie Moléculaire - Biotechnologie

Chimie Thérapeutique

Biochimie Générale et Clinique

Physiologie

Bactériologie - Virologie

Bactériologie et Virologie

Biologie Cellulaire

Toxicologie

Chimie générale – Chimie analytique

Pharmacognosie

Parasitologie et Mycologie médicale

Biophysique pharmaceutique et biostatistiques

Chimie Organique

Pharmacotechnie

MAITRES DE CONFERENCES

ANNAIX Véronique

BASTIAT Guillaume

BAGLIN Isabelle

BATAILLE Nelly

BENOIT Jacqueline

CLÈRE Nicolas

CORVEZ Pol

DERBRE Séverine

Disciplines

Biochimie Générale et Clinique

Biophysique pharmaceutique et biostatistiques

Pharmaco - Chimie

Biologie Cellulaire et Moléculaire

Pharmacologie et Pharmacocinétique

Pharmacologie

Sémiologie

Pharmacognosie

MAITRES DE CONFERENCES

DUBREUIL Véronique
ÉVEILLARD Matthieu
FAURE Sébastien
FLEURY Maxime
GALLAND Françoise
GIRAUD Sandrine
GUILLET David
HELESBEUX Jean-Jacques
JOLIVET Jean-Paul
KHAN Mustayeen
LAGARCE Frédéric
LANDREAU Anne
LARCHER Gérald
LE RAY Anne-Marie
LICZNAR Patricia
MALLET Marie-Sabine
MAROT Agnès
MILTGEN-LANCELOT Caroline

NAIL BILLAUD Sandrine
OGER Jean-Michel
PECH Brigitte
SCHINKOVITZ Andréas
TRICAUD Anne

A.H.U.

SPIESSER-ROBELET Laurence

PRAG (Professeurs Agrégés)

HANOTTE Caroline
ROUX Martine

***PRCE (Professeurs certifiés affectés dans
l'enseignement supérieur)***

GENARD Nicole
LECOMTE Stéphane

Disciplines

Chimie Analytique
Bactériologie - Virologie
Pharmacologie Physiologie
Immunologie
Biophysique
Biologie moléculaire et cellulaire
Chimie Analytique
Chimie Organique
Biophysique
Chimie Générale et Minérale
Pharmacotechnie-Biopharmacie
Botanique
Biochimie Générale et Clinique
Valorisation des substances naturelles
Bactériologie - Virologie
Chimie Analytique et Bromatologie
Parasitologie et Mycologie médicale
Management et gestion des organisations
de santé
Immunologie
Chimie
Pharmacotechnie
Pharmacognosie
Biologie Cellulaire

Disciplines

Pharmacie clinique et Éducation Thérapeutique

Disciplines

Economie – Gestion
Espagnol

Anglais
Anglais

Remerciements

En premier lieu, je tiens à adresser mes plus chaleureux remerciements au Dr Sandy Vrignaud, Assistante Spécialiste des Hôpitaux, qui a accepté de diriger mon travail. Merci d'avoir su m'aiguiller, me conseiller et me donner la motivation pour cette thèse. Je tiens à la remercier également pour la disponibilité dont elle a fait preuve à mon égard.

Je tiens à remercier le Pr Frédéric Lagarce, Professeur des Universités à l'Université d'Angers et Praticien Hospitalier au CHU d'Angers, pour avoir accepté la co-direction de cette thèse, pour m'avoir confié l'étude expérimentale et également pour son aide et ses conseils dans la réalisation de cette étude. Je le remercie également d'avoir accepté la présidence du jury de thèse.

J'adresse également mes plus sincères remerciements aux personnes qui m'ont aidé dans la réalisation de ce travail : je pense tout particulièrement à Mme Christine Truffaut, technicienne au laboratoire de contrôle, aux préparatrices de la pharmacie du CHU d'Angers, plus particulièrement à Eulalie. Je tiens à les remercier également pour leur accueil chaleureux au sein de la pharmacie du CHU d'Angers.

Merci au Dr Marie Kempf pour son aide dans la réalisation de l'étude bactériologique mais aussi pour avoir accepté de faire partie du jury de thèse. Je remercie également les étudiants du laboratoire de bactériologie du CHU d'Angers.

Je remercie le personnel de l'unité Micro et Nanomédecines Biomimétiques (MINT) UMR-S 1066 de l'INSERM, dirigée par le Pr Jean-Pierre Benoit. Je tiens à remercier en particulier Anne-Laure Laine qui m'a apporté son aide lors de réalisation de mesures.

Je souhaite remercier le Dr Brigitte Pech, Maître de Conférences à l'Université d'Angers, d'avoir porté un intérêt à ce travail et de participer à son évaluation en ayant accepté d'être membre du jury de thèse.

Je souhaite remercier tout particulièrement Romain pour son soutien et sa patience pendant ces années d'études.

Je remercie toutes les personnes qui ont été à mes côtés et qui m'ont soutenue pendant ces six années d'études, je pense à mes amis : Amélie, Clémence, Marie-Elise, Marine G., Marine V., Matthieu. Je remercie également Julie sans qui je n'en serais sûrement pas là aujourd'hui. J'adresse mes remerciements les plus sincères à mon binôme, Maxime.

Enfin, je remercie ceux sans qui je n'aurais pas pu réaliser tout cela, mes parents, Florence et Gaston Launay, et ma sœur Ophélie. Merci pour votre soutien pendant ces longues années, surtout lors des moments de doute, vous m'avez sincèrement aidé à continuer sur cette voie.

Sommaire

Liste des abréviations.....	10
I. Introduction	12
A. La leucémie aiguë lymphoblastique.....	15
1. Définition.....	15
2. Epidémiologie de la LAL.....	16
3. Facteurs de risque de LAL.....	16
4. Signes cliniques et diagnostic de la LAL.....	16
5. Survie après une LAL	18
6. Le protocole FRALLE et l'utilisation du MTX administré à faible dose	18
B. Le principe actif de la préparation : le méthotrexate	21
1. Présentation de la molécule.....	21
2. Propriétés physicochimiques de la molécule de MTX.....	23
3. Mécanisme d'action	24
4. Pharmacocinétique	28
5. Effets secondaires	32
6. Surveillance spécifique pendant le traitement	33
7. Contre-indications et interactions médicamenteuses	33

8. Administration lors de la grossesse ou de l'allaitement.....	34
C. Législation des préparations réalisées en milieu hospitalier	35
D. Objectifs et démarche de l'étude réalisée	37
II. Matériels et méthodes.....	42
1. Matériel.....	42
2. Méthode pour l'étude de la stabilité chimique.....	44
3. Méthode pour l'étude de la stabilité bactériologique	52
4. Méthode pour l'étude du pH de la solution buvable	56
III. Résultats - Discussion	57
1. Caractères organoleptiques de la solution.....	57
2. Résultats de l'étude de stabilité chimique	59
3. Résultats de l'étude bactériologique.....	70
4. Résultats de l'étude du pH de la solution buvable.....	72
IV. Conclusion.....	74
Bibliographie	75
Annexes.....	80
Annexe 1 : Schéma général du protocole FRALLE 2000-A.....	81
Annexe 2 : Protocole FRALLE 2000-A – Consolidation (groupe A1)	82
Annexe 3 : Protocole FRALLE 2000-A – Interphase (groupe A1)	83

Annexe 4 : Protocole FRALLE 2000-A – Traitement d’entretien (groupe A1).....	84
Annexe 5 : Protocole FRALLE 2000-BT – Schéma général pour le groupe B	85
Annexe 6 : Protocole FRALLE 2000-BT – Schéma général pour le groupe T.....	86
Annexe 7 : Fiche de fabrication des solutions buvables pour l’étude de la stabilité chimique	87
Annexe 8 : Préparation du tampon phosphate pour l’étude HPLC	91
Annexe 9 : Fiche de fabrication des solutions buvables contenant du méthotrexate pour l’étude de stabilité bactériologique	92
Annexe 10 : Fiche de fabrication des solutions buvables ne contenant pas de méthotrexate pour l’étude de stabilité bactériologique	93

Liste des abréviations

7-OH-MTX : 7-hydroxy-méthotrexate

AINS : Anti-inflammatoire Non Stéroïdien

AMM : Autorisation de mise sur le marché

ANSM : Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé

BPP : Bonnes Pratiques de Préparation

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

CLHP : Chromatographie en phase liquide à haute performance

CSP : Code de la Santé Publique

DAMPA : acide 2,4-diamino-N¹⁰-méthylptéroïque

DHF ou FH₂ : Acide dihydrofolique

DHFR : Dihydrofolate réductase

DLU : Date limite d'utilisation

EEN : Excipient à effet notoire

FPGS : Folylpolylglutamate synthase

HPLC : Chromatographie en phase liquide à haute performance

ICH : International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use

LAL : Leucémie aiguë lymphoblastique

LOD : Limite de détection

LOQ : Limite de quantification

MTX : Méthotrexate

NFS : Numération Formule Sanguine

PDCO : Paediatric Committee (Comité européen pédiatrique)

Ph.Eur. : Pharmacopée Européenne

PUI : Pharmacie à Usage Intérieur

PH : Préparation Hospitalière

PIP : Plan d'investigation pédiatrique

PM : Préparation Magistrale

PPI : Pour Préparation Injectable

SFCE : Société Française de lutte contre les Cancers et leucémies de l'Enfant et de l'adolescent

THF ou FH₄ : Acide tétrahydrofolique

TS : Thymidylate synthase

I. Introduction

Une réglementation européenne visant à faciliter le développement et l'accès aux médicaments adaptés aux enfants est entrée en vigueur en janvier 2007. Elle stipule l'obligation des firmes pharmaceutiques de déposer un plan d'investigation pédiatrique (PIP) auprès du comité européen pédiatrique (PDCO) lors d'une nouvelle demande d'Autorisation de mise sur le marché (AMM) ou lorsqu'une modification de l'AMM est proposée pour une spécialité pharmaceutique déjà autorisée (ex : nouvelle forme pharmaceutique, voie d'administration). Malheureusement, malgré l'existence de telles mesures, il n'existe toujours pas assez de médicaments ayant une forme galénique satisfaisante pour l'administration chez l'enfant.

La solution buvable de méthotrexate (MTX) dosée à 2mg/mL a été mise au point afin de répondre à une demande des médecins du service d'oncopédiatrie, qui souhaitaient l'élaboration d'une forme buvable de MTX. Elle est utilisée dans le cadre du traitement de la leucémie aiguë lymphoblastique (LAL).

En effet, une forme pharmaceutique destinée à la voie orale possède de nombreux avantages. L'administration est facilitée et mieux acceptée par les enfants : celle-ci n'est pas douloureuse, il n'y a pas d'effraction de la barrière cutanée et donc pas de risque infectieux. Cette voie d'administration est également plus économique. Ainsi, la présence de personnel qualifié pour l'administration n'est pas nécessaire, celle-ci pouvant être réalisée par les parents.

Comme dans le cas de la majorité des cytotoxiques, la dose de MTX à administrer est calculée en fonction de la surface corporelle du patient. Dans le protocole FRALLE, protocole de traitement utilisé dans le cas des leucémies, celle-ci est calculée à partir de la formule

suivante : $SC = \sqrt{\frac{\text{Poids} \times \text{taille}}{3600}}$ avec SC correspondant à la surface corporelle en m², la taille étant exprimée en centimètres et le poids en kilogrammes. Considérons un garçon de 4 ans atteint de LAL, mesurant 1 m et pesant 16 kg (taille et poids moyen pour un garçon de 4 ans). Sa surface corporelle est donc de 0,67 m² environ.

Dans le cas du traitement par le protocole FRALLE, le méthotrexate par voie orale est administré à la dose de 25 mg/m²/prise. La dose devant être administrée au jeune garçon pris en exemple ci-dessus est de 16,75 mg. Actuellement, les spécialités administrables par voie orale possédant l'AMM pour le traitement des LAL sont des comprimés contenant 2,5 mg de MTX. Le patient devrait donc prendre 6,7 comprimés dosés à 2,5 mg. On imagine mal un enfant de cet âge avaler autant de comprimés, d'autant plus que l'âge indiqué pour la prise de comprimés est de 6 ans. Avant cet âge, le risque de fausse route est trop important. De plus, l'exactitude de la dose n'est pas garantie : soit celle-ci est plus élevée que prévue (dans le cas où l'on donnerait 7 comprimés) ou alors plus faible (dans le cas où l'on en donnerait 6 ou 6,5). Par ailleurs, si une section de comprimés était envisagée, la dose administrée serait approximative, la section de comprimés ne permettant pas d'aboutir à une dose précise et reproductible. Il n'est pas donc possible d'ajuster la dose précisément si la forme galénique choisie pour le traitement est un comprimé.

Une solution buvable a donc été mise au point par la pharmacie du Centre hospitalier universitaire (CHU) d'Angers en 2010 [1]. La mise à disposition de telles formes adaptées pour les enfants évite également certaines dérives qui pouvaient avoir lieu comme l'écrasement des comprimés et l'utilisation de formes galéniques non-adaptés à la voie orale, comme par exemple l'utilisation de solutions injectables sans se soucier du pH des solutions ou de la présence d'excipients non adaptés pour la voie orale [2].

Le travail réalisé ici a pour but final l'amélioration du confort du patient. Pour cela, il est nécessaire d'améliorer les conditions de dispensation du médicament. Il s'agit d'un tra-

vail multidisciplinaire : en effet, il fait appel à des connaissances de chimie, mais également de bactériologie et de droit pharmaceutique pour ce qui concerne la législation de ces préparations.

Le travail réalisé ici sera présenté en deux parties.

Dans une première partie, une étude bibliographique permettra de s'intéresser à la leucémie aiguë lymphoblastique, au principe actif de la solution buvable, c'est-à-dire le méthotrexate et enfin à la législation des préparations réalisées en milieu hospitalier.

Dans une seconde partie, l'étude expérimentale réalisée sera exposée : les objectifs et la démarche de cette étude, les matériels et méthodes utilisés, les résultats obtenus lors des expérimentations et la discussion de ceux-ci.

A. La leucémie aiguë lymphoblastique

1. Définition

La leucémie aiguë est une hémopathie maligne qui se manifeste par une prolifération de cellules clonales à partir de précurseurs de cellules sanguines bloqués à un stade précoce de leur différenciation. Ces cellules sont appelées « blastes » [3].

La leucémie aiguë lymphoblastique (LAL) concerne la lignée lymphocytaire. Il y a donc une accumulation des précurseurs des lymphocytes B et/ou T.

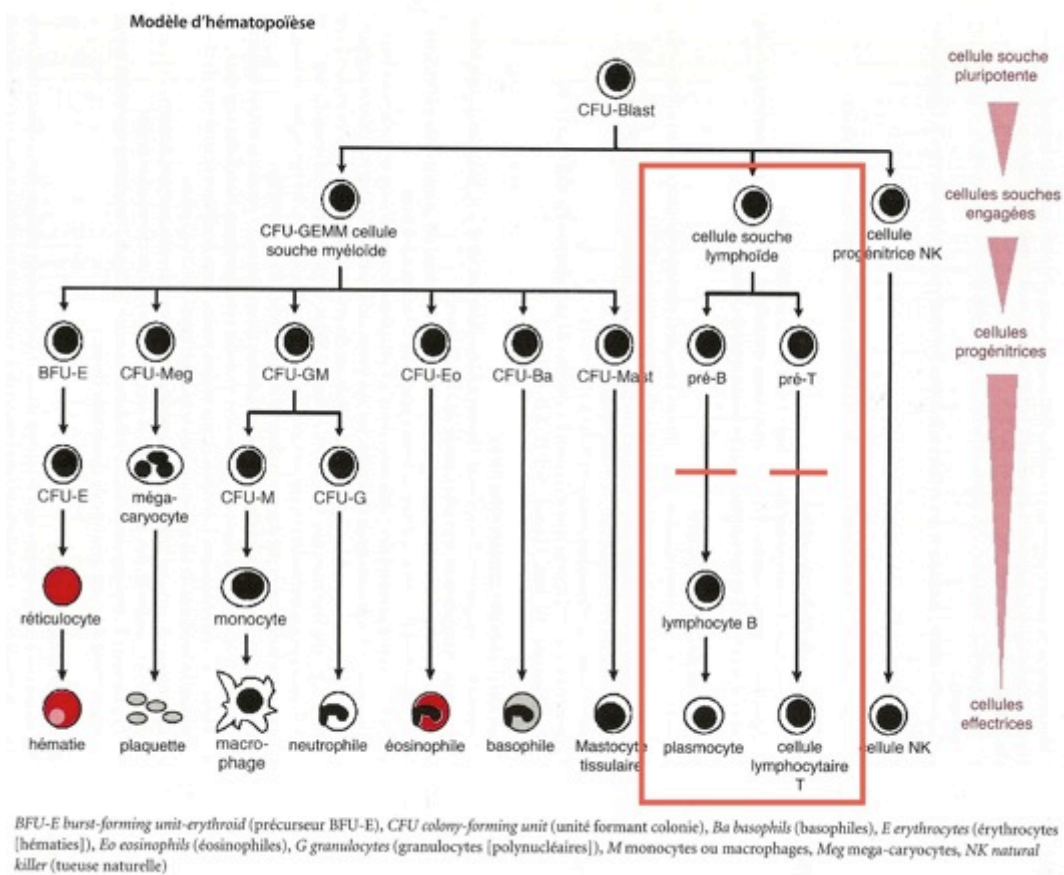


Figure 1 : Hématopoïèse normale et modifications dans la LAL
D'après : [4]

2. Epidémiologie de la LAL

Les leucémies aiguës sont les cancers les plus fréquents chez l'enfant et les LAL représentent environ 80% des cas de leucémies aiguës. Les leucémies aiguës de type B représentent 80% à 85% des cas de LAL [5].

Les LAL de type B ont un pic d'incidence situé entre 2 et 5 ans, contrairement aux LAL de type T qui ont un pic d'incidence plus tard, vers l'adolescence. Les garçons sont plus touchés que les filles et ce quel que soit le type de LAL. L'incidence des LAL a augmenté lors des 20 dernières années [3].

3. Facteurs de risque de LAL

Plusieurs facteurs de risque ont pu être mis en évidence. Ainsi, les personnes présentant des anomalies génétiques comme la trisomie 21, des anomalies de réparation de l'ADN ou les personnes atteintes du syndrome de Li-Fraumeni (anomalie constitutionnelle du gène suppresseur de tumeur p53) possèdent un risque plus élevé de développer une leucémie aiguë lymphoblastique.

Additionnés à ces facteurs génétiques, il existe également des facteurs environnementaux : l'exposition aux radiations ionisantes et non ionisantes, l'exposition à certains toxiques [6].

4. Signes cliniques et diagnostic de la LAL

Signes cliniques

Les signes cliniques ne sont pas considérés comme étant « caractéristiques ». Il est néanmoins possible de noter la présence de signes liés à l'insuffisance médullaire et/ou de signes tumoraux.

Les signes de l'insuffisance médullaire sont liés à la diminution des cellules dans le sang circulant. Ainsi, on pourra observer une anémie, une neutropénie (entraînant des signes infectieux, majoritairement de la sphère ORL) et une thrombopénie (pouvant induire des syndromes hémorragiques cutanées ou muqueux).

Les signes tumoraux se manifestent par une hypertrophie des organes hématopoïétiques : adénopathies et splénomégalie. Des douleurs osseuses et une atteinte testiculaire (augmentation du volume) sont également à noter dans les LAL de l'enfant [3].

Diagnostic

Le diagnostic biologique comprend un hémogramme et une ponction médullaire permettant de réaliser un myélogramme.

L'hémogramme pourra montrer la présence de l'anémie et de la neutropénie (fréquentes) mais également de la thrombopénie (très fréquente). La présence d'un nombre important de blastes pourra également être visible sur l'hémogramme.

Le myélogramme est indispensable car il permet d'affirmer le diagnostic. Il permettra de visualiser l'envahissement de la moelle par les blastes. L'étude des frottis médullaires peut aider à différencier une leucémie aiguë lymphoblastique d'une leucémie aiguë myéloïde. Dans le cas de la LAL, les blastes sont de petite taille et possèdent un cytoplasme peu abondant.

L'étude immunophénotypique des blastes est nécessaire pour le diagnostic et le classement des LAL. Elle peut influencer le traitement [3].

5. Survie après une LAL

Plusieurs facteurs pronostiques peuvent modifier les chances de survie et influencent le traitement mis en place. Ainsi, l'âge joue un rôle : le pronostic est péjoratif avant 1 an et plus défavorable à l'adolescence que pendant l'enfance. Le sexe influe également : être un garçon est synonyme de moins bon pronostic selon certaines études. Enfin, les facteurs nutritionnels et ethniques, qui sont des facteurs propres au patient, peuvent modifier les chances de survie. Il existe également des facteurs liés à la maladie comme la masse tumorale ou l'immunophénotype des blastes. Le traitement influe également sur la survie des patients [6].

Selon une étude menée en France entre 1990 et 2000, le taux de survie à 1 an lors d'une LAL est de 94%, celui à 5 ans est de 82%. Ces pourcentages de survie ont tendance à augmenter sur la période de l'étude. Le taux survie dans le cas d'une LAL de type B semble être meilleur que dans le cas d'une LAL de type T (85% contre 67% respectivement). Comme cité précédemment, l'âge influe sur le taux de survie : pour un enfant âgé de moins de 1 an le taux de survie à 5 ans est de l'ordre de 48% alors que pour un enfant ayant un âge compris entre 1 et 4 ans, il est de 87% [7].

6. Le protocole FRALLE et l'utilisation du MTX administré à faible dose

Les traitements des leucémies suivent des protocoles bien définis. Dans le cadre du traitement de la LAL, le protocole FRALLE est recommandé par la SFCE (Société Française de lutte contre les Cancers et leucémies de l'Enfant et de l'adolescent). Il est utilisé dans la majorité des centres hospitaliers en France. Plusieurs versions de ce protocole ont été éditées. Actuellement, la version en vigueur est intitulée FRALLE 2000. Celle-ci se décline en deux entités : FRALLE 2000-A et FRALLE 2000-BT.

Le protocole FRALLE 2000-A

Le protocole FRALLE 2000-A permet le traitement des LAL de la lignée B de risque standard de l'enfant. Par risque standard, on entend l'exclusion de certains patients présentant certaines comorbidités ou possédant des critères de gravité. On exclut par exemple les enfants atteints de trisomie 21, ceux présentant une atteinte initiale du système nerveux central ou ceux présentant une pathologie chronique empêchant l'administration du traitement prévu par le protocole. Pour suivre ce traitement, les patients devront avoir un âge lors du diagnostic situé entre 1 et 10 ans et une leucocytose inférieure à 50000/mm³.

