

MEMOIRE

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

Soutenu le 10 septembre 2015

Par Mr CHOUQUET Thibaut
Né le 11 janvier 1987

Conformément aux dispositions de l'Arrêté du 4 octobre 1988 tient lieu de :

THESE

POUR LE DIPLÔME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

**MISE EN PLACE DU CONTRÔLE ANALYTIQUE DES
PREPARATIONS DE CHIMIOETHERAPIES INJECTABLES
PEDIATRIQUES SUR AUTOMATE QCPrep+**

JURY

Président : Mr Patrice PROGNON

Professeur,
Pharmacien Praticien Hospitalier.
Hôpital Européen George Pompidou (AP-HP) - Paris.

Membres : Mme Karine MORAND

Pharmacien Praticien Hospitalier.
Hôpital Armand-Trousseau (AP-HP) - Paris.

Mme Nathalie RIZZO-PADOIN

Maître de Conférences Universitaire,
Pharmacien Praticien Hospitalier.
Hôpital Saint-Louis (AP-HP) - Paris.

Mr Guy BENOIT

Pharmacien Praticien Hospitalier.
Hôpital Armand-Trousseau (AP-HP) - Paris.

Remerciements

A Karine MORAND, pour m'avoir accordé sa confiance et son encadrement sur ce projet. Pour nos longues discussions sur la théorie du contrôle et notre patience partagée lors de l'utilisation de l'automate.

Au Professeur P. PROGNON, pour avoir accepté d'être le Président de cette thèse

Au Dr G. BENOIT, pour avoir accepté d'être membre du jury et apporté ses précieux conseils.

Au Dr N. RIZZO-PADOIN, pour avoir accepté d'être membre du jury.

*A **Papa**, parti trop tôt. Cette thèse et tout mon parcours d'internat te sont dédiés. Je sais, sans nul doute, que tu es fier de moi.*

*A **Maman, Simon et Aude** pour être là tout simplement, même si le contrôle analytique vous paraît bien souvent obscur.*

*A **mes co-internes** avec qui j'ai partagé tous ces bons moments durant mon internat.*

*Aux **préparateurs** de l'Hôpital Armand Trousseau, Sandrine, Aurélie, Pepette, les 2 Philippe, Eddy, Alexandra, Florence, Steph, Imen et Mélanie. Merci pour cette belle année passée parmi vous.*

*A **Lauriane, Benoit et Pascale** pour cette amitié et toutes ces discussions qui ne servent à rien.*

*A **mes amis** de longue date.*

Table des matières

Index des Figures	4
Index des Graphiques.....	5
Index des Tableaux.....	6
Table des Abréviations.....	7

Introduction	9
---------------------------	----------

Problématique et objectifs	11
---	-----------

1- Problématique.....	11
2- Rationnel	11
3- Objectifs	12

PREMIERE PARTIE

Contrôle et Sécurisation du circuit des chimiothérapies.....	13
---	-----------

1- Préparations de chimiothérapie injectable	14
1-1 Définitions et obligations réglementaires	14
1-2 Spécificités de l'oncologie pédiatrique	15
2- Contrôle des préparations.....	16
2-1 Aspect réglementaire.....	16
2-2 Place du contrôle dans la sécurisation du circuit des chimiothérapies.....	17
2-3 Les différents types de contrôles	19
2-3-1 Notion de contrôle libératoire	19
2-3-2 Les contrôles visuels	20
2-3-3 Le contrôle gravimétrique.....	21
2-3-4 Le contrôle analytique	22
2-3-5 Quels contrôles pour quelles unités ?.....	24

DEUXIEME PARTIE

Mise en place du contrôle des préparations de chimiothérapies pédiatriques.....	25
--	-----------

1- Matériel : Automate QCPrep+®	26
1-1 Choix du matériel	26
1-2 Rappels sur la théorie de la spectroscopie.....	26
1-3 Principes de fonctionnement	37

2- Prérequis à la mise en place du contrôle	48
3- Méthodes	48
3-1 Méthodes de prélèvement.....	48
3-2 Méthodes de validation	49
4- Résultats	51
4-1 Méthodes de prélèvement.....	51
4-2 Validation des méthodes et des gammes	52
5- Discussion	55
5-1 Avantages de l'automate QCPrep+®	55
5-2 Validation des gammes	56
5-3 Méthode de prélèvement	57
5-4 Problématiques liées aux préparations pédiatriques.....	61
5-5 Contrôles qualités de routine.....	63