Le protocole est divisé en plusieurs phases de traitement. Le schéma général du traitement comporte (cf. Annexe 1) :

- Une préphase (1 semaine)
- Une phase d'induction séquentielle (5 semaines)
- Une phase de consolidation (9 à 12 semaines)
- Une première phase d'intensification (8 semaines)
- Une interphase (8 semaines)
- Une seconde phase d'intensification (6 à 8 semaines)
- Un traitement d'entretien (24 mois)

Les patients suivant le protocole FRALLE 2000-A sont divisés en 3 groupes : A1, A2 et A3, selon le taux de blastes dans la moelle à J21. Tous les groupes utilisent du MTX administré à faible dose per os (25 mg/m²/prise) dans une ou plusieurs phases du protocole selon le groupe en question.

- Groupe A1 : utilisation lors des phases de consolidation, interphase et entretien.
- Groupe A3 : utilisation lors de l'interphase et de la phase d'entretien

- Groupe A2 : les patients suivent soit le traitement administré au groupe A1 ou celui administré au groupe A3, selon l'intensité de la maladie.

Les protocoles de traitements suivis par le groupe A1 sont inclus en annexe pour exemple (cf. annexes 2, 3 et 4).

Le protocole FRALLE 2000-BT

Le protocole FRALLE 2000-BT permet le traitement des patients possédant un risque élevé. Il est divisé en 2 groupes : le groupe B et le groupe T, eux-mêmes divisés en sous-groupes (B1 et B2, T1 et T2). Le traitement des LAL de la lignée B est réalisé dans le groupe B. Le traitement des LAL de la lignée T a lieu dans le groupe T. Le schéma général du traitement comporte les mêmes phases que le protocole FRALLE 2000-A (cf. schémas généraux en annexe : annexes 5 et 6).

Tous les groupes utilisent du MTX administré à faible dose per os ($25 \text{ mg/m}^2/\text{prise}$) dans une ou plusieurs phases du protocole selon le groupe en question.

- Groupe B1 : consolidation, interphase et entretien
- Groupe B2, T1 et T2 : interphase et entretien

Le MTX administré à faible dose per os est donc largement utilisé dans ces protocoles. La solution buvable de MTX mise au point par la pharmacie du CHU d'Angers est donc importante, notamment pour le traitement des leucémies survenant chez le jeune enfant. Notons également que la problématique est la même pour les autres molécules utilisées dans le protocole : mercaptopurine, dexaméthasone et thioguanine, dont les suspensions buvables sont également réalisées au CHU d'Angers.

B. Le principe actif de la préparation : le méthotrexate

1. Présentation de la molécule

Le méthotrexate est aussi appelé acide (2S)-2-[[4-[[[(2,4-diaminoptéridin-6-yl)méthyl]méthylamino]benzoyl]amino]pentanedioïque.

Sa structure s'apparente à celle de l'acide folique. La molécule d'acide folique peut être divisée en 3 parties : une première partie composée d'un cycle ptéridine, une seconde d'un acide para-aminobenzoïque et une dernière d'un acide L-glutamique (cf. Figure 2).

Le méthotrexate ne diffère que très peu de l'acide folique. En effet, seules deux différences existent entre ces deux molécules. La première différence se situe sur le cycle ptéridine, qui est substitué d'un hydroxyle en 4 dans le cas de l'acide folique et d'une amine primaire dans le cas du MTX. La seconde différence est localisée sur la partie para-aminobenzoïque, au niveau de laquelle l'azote est substitué par un atome d'hydrogène dans le cas de l'acide folique et par un groupement méthyle dans le cas du MTX (cf. Figure 3) [8].

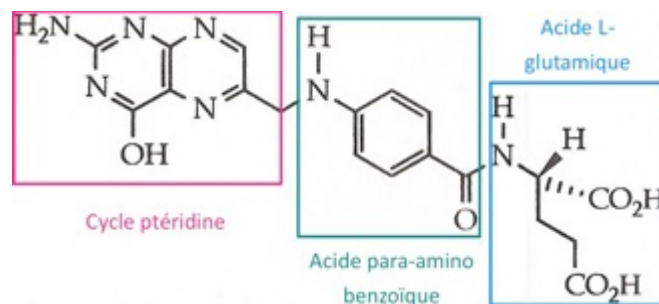


Figure 2 : Composition chimique de l'acide folique

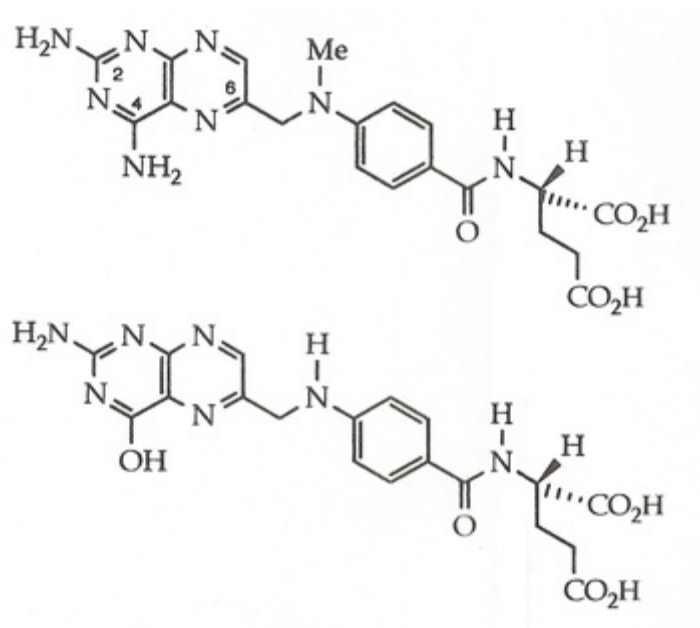


Figure 3 : Molécules de méthotrexate (haut) et acide folique (bas)
D'après : [8]

La configuration S de la molécule, au niveau de l'acide L-glutamique, est très importante pour l'activité. En effet, l'isomère R (= D-méthotrexate) n'est pas absorbé lors d'une administration per os. S'il est administré par intraveineuse, le D-méthotrexate est éliminé par le rein avec la même cinétique que le L-méthotrexate. Il possède également la même affinité pour la dihydrofolate réductase (DHFR) [8]. La pharmacopée limite sa concentration autorisée à 3%.

2. Propriétés physicochimiques de la molécule de MTX

Certaines propriétés de la molécules de MTX sont importantes à connaître afin d'une part de mettre au point la solution buvable et d'autre part de définir les critères de conservation de celle-ci.

Solubilité

Le MTX est quasiment insoluble dans l'eau, de même que dans l'alcool, l'éther éthylique et le chloroforme.

Il est soluble dans les solutions diluées d'acides minéraux et dans les solutions diluées d'hydroxyde et de carbonates alcalins.

Il précipite à pH acide, lorsque celui-ci est inférieur à 6,6 [8, 9].

Stabilité

Le méthotrexate est sensible à la lumière. En cas d'exposition à la lumière, il se produit une photodécomposition entraînant la formation d'un précipité de couleur jaune [9].

3. Mécanisme d'action

Le méthotrexate fait partie de la classe des antimétabolites. Il interfère dans la synthèse de l'ADN grâce à l'inhibition de plusieurs enzymes. Son action s'exerce lors de la phase S du cycle cellulaire, phase correspondant à la réplication de l'ADN (cf. Figure 4).

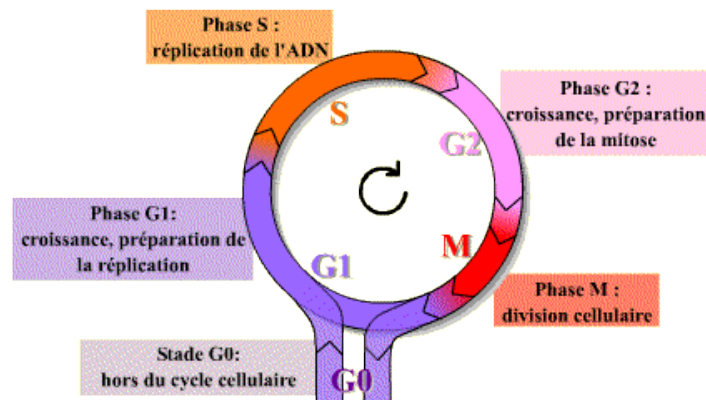


Figure 4 : Cycle cellulaire

D'après : <http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/cyclecellBM/index.htm>

Analogue de l'acide folique agissant comme faux substrat, il inhibe la dihydrofolate réductase (DHFR), enzyme qui joue un rôle lors de la synthèse d'une base pyrimidique : la thymidine. L'inhibition de l'activité de la DHFR par le MTX est qualifiée de compétitive. En effet, l'administration d'une forte concentration d'acide folique provoque le déplacement du MTX de ses sites de liaisons à la DHFR. La DHFR retrouve alors son activité. Physiologiquement, la DHFR est impliquée dans la réduction de l'acide dihydrofolique (DHF ou FH_2) en acide tétrahydrofolique (THF ou FH_4), en présence du coenzyme NADPH, H^+ . Le blocage de la DHFR empêche la régénération du THF et donc du N^5, N^{10} -Méthylène-tétrahydrofolate qui est un cofacteur nécessaire à la transformation du dUMP en dTMP (cf. Figure 5) [10].

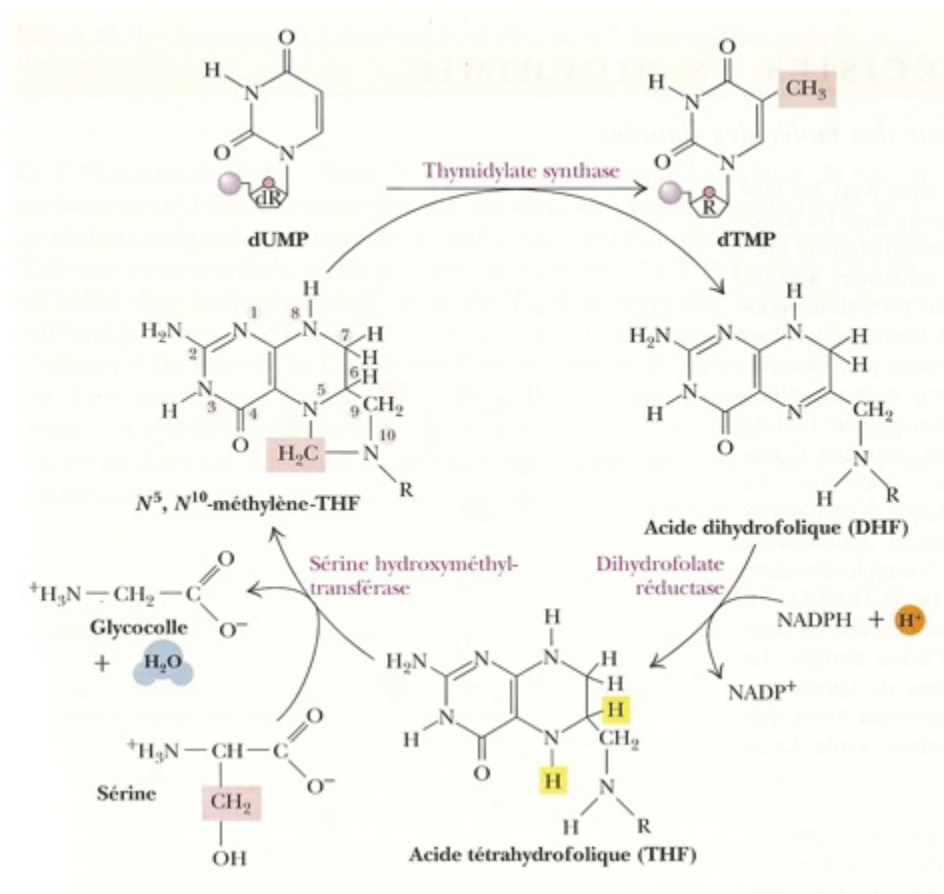


Figure 5 : Synthèse du dTMP à partir du dUMP, d'après [11]

La transformation du dUMP en dTMP est assurée par la thymidylate synthase (TS). Cette réaction est inhibée par le MTX de deux manières : d'une part par la déplétion en N^5, N^{10} -Méthylène-tétrahydrofolate provoquée elle-même par l'inhibition de la DHFR, et d'autre part par une inhibition enzymatique directe de la TS par des dérivés polyglutamiques du MTX et du DHF. Les dérivés polyglutamiques du MTX, de la même façon que les dérivés polyglutamiques des folates, sont formés par l'addition de 2 à 5 groupes glutamate après la pénétration dans les cellules [10].

Le méthotrexate est également un puissant inhibiteur de l'AICAR transformylase. Cette enzyme catalyse la transformation du 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucléotide (AICAR) en N-formylaminoimidazole-4-carboxamide ribonucléotide (formyl-AICAR). Ce dernier sera transformé ensuite en Inosine monophosphate (IMP), dérivé purique nécessaire à la synthèse *de novo* des nucléotides puriques (cf. Figure 6, réaction 10) [10, 11].

Plus récemment, il a été montré que les dérivés polyglutamiques du MTX et de l'acide dihydrofolique inhibent l'amidophosphoribosyltransférase. Cette enzyme catabolise une des premières réactions de la synthèse *de novo* des nucléotides puriques (cf. Figure 6, réaction 2) [12].

Le MTX agit donc à plusieurs niveaux dans le blocage de la synthèse de l'ADN. Il inhibe tout d'abord lors de la synthèse des nucléotides puriques, mais également la synthèse d'un nucléotide pyrimidique : la thymidine. Ces différentes actions du MTX ont toutes pour résultat une interférence dans la synthèse de l'ADN lors de la phase S du cycle cellulaire.

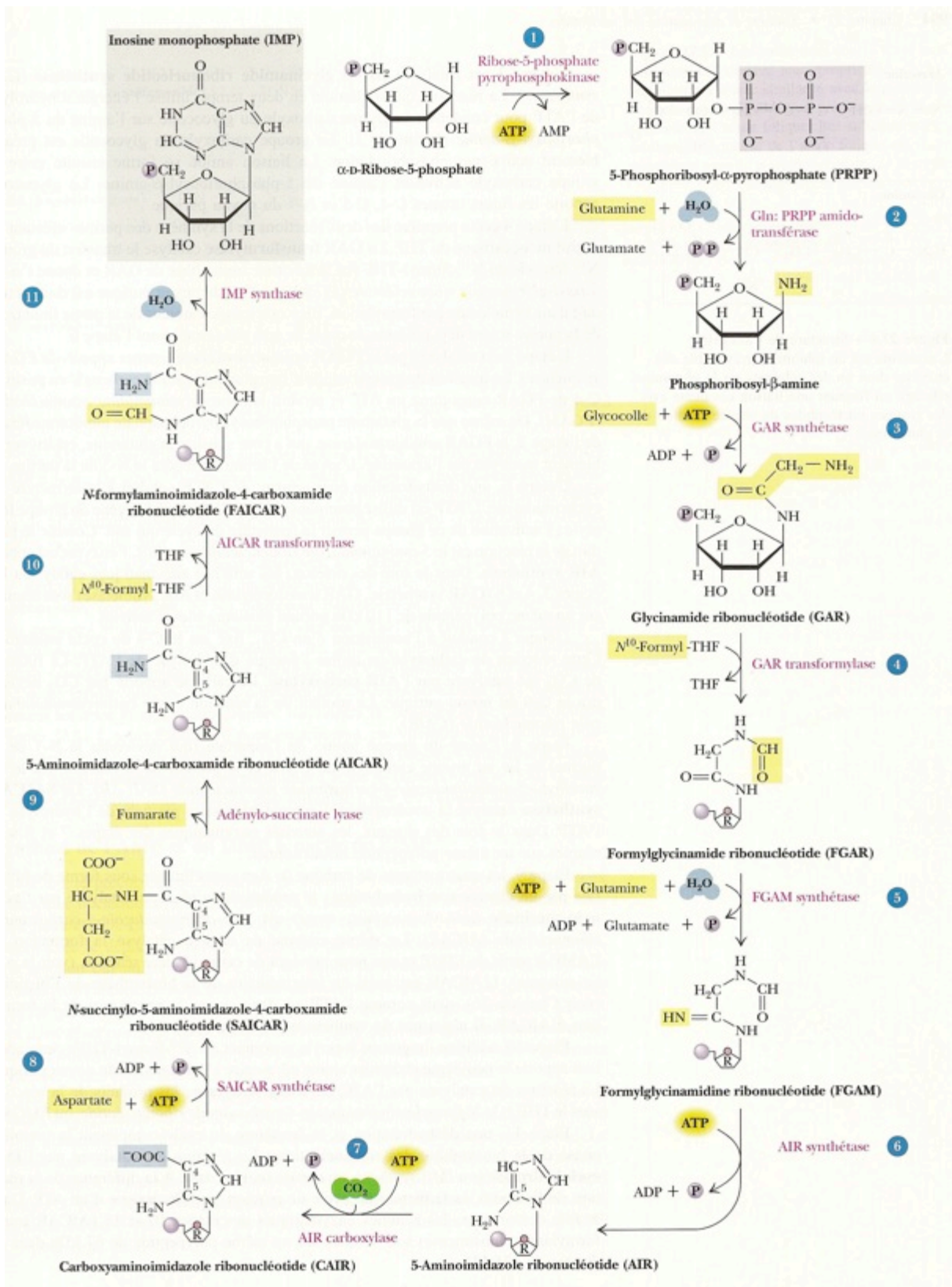


Figure 6 : Voie de synthèse *de novo* des nucléotides puriques, d'après [11]

4. Pharmacocinétique

Absorption

Lors du traitement d'une LAL par le protocole FRALLE, le MTX est administré par voie orale dans certaines phases du traitement. Lors de l'administration par voie orale, son absorption présente une très grande variabilité.

Tout d'abord, l'absorption est dose-dépendante. En effet, plus la dose est faible, plus l'absorption sera importante. Par exemple, lors de l'administration de doses inférieures à 30 mg/m², 70 à 80% de la dose est absorbée. Dans le cas de doses supérieures à 80 mg/m², 50 à 70% de la dose est absorbée. L'absorption du MTX est donc un processus saturable [13]. Dans le protocole FRALLE, la dose administrée lors de la prise per os de MTX est de 25 mg/m². Cette dose fait donc partie de la catégorie des faibles doses et devrait donc être mieux absorbée qu'une dose importante.

Il existe également une variabilité interindividuelle. Ainsi, certains facteurs comme la concentration maximale, le temps pour atteindre cette concentration et la fraction absorbée varient selon les individus [14].

L'absorption du MTX est également réduite par les laitages [15].

Distribution

Dans la circulation, le MTX se lie à l'albumine. La liaison aux protéines plasmatiques est évaluée entre 50 et 60% [16].

Le MTX possède une bonne diffusion tissulaire. Néanmoins, le passage dans le LCR est faible [15].

Le volume de distribution du MTX est de 0,4 à 0,8 L.Kg⁻¹ [17].

Le MTX peut pénétrer dans les cellules grâce à deux mécanismes de transport actif. Il s'agit des mêmes mécanismes de transport que ceux utilisés par les folates réduits. Lorsqu'une forte dose de MTX est administrée, celui-ci peut pénétrer par un mécanisme de diffusion passive dans les cellules [10].

La demi-vie du MTX, dans le cas d'administration de doses faibles, se situe entre 3 et 10 heures [16].

Métabolisme

Lorsqu'il est administré par voie orale, le MTX, après absorption, est métabolisé par le foie en 7-hydroxyméthotrexate (7-OH-MTX). L'hydroxylation, réalisée par l'aldéhyde oxydase hépatique, a lieu en position 7 sur le cycle ptéridine (cf. Figure 7). Le 7-OH-MTX peut être présent au niveau cellulaire lorsque le MTX est administré à hautes doses. Il peut ainsi inhiber la DHFR et la TS, mais son efficacité est moindre que celle du MTX [10, 18].

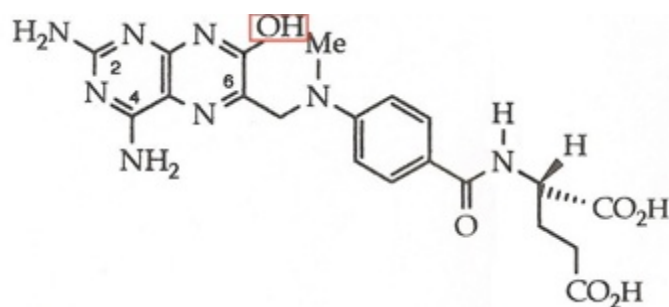


Figure 7 : 7-hydroxyméthotrexate

Le MTX subit un cycle entérohépatique. Au cours de ce cycle, le MTX peut être métabolisé, après excrétion dans la bile, en acide 2,4-diamino-N10-méthylptéroïque (DAMPA) grâce à une carboxypeptidase contenue dans la flore bactérienne intestinale. Il est ensuite réabsorbé. Le DAMPA est un métabolite inactif du MTX. En effet, il ne semble pas avoir d'action cytotoxique et il n'a aucune action sur la dihydrofolate réductase. Il est considéré

comme un métabolite minoritaire du MTX, il ne représente que moins de 5% de la dose totale éliminée dans les urines [19].

Après avoir pénétré dans la cellule, le MTX est métabolisé en dérivés polyglutamiques. Cette transformation, réalisée par une enzyme cytosolique : la folylpolyglutamate synthase (FPGS), a lieu rapidement après l'entrée du MTX dans la cellule et consiste en l'addition de 2 à 5 groupes glutamates. Le 7-OH-MTX subit aussi cette transformation lorsqu'il entre dans la cellule. La formation de ces dérivés augmente la durée d'inhibition enzymatique. En effet, ils persistent dans les tissus après que le MTX présent dans le compartiment extracellulaire ait été éliminé [10, 18].

La Figure 8 récapitule les voies de métabolisme du MTX.