TROISIEME PARTIE

Contrôle des préparations de chimiothérapie destinées aux patients 64

1- Introduction	65
1-1 Présentation de l'UPAC de l'hôpital Armand Trousseau	65
1-2 Détails des molécules contrôlées	65
2- Matériel & Méthode	70
2-1 Conditions de préparation	70
2-2 Analyse des résultats de conformité.....	70
2-3 Relevé et analyse des non-conformités	72
2-4 Test statistique de comparaison des résultats.....	73
3- Résultats	74
3-1 Nombre et nature des contrôles réalisés.....	74
3-2 Taux de conformité	77
3-2-1 Global	77
3-2-2 Par type de préparation	79
3-2-3 Par molécule	84
3-2-4 Par préparateur.....	86
3-3 Répartition des taux de conformité	87
3-4 Non-conformités	90

4- Discussion	91
4-1 Discussion sur les résultats de conformité.....	91
4-2 Discussion sur la répartition des taux de conformité.....	96
4-3 Application de la recommandation de la SFPO	98
4-4 Non-conformités	99
4-5 Problèmes rencontrés	104
 Conclusion	 107
 Bibliographie	 109
 Annexes	 115

Index des Figures

Figure 1 : Spectre électromagnétique	27
Figure 2 : Représentation du spectre d'absorption mettant en jeu les énergies électronique, de rotation et de vibration.....	30
Figure 3 : Exemple de spectre RAMAN en fonction de la longueur d'onde d'excitation [55]	34
Figure 4 : Spectre IR en transmission (au-dessus) et Spectre Raman (en-dessous) [43].....	35
Figure 5 : Automate d'analyse QCPrep+®	37
Figure 6 : Paramètres d'un protocole d'analyse	40
Figure 7 : Paramétrage d'une gamme d'étalonnage.....	42
Figure 8 : Acquisition et validation d'une gamme d'étalonnage.....	42
Figure 9 : Présentation des résultats d'analyse dans le logiciel QCprep	46
Figure 10 : Présentation des résultats dans le fichier Excel de validation.....	47

Index des Graphiques

Graphique 1: Comparaison des spectres UV de 3 vinca-alcaloïdes : vinorelbine, vindésine et vinblastine.	30
Graphique 2 : Comparaison des spectres UV de 3 anthracyclines : daunorubicine, doxorubicine et épirubicine.	31
Graphique 3 : Comparaison des spectres Raman de 3 anthracyclines : daunorubicine, doxorubicine et épirubicine	43
Graphique 4 : Zones spectrales de la librairie spécifique des anthracyclines	44
Graphique 5 : Identification du solvant de dilution dans le Raman	45
Graphique 6: Spectre absorption d'une molécule d'H ₂ O	55
Graphique 7 : Nombre de contrôles réalisés par mois.....	74
Graphique 8 : Proportion de la production contrôlée analytiquement	75
Graphique 9 : Nombre de préparations contrôlées par molécules (1)	76
Graphique 10 : Nombre de préparations contrôlées par molécules (2)	76
Graphique 11 : Taux de conformité global sur la période mars 2014 – janvier 2015	78
Graphique 12 : Répartition des préparations en poche de dilution avec un volume final > 50mL.....	79
Graphique 13 : Répartition des contrôles des préparations réalisées en seringue	81
Graphique 14 : Répartition des contrôles des préparations de vinca-alcaloïdes.....	83
Graphique 15 : Taux de conformités représentés par molécules et par périodes (1).....	85
Graphique 16 : Taux de conformités représentés par molécules et par périodes (2).....	85
Graphique 17 : Taux de conformité en fonction du nombre de préparations réalisées.....	87
Graphique 18 : Répartition des taux de conformité par type de préparations.....	87
Graphique 19 : Répartition des taux de conformité par molécule.....	88
Graphique 20 : Répartition des non-conformités en fonction des molécules et des préparateurs.....	90