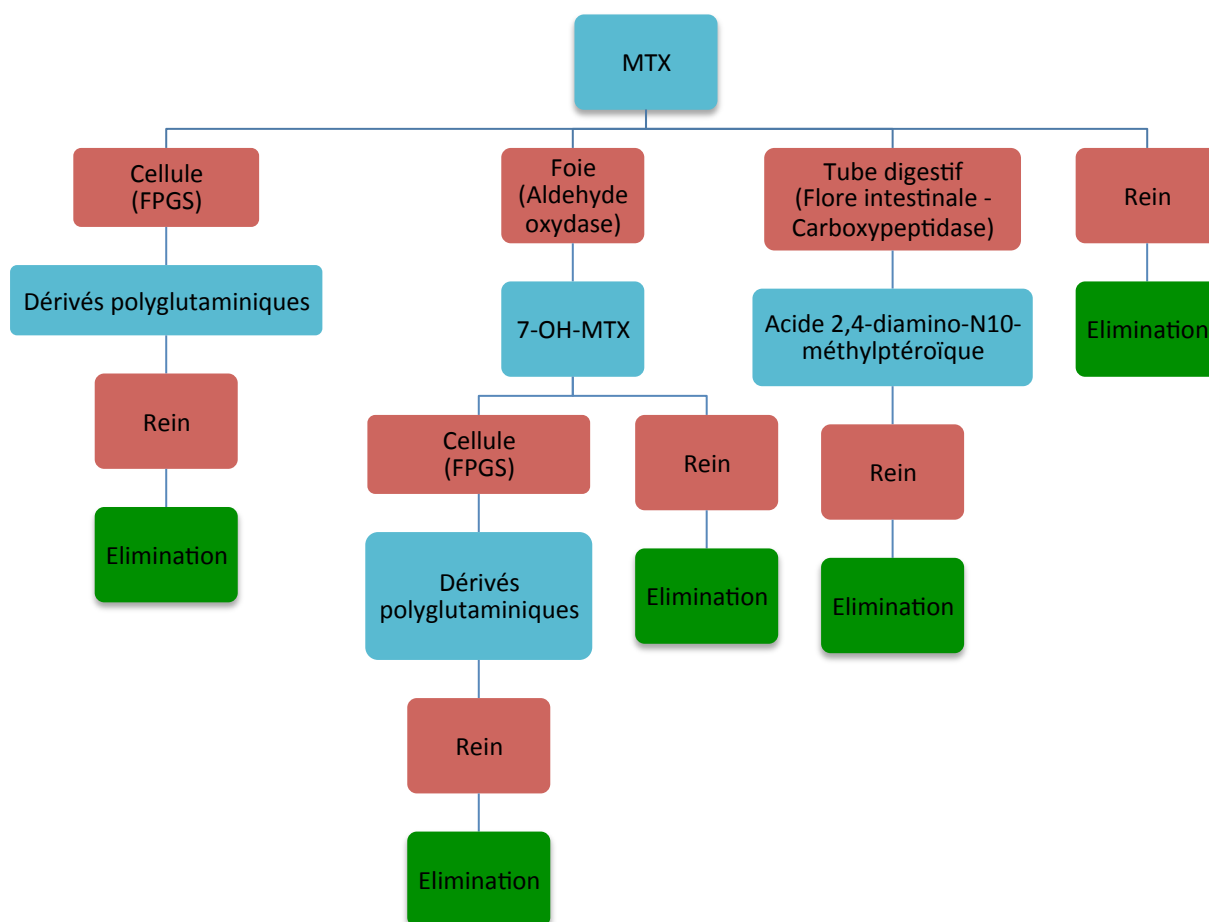


Figure 8 : Schéma récapitulatif des voies de métabolisme du MTX

Elimination

90% du MTX est éliminé sous forme inchangée, 1 à 10% sous forme de 7-OH-MTX.

L'élimination du MTX se fait majoritairement par voie rénale, 80% du MTX absorbé est éliminé par cette voie grâce à la filtration glomérulaire et une sécrétion active par le tubule rénal [16]. Le pH urinaire a une influence sur l'élimination du MTX. En effet, un pH urinaire trop acide provoque la précipitation du MTX.

Une fraction minoritaire est éliminée via la bile et les fèces [18].

L'élimination du MTX est différente selon le moment de la journée. En effet, la nuit, le pH urinaire tend à être plus acide. Le MTX est donc moins bien éliminé la nuit [20].

L'élimination est dose-dépendante. Tout comme l'absorption, l'élimination est meilleure dans le cas de doses faibles et le phénomène de sécrétion tubulaire est saturable [13].

5. Effets secondaires

Le méthotrexate possède une certaine toxicité, même lorsqu'il est administré à faibles doses. Celle-ci se manifeste à plusieurs niveaux.

Tout d'abord, il peut entraîner une myélosuppression. Ainsi, une thrombopénie et une leuconéutropénie peuvent survenir [8].

Une toxicité rénale peut également se manifester. Elle est due à la précipitation du MTX dans les tubules rénaux, lorsque la concentration de celui-ci est supérieure au seuil de solubilité et/ou lorsque le pH rénal n'est pas assez alcalin. La précipitation du 7-OH-MTX, métabolite insoluble, est également responsable de cette néphrotoxicité. Pour se prévenir d'une telle toxicité, on pourra conseiller de boire abondamment, si possible de l'eau plutôt alcaline riche en bicarbonates telle que l'eau de Vichy par exemple, afin de générer une diurèse alcaline et importante. Pour une élimination correcte, le pH urinaire doit être supérieur à 7,0 [8, 9].

Il sera possible d'observer l'apparition d'une mucite. Cette affection, fréquente lors des chimiothérapies, se traduit par des lésions buccales et aphtes qui peuvent être douloureuses et empêcher la bonne alimentation du patient. L'administration d'acide folique permet de réduire l'apparition de ces effets indésirables [21]. Une étude menée en 2006 par Peirera Pinto *et al.* montre qu'une bonne hygiène buccale, additionnée à l'administration d'un bain de bouche à 0,12% de gluconate de chlorhexidine, diminue également l'intensité de la mucite [22].

Des stomatites, diarrhées et des vomissements sont également à noter. Ces effets sont dus à la cytotoxicité du méthotrexate.

Certains effets hépatiques peuvent être observés. Une fibrose voire une cirrhose hépatique peut survenir. L'augmentation des transaminases sera donc à surveiller [8].

Une alopécie, des photosensibilisations ainsi que des éruptions cutanées ont également été notées chez des patients traités par le MTX [23].

L'effet immunosuppresseur du MTX peut augmenter le risque de survenue d'infections opportunistes et de pneumonies. Des pneumopathies interstitielles sont survenues chez certains patients [23].

6. Surveillance spécifique pendant le traitement

Au cours du traitement, il faudra effectuer régulièrement une surveillance des cellules sanguines grâce à un bilan comprenant une numération formule sanguine (NFS) et une numération des plaquettes. La fonction hépatique sera également surveillée grâce au dosage des transaminases, reflet de l'activité hépatique [4].

7. Contre-indications et interactions médicamenteuses

Les insuffisances rénale et/ou hépatique sévères sont considérées comme des contre-indications absolues à l'administration de MTX.

L'administration de vaccins vivants atténués, notamment le vaccin contre la fièvre jaune est formellement contre-indiqué pendant le traitement. Cette contre-indication est due à l'effet immunosuppresseur du MTX [8].

L'association du MTX et du probénécide est absolument contre-indiquée. En effet, le probénécide inhibe la sécrétion tubulaire et majore donc la toxicité du MTX notamment la toxicité hématologique. Le même mécanisme est mis en cause dans l'association avec les salicylés et les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS). La phénylbutazone, AINS ne faisant plus l'objet de spécialité actuellement sur le marché, inhibe très fortement la clairance rénale du MTX.

50 à 60% du MTX présent dans l'organisme est lié aux protéines plasmatiques. Cette liaison peut être modifiée par l'administration concomitante de médicaments tels que les AINS qui ont une affinité plus forte pour les récepteurs situés sur les protéines plasmatiques.

La répartition du MTX est donc modifiée : une partie plus importante est libre d'où un risque de toxicité accru.

Le triméthoprime, agent anti-infectieux présent dans l'association commercialisée sous le nom Bactrim[®], est également contre-indiqué formellement en cas d'administration de MTX. En effet, il augmente la toxicité du MTX par plusieurs mécanismes. Tout d'abord, il inhibe son excrétion rénale. Il provoque également un déplacement du MTX de ses sites de fixation aux protéines plasmatiques d'où une concentration en MTX libre augmentée. Enfin, il inhibe la dihydrofolate réductase, une des enzymes cible d'action du MTX [23, 24].

L'association entre la phénytoïne, molécule contenue dans la spécialité Di-hydan[®] par exemple, et le MTX est absolument contre-indiquée. Il existe deux risques liés à cette association : un risque de convulsions par la diminution de l'absorption de la phénytoïne et un risque de diminution de l'efficacité du MTX par une augmentation de son métabolisme hépatique provoquée par la phénytoïne [23].

Les pénicillines, la ciprofloxacine et les inhibiteurs de la pompe à protons inhibent la sécrétion tubulaire du MTX. Cette inhibition étant moins importante qu'avec les molécules citées précédemment, il s'agit d'une association déconseillée [23].

8. Administration lors de la grossesse ou de l'allaitement

Le MTX est contre-indiqué en cas de grossesse. En effet, le MTX est tératogène et mutagène chez l'animal. De plus, chez l'homme, quelques cas de malformations sévères ont été rapportés.

Il existe un passage du MTX dans le lait maternel, le MTX est donc contre-indiqué également en cas d'allaitement en raison des effets indésirables graves que celui-ci pourrait entraîner chez l'enfant [25].

C. Législation des préparations réalisées en milieu hospitalier

Les pharmacies à usage intérieur (PUI) se sont vues attribuer certaines missions dans le décret numéro 2000-1316 du 26 décembre 2000. Parmi ces missions, en plus de l'approvisionnement et de la dispensation des médicaments et dispositifs médicaux, les PUI doivent réaliser les préparations magistrales (PM) et hospitalières (PH) à partir de matières premières ou de spécialités pharmaceutiques. Pour réaliser ces préparations, chaque PUI devra s'assurer qu'elle dispose de locaux, de personnels, d'équipements et d'un système d'information leur permettant d'assurer cette production. Elles doivent également disposer des équipements nécessaires pour effectuer les contrôles sur les matières premières et les produits finis. Toutes ces dispositions figurent dans le guide des Bonnes Pratiques de Préparation (BPP) [26].

Les préparations magistrales sont définies dans l'article L.5121-1 du Code de la Santé Publique (CSP) : il s'agit de « tout médicament préparé selon une prescription médicale destinée à un malade déterminé en raison de l'absence de spécialité pharmaceutique disponible disposant d'une autorisation de mise sur le marché, de l'une des autorisations mentionnées aux articles L. 5121-9-1 et L. 5121-12, d'une autorisation d'importation parallèle ou d'une autorisation d'importation délivrée à un établissement pharmaceutique dans le cadre d'une rupture de stock d'un médicament, soit extemporanément en pharmacie, soit dans les conditions prévues à l'article L. 5125-1 ou à l'article L. 5126-2 » [27].

Les préparations hospitalières, également définies dans l'article L.5121-1 du CSP, consistent en « tout médicament, à l'exception des produits de thérapies génique ou cellulaire, préparé selon les indications de la pharmacopée et en conformité avec les bonnes pratiques mentionnées à l'article L. 5121-5, en raison de l'absence de spécialité pharmaceutique disponible ou adaptée disposant d'une autorisation de mise sur le marché, de l'une des autorisations mentionnées aux articles L. 5121-9-1 et L. 5121-12, d'une autorisation d'importation parallèle ou d'une autorisation d'importation délivrée à un établissement pharmaceutique dans le cadre d'une rupture de stock d'un médicament, par une pharmacie à usage intérieur (PUI) d'un établissement de santé, ou par l'établissement pharmaceutique de cet

établissement de santé autorisé en application de l'article L. 5124-9 ou dans les conditions prévues à l'article L. 5126-2. Les préparations hospitalières sont dispensées sur prescription médicale à un ou plusieurs patients par une pharmacie à usage intérieur dudit établissement. Elles font l'objet d'une déclaration auprès de l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM), dans des conditions définies par arrêté du ministre chargé de la santé » [27].

D. Objectifs et démarche de l'étude réalisée

La formule de la solution buvable de MTX dosée à 2 mg/mL réalisée au CHU d'Angers depuis 2010 a été adaptée d'après la publication des travaux de Stuart *et al.* en 1979 [28]. La formule mise au point par Stuart *et al.* était la suivante :

- Bicarbonate de sodium : 20 g
- MTX injectable (25 mg/mL) : 80 mL
- Sirop simple : 250 mL
- Eau chloroformée : QSP 1 litre

Les proportions ont été divisées afin d'obtenir une formule unitaire pour 30 mL. Le sirop simple a été remplacé par de l'Ora-Sweet[®], un excipient équivalent au sirop simple mais plus intéressant au point de vue galénique car il contient des conservateurs. Il possède également une saveur édulcorée qui est plus adaptée pour la bonne compliance des enfants au traitement. De même, l'eau chloroformée a été remplacée par de l'eau pour préparation injectable (PPI). La formule ainsi mise au point en 2010 est la suivante :

- Méthotrexate : 2,4 mL (Solution injectable dosée à 500mg/20mL)
- Bicarbonate de Sodium : 0,6 g (sous forme de poudre)
- Ora-Sweet[®] : 7,5 mL
- Eau PPI : QSP 30 mL

Les excipients à effet notoire (EEN) contenus dans l'Ora-Sweet[®] ne dépassent pas les rations journalières recommandées dans le cas de cette préparation. La quantité de saccharose ne doit pas dépasser 5 g par jour soit 7 mL d'Ora-Sweet[®], celle de glycérol 3 g par jour soit 50 mL et celle de sorbitol 3 g par jour soit 60 mL [2]. Il n'est pas possible d'administrer de telles quantités d'Ora-Sweet[®] avec la solution buvable de MTX dosée à 2 mg/mL. Effectivement, l'Ora-Sweet[®] ne représente que 25% de la préparation donc pour avoir à administrer 7 mL d'Ora-Sweet[®], il faudrait avoir à administrer 28 mL de solution buvable (soit 56 mg de MTX. Cette dose de MTX correspondrait à une surface corporelle de 2,24 m². Sachant que

la surface corporelle moyenne d'un adulte est de $1,7 \text{ m}^2$, il paraît donc très improbable voire impossible d'atteindre une telle surface chez un enfant.

Cette solution buvable est conditionnée dans des flacons en verre brun et est délivrée avec un système spécifique pour la délivrance de la dose : il s'agit d'un bouchon type SEGAP® (cf. Figure 9). Celui-ci a la particularité de présenter un système luer-lock dans lequel on peut adapter une seringue entérale. Par conséquent, il n'y a plus besoin de tremper la seringue d'administration dans la solution buvable et ainsi risquer l'exposition au produit cytotoxique de la personne administrant la solution buvable de MTX. Ce système permet donc la protection de la personne administrant le médicament.



Figure 9 : Bouchon type SEGAP®
D'après [29]

La date limite d'utilisation (DLU) de la solution buvable ainsi mise au point avait été fixée à 1 mois d'après les travaux de Stuart *et al.* également. En effet, l'étude de stabilité réalisée en 2010 lors de la mise au point de la formule ne permettait pas d'envisager une DLU plus longue.

A ce jour au CHU d'Angers, la solution buvable de MTX dosée à 2 mg/mL est une préparation magistrale (PM). Elle est préparée extemporanément pour un malade déterminé. Il n'est donc pas possible de préparer ce type de médicament à l'avance et d'en stocker quelques unités.

Sous réserve de l'enregistrement de la préparation auprès de l'ANSM, le statut de préparation hospitalière (PH) permet de dispenser cette préparation aux usagers de la PUI de l'établissement qui l'a enregistrée. Une PH n'impose pas une préparation extemporanée,

elle peut donc être préparée à l'avance et stockée dans des conditions appropriées à sa bonne conservation.

Le changement de statut de la solution buvable de MTX vers celui de préparation hospitalière autoriserait donc la préparation à l'avance et le stockage de quelques unités. Ce changement possède plusieurs avantages. Tout d'abord, la préparation serait disponible plus rapidement pour le patient. Cela permettrait également une diminution des coûts de production, grâce à une fabrication de lots plus importants en une seule fois diminuant ainsi le coût de personnel et de matériel. Le coût final du médicament pourrait ainsi diminuer.

Pour pouvoir préparer et stocker la solution buvable, il nous faut prolonger la DLU de la préparation. Il est donc nécessaire de prouver la stabilité de la préparation, tant du point de vue chimique que bactériologique. L'étude de stabilité réalisée permet de vérifier la concentration en principe actif du médicament, l'apparition de composés de dégradation et quelques paramètres utiles à la bonne conservation du produit comme le pH de la solution ou la contamination bactériologique.

En se basant sur diverses études, notamment l'étude de Fajolle *et al.* sur des suspensions orales pédiatriques de spironolactone, hydrochlorothiazide et captopril [30], et l'étude de Santoveña *et al.* sur une suspension buvable d'hydrochlorothiazide [31], mais également sur la Pharmacopée Européenne (Ph.Eur.), les paramètres qu'il est judicieux d'étudier lors de la conservation de la solution buvable de MTX ont été établis. L'étude de ces paramètres concernant la stabilité de la préparation a été divisée en deux parties.

La première partie de l'étude concerne la stabilité chimique du produit, elle comprend dans le cas présent : une étude de stabilité par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC ou CLHP), la variation des caractères organoleptiques et l'étude de variation du pH.

L'étude de stabilité réalisée par HPLC permet de visualiser en même temps la stabilité de la concentration en principe actif de la préparation mais également l'apparition ou non de composés de dégradation. Usuellement, une réduction de la concentration pour atteindre 90% de la concentration initiale en principe actif est considérée comme le maximum acceptable [32]. Il n'existe pas de valeur seuil fixée pour la concentration en composés de dégradation. Ceux-ci ne doivent néanmoins pas posséder une toxicité élevée.

La variation des caractères organoleptiques (couleur, aspect, odeur, goût...) est le reflet de la conservation du produit. Par exemple, lorsque certains principes actifs se dégradent, ils évoluent parfois en des composés possédant une couleur différente de la molécule de principe actif. L'étude de cette variation, même si elle reste subjective, paraît néanmoins essentielle.

L'étude du pH permet de vérifier si le MTX est conservé dans des conditions permettant de limiter sa dégradation. Le pH de la solution est une donnée importante qui peut influencer sur la conservation et la dégradation ou non du principe actif. Le MTX est ionisé au pH physiologique. Lorsque le pH est acide (pH < 6,6), il est converti en un acide bicarboxylique qui est insoluble (cf. Figure 10). Le MTX précipite donc à pH acide. C'est pour cela que les présentations commerciales de MTX injectable ont un pH aux alentours de 8,4 [9].

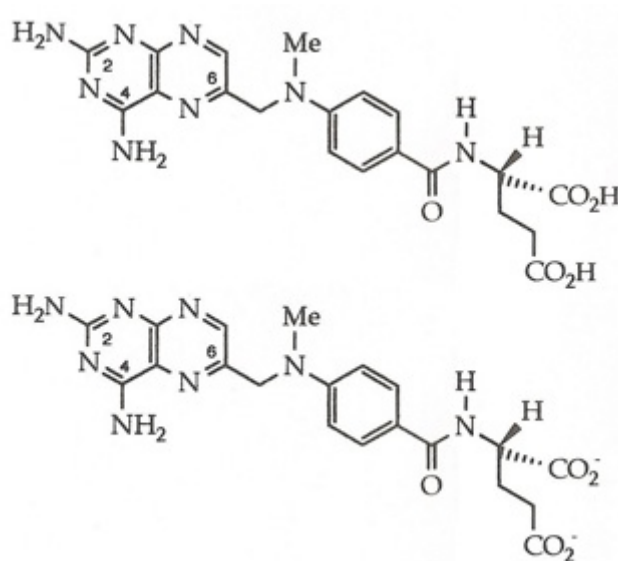


Figure 10 : Molécules de MTX : en haut molécule non ionisée (acide bicarboxylique), en bas molécule ionisée

La seconde partie de l'étude se concentre sur la stabilité bactériologique de la solution. En effet, bien que la fabrication de la solution buvable de MTX n'ait pas lieu dans un environnement stérile, la pharmacopée spécifie néanmoins des seuils de contamination bactérienne à ne pas dépasser [33]. De plus, ces solutions buvables sont dispensées à des patients jeunes, dont l'immunité est fortement déprimée par le traitement de chimiothérapie qu'ils suivent. La qualité bactériologique de ces solutions est donc importante.

II. Matériels et méthodes

1. Matériel

Préparation des solutions buvables de MTX pour étude

Les solutions buvables de MTX pour analyses sont réalisées grâce aux matières premières indiquées dans le Tableau 1.

Composant	Fabricant
Méthotrexate injectable (500mg/20mL)	Mylan, Pittsburg, Etats-Unis
Bicarbonate de sodium (poudre)	Coopération Pharmaceutique Française, Melun, France
Ora-Sweet®	Paddock Laboratories, Minneapolis, Etats-Unis
Eau ppi	Aguettant, Lyon, France

Tableau 1 : Origine des matières premières utilisées pour la préparation des solutions buvables de MTX

Les solutions buvables de MTX ont été conditionnées grâce aux articles de conditionnement indiqués dans le Tableau 2.

Article de conditionnement	Fabricant
Flacon en verre brun type III	Coopération Pharmaceutique Française, Melun, France
Bouchon inviolable bakélite blanc	Coopération Pharmaceutique Française, Melun, France
Bouchon SEGAP®	Pentaferte, Villeparisis, France

Tableau 2 : Origine des articles de conditionnement utilisés

Etude de stabilité par HPLC

L'acétonitrile utilisé provient du fabricant Carlo Erba (Val de Rueil, France).

Les deux réactifs utilisés pour la préparation du tampon, $H_2K_2O_4P$ et KOH, proviennent du fabricant ACROS Organics (Geel, Belgique).

Les mesures ont été réalisées grâce à un système HPLC de la marque PerkinElmer (Waltham, Etats-Unis) modèle Series 200. Le détecteur utilisé est un détecteur UV/Visible modèle Series 200, PerkinElmer (Waltham, Etats-Unis). La colonne utilisée est une colonne ODS HYPERSIL de Thermo Scientific (Waltham, Etats-Unis) mesurant 250 x 4.6 mm avec une granulométrie de 5 μ m. Le logiciel pilotant le système HPLC est le logiciel TotalChrom 6.21 également fourni par la société PerkinElmer (Waltham, Etats-Unis).

Etude bactériologique de la solution

Plusieurs types de géloses et bouillons ont été utilisés lors de l'étude :

- Gélose COS : Columbia additonnée de 5% de sang de mouton (Biomérieux, Marcy l'Etoile, France)
- Gélose UTI : Urinary Tract Infection (germes responsables d'infections du tractus urinaire) (Oxoid, Basingstoke, Royaume-Uni)
- Gélose Sabouraud (Becton, Dickinson and Company, Sparks, Etats-Unis)
- Bouillon BHI : Brain Heart Infusion (Bouillon cœur-cervelle) (Biomérieux, Marcy l'Etoile, France)

Etude de pH

Les mesures ont été réalisées grâce à un pH-mètre de la marque Consort (Turnhout, Belgique) modèle C561. L'électrode utilisée est une électrode 662-1788, fournie par VWR, (Radnor, Etats-Unis). Il s'agit d'une électrode en verre, ayant pour électrolyte une solution de KCl à la concentration de 3,5 mol/L et prévue pour l'étude du pH en milieux aqueux.

2. Méthode pour l'étude de la stabilité chimique

Réalisation des solutions buvables pour l'étude

Plusieurs conditions de conservation ont été testées. Pour cela, les flacons de 30 mL de solution ont été préparés selon la fiche de fabrication de la préparation (cf. fiche de fabrication, annexe 7). 9 flacons ont ainsi été préparés afin de tester les trois conditions de conservation choisies (37°C, 20°C et 4°C).

La préparation est effectuée selon la formule suivante, donnée pour la réalisation de 30 mL de solution buvable :

- Méthotrexate : 2,4 mL (Solution injectable dosée à 500mg/20mL)
- Bicarbonate de Sodium : 0,6 g (sous forme de poudre)
- Ora-Sweet® : 7,5 mL
- Eau PPI : QSP 30 mL

La première partie de la préparation est effectuée dans un préparatoire sans conditions de stérilité ni précautions particulières vis-à-vis des produits, ceux-ci étant non toxiques. Dans un premier temps, le bicarbonate de sodium est pesé puis introduit dans un bécher. L'eau est mesurée puis ajoutée au bicarbonate de sodium grâce à une seringue dont le volume a été contrôlé par une personne du laboratoire de contrôle. De même, le volume d'Ora-Sweet® est mesuré grâce à une seringue dont le volume est validé. Ce volume est ensuite ajouté dans le bécher et une agitation est réalisée.

Lors de l'étape d'ajout du méthotrexate, il est nécessaire de poursuivre la fabrication sous un isolateur. En effet, étant donné que le méthotrexate est un agent cytotoxique, la protection des préparateurs doit être assurée. Le travail en isolateur permet au préparateur de ne pas être en contact direct avec le méthotrexate.

L'isolateur est d'abord décontaminé. Ensuite, les produits (dont le bécher contenant le mélange réalisé auparavant) sont introduits dans l'isolateur via le sas d'entrée. Le MTX est prélevé puis ajouté dans le bécher. La solution est agitée puis conditionnée dans le flacon de verre jaune. Ensuite, la solution est sortie de l'isolateur par le sas de sortie et l'isolateur est nettoyé. La fiche de fabrication mentionne les solvants à utiliser pour nettoyer l'isolateur après réalisation de la préparation dans le but d'éviter la survenue de contaminations croisées. Pour chaque préparation, le solvant choisi est un solvant dans lequel le principe actif utilisé est très soluble afin de faciliter le nettoyage. Dans le cas de la solution buvable de MTX, il s'agit d'une solution d'acide chlorhydrique à la concentration de 0,1N. On terminera le nettoyage de l'isolateur avec de l'alcool isopropylique, qui permet de désinfecter et d'éliminer les résidus d'agent de nettoyage restant dans l'isolateur [34].

De même, lors de la préparation des échantillons pour chromatographie, des protections sont nécessaires. Le travail sous la hotte et le port d'une double paire de gants changée régulièrement sont indispensables. Du matériel à usage unique sera privilégié. La verrerie utilisée pour les dilutions subira un nettoyage strict avec en premier lieu le solvant dans lequel le principe actif est très soluble, puis en second lieu de l'eau osmosée.

Conditions de l'étude

Les flacons utilisés pour le conditionnement de la préparation sont des flacons en verre brun, conformément à la fiche de fabrication, et ce dans le but de protéger le MTX des rayons UV. En effet, sous l'effet des rayonnements UV, le méthotrexate peut être dégradé et former un précipité de couleur jaune [9].

Les 3 premiers flacons (numérotés 1, 2 et 3) ont été placés dans une étuve dont la température est maintenue constamment à 37°C. Ces échantillons serviront de témoin positif lors de l'étude de stabilité, ils montreront la dégradation forcée du MTX. 3 autres flacons (numérotés 4, 5 et 6) ont été placés au réfrigérateur à 4°C. Les 3 derniers flacons (numérotés 7, 8 et 9) ont été placés dans un placard, à température ambiante (20°C) et à l'abri de la lumière.

Méthode HPLC utilisée

La méthode HPLC utilisée est basée sur une méthode qui avait été utilisée au laboratoire de contrôle lors de la réalisation de la précédente étude de stabilité de cette préparation en 2010 [1]. Cette méthode a été testée et modifiée afin d'obtenir des résultats satisfaisants.

- Paramètres de la méthode

Les mesures ont été réalisées grâce à une HPLC PerkinElmer Series 200. La colonne utilisée est une colonne ODS HYPERSIL mesurant 250 x 4.6 mm avec une granulométrie de 5 µm. La température lors de l'analyse est maintenue constante, à 20°C, grâce à un four. L'analyse est réalisée grâce à un détecteur UV/Visible, la longueur d'onde d'analyse est de 302 nm et la durée d'analyse est de 10 min par échantillon.

La phase mobile utilisée est un mélange de tampon phosphate (cf. annexe 8) avec un pH ajusté à 6,6 et d'acétonitrile en proportions respectives 90:10. Le débit de phase mobile lors de l'analyse est de 1 mL/min.

La pression d'analyse est de 1600 psi. Cependant, au cours de l'étude, quelques problèmes ayant potentiellement leur source au niveau de la pompe, ont été constatés et la pression d'analyse a diminué. Le temps de rétention des composés a augmenté. La réalisation de la gamme d'étalonnage lors de chaque analyse a permis de s'affranchir de ce problème.

Le logiciel utilisé pour piloter l'HPLC mais également pour l'analyse des chromatogrammes est le logiciel TotalChrom 6.21. Les résultats ont ensuite été transférés dans des fichiers Excel afin de réaliser l'analyse des données.

○ Préparation de la gamme d'étalonnage et des échantillons pour HPLC

Afin d'obtenir les mêmes conditions d'analyse dans le cas des échantillons de la gamme d'étalonnage que dans le cas des échantillons des préparations à analyser et pour s'affranchir de l'effet de matrice parfois observé en HPLC, il est nécessaire que le MTX utilisé pour obtenir les solutions de la gamme d'étalonnage soit dilué dans une solution contenant les mêmes excipients que la préparation. Ce diluant est donc préparé selon la formule suivante :

- Bicarbonate de sodium : 0,6 g
- Ora-Sweet® : 7,5 mL
- Eau PPI : 20,1 mL

Les différentes solutions correspondant aux points de la gamme d'étalonnage sont préparées selon le Tableau 3. Le MTX utilisé est le même que dans le cas de la préparation c'est-à-dire une solution injectable dosée à 500 mg/20 mL soit 2 mg/mL.

Dénomination	Cal 1	Cal 2	Cal 3	Cal 4	Cal 5
Concentration (mg/mL)	1	1,5	2	2,5	3
Volume de MTX (mL)	0,200	0,300	0,400	0,500	0,600
Diluant (mL)	4,8	4,7	4,6	4,5	4,4

Tableau 3 : Composition des solutions de la gamme d'étalonnage

Par la suite, ces solutions à différentes concentrations sont traitées de la même manière que la solution buvable de MTX pour obtenir des échantillons compatibles avec le traitement par l'HPLC.

○ Préparation des échantillons pour le dosage par HPLC

500 µL de solution de MTX (préparée pour la gamme ou issue d'un des flacons stocké pour l'étude) sont prélevés à l'aide d'une pipette à déplacement positif étant donné qu'il s'agit d'une solution visqueuse. Ils sont introduits dans une fiole jaugée de 10 mL complétée au trait de jauge grâce au mélange de phase mobile (tampon phosphate et acétonitrile en proportions respectives 90 : 10). On obtient à ce moment une dilution au 1/20^{ème}. 5 mL de cette dilution sont alors introduits dans un tube à centrifuger. La centrifugation a pour but d'éliminer un maximum d'Ora-Sweet®, afin que celui-ci soit présent en quantité minime et ne perturbe pas l'analyse. Ces tubes sont placés dans une centrifugeuse et centrifugés pendant 7 min à 4000 tours/min. Enfin, 100 µL du surnageant obtenu dans chaque tube suite à la centrifugation sont prélevés et introduits dans un vial. 900 µL de phase mobile y sont ajoutés. On obtient donc une seconde dilution au 1/10^{ème} soit une dilution totale au 1/200^{ème}.

○ Validation de la méthode de dosage

Pour valider la méthode de dosage, la gamme d'étalonnage (cf. Figure 11) a été réalisée 3 fois afin de vérifier la reproductibilité de cette gamme.

Points de gamme	Aire - essai 1	Aire - essai 2	Aire - essai 3	Moyenne	Ecart-type	Coefficient de variation (%)
Cal 1 (1 mg/mL)	817013	874942	718846	803600,3	78907,6	9,8
Cal 2 (1,5 mg/mL)	1259491	1273507	1231553	1254850,3	21358,5	1,7
Cal 3 (2 mg/mL)	1647910	1682861	1601081	1643950,7	41033,5	2,5
Cal 4 (2,5 mg/mL)	2004777	2083295	2036363	2041478,3	39508,2	1,9
Cal 5 (3 mg/mL)	2590687	2466873	2360502	2472687,3	115202,6	4,7
Pente de la droite : a	858526	798730	817624	824960,0	30565,6	3,7
Coefficient r ²	0,992737	0,999883	0,994552	0,996		

Tableau 4 : Statistiques réalisés à partir des essais de gamme d'étalonnage

Le Tableau 4 montre les statistiques réalisées à partir des 3 essais de gamme d'étalonnage. Les coefficients de variation entre les 3 essais sont acceptables. Néanmoins, le coefficient de variation du point d'étalonnage 1 est légèrement plus élevé que les autres. Ceci est dû à la valeur obtenue lors de l'essai 3, plus faible que les deux autres. On accepte tout de même la validation de la méthode d'autant plus que les coefficients de variation entourant la valeur cible (2 mg/mL) sont plus faibles, atteignant un maximum de 2,5%.

Le coefficient de variation correspondant à la valeur de la pente de la droite est lui aussi acceptable.

Le coefficient r^2 correspond au coefficient de corrélation linéaire. Lorsque les points sont parfaitement alignés, sa valeur est de 1,0. Ici, il est supérieur à 0,99. Cette valeur est donc satisfaisante.

La gamme d'étalonnage est donc considérée comme étant linéaire et reproductible.

La limite de détection (LOD) a été ici calculée à partir du bruit de fond [35]. Elle correspond à la plus petite quantité d'analyte que l'on peut détecter dans un échantillon.

$$LOD = 3,3 \times h_{max} \times \frac{\text{Quantité injectée}}{\text{Signal enregistré (hauteur)}}$$

$$LOD = 3,3 \times 10 \times \frac{0,99}{87}$$

$$LOD = 0,34 \text{ mg/mL}$$

Dans la formule, h_{max} correspond à l'amplitude maximale du bruit de fond.

La limite de détection est donc bien respectée pour tous les points de la gamme d'étalonnage.

Fit Analysis Output For Method File:

C:\TOTALCHROM\METHODS\METHOTREXATE\AURELIE.MTH

Reprocess Number : hplc_d6xml1j: 8110

Component Name : methotrexate

Date : 21/10/2011 17:22:56

Curve Parameters:

Curve #1 : 1st Order
 Weighting Factor = 1 (No Weighting) R-Squared = 0.999883
 Calibration Curve : $Y = (78835.941529) + (796730.150695) X$

Curve #1 : Level Name	Observed X-Value	Calculated X-Value	Delta	%Diff.	Observed Y-Value	Calculated Y-Value	Delta	%Diff.
cal1	1.000000	0.996715	0.003285	0.330	874942.349200	877566.092	-2623.743	-0.299
cal2	1.500000	1.495714	0.004286	0.287	1273507.767379	1276931.168	-3423.400	-0.268
cal3	2.000000	2.008220	-0.008220	-0.409	1682861.804906	1676296.243	6565.562	0.392
cal4	2.500000	2.509558	-0.009558	-0.381	2083295.366972	2075661.318	7634.049	0.368
cal5	3.000000	2.989793	0.010207	0.341	2466873.926142	2475026.394	-8152.467	-0.329

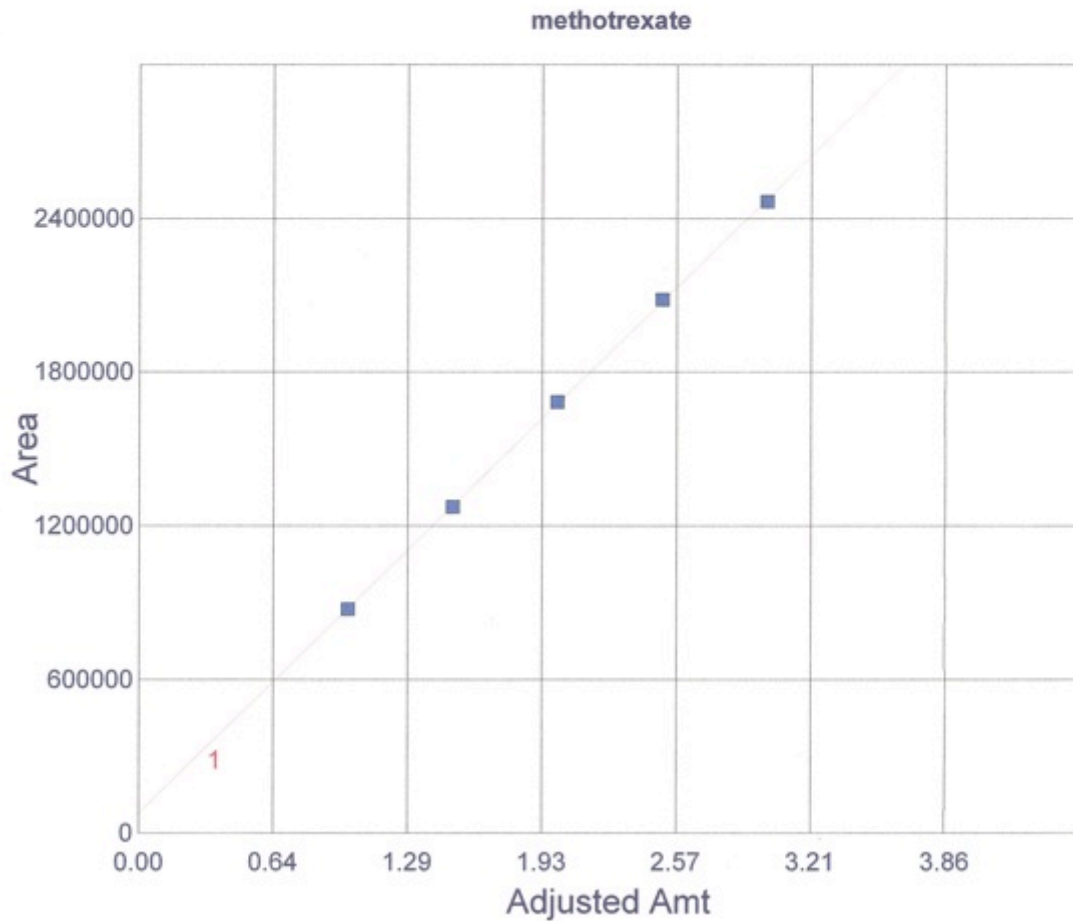


Figure 11 : Exemple de gamme d'étalonnage

La limite de quantification (LOQ) a également été calculée à partir du bruit de fond. Elle correspond à la plus petite quantité d'analyte contenue dans un échantillon pouvant être quantifiée avec une exactitude définie.

$$LOQ = 10 \times h_{max} \times \frac{\text{Quantité injectée}}{\text{Signal enregistré (hauteur)}}$$

$$LOQ = 10 \times 10 \times \frac{0,99}{87}$$

$$LOQ = 1,13 \text{ mg/mL}$$

Néanmoins, cette méthode de calcul est approximative. Il aurait été préférable d'analyser des solutions de concentration connues en MTX qui sont diluées jusqu'à ce que le rapport signal/bruit présente la valeur attendue de 10.

La limite de quantification n'est donc pas respectée en ce qui concerne le premier point de gamme d'étalonnage qui est dosé à 1 mg/mL. Il aurait été préférable de rapprocher les points de la gamme d'étalonnage de la valeur cible de 2 mg/mL et de réaliser une gamme comprenant les points 60%, 80%, 100%, 120% et 140% de la concentration cible et non 50% ,75% ,100%, 125% et 150% comme dans cette étude.

3. Méthode pour l'étude de la stabilité bactériologique

La pharmacopée précise des seuils de contaminations à respecter. Une préparation aqueuse destinée à la voie orale devra ainsi respecter les critères suivants :

- Germes aérobies totaux < 10^2 UFC/mL
- Moisissures et Levures < 10^1 UFC/mL
- Absence d'*Escherichia coli* sur 1 mL [33]

La pharmacopée précise que si le produit à examiner possède une activité antimicrobienne, celle-ci est autant que possible éliminée ou neutralisée [33]. Le méthotrexate pourrait avoir ce type d'activité, il a donc été décidé de vérifier que celui-ci n'empêche pas la pousse de bactéries en contaminant directement une solution buvable contenant du MTX et en vérifiant 7 jours plus tard la pousse bactérienne. De même, l'Ora-Sweet® possède dans sa composition des conservateurs antimicrobiens : le methylparabene et le sorbate de potassium. Ces deux conservateurs possèdent à la fois une activité antibactérienne et une activité antifongique [36]. Le second témoin positif, qui ne contient pas de MTX mais uniquement de l'Ora-sweet®, du bicarbonate de sodium et de l'eau ppi, permettra de disculper ou non ces agents conservateurs.

Réalisation des lots de solutions buvables pour l'étude

Plusieurs solutions ont donc été préparées pour constituer les lots de l'étude : un lot contenant du MTX et un autre contenant les mêmes proportions d'excipients, mais dans lequel le MTX est remplacé par de l'eau stérile. Tous les lots préparés ont été conservés à l'abri de la lumière et à température ambiante (20°C).

Les flacons de solution contenant du MTX ont été préparés suivant le protocole de fabrication en vigueur à la pharmacie (cf. fiche de fabrication, annexe 9). 7 flacons de 30 mL ont ainsi été préparés. Les flacons utilisés pour le conditionnement sont des flacons de verre brun, comme dans le cas d'une préparation visant à être délivrée.

La fréquence d'administration du MTX chez les patients étant d'une dose tous les 7 jours, 3 flacons ont servi à l'analyse tous les 7 jours sur un mois. 3 flacons ont servi à l'analyse après 4 mois de stockage. Le dernier flacon sert de témoin positif : il a été contaminé le jour de sa production grâce à un écouvillon contaminé par des prélèvements au sol et il a été analysé 7 jours plus tard.

7 flacons de 30 mL de solution contenant de l'eau stérile à la place du MTX ont été préparés (cf. fiche de fabrication, annexe 10). Dans ce cas, la préparation effectuée ne possédant pas de produit cytotoxique dans sa composition, toutes les étapes de la préparation peuvent être réalisées dans la salle de préparation pour poudre non toxique et non stérile. Pour l'analyse, ces flacons ont été répartis comme ceux contenant du MTX : 3 flacons pour l'analyse sur 1 mois, 3 flacons pour l'analyse après 4 mois de conservation et 1 dernier flacon contaminé, correspondant à un témoin positif.

Protocole de l'étude

Les échantillons de solution buvable à analyser ont été prélevés stérilement et transportés au laboratoire de bactériologie du CHU pour l'ensemencement des prélèvements, l'incubation des milieux de culture, la lecture et l'identification éventuelle des bactéries.

Numéro du flacon	Intitulé	Jour de prélèvement					
		J0	J7	J14	J21	J28	J120
1	Sirop avec MTX	X					X
2	Sirop avec MTX	X					X
3	Sirop avec MTX	X					X
4	Sirop avec MTX	X	X	X	X	X	
5	Sirop avec MTX	X	X	X	X	X	
6	Sirop avec MTX	X	X	X	X	X	
7	Sirop avec MTX (contaminé)		X				
8	Sirop sans MTX	X					X
9	Sirop sans MTX	X					X
10	Sirop sans MTX	X					X
11	Sirop sans MTX	X	X	X	X	X	
12	Sirop sans MTX	X	X	X	X	X	
13	Sirop sans MTX	X	X	X	X	X	
14	Sirop sans MTX (contaminé)		X				

Tableau 5 : tableau récapitulatif des échantillons à analyser par jour d'analyse

Les prélèvements sont ensemencés selon un protocole défini avec le service de bactériologie du CHU. Les recherches bactériennes n'ont pas été effectuées en utilisant les milieux de culture indiqués par la pharmacopée. Elles ont été réalisées grâce à des milieux de culture utilisés au laboratoire de bactériologie du CHU et adaptés à la recherche des bactéries exigée par la pharmacopée.

Le sirop prélevé est d'abord dilué au $1/10^{\text{ème}}$ dans du sérum physiologique.

Cette dilution est ensuite ensemencée sur différentes géloses. Tout d'abord, elle est ensemencée sur deux géloses COS (gélose Columbia additionnée de 5% de sang de mouton). Une de ces géloses sera incubée en aérobie, l'autre en anaérobie. Ce type de gélose constitue un apport nutritif riche, il permet la croissance de la majorité des espèces bactériennes et notamment la croissance des microorganismes exigeants [37].

Ensuite, la dilution est ensemencée sur une gélose UTI, une gélose chromogène qui permet l'identification rapide de certaines bactéries pathogènes notamment *Escherichia coli*, des *Enterococcus* et des coliformes grâce à la présence de deux substrats chromogènes dans la gélose qui induisent une coloration différente des colonies selon le type de bactéries présentes. Ces substrats chromogènes sont clivés par différentes enzymes produites par les bactéries. Les colonies formées par *Escherichia coli* présenteront une couleur rouge-rosé grâce à l'activité de clivage de la β -galactosidase produite par cette bactérie. L'activité de la β -glucosidase produite par les espèces *Enterococcus* produira une coloration bleu turquoise. Les coliformes possèdent les deux types d'enzymes, la coloration des colonies sera donc bleu foncé à violette [38].

Enfin, une gélose Sabouraud est également ensemencée grâce à la dilution. Cette gélose permet de détecter la présence de moisissures et de levures.

500 μ L de sirop sont également ensemencés dans un bouillon d'enrichissement BHI (bouillon cœur-cervelle). Grâce à ce milieu liquide, la culture de très nombreux microorganismes (aérobies, anaérobies, levures, moisissures) est possible. Il permet une multiplication des microorganismes lorsque ceux-ci sont en quantité insuffisante pour pousser directement après ensemencement sur gélose [39]. Si le bouillon devient trouble, cela signifie qu'il y a contamination. Les bactéries devront alors être réensemencées sur gélose COS afin de permettre une identification ultérieure.

4. Méthode pour l'étude du pH de la solution buvable

Les échantillons utilisés sont ceux employés pour l'étude de stabilité par HPLC. Le pH des solutions de MTX conservées à 37°C, 20°C et 4°C a été mesuré à J0 et à 4 mois afin de vérifier si celui-ci a évolué et s'il est dans la fourchette idéale pour la conservation du MTX. Le pH doit donc se situer entre 6,6 et 8,2, le plus important étant qu'il ne soit pas inférieur à 6,6 pour ne pas risquer une précipitation du MTX [9].

III. Résultats - Discussion

1. Caractères organoleptiques de la solution

Les caractères organoleptiques d'une solution sont des caractéristiques évaluées par les organes des sens : couleur, aspect, odeur, goût...[40]

Dans le cas de la solution buvable de méthotrexate, les caractères odeur et goût n'ont pas pu être évalués étant donné la nature toxique du principe actif. Seules les variations de couleur et d'aspect de la solution seront donc développées ici.

Aspect de la solution

La solution buvable de MTX est une solution légèrement visqueuse. Cette viscosité est attribuée à la présence de l'excipient Ora-Sweet®. Visuellement, cet aspect ne semble pas modifié lors de l'étude.

Quelle que soit la température de conservation, aucun précipité n'est apparu dans les flacons pendant les 4 mois de l'étude. Les solutions sont restées limpides (cf. Figure 12).

Les flacons placés à 37°C présentent une caramélisation de la solution au niveau du bouchon que ne présentent pas les flacons conservés à 4°C et 20°C.

Couleur de la solution

Une solution buvable de MTX fraîchement préparée montre une couleur jaune fluorescente. Cette couleur résulte d'une propriété de la molécule de méthotrexate.

Lors de l'étude, les flacons placés à 4°C et à 20°C ne montrent pas de changement visuellement significatif de couleur. Contrairement à cela, les flacons placés à 37°C ont vu leur couleur modifiée dès le début de l'étude. Leur couleur est devenue de plus en plus foncée,

passant de jaune fluorescente à jaunâtre puis à brune. Ce changement de couleur peut témoigner de la dégradation du méthotrexate.

Il est possible de voir ce changement de couleur sur la Figure 12, une photographie prise lors du 91^{ème} jour de l'étude. A gauche, le premier tube contient un échantillon d'un flacon de la solution conservée à 37°C. Au milieu, le tube contient un échantillon d'un flacon de la solution conservée à 4°C. A droite, le troisième tube contient un échantillon d'un flacon de la solution conservée à 20°C. La différence de couleur entre le tube de gauche et les deux autres tubes est indéniable.



Figure 12 : Photographie des différentes solutions dans chaque condition de conservation à J91

2. Résultats de l'étude de stabilité chimique

Evolution de la concentration en principe actif

Les dosages ont d'abord été effectués toutes les semaines puis ensuite, constatant le peu de changement entre deux mesures à température ambiante et 4°C, les analyses ont été réalisées toutes les deux semaines environ. La durée totale de l'étude a été de 119 jours. La Figure 13 montre l'évolution de la concentration du principe actif dans les flacons de solution buvable pendant ces 119 jours.

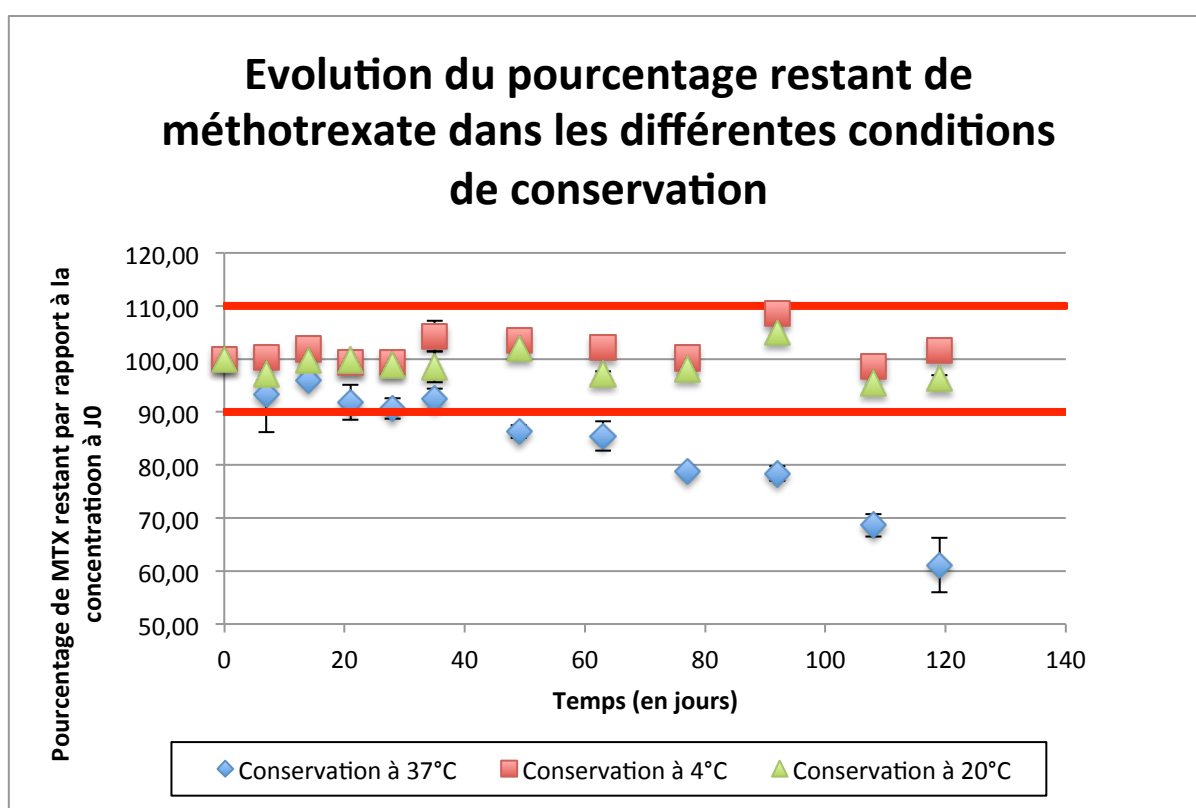


Figure 13 : Evolution du pourcentage restant de MTX pendant l'étude

La concentration en MTX dans les échantillons conservés à 37°C diminue fortement. La différence entre ces échantillons et ceux conservés à 20°C et 4°C est prononcée et elle apparaît dès les premières mesures, dès le 1^{er} mois de l'étude. La moyenne des concentrations en MTX passe sous la limite acceptable après 49 jours de stockage à 37°C. Elle est en effet de 86,3 +/- 1,2% de la concentration initiale, soit en-dessous de la limite de 90% de la concentration initiale. Il est même possible d'observer que la limite est déjà dépassée à J7 si

l'on considère la barre d'écart-type, étant donné qu'un des trois résultats obtenus se trouve déjà hors limite (85,6%). Le même phénomène se produit à J21 et J28. A la fin de l'étude, après 119 jours de stockage, la concentration en MTX est effondrée et atteint $61,1 \pm 5,1\%$ de la concentration initiale.

Dans le cas des flacons stockés à 20°C, la concentration en MTX diminue légèrement. Le taux le plus faible mesuré est de $95,5 \pm 1,2\%$ après 108 jours de conservation. Ce taux est au-dessus de la limite fixée de 90%. Les valeurs imposées par les normes ICH en matière de concentration en principe actif sont également respectées [41].

La conservation de la solution buvable à 4°C est celle utilisée actuellement. Elle permet une stabilité du taux de MTX, celui-ci restant, au long des 4 mois de l'étude, aux alentours de 100%. Le taux le plus faible mesuré est de $98,7 \pm 1,8\%$ après 108 jours de conservation.

Evolution de la concentration en produits de dégradation

Au cours de l'étude, il a été possible d'observer l'apparition de composés de dégradation dans les flacons de solution buvable de MTX.

L'évolution de ces composés est nettement visible sur les chromatogrammes obtenus lors de l'étude. On peut ainsi noter une différence entre le chromatogramme obtenu lors du premier jour de l'étude (cf. Figure 14) et ceux obtenus à J28, J63, J92 et J119 (cf. Figure 15 à 18). En effet, on observe l'apparition de différents pics correspondant à des produits de dégradation à gauche du pic correspondant au MTX. Ces pics sont de plus en plus importants au fil de l'étude.

Il est possible d'observer sur les chromatogrammes suivants que le temps de rétention du MTX a augmenté le long de l'étude. Cette augmentation est très probablement due à une chute de la pression d'analyse elle-même causée par un problème au niveau de la pompe. Afin de s'affranchir de ce problème et d'être certains qu'il s'agit bien du pic correspondant au MTX et non de l'apparition d'un nouveau composé de dégradation, la gamme d'étalonnage a été réalisée lors de chaque analyse.

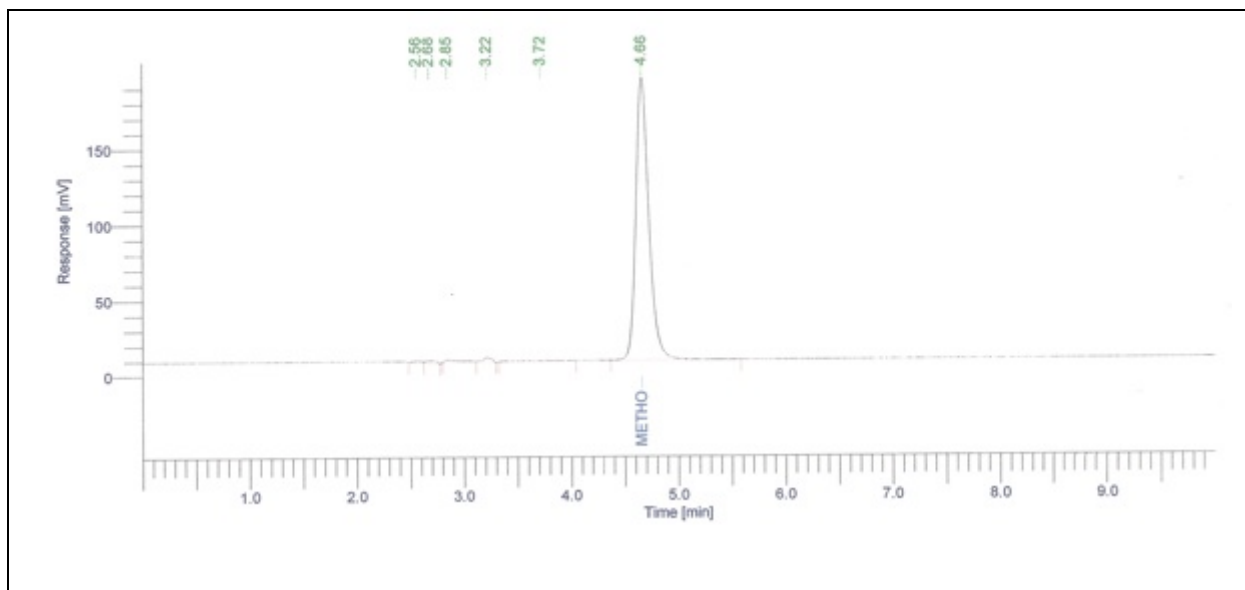


Figure 14 : Chromatogramme obtenu à J0

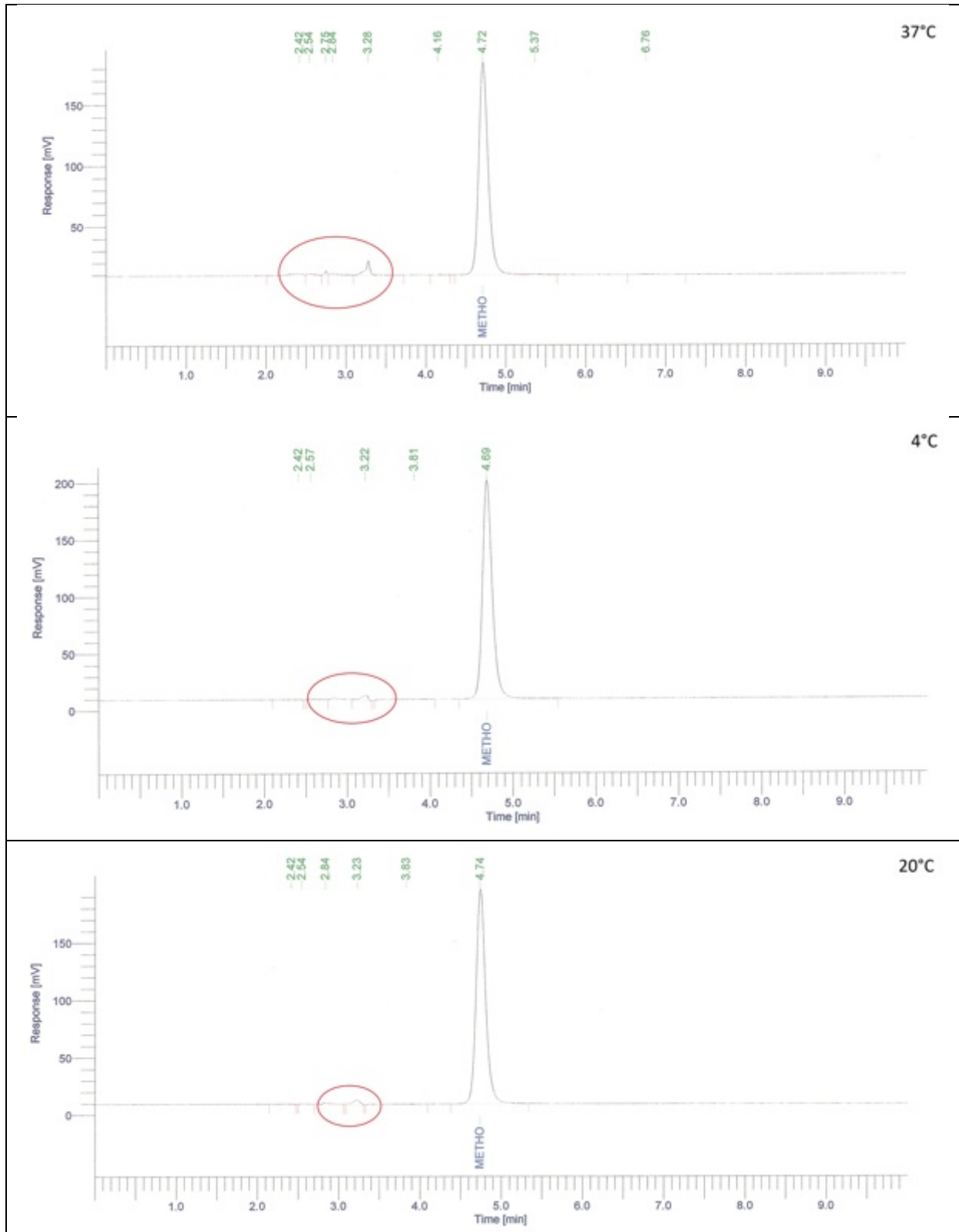


Figure 15 : Chromatogrammes obtenus à J28 : en haut dans le cas de la conservation à 37°C, au milieu à 4°C et en bas à 20°C

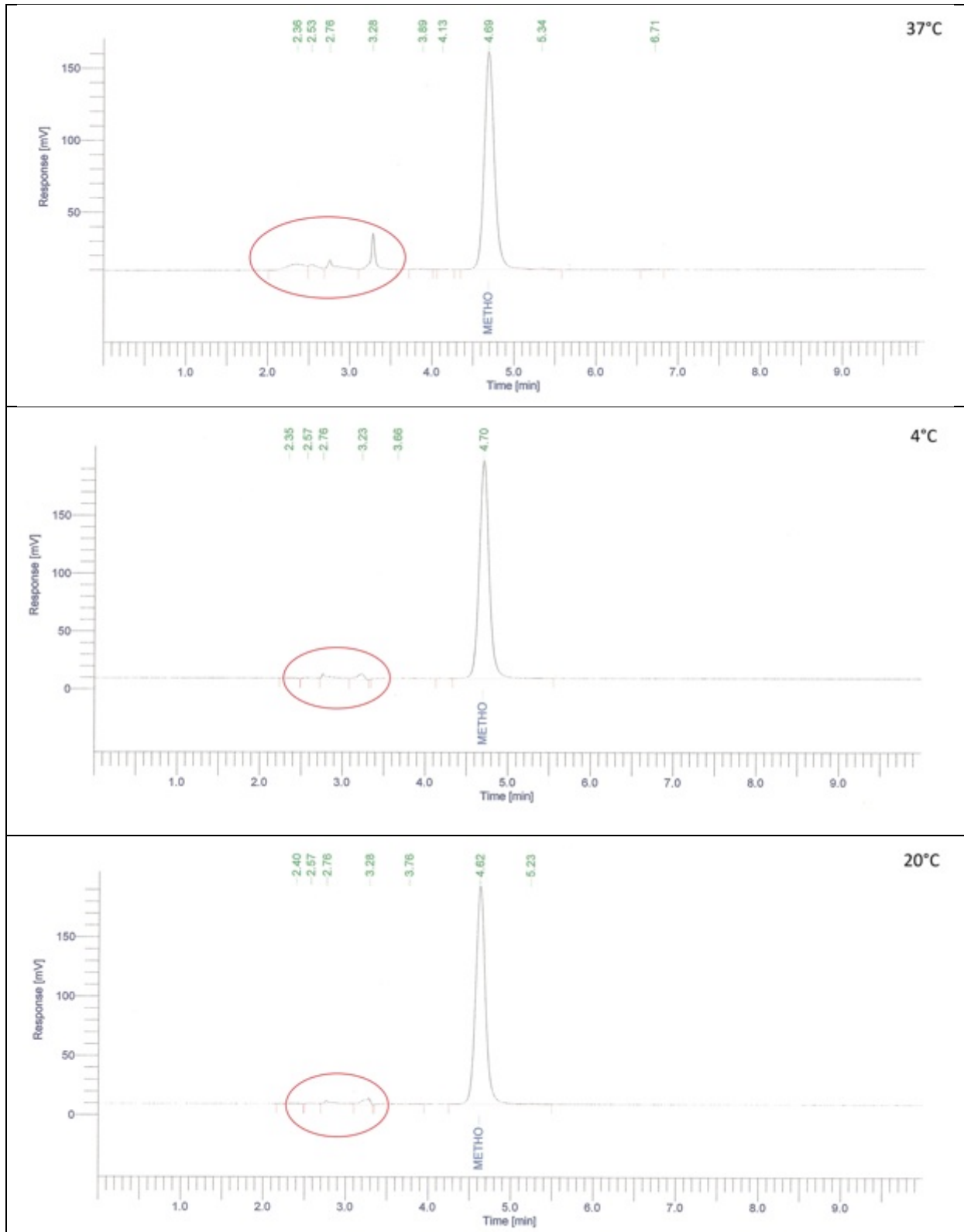


Figure 16 : Chromatogrammes obtenus à J63 : en haut dans le cas de la conservation à 37°C, au milieu à 4°C et en bas à 20°C

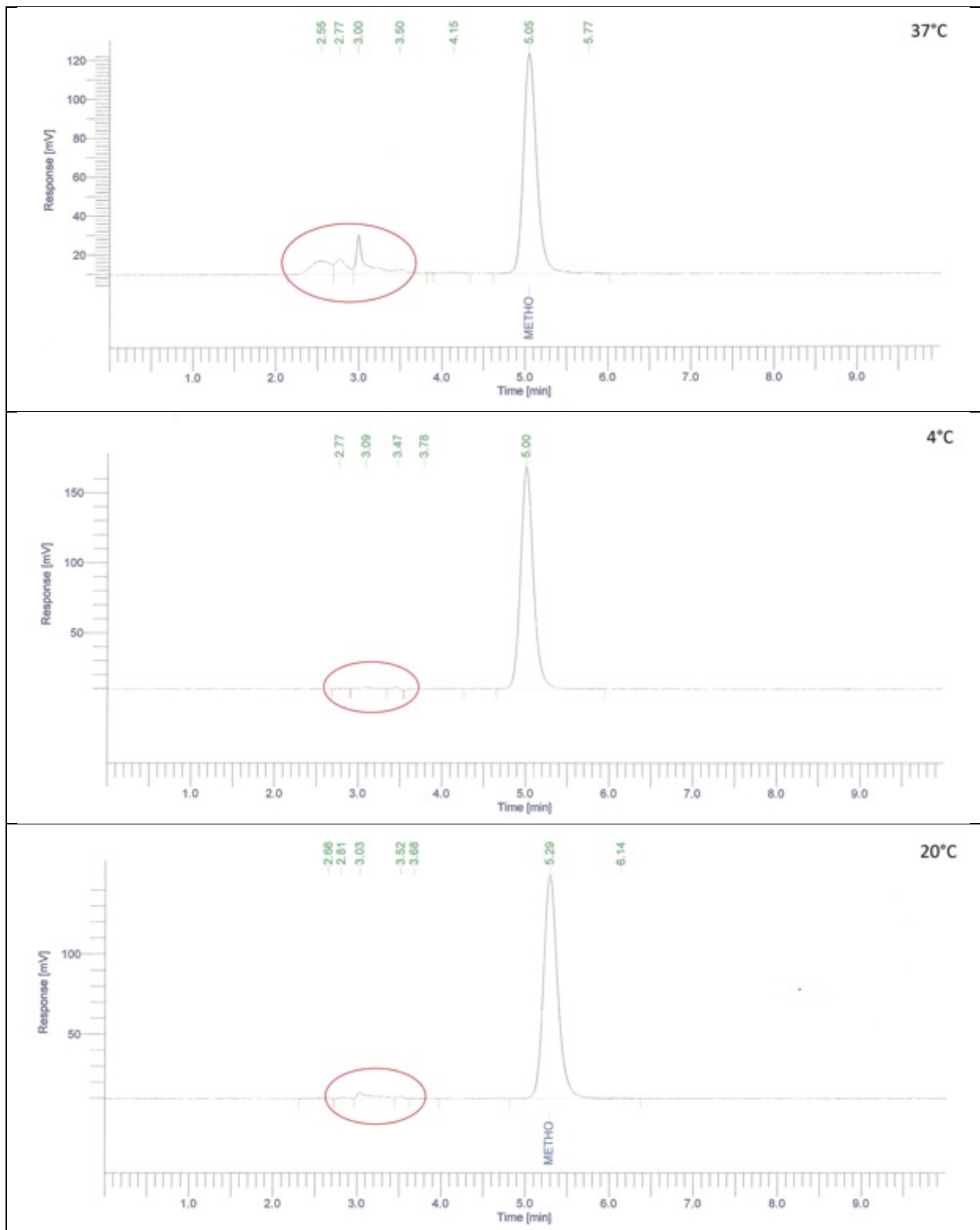


Figure 17 : Chromatogrammes obtenus à J92 : en haut dans le cas de la conservation à 37°C, au milieu à 4°C et en bas à 20°C

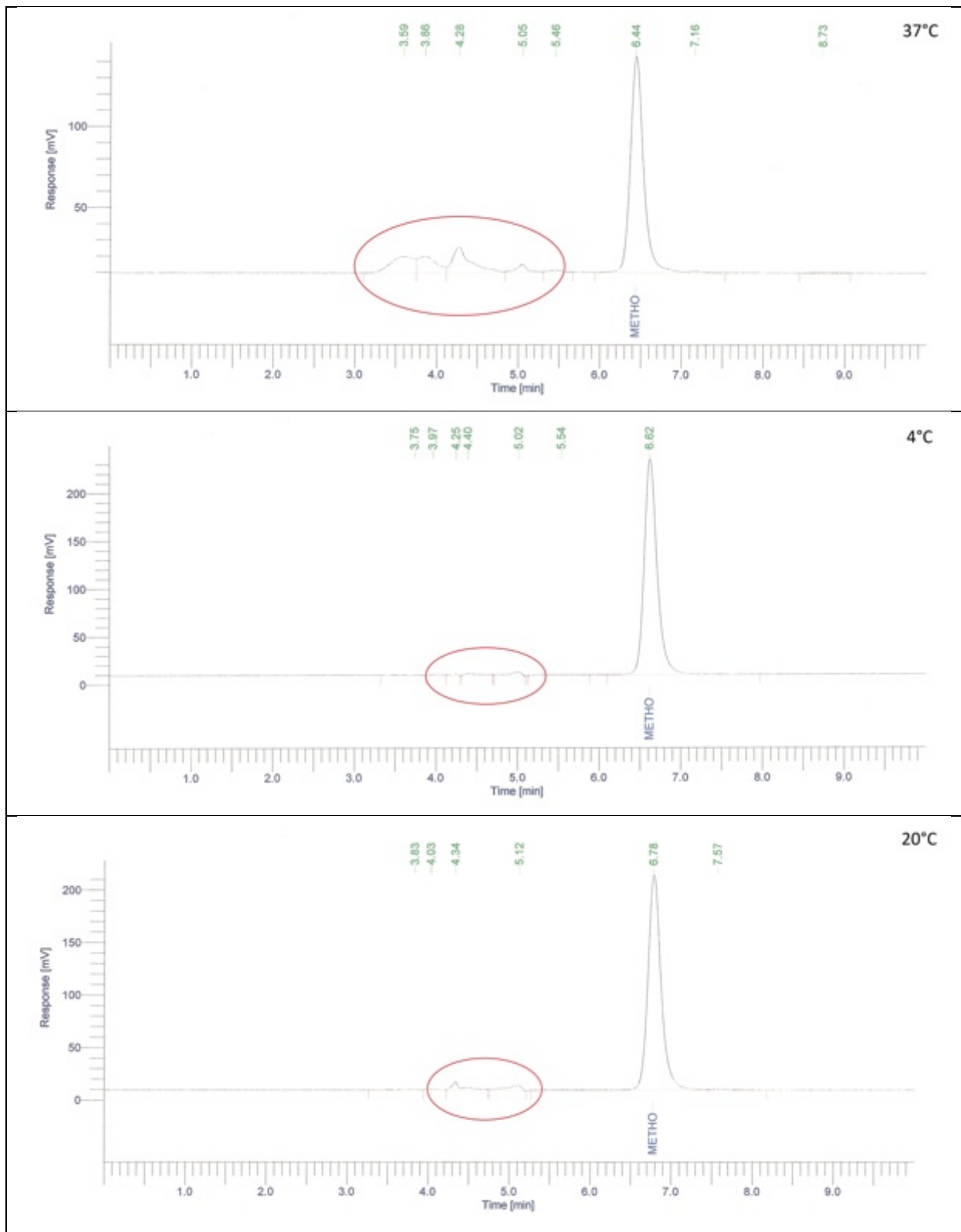


Figure 18 : Chromatogrammes obtenus à J119 : en haut dans le cas de la conservation à 37°C, au milieu à 4°C et en bas à 20°C

Grâce au logiciel TotalChrom 6.21, il est possible de déterminer le pourcentage de ces composés de dégradation. Il est ainsi possible de mesurer l'augmentation du pourcentage des produits de dégradation dans les différents flacons et d'établir une moyenne de concentration des composés de dégradation dans chaque condition (cf. Figure 19).

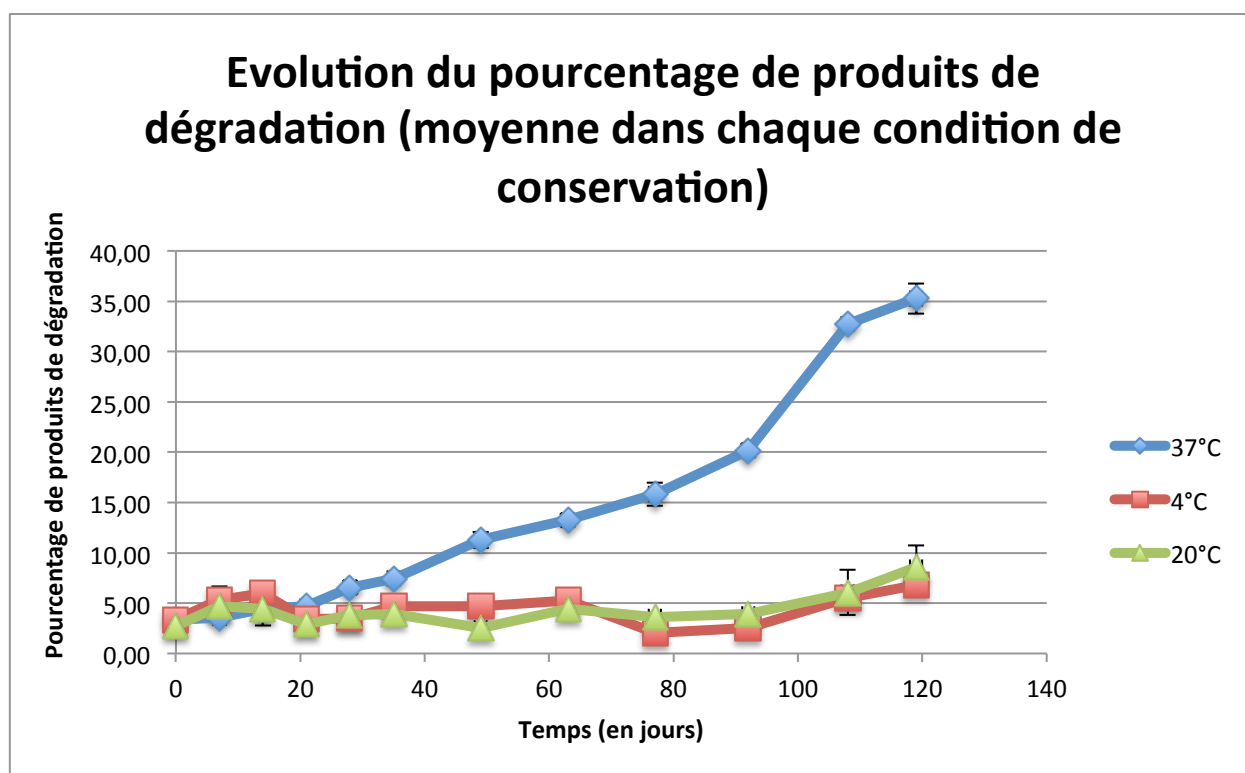


Figure 19 : Evolution de la moyenne des pourcentages de produits de dégradation dans les différentes conditions de conservation

On constate que dans le cas de la conservation à 37°C, la concentration des produits de dégradation augmente rapidement et dépasse celle observée dans les autres conditions de conservation, et ce dès le 20^{ème} jour de l'étude. Ensuite, la concentration ne fait qu'augmenter et ce de manière assez rapide. Au départ, la concentration en composés de dégradation dans ces flacons était de 3,1 +/- 0,4%. Elle atteint 6,6 +/- 0,6% après 28 jours de conservation et 35,3 +/- 1,5% à la fin de l'étude, après 119 jours de conservation à 37°C.

Dans le cas des flacons conservés à 4°C, la concentration des composés de dégradation augmente légèrement, elle passe de 3,1 +/- 0,4% au début de l'étude à 6,8 +/- 0,2% à la fin de celle-ci.

Enfin, dans le cas de la conservation à 20°C, la concentration en produits de dégradation observée à la fin de l'étude est légèrement supérieure à celle observée à 4°C, atteignant ainsi 8,6 +/- 2,2%.

Les résultats de l'étude par montrent que la condition de conservation à 37°C n'est pas envisageable pour la solution buvable de MTX, que ce soit au niveau de la concentration en principe actif, qui devient rapidement insuffisante, ou alors au niveau de la concentration très importante en produits de dégradation. Par chance, il est rare de conserver les médicaments à une telle température dans nos régions. Néanmoins, l'étude de la solution dans cette condition permet de visualiser le profil de dégradation accélérée du produit. Le travail effectué comporte néanmoins une limite. En effet, si l'on suit les recommandations ICH, les études visant la dégradation accélérée des produits se déroulent généralement plutôt à une température supérieure à 40°C dans des enceintes contrôlées, avec une maîtrise de l'humidité ambiante [41]. L'indisponibilité d'une telle étuve a empêché la réalisation de l'étude de l'évolution de la solution buvable dans ces conditions.

La conservation donnant les meilleurs résultats tout au long des 119 jours de l'étude tant du point de vue de la concentration en principe actif que de la concentration en produits de dégradation est la conservation à 4°C.

Dans le cas des flacons stockés à 20°C, la concentration en MTX diminue légèrement, le taux le plus faible étant de 95,5 +/- 1,2% de la concentration initiale en MTX. Ce taux est au-dessus de la limite fixée de 90%. Cette condition de conservation respecte donc cette qualité et pourrait être envisageable. Néanmoins, la teneur en composés de dégradation dépasse celle obtenue avec la conservation à 4°C. Un test de Student de comparaison des moyennes a été effectué et il apparaît qu'il existe une différence significative entre les résultats obtenus à 4°C et 20°C. La conservation à 4°C est donc recommandée.

Une autre limite de cette expérimentation consiste en l'absence d'identification de ces produits de dégradation. En effet, les produits de dégradation ne doivent pas posséder une toxicité supérieure à celle du principe actif. Cette identification n'a pas été réalisée par manque de temps et demanderait des études plus poussées.

Le profil de dégradation théorique du MTX a néanmoins été étudié. Lorsqu'il est en solution aqueuse d'hydrogénocarbonate et s'il est placé sous irradiation, le MTX se dégrade en 3 composés : 2,4-diamino-6-ptéridinecarbaldéhyde (cf. Figure 20), acide 2,4-diamino-6-ptéridinecarboxylique (cf. Figure 21) et acide N-(4-aminobenzoyl)glutamique (cf. Figure 22). Il suffira donc de limiter l'exposition aux irradiations comme par exemple aux rayons UV pour éviter ce type de dégradation [8].

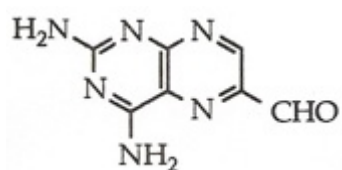


Figure 20 : 2,4-diamino-6-ptéridinecarbaldéhyde

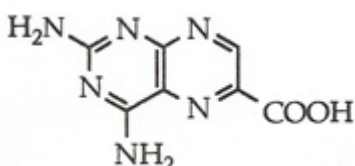


Figure 21 : acide 2,4-diamino-6-ptéridinecarboxylique

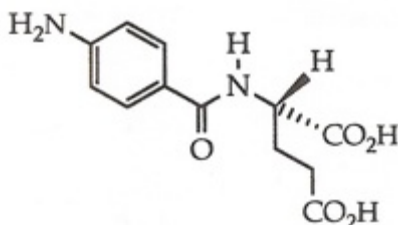


Figure 22 : acide N-(4-aminobenzoyl)glutamique

Le méthotrexate peut également subir une photodécomposition qui conduit à de faibles quantités de 2 composés différents. Grâce à une désamination du carbone en position 4, on obtient la méthoptérine (acide 10-méthylptéroylglutamique) (cf. Figure 24). Une déméthylation de l'azote en position 10 conduit à l'aminoptérine (cf. Figure 24) [8]. Ce composé, voisin du méthotrexate, possède également des propriétés antitumorales mais il possède un index thérapeutique moins favorable que le méthotrexate [42].

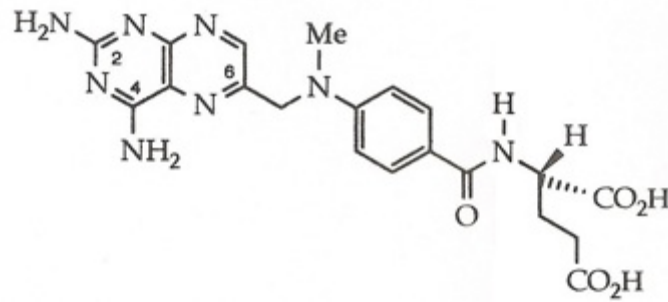


Figure 23 : Molécule de MTX pour rappel

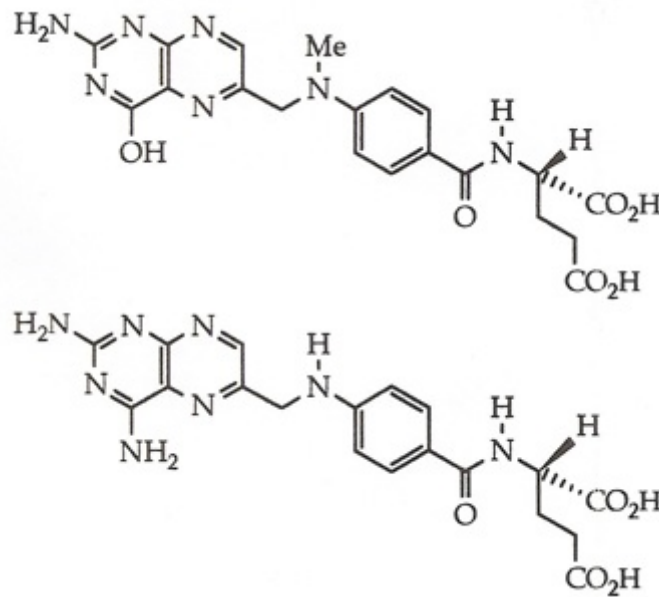


Figure 24 : Molécules de méthoptérine (haut) et aminoptérine (bas)

La toxicité de tous ces dérivés n'a pas été forcément étudiée, mis-a-part celle de l'aminoptérine qui est donc théoriquement légèrement plus élevée que le MTX. Il apparaît donc très important de bien préserver les solutions buvables de MTX des rayons lumineux.

3. Résultats de l'étude bactériologique

Numéro du flacon	Intitulé	Jour de prélèvement : Résultats					
		J0	J7	J14	J21	J28	J120
1	Sirop avec MTX	-					-
2	Sirop avec MTX	-					-
3	Sirop avec MTX	-					-
4	Sirop avec MTX	-	-	-	-	-	
5	Sirop avec MTX	-	-	-	-	-	
6	Sirop avec MTX	-	-	-	-	-	
7	Sirop avec MTX (contaminé)		+				
8	Sirop sans MTX	-					-
9	Sirop sans MTX	-					-
10	Sirop sans MTX	-					-
11	Sirop sans MTX	-	-	-	-	-	
12	Sirop sans MTX	-	-	-	-	-	
13	Sirop sans MTX	-	-	-	-	-	
14	Sirop sans MTX (contaminé)		+				

Figure 25 : Tableau récapitulatif des résultats obtenus lors de l'étude bactériologique

+ = présence de bactéries et/ou de levures dans l'échantillon prélevé

- = absence de bactéries et/ou de levures dans l'échantillon prélevé

Les sirops contaminés, avec ou sans MTX, considérés comme témoins positifs (flacons 7 et 14, analysés à J7) ont montré une contamination bactérienne, ce qui signifie que ni le MTX, ni les conservateurs contenus dans l'Ora-Sweet® n'empêchent le développement bactérien. La condition posée par pharmacopée pour mener une étude bactériologique est donc respectée.

La première partie de cette étude concerne une étude sur 1 mois, avec un prélèvement par semaine, comme il est habituel de procéder pour les patients. Les flacons 4, 5 et 6 ont été utilisés pour cette étude. On peut observer que ceux-ci n'ont pas été contaminés bactériologiquement.

La seconde partie concerne une étude sur un plus long terme : 4 mois. Les solutions ont été analysées à J0 puis les flacons ont été conservés à l'abri de la lumière à 20°C. Ils ont été ouverts 4 mois plus tard et un prélèvement a été réalisé afin de savoir si le stockage ne

favorisait pas la contamination bactérienne des solutions. Les résultats ont montré que les solutions étaient exemptes de bactéries. Il est possible d'extrapoler cette absence de contamination pour les solutions qui sont conservées à 4°C.

Le fait de ne pas avoir utilisé les milieux de culture recommandés par la pharmacopée pourrait nous être opposable. Néanmoins, les milieux de culture utilisés sont bien adaptés à la recherche demandée.

En conclusion, les solutions buvables de MTX sont conformes aux recommandations de la pharmacopée pour les préparations aqueuses destinée à la voie orale (Germes aérobies totaux < 10^2 UFC/mL, Moisissures et Levures < 10^1 UFC/mL et absence d'*Escherichia coli* sur 1 mL) et peuvent donc être délivrées aux patients.

4. Résultats de l'étude du pH de la solution buvable

Les résultats des mesures de pH des solutions de MTX conservées à 37°C, 20°C et 4°C effectuées après 4 mois de conservation sont présentés dans le Tableau 6. Le pH de la solution contenue dans le flacon 5 n'a pas pu être déterminé car le volume de solution restant était trop faible.

Flacons	Température de conservation	pH mesuré
Flacon 1	37°C	7,78
Flacon 2		7,79
Flacon 3		7,62
Flacon 4	4°C	8,84
Flacon 6		8,88
Flacon 7	20°C	8,53
Flacon 8		8,52
Flacon 9		8,53

Tableau 6 : Résultats des mesures de pH effectuées

Les solutions ont un pH supérieur au seuil de 6,6 au-dessous duquel le MTX peut précipiter. Ce pH légèrement basique peut être conservé grâce à la présence du bicarbonate de sodium dans la solution qui peut ainsi contrebalancer le pH de l'Ora-Sweet®. En effet, l'Ora-Sweet® possède un pH acide, situé aux environs de 4,2. Sans la présence du bicarbonate de sodium, le MTX précipiterait.

Le pH de la solution fraîchement préparée, mesuré le lendemain de sa préparation, est de 8,07. On observe donc qu'il a diminué dans le cas de la conservation à 37°C et augmenté dans les cas des conservations à 4°C et 20°C (Tableau 7).

Condition de conservation	Différence par rapport au pH mesuré à J1 (%)
37°C	-4,2%
4°C	9,8%
20°C	5,7%

Tableau 7 : Différence entre le pH mesuré à J1 et à J141 dans chaque condition de conservation

Quelque soit la condition de conservation, le pH des solutions buvables reste dans une fourchette acceptable pour la bonne conservation du MTX.

La solution est légèrement visqueuse étant donné qu'elle est composée pour une partie d'Ora-Sweet®. Le pH mesuré peut donc varier du pH réel de la solution. Pour s'affranchir de ce problème, il serait intéressant de refaire ces mesures avec une sonde adaptée aux solutions visqueuses.

IV. Conclusion

La conservation pendant 4 mois à 4°C à l'abri de la lumière est donc validée par cette étude. Cette condition respecte les indicateurs choisis pour l'observation de la stabilité de la solution : concentration en principe actif suffisante, absence de contamination bactériologique et pH de la solution adapté à la conservation du principe actif. La formulation de la solution buvable est bien adaptée. En effet, les excipients jouent bien leur rôle quand à la conservation du produit : le bicarbonate de sodium empêche une variation trop importante du pH de la solution et les excipients conservateurs contenus dans l'Ora-Sweet® protègent effectivement de la contamination bactérienne.

Dans la mesure où il existe de fortes variations de la biodisponibilité, il serait intéressant, pour compléter ce travail, de réaliser des études de biodisponibilité appropriées afin de vérifier que la dose administrée est effectivement efficace. Ces études pourraient être réalisées dans le cadre d'un essai clinique.

50% des préparations hospitalières déclarées à l'ANSM entre 2008 et 2011 visaient un traitement pédiatrique, la plupart étant des adaptations de formes galéniques destinées aux adultes [2].

La solution buvable de méthotrexate fera bientôt partie de ces préparations hospitalières. En effet, grâce à cette étude, la solution va pouvoir être conservée jusqu'à 4 mois à 4°C, à l'abri de la lumière. Elle pourra donc être préparée à l'avance et stockée dans des conditions appropriées à la pharmacie du CHU.

Ainsi, le temps d'attente à la pharmacie du CHU pour obtenir la préparation sera réduit. Ce travail permet donc de faciliter la vie des familles déjà fragilisées par la maladie.

Bibliographie

- [1] M. DARDENNE - *Les préparations pédiatriques, situation en 2010 et exemples pratiques*, thèse d'exercice : Pharmacie, Université d'Angers, Angers, 2010 - 80 p.
- [2] M. BAY, C. SAINT-LAURENT ET A. DUPUIS - *Les préparations buvables en pédiatrie - Actualités Pharmaceutiques Hospitalières* - mai 2011 - vol. 7, n° 26 - p. 20-24.
- [3] C. BINET, M. ZANDECKI ET SOCIETE FRANÇAISE D'HEMATOLOGIE - *Hématologie* - Issy-les-Moulineaux : Elsevier-Masson, 2011 - 360 p.
- [4] R. MERTELSMANN, M. ENGELHARDT ET D. P. BERGER - *Précis d'hématologie et d'oncologie* - Paris : Springer, 2011 - 1042 p.
- [5] D. SOMMELET, J. CLAVEL ET B. LACOUR - *Épidémiologie des cancers de l'enfant* - Paris : Springer, 2009 - 371 p.
- [6] C. KALIFA, F. PEIN, J. LEMERLE, ET AL. - *Cancers de l'enfant* - Paris : Flammarion médecine-sciences, 2008 - 378 p.
- [7] A. GOUBIN, M. F. AUCLERC, A. AUVRIGNON, ET AL. - *Survival in France after childhood acute leukaemia and non-Hodgkin's lymphoma (1990-2000)* - Eur. J. Cancer - 2006 - vol. 42, n° 4 - p. 534-541.
- [8] ASSOCIATION FRANÇAISE DES ENSEIGNANTS DE CHIMIE THERAPEUTIQUE - *Traité de chimie thérapeutique : Médicaments antitumoraux et perspectives dans le traitement des cancers* - Cachan : Ed. médicales internationales, 2003 - 879 p.
- [9] M. ALLWOOD, A. STANLEY ET P. WRIGHT - *The Cytotoxics Handbook* - Abingdon : Radcliffe Publishing, 2002 - 504 p.
- [10] L. GENESTIER, R. PAILLOT, L. QUEMENEUR, ET AL. - *Mechanisms of action of methotrexate - Immunopharmacology* - 2000 - vol. 47 - p. 247-257.

- [11] R. GARRETT ET C. GRISHAM - *Chapitre 27 : Synthèse et dégradation des nucléotides*, in *Biochimie*, 2^e éd. - Paris : De Boeck Université, 2000 - p. 899-926.
- [12] L. D. FAIRBANKS, K. RÜCKEMANN, Y. QIU, ET AL. - *Methotrexate inhibits the first committed step of purine biosynthesis in mitogen-stimulated human T-lymphocytes: a metabolic basis for efficacy in rheumatoid arthritis?* - *Biochem J* - 1999 - vol. 342, n^o 1 - p. 143-152.
- [13] E. GRONINGER, J. H. PROOST ET S. S. DE GRAAF - *Pharmacokinetic studies in children with cancer* - *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* - 2004 - vol. 52, n^o 3 - p. 173-197.
- [14] F. M. BALIS, J. L. SAVITCH ET W. A. BLEYER - *Pharmacokinetics of oral methotrexate in children* - *Cancer Res.* - 1983 - vol. 43, n^o 5 - p. 2342-2345.
- [15] P. DOROSZ, D. V. DURAND ET C. L. JEUNNE - *Guide pratique des médicaments*, 32^e éd. - Paris : Maloine, 2012 - 1905 p.
- [16] C. K. TAKETOMO, J. H. HODDING ET D. M. KRAUS - *Pediatric dosage handbook*, 16^e éd. - Hudson : Lexi-Comp, 2009 - 1764 p.
- [17] M. E. BURTON, L. M. SHAW, J. J. SCHENTAG, ET AL. - *Applied Pharmacokinetics and Pharmacodynamics : Principles of Therapeutic Drug Monitoring*, 4^e éd. - Baltimore : Lippincott Williams & Wilkins, 2005 - 867 p.
- [18] T. ADAM DE BEAUMAIS - *Traitement des leucémies aiguës lymphoblastiques chez l'enfant : apport des études pharmacologiques du Méthotrexate et de la 6-Mercaptopurine* - Thèse de doctorat, Université Paris Descartes, Paris, 2010 - 178 p.
- [19] B. C. WIDEMANN, E. SUNG, L. ANDERSON, ET AL. - *Pharmacokinetics and metabolism of the methotrexate metabolite 2, 4-diamino-N(10)-methylpteroic acid* - *J. Pharmacol. Exp. Ther.* - sept. 2000 - vol. 294, n^o 3 - p. 894-901.
- [20] G. FERRAZZINI, H. SOHL, I. ROBIEUX, ET AL. - *Diurnal variation of methotrexate disposition in children with acute leukaemia* - *Eur. J. Clin. Pharmacol.* - 1991 - vol. 41, n^o 5 - p. 425-427.

- [21] A. KALANTZIS, Z. MARSHMAN, D. T. FALCONER, ET AL. - *Oral effects of low-dose methotrexate treatment* - Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod - juill. 2005 - vol. 100, n° 1 - p. 52-62.
- [22] L. PEREIRA PINTO, L. B. DE SOUZA, M. A. GORDON-NUÑEZ, ET AL. - *Prevention of oral lesions in children with acute lymphoblastic leukemia* - Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol. - nov. 2006 - vol. 70, n° 11 - p. 1847-1851.
- [23] eVidal. [En ligne] - Adresse URL : <http://www.evidal.net/> - [Consulte le : 17 juillet 2012].
- [24] J. CALOP, G. AULAGNER, C. FERNANDEZ, ET AL. - *Pharmacie clinique et thérapeutique*, 4^e éd. - Paris : Elsevier Masson, 2012 - 1336 p.
- [25] CRAT - *Centre de référence sur les agents tératogènes chez la femme enceinte*. [En ligne] - Adresse URL : <http://www.lecrat.org/> - [Consulte le : 02 mars 2013].
- [26] ANSM (AGENCE NATIONALE DE SECURITE DU MEDICAMENT ET DES PRODUITS DE SANTE) - *Bonnes pratiques de préparation*, 2007.
- [27] LEGIFRANCE - *Code de la santé publique*. [En ligne] - Adresse URL : <http://www.legifrance.gouv.fr/> - [Consulte le : 12 mars 2013].
- [28] J. F. B. STUART, K. C. CLAMAN, J. WATTERS, ET AL. - *Bioavailability of methotrexate: Implications for clinical use* - Cancer Chemotherapy and Pharmacology - 1979 - vol. 3, n° 4 - p. 239-241.
- [29] PENTAFERTE - *Fiche technique : Accessories for enteral feeding*. 2012.
- [30] V. FAJOLLE, C. DUJOLS, J.C. DARBORD, ET AL. - *Évaluation de suspensions orales pédiatriques de spironolactone, hydrochlorothiazide et captopril : stabilité microbiologique et revue d'utilisation clinique* - Journal de Pharmacie Clinique - janv. 2005 - vol. 24, n° 1 - p. 23-29.

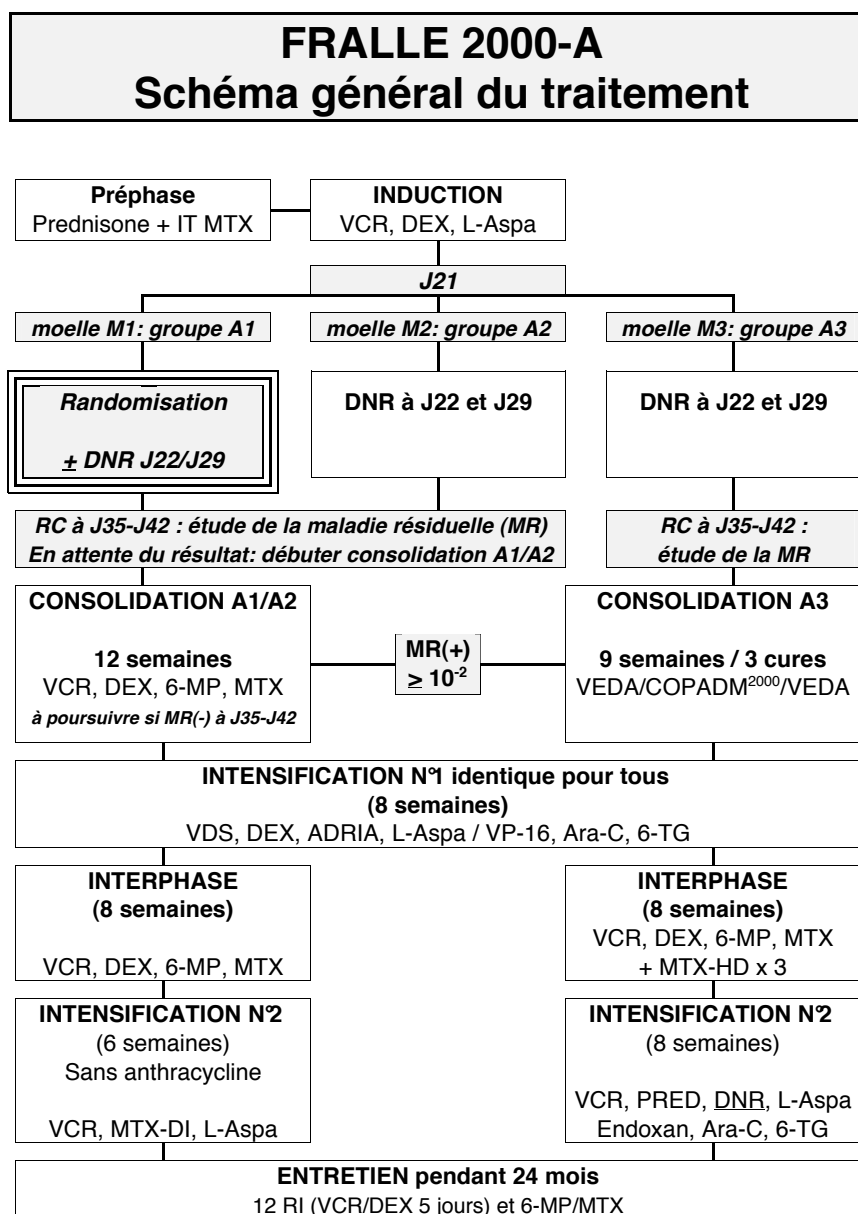
- [31] A. SANTOVEÑA, Z. HERNANDEZ-PAIZ ET J. B. FARIÑA - *Design of a pediatric oral formulation with a low proportion of hydrochlorothiazide* - International Journal of Pharmaceutics - févr. 2012 - vol. 423, n° 2 - p. 360-364.
- [32] M. E. AULTON - *Chapitre 44 : Product stability and stability testing*, in *Aulton's pharmaceuticals : the design and manufacture of medicines* - New York : Elsevier-Churchill Livingstone, 2007 - p. 650-665.
- [33] *Pharmacopée Européenne 7.8.* [En ligne] - Adresse URL : <http://online6.edqm.eu/ep708/> - [Consulte le : 02 janvier 2013].
- [34] H. SIEGERMAN ET K. BONNELL - *Nettoyage et désinfection : les isolateurs pharmaceutiques* - févr. 2007.
- [35] ICH GUIDELINES - *ICH Q2 (R1) : Validation of analytical procedures : text and methodology* - 2005.
- [36] R. C. ROWE, P. J. SHESKEY ET M. E. QUINN - *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 6^e éd. - Londres : Pharmaceutical Press, 2009 - 888 p.
- [37] BIOMERIEUX - *Fiche technique : Gélose Columbia + 5% de sang de mouton*. 2002.
- [38] OXOID - *Fiche technique : Brilliance UTI and UTI clarity agars*. 2008.
- [39] BIOKAR DIAGNOSTICS - *Fiche technique : Bouillon coeur-cervelle*. 2010.
- [40] ACADEMIE NATIONALE DE PHARMACIE - *Dictionnaire des sciences pharmaceutiques & biologiques*, 2^e éd. - Paris : Ed. Louis Pariente, 2001 - 1643 p.
- [41] ICH GUIDELINES - *ICH Q1A (R2) : Stability testing of new drug substances and products* - 2003.

[42] I. R. VLAHOV, F. YOU, H. K. R. SANTHAPURAM, ET AL. - *Design and regioselective synthesis of a new generation of targeted therapeutics. Part 3: Folate conjugates of aminopterin hydrazide for the treatment of inflammation* - Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters - févr. 2011 - vol. 21, n° 4 - p. 1202-1205.

Annexes

Annexe 1 : Schéma général du protocole FRALLE 2000-A

39



Annexe 2 : Protocole FRALLE 2000-A – Consolidation (groupe A1)

43

FRALLE 2000-A

Groupe A1. Consolidation

A débiter dès que $PNN + Monocytes > 1000/mm^3$ et plaquettes $> 100.000/mm^3$.

	J1 J2	J8	J15	J22
Vincristine	V	V		
Dexaméthasone				
Purinéthol				
Méthotrexate		m	m	m
IT simple	IT			
	J29 J30	J36	J43	J50
Vincristine	V	V		
Dexaméthasone				
Purinéthol				
Méthotrexate		m	m	m
IT simple	IT			
	J57 J58	J64	J71	J78
Vincristine	V	V		
Dexaméthasone				
Purinéthol				
Méthotrexate		m	m	m
IT simple	IT			(repos)
Vincristine	: 1,5 mg/m ² /injection (IVD 1 mn)		: J1, J8, J29, J36, J57, J64	
	NE PAS DEPASSER 2 mg par injection.			
Dexaméthasone	: 6 mg/m ² /j (3 prises per os)		: J1 à J5 / J29 à J33 / J57 à J61	
Purinéthol	: 75 mg/m ² /j (per os)		: J1 à J77	
Méthotrexate (m)	: 25 mg/m ² /prise (per os)		: J8, J15, J22, J36, J43, J50, J64, J71, J78	
IT simple	: MTX : J2, J30, J58 ; posologie : cf. Annexe 6			

NB1 : En l'absence de problème clinique, cette consolidation est à poursuivre sans modification tant que les PNN sont $> 500/mm^3$ et les plaquettes $> 50.000/mm^3$

NB2 : PAS de prise de MTX aux J2, J30, J58 du fait de l'administration de MTX en IT.

NB3 : les patients chez qui le résultat de la MR à J35-J42 revient positif ($\geq 10^2$) doivent recevoir la consolidation du groupe A3 en débutant au VEDA N°1 qui sera à faire dès que possible. Un contrôle de la MR médullaire sera systématique avant le début du VEDA.





NB4 : Vérifier l'échographie cardiaque avant l'intensification N°1.

Annexe 3 : Protocole FRALLE 2000-A – Interphase (groupe A1)

45

FRALLE 2000-A Groupe A1. Interphase

A débiter dès que PNN + monocytes > 1000/mm³ et plaquettes > 100.000/mm³

	J1 J2	J8	J15	J22	
Vincristine	V				
Dexaméthasone					
Purinéthol					
Méthotrexate		m	m	m	
IT simple	IT				
	J29 J30	J36	J43	J50	J56
Vincristine	V				
Dexaméthasone					
Purinéthol					
Méthotrexate		m	m	m	(repos)
IT simple	IT				

Vincristine	: 1,5 mg/m ² /injection (IVL 1 mn)	:	J1, J29
	NE PAS DEPASSER 2 mg par injection.		
Dexaméthasone	: 6 mg/m ² /j (3 prises per os)	:	J1 à J5 / J29 à J33
Purinéthol	: 75 mg/m ² /j (per os)	:	J1 à J49
Méthotrexate (m)	: 25 mg/m ² /prise (per os)	:	J8, J15, J22, J36, J43, J50
IT simple	: MTX : J2, J30 ; posologie : cf. Annexe 6.		

NB1 : En l'absence de problème clinique, cette phase est à poursuivre sans modification tant que les PNN sont > 500/mm³ et les plaquettes > 50.000/mm³

NB2 : PAS de MTX per os aux J2 et J30 du fait de l'administration de MTX en IT

Annexe 4 : Protocole FRALLE 2000-A – Traitement d'entretien (groupe A1)

47

FRALLE 2000-A Groupe A1. Traitement d'entretien

- La durée du traitement d'entretien est de 24 mois, pour les filles comme pour les garçons. Le traitement d'entretien est à débiter à J40 de l'intensification N°2 si PNN >1000/mm³ et plaquettes > 100.000/mm³

Le traitement d'entretien associé :

- Purinéthol (6-MP) : 75 mg/m²/j sans arrêt lors des réinductions.
- Méthotrexate (MTX) : 25 mg/m²/semaine (arrêt la semaine de la RI).
- +
12 réinductions mensuelles VCR + Dexaméthasone à faire la première année :
- Vincristine : 1,5 mg/m² par injection au J1 (sans dépasser 2 mg)
- Dexaméthasone : 6 mg/m²/j en 3 prises per os de J1 à J5.
- +
1 IT simple tous les 3 mois en débutant à la RI N°1 au J15 de la réinduction (RI N°1, 4, 7, 10 + 4 IT supplémentaires après la fin des RI) :
- IT simple : MTX : posologie : cf. Annexe 6

NB : les RI sont à faire toutes les 4 semaines.

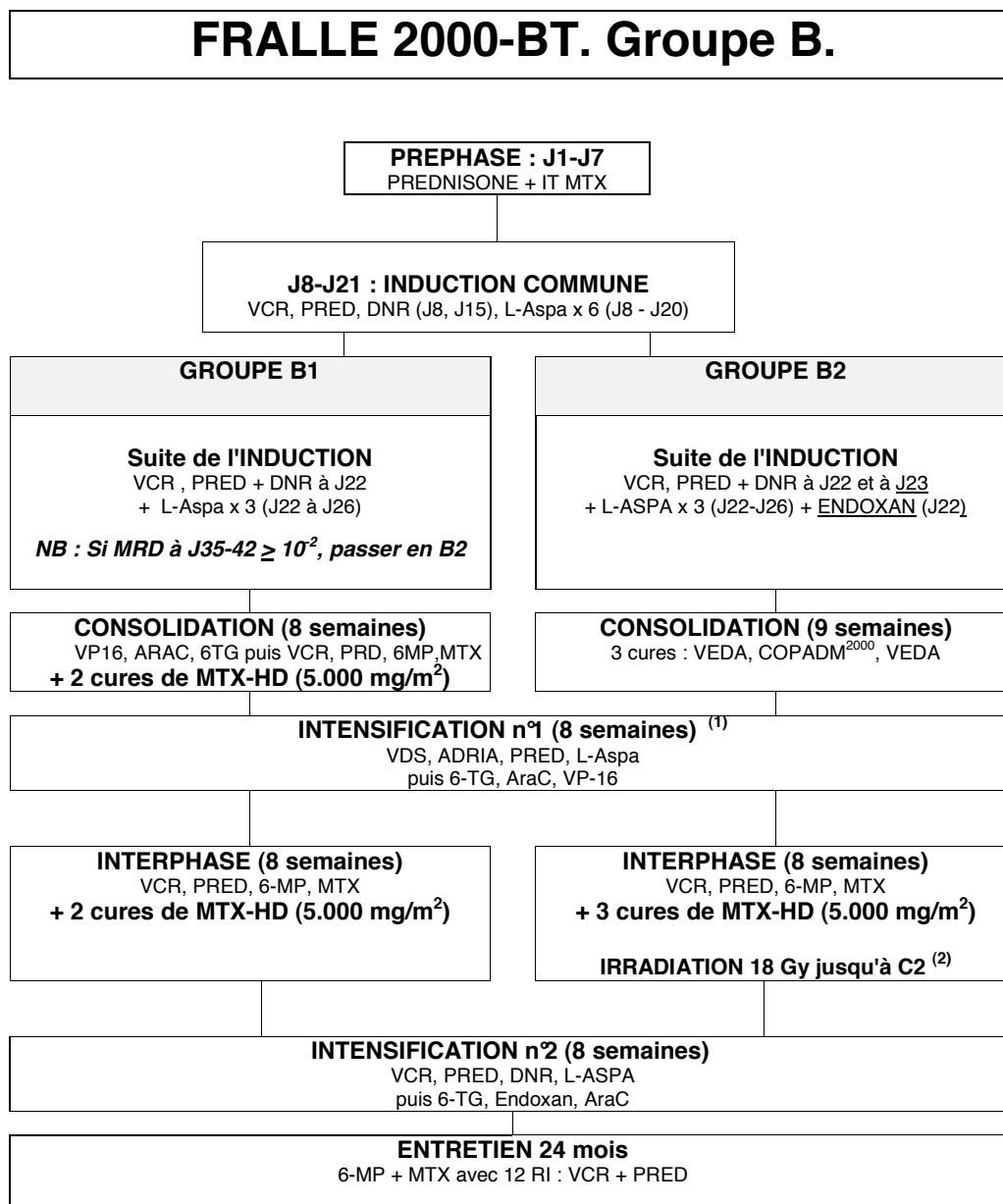
Conditions : PNN > 500/mm³, plaquettes > 100.000/mm³

Nombre d' IT	:	Préphase	:	1	
		Induction	:	1	
		Consolidation	:	3	
		Intensification N°1	:	2	<i>Soit 18 au total</i>
		Interphase	:	2	
		Intensification N°2	:	1	
		Entretien	:	8	

NB1 : Ne pas donner le méthotrexate per os à J15 le jour de l'IT post-réinduction n°1, 4, 7, 10

NB2 : La prophylaxie de la pneumocystose est à assurer pendant tout le traitement d'entretien. On utilisera le Bactrim^R : 25 mg/kg en 1 prise, 3 jours par semaine. En cas de mauvaise tolérance du traitement d'entretien : arrêter le Bactrim et le remplacer par des aérosols mensuels de Pentacarina^R.

Annexe 5 : Protocole FRALLE 2000-BT – Schéma général pour le groupe B

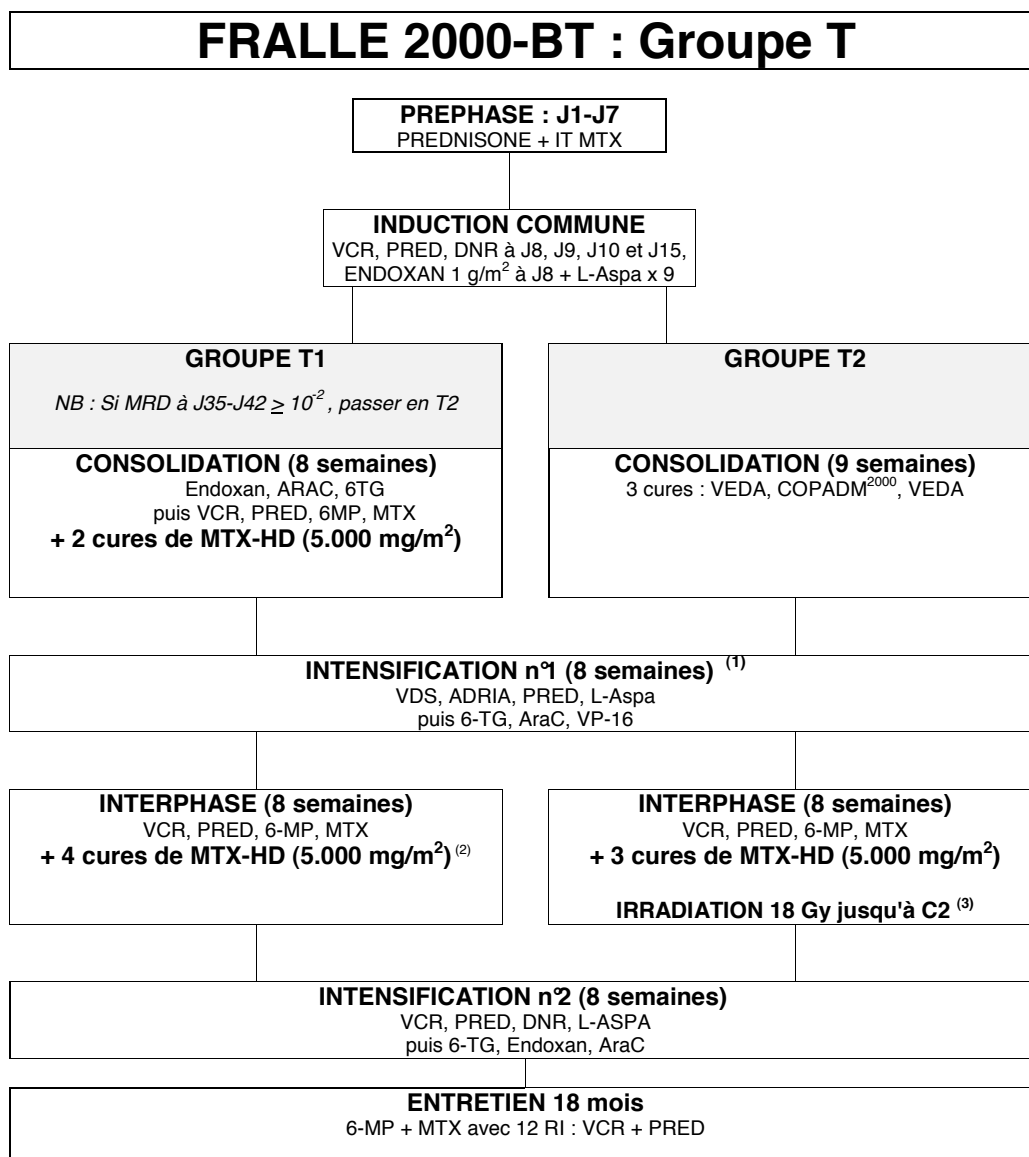


(1) : les patients du groupe B2 allogreffés le sont après la 1^{ère} partie de l'intensification n°1.

(2) : les patients du groupe B2 et âgés de moins de 4 ans **ne sont pas** irradiés sur le SNC en PROPHYLACTIQUE: cf. p ##

NB : le traitement des formes SNC(+) au diagnostic, incluses en B1 ou en B2 est défini p##

Annexe 6 : Protocole FRALLE 2000-BT – Schéma général pour le groupe T



(1) : les patients du groupe T2 allogreffés le sont après la 1^{ère} partie de l'intensification n°1.

(2) : les seuls patients du groupe T1 irradiés sur le SNC en PROPHYLACTIQUE sont les patients ayant plus de 4 ans ET plus de 100.000 GB : cf. p

(3) : les patients du groupe T2 et âgés de moins de 4 ans ne sont pas irradiés sur le SNC en PROPHYLACTIQUE : cf. p##

NB : le traitement des formes SNC(+) au diagnostic, incluses en T1 ou en T2 est défini p##

FRALLE 2000-BT. Version de Janvier 2003

Annexe 7 : Fiche de fabrication des solutions buvables pour l'étude de la stabilité chimique

Pharmacie							
PHAR-91500-ME-0004	Version 03						
21/10/2010							
Méthotrexate solution buvable dosée à 2 mg/ml.							
Fiche de fabrication préparation magistrale							
Référence PM N° : 74 Edition N° : 3 Date de 1 ^{ère} édition : 29/10/2009 Date de mise à jour : 12/10/2010	Nom pharmacien responsable de la production : V. LE PÊCHEUR						
DÉNOMINATION : Méthotrexate® solution buvable dosée à 2 mg/ml							
INDICATION / PROPRIETES :							
SERVICE UTILISATEUR : Oncologie pédiatrique / RETROCESSION							
Nom, prénom du patient :							
Nom prescripteur :							
LÉGISLATION : Liste I	DATE DE FABRICATION : 07/11/11						
FORMULE POUR : 30 ml	LIEU : Salle préparations poudre non stériles N° 1044						
Prévoir 10% supplémentaire pour pertes et 1 ml pour le contrôle	+ Salle préparations toxiques non stériles N° 1037						
<ul style="list-style-type: none"> - Préparations toxiques non stériles - Habillage de protection - Manipulation sous isolateur 							
Formule Unitaire (30 ml)	Matières premières ou spécialités	Qtés à mettre en oeuvre	N° lot	Date limite d'utilisation	N° contrôle du labo	Qtés mises en oeuvre	Nombre théorique d'unités : 1 flacon
2.4 ml	Méthotrexate® Sol inj. : 500.mg/30ml II Fournisseur : Hylian	2,4 ml	2037	04/13	✓	2,4 ml	DLU : 1 mois ou selon la DLU de(s) matière(s) première(s) ou de la spécialité Conservation : 4°C A l'abri de la lumière
0.6 g	Sodium bicarbonate (Hydrogénocarbonate de Na (Na HCO ₃)) Forme : poudre Fournisseur : Cooper	0,6 g	08090092A	10/13	16001	0,6 g	
7.5 ml	Ora sweet Fournisseur : Inrésa	7,5 ml	1054526	01/14	16307	7,5 ml	
QSP 30ml	Eau PPI Fournisseur : Agulha	QSP 30 ml	3008175	10/12	✓	QSP 30 ml	
TECHNIQUE FABRICATION ET CONDITIONNEMENT : Voir page suivante					PRÉPARATION EFFECTUÉE PAR : C. Teuffaut		
CONDITIONNEMENT : Flacon verre jaune 30 ml + bouchon SEG AP Bouchon inviolable bakélite blanc Sachet papier blanc + seringue(s) de ml nutrition entérale (adapté le volume et le nombre de la seringue à la posologie) + sondes de prélèvements + 1 mange-aiguille (disponible au rétro)					Signature :		CONDITIONNEMENT EFFECTUÉ PAR : C.T.
MODÈLE ÉTIQUETTE					ÉTIQUETTE		
Pharmacie CHU ANGERS Méthotrexate solution buvable dosée 2 mg/ml Réf. PM N° : 74 N° Ord. : Date limite d'utilisation: TENIR HORS DE LA PORTÉE ET DE LA VUE DES ENFANTS POSOLOGIE : Se conformer à la prescription médicale NOM DU PATIENT : A conserver à température: 4°C A l'abri de la lumière À MANIPULER AVEC DES GANTS							
CONTRÔLE LABO					Contrôle N° :		
VERIFICATIONS							
Validation ordonnance : <input type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non		Nombre de produits finis conforme : <input checked="" type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non		Conditionnement conforme : <input checked="" type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non		Libération du lot <input type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON	
N° ordonnance conforme : <input type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non		Pesée conforme : <input checked="" type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non		Etiquetage conforme : <input type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non		Visa du pharmacien responsable du laboratoire :	
Matière 1 ^{ère} conforme : <input checked="" type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non		Volume conforme : <input checked="" type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non		Date : 07/11/11		Date :	
Spécialité conforme : <input checked="" type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non		Dosage conforme : <input checked="" type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non		Signature : AP			
DLU conforme : <input checked="" type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non		Date : 07/11/11		Signature : AP			
N° lot conforme : <input checked="" type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non		Date : 07/11/11		Signature : AP			
N° contrôle conforme : <input checked="" type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non		Date : 07/11/11		Signature : AP			
Calcul conforme : <input checked="" type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non		Date : 07/11/11		Signature : AP			
Date : 07/11/11		Date : 07/11/11		Date : 07/11/11			
Signature : AP		Signature : AP		Signature : AP			

PHAR-91500-ME-0004, version 03 Méthotrexate solution buvable dosée à 2 mg/ ml.
Fiche de fabrication préparation magistrale 21/10/2010

1. OBJECTIFS ET DOMAINES D'APPLICATION

Ce document a pour but de décrire les modalités de préparation, de conditionnement et de contrôle de solution buvable de Méthotrexate dosée à 2 mg/ ml.

2. DESTINATAIRES

Secteur Préparatoire :

- Pharmacien responsable du préparatoire
- Préparateur du préparatoire

Secteur Laboratoire de contrôle :

- Pharmacien responsable du laboratoire
- Technicien du laboratoire
- Interne du laboratoire

3. DOCUMENTS LIES

Codification	Libellé de document
PHAR-91500-PR-0013	ELABORATION D'UNE PREPARATION

4. REFERENCES : Néant

5. ABREVIATIONS

NS : Non Stérile

SPTNS : Salle de Poudre Toxique Non Stérile

6. MATÉRIEL

Dans la salle préparation poudre N°1044 :

- Spatule de pesée en inox (1)
 - Papier de pesée (1)
 - 2 seringuesml (adapté le volume et le nombre de la seringue à la posologie)
 - Compresses non stériles
 - Sachet papier blanc
 - Bêcher 250 ml
 - Agitateur blanc
 - Gants non stériles
 - Sonde de prélèvement
- } Réservés à Méthotrexate

Dans l'isolateur poudre toxique de la SPTNS N° 1037 :

- Champ stérile
- 1 spike
- Flacon verre jaune ml
- 1 seringue deml
- Mange aiguille
- Gants stériles
- Bouchon bakélite blanc
- 1 seringue 2.5 ml stérile + un obturateur (pour le dosage)

7. DESCRIPTION DU PROCESSUS DE FABRICATION ET DE CONDITIONNEMENT DE METHOTREXATE A 2MG/ ML

7.1. Pour le préparateur

7.1.1. Préparation avant l'entrée en salle préparation poudre N°1044

- Habillage pour entrée en salle de préparation poudre
- Lavage hygiénique des mains
- Décontamination du plan de travail
- Antiseptie des mains
- Réunir tout le matériel nécessaire

PHAR-91500-ME-0004, version 03 Méthotrexate solution buvable dosée à 2 mg/ ml.
Fiche de fabrication préparation magistrale 21/10/2010

7.1.2. Dans la salle préparation poudre N° 1044

- Peser le bicarbonate de sodium sur la balance sartorius (tare + impression du ticket)
- Mettre le bicarbonate de sodium dans le bécherml
- Mesure lesml d'eau avec une seringue deml. Faire valider le volume par le laboratoire de contrôle.
- Ajouter l'eau dans le bécher
- Mesurer lesml d'Ora-sweet avec une seringue deml. Faire valider le volume par le laboratoire de contrôle.
- Ajouter l'Ora-sweet dans le bécher, agiter avec l'agitateur blanc

7.1.3. Préparation avant la fabrication sous l'isolateur dans la SPTNS N° 1037

- Habillage pour entrée en salle de préparation poudre
- Décontamination de l'isolateur
- Introduire dans l'isolateur par le sas d'entrée : tout le matériel nécessaire à la fabrication + compresses non stériles, gants stériles

7.1.4. Préparation avant la fabrication sous l'isolateur dans la SPTNS N° 1037

- Habillage pour entrée en salle de préparation poudre
- Décontamination de l'isolateur
- Introduire dans l'isolateur par le sas d'entrée : tout le matériel nécessaire à la fabrication + compresses non stériles, gants stériles

7.1.5. Dans l'isolateur poudre toxique non stérile dans la SPTNS N° 1037

- Déployer un champ stérile
- Entrer le bécher contenant le mélange eau + Ora-^{Sweet} + bicarbonate de sodium muni d'un parafilm par le sas d'entrée
- Mettre un spike sur le flacon de Méthotrexate 500mg/20ml
- Mesurer avec une seringue deml le volume de Méthotrexate. Faire valider le volume par le laboratoire de contrôle.
- Mettre le Méthotrexate dans le bécher
- Agiter la solution avec l'agitateur blanc
- Prélever 1 ml de la solution dans une seringue de 2.5 ml mettre un obturateur pour le contrôle du dosage réalisé par le laboratoire de contrôle
- Mettre la solution dans le flacon verre jaune ml
- Boucher le flacon avec le bouchon inviolable et mélanger.

7.1.6. Nettoyage et élimination des déchets

- Nettoyage du matériel avec de l'hydroxychloride dilué (HCL) puis avec de l'alcool isopropylique selon DO.
- Elimination du matériel par le sas n°2. Selon DO
- Elimination des déchets par le sas n°2. Selon DO
- Nettoyage de l'isolateur et du chariot. Selon DO
- Nettoyage de la salle par le service d'entretien. Selon DO
- Rangement des matières premières avec le sac plastique des stocks matières 1ères
- Rangement des ustensiles avec le sac plastique dans le meuble de la salle PT

7.1.7. Prélèvement d'échantillon pour le contrôle

- Donner au laboratoire de contrôle l'échantillon de 1 ml munie d'une étiquette et de deux pastilles rouges pour le dosage.
- Noter sur la seringue **ANTICANCÉREUX**

7.1.8. Conditionnement

- Flacon verre jaune ml + bouchon bakélite blanc inviolable + sac en papier
- Donner le nombre de seringue nutrition entéraleml nécessaire au patient. Posologie habituelle : 1 prise par semaine donc fournir 1 seringue de nutrition entérale et 1 canule à chaque prise+ canule de prélèvement (s'assurer que les parents utilisent des gants non stériles) et donner un mange aiguille pour les déchets (disponible au rétro)

PHAR-91500-ME-0004, version 03 Méthotrexate solution buvable dosée à 2 mg/ ml.
Fiche de fabrication préparation magistrale 21/10/2010

7.1.9. Etiquetage

- Sur fiche de fabrication.
- Sur la seringue de 2.5 ml destinée au labo de contrôle
- Sur le flacon VJ ml.
- Sur le sac papier.

7.1.10. Autres informations

- Enregistrement de cette préparation dans le tableau Suivi de préparations et matières premières (g/ pharmaci/ production/ Suivi des préparations et MP/ année en cours/ enregistrement.xls)
Si oui, cocher la case : Enregistrement par : Date :
- Temps de fabrication et de conditionnement : 90 minutes

7.2. Pour le technicien du laboratoire de contrôle

7.2.1. Contrôles effectués avant l'entrée en salle

- Contrôle de la validation de l'ordonnance par le pharmacien responsable du préparatoire
- Contrôle de la conformité du n° ordonnancier
- Contrôle des matières premières et spécialité avec le numéro de lot ou de contrôle.
- Contrôle de la DLU
- Contrôle des calculs
- Contrôle validation ordonnance par le pharmacien

7.2.2. Contrôle pendant la fabrication

- Contrôle de la conformité de la pesée
- Contrôle de la conformité du volume

7.2.3. Contrôles effectués après fabrication

- Contrôle de la conformité du nombre de produits finis.
- Contrôle de la conformité du dosage
- Contrôle de la conformité du conditionnement et de l'étiquetage final.

Tous les contrôles sont attachés sur la première page

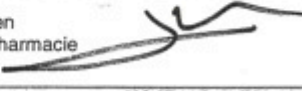
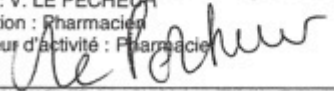
8. DESCRIPTION DU PROCESSUS EN MODE DÉGRADÉ : néant

9. ÉVALUATION :

- Nombre de flacons de solution buvable Méthotrexate à 2mg/ ml non-conformes

10. COMPOSITION DU GROUPE DE TRAVAIL

NOM Prénom	Fonction	Secteur d'activité	Rôle
LE PÊCHEUR Véronique	Pharmacien responsable du préparatoire	Pharmacie	Coordonnatrice
BALDUINI Eulalie	Préparateur du préparatoire	Pharmacie	Rédactrice
LAGARCE Frédéric	Pharmacien responsable du laboratoire de Contrôles	Pharmacie	Relecteur

Validation (Expertise)	Approbation (Responsabilité)
Nom : F. LAGARCE Fonction : Pharmacien Secteur d'activité : Pharmacie Visa : 	Nom : V. LE PÊCHEUR Fonction : Pharmacien Secteur d'activité : Pharmacie Visa : 
Vérification (Normes documentaires)	
Nom : Virginie ROUE	Secteur d'activité : Cellule qualité Visa :

Annexe 8 : Préparation du tampon phosphate pour l'étude HPLC


Le tampon phosphate est préparé extemporanément grâce à la formule suivante, donnée pour 500 ml de tampon phosphate :

- Peser 3,4 g de $\text{H}_2\text{KO}_4\text{P}$. Ajouter 500 mL exactement mesurés d'eau désionisée. Mettre sous agitation magnétique jusqu'à dissolution de la poudre.
- Ajuster le pH à 6,6 grâce à une solution de potasse (KOH) à la concentration 2M.

Préparation de la solution de KOH à la concentration 2M :

- Peser 1,2 g de KOH en pastilles dans une fiole jaugée de 10 mL.
- Ajuster au trait de jauge avec de l'eau désionisée.

Annexe 9 : Fiche de fabrication des solutions buvables contenant du méthotrexate pour l'étude de stabilité bactériologique

Pharmacie		Version 03		21/10/2010			
PHAR-91500-ME-0004		Version 03		21/10/2010			
Méthotrexate solution buvable dosée à 2 mg/ ml. Fiche de fabrication préparation magistrale							
Référence PM N° : 74 Edition N° : 3 Date de 1 ^{ère} édition : 29/10/2009 Date de mise à jour : 12/10/2010			Nom pharmacien responsable de la production : V. LE PÊCHEUR				
DÉNOMINATION : Méthotrexate® solution buvable dosée à 2 mg/ml				Nom, prénom du patient :			
INDICATION / PROPRIETES :				Nom prescripteur :			
SERVICE UTILISATEUR : Oncologie pédiatrique / RETROCESSION							
LÉGISLATION : Liste I		DATE DE FABRICATION : 05/06/12	LIEU : Salle préparations poudre non stériles N° 1044 + Salle préparations toxiques non stériles N° 1037		 <ul style="list-style-type: none"> - Préparations toxiques non stériles - Flabilage de protection - Manipulation sous isolateur 		
FORMULE POUR : 30... ml		N° ORDONNANCIER :					
Prévoir 10% supplémentaire pour pertes et 1 ml pour le contrôle							
Formule Unitaire (30 ml)	Matières premières ou spécialités	Qtés à mettre en oeuvre	N° lot	Date limite d'utilisation	N° contrôle du labo	Qtés mises en oeuvre	Nombre théorique d'unités : 1 flacon
2.4 ml	Méthotrexate® Sol inj. : 500.mg/20ml II Fournisseur : Nylan	2,4... ml	2038	11/13	-	2,4... ml	DLU : 1 mois ou selon la DLU de(s) matière(s) première(s) ou de la spécialité Conservation : 4°C A l'abri de la lumière
0.6 g	Sodium bicarbonate (Hydrogénocarbonate de Na (Na HCO ₃)) Forme : Poudre Fournisseur : Cooper	0,6... g	08080092A	10/13	16001	0,6... g	
7.5 ml	Ora sweet Fournisseur : Inrésa	7,5... ml	1114983	03/14	16335	7,5... ml	
QSP 30ml	Eau PPI Fournisseur : Aguelhart	QSP 30 ml	3008873	05/13	-	QSP 30 ml	
TECHNIQUE FABRICATION ET CONDITIONNEMENT : Voir page suivante				PRÉPARATION EFFECTUÉE PAR : A. LAINAY Signature :			
CONDITIONNEMENT : Flacon verre jaune 30... ml + bouchon SEG AP Bouchon inviolable bakélite blanc Sachet papier blanc + seringue(s) de ml nutrition entérale (adapté le volume et le nombre de la seringue à la posologie) + sondes de prélèvements + 1 mange-aiguille (disponible au rétro)				Nombre d'unités conditionnées : 1 flacon		CONDITIONNEMENT EFFECTUÉ PAR : A. LAINAY Signature :	
Date limite d'utilisation :				Date limite d'utilisation :			
MODÈLE ÉTIQUETTE				ÉTIQUETTE			
Pharmacie CHU ANGERS Méthotrexate solution buvable dosée 2 mg/ml Réf. PM N° : 74 N° Ord. : Date limite d'utilisation : TENIR HORS DE LA PORTÉE ET DE LA VUE DES ENFANTS POSOLOGIE : Se conformer à la prescription médicale NOM DU PATIENT : A conserver à température : 4°C A l'abri de la lumière À MANIPULER AVEC DES GANTS							
CONTRÔLE LABO				Contrôle N° :			
VERIFICATIONS							
Validation ordonnance : <input type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non		Nombre de produits finis conforme : <input checked="" type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non		Conditionnement conforme : <input checked="" type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non		Libération du lot <input type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON	
N° ordonnancier conforme : <input type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non		Pesée conforme : <input checked="" type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non		Etiquetage conforme : <input type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non		Visa du pharmacien responsable du laboratoire : Date :	
Matière 1 ^{ère} conforme : <input checked="" type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non		Volume conforme : <input checked="" type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non					
Spécialité conforme : <input checked="" type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non		Dosage conforme : <input checked="" type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non					
DLU conforme : <input checked="" type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non							
N° lot conforme : <input checked="" type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non							
N° contrôle conforme : <input checked="" type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non							
Calcul conforme : <input checked="" type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non							
Date : 05/06/12		Date : 05/06/12		Date : 05/06/12			
Signature : AP		Signature : AP		Signature : AP			

Annexe 10 : Fiche de fabrication des solutions buvables ne contenant pas de méthotrexate pour l'étude de stabilité bactériologique

Solution buvable sans méthotrexate
Fiche de fabrication

Date de fabrication : 05/06/12

Formule unitaire (30 mL)	Matières premières ou spécialités	Qtés à mettre en oeuvre	N° de lot	Date limite d'utilisation	N° contrôle du labo	Qtés mises en oeuvre	Nombre théorique d'unités : <u>1 flacon</u>
0,6 g	Sodium bicarbonate (Hydrogénocarbonate de Na (NaHCO ₃)) Forme : <u>Poudre</u> Fournisseur : <u>Cooper</u>	<u>0,6</u> g	<u>08090092A</u>	<u>10/13</u>	<u>16001</u>	<u>0,6</u> g	Conservation : Température ambiante, à l'abri de la lumière
7,5 mL	Ora-Sweet Fournisseur : <u>Inresa</u>	<u>7,5</u> mL	<u>1114983</u>	<u>03/14</u>	<u>16335</u>	<u>7,5</u> mL	
QSP 30 mL	Eau PPI Fournisseur : <u>Aguehant</u>	<u>22,5</u> mL (qsp 30 mL)	<u>3008893</u>	<u>05/13</u>	<u>/</u>	<u>22,5</u> mL	
					Préparation effectuée par : <u>A. Larnay</u> Signature : <u>AL</u>		
Conditionnement : Flacon en verre jaune : <u>30</u> mL					Nombre d'unités conditionnées : <u>1 flacon</u> Date limite d'utilisation : <u>/</u>		Conditionnement effectué par : <u>A. Larnay</u> Signature : <u>AL</u>

Aurélie LAUNAY

Médicaments et Oncopédiatrie : Amélioration des conditions de conservation et de dispensation de la solution buvable de méthotrexate dosée à 2 mg/mL réalisée au CHU d'Angers

L'amélioration du confort du patient est un enjeu majeur pour les pharmaciens. Par sa réalisation, ce travail contribue à augmenter ce confort. Le but de cette étude est l'optimisation de la dispensation du médicament en rendant accessible plus rapidement la solution buvable de méthotrexate aux patients.

La solution buvable de méthotrexate est une préparation magistrale réalisée au CHU d'Angers pour le traitement de jeunes patients atteints de leucémie aigue lymphoblastique. Sa stabilité au cours du temps a été observée grâce à l'étude de plusieurs paramètres importants pour évaluer la bonne conservation du produit : concentration en principe actif, pH de la solution, caractères organoleptiques et contamination bactériologique. Une étude de stabilité chimique par HPLC, complétée par une étude du pH de la solution et une étude de la contamination bactériologique a donc été réalisée. Ainsi, les résultats obtenus grâce à ce travail permettent d'autoriser la préparation à l'avance de la solution buvable de méthotrexate par le changement de statut de la préparation. Auparavant préparation magistrale, elle est maintenant une préparation hospitalière. L'étude permet de valider la conservation de la solution à 4°C à l'abri de la lumière pendant 4 mois.

Mots clés : méthotrexate, stabilité, dispensation, conservation, préparations magistrales, préparations hospitalières, leucémie aigue lymphoblastique

Drugs and Pediatric Oncology : Improvement of preservation and dispensation of methotrexate oral solution dosed at 2 mg/mL made at the Teaching Hospital of Angers

The improvement of patient's comfort is a major issue for pharmacists. This work contributes to increase this comfort. The first aim of this study is the optimization of drug dispensation by making available more quickly methotrexate oral solution for patients. The second aim is having easier storage conditions of this preparation at patient's home.

The oral solution of methotrexate is performed at the Teaching Hospital of Angers for the treatment of young patients with acute lymphoblastic leukemia. Stability over time was observed through the study of several important parameters to evaluate the preservation of the product: concentration of active ingredient, pH of the solution, organoleptic parameters and bacteriological contamination. A chemical study by HPLC, a study of the pH of the solution and a study of the bacteriological contamination have been achieved. Thus, the results obtained in this work allow the manufacture in advance of the oral solution of methotrexate. It allows the preservation of the solution at 4°C in the dark for 4 months.

Key words : methotrexate, stability, dispensation, preservation, preparations, acute lymphoblastic leukemia.