Index des Tableaux

Tableau 1 : Répartition des contrôles en fonction des unités.....	24
Tableau 2 : Résultats d'analyse d'une gamme volumique de cytarabine	51
Tableau 3 : Résultats analyses avec diminution du volume de prélèvement	51
Tableau 4 : Résultats de la validation de la gamme d'asparaginase	52
Tableau 5 : Résultats de la validation de la gamme de cyclophosphamide	52
Tableau 6 : Résultats de la validation de la gamme de cytarabine	52
Tableau 7 : Résultats de la validation de la gamme de doxorubicine	53
Tableau 8 : Résultats de la validation de la gamme de daunorubicine	53
Tableau 9 : Résultats de la validation de la gamme d'ifosfamide	53
Tableau 10 : Résultats de la validation de la gamme de méthotrexate	53
Tableau 11 : Résultats de la validation de la gamme de vincristine.....	54
Tableau 12 : Résultats de la validation de la gamme d'étoposide phosphate	54
Tableau 13 : Résultats de la validation de la gamme d'étoposide	54
Tableau 14 : Taux de conformité global par période	77
Tableau 15 : Taux de conformité global mensuel	78
Tableau 16 : Résultat de conformité des préparations réalisées en poche de dilution supérieure à 50 mL	80
Tableau 17 : Résultat de conformité des préparations réalisées en seringue	82
Tableau 18 : Comparaison statistique des taux de conformité entre préparations en poche et seringue	82
Tableau 19: Résultat de conformité des préparations de vinca-alcaloïdes.....	83
Tableau 20 : Comparaison statistique des taux de conformité entre préparations en seringue et préparations de vinca-alcaloïdes	83
Tableau 21 : Taux de conformité détaillé par molécule et par période	84
Tableau 22 : Résultats de conformité en fonction des manipulateurs	86
Tableau 23 : Répartition des non-conformités.....	90
Tableau 24 : Comparaison des résultats de conformité avec des seuils de tolérance de $\pm 15\%$ et $\pm 10\%$ sur la période aout-octobre 2014.....	98

Table des Abréviations

ANSM : Agence Nationale de Sécurité du Médicament

AP-HP : Assistante Publique des Hôpitaux de Paris

BPP : Bonnes Pratiques de Préparation

CMR : Cancérigène, Mutagène, Reprotoxique

FIA : Flow Injection Analysis

HPLC : High Pressure Liquid Chromatography

ICH : International Conference on Harmonization

IM : Intra Musculaire

IR : Infrarouge

IT : Intrathécale

LAL : Leucémie Aigue Lymphoblastique

LAM : Leucémie Aigue Myéloblastique

PPH : Préparateur en Pharmacie Hospitalière

PUI : Pharmacie à Usage Intérieur

SC : Sous Cutanée

SFPO : Société Française de Pharmacie Oncologique

UI : Unité Internationale

UPAC : Unité de Préparation des AntiCancéreux

UV : Ultraviolet

ZAC : Zone à Atmosphère Contrôlée

Introduction

Les chimiothérapies anticancéreuses sont des médicaments à hauts risques avec une toxicité élevée et des marges thérapeutiques étroites. Ces risques sont présents à toutes les étapes du circuit : prescription, préparation, administration, aussi bien pour les patients que pour le personnel manipulant : infirmières, préparateurs en pharmacie hospitalière, pharmaciens et agents hospitaliers. Pour le patient, les risques et conséquences d'un surdosage peuvent entraîner des effets secondaires graves voire mortels et être préjudiciables pour le bon déroulement du protocole de prise en charge de leur pathologie cancéreuse. A ce titre, l'Agence National de Sécurité du Médicament (ANSM) classe le surdosage des médicaments anticancéreux comme l'un des douze événements qui ne devraient jamais arriver (never event). Dans ce contexte, de nombreuses recommandations ont été émises par différents organismes (American Society of Health-System Pharmacists (ASHP) [1], International Society of Oncology Pharmacy Practitioners (ISOPP) [2], Occupational Safety and Health Administration (OSHA) [3], National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH) ou encore l'ANSM avec les Bonnes Pratiques de Préparation (BPP) 2007 [4]). Les objectifs de ces recommandations sont de protéger la préparation, le personnel, l'environnement ainsi que le patient. L'une des mesures la plus importante, pour l'amélioration des pratiques et la sécurisation du circuit, a été la centralisation de la préparation sous la responsabilité, le contrôle et le savoir-faire du pharmacien. On retrouve aussi, l'informatisation, la standardisation des prescriptions à l'aide de protocoles, la mise en place de procédures et de fiches de fabrication, le développement de contrôles en cours de fabrication et sur les préparations terminées.

La centralisation s'est accompagnée du développement des contrôles qualité des préparations et notamment le développement du contrôle analytique. Le double contrôle visuel constitue le premier niveau d'assurance qualité et de sécurisation du processus de reconstitution. Les avancées technologiques dans le domaine du contrôle et de l'analytique ont permis d'enrichir les outils à disposition du pharmacien hospitalier. C'est ainsi que se sont développées, dans la dernière décennie, différentes technologies tel que des automates d'analyse spectrométrique ou des outils informatiques permettant l'assistance et le contrôle vidéonumérique et gravimétrique. Le contrôle analytique représente un outil de contrôle

qualité indispensable et déjà largement utilisé dans différentes activités de pharmacotechnie hospitalière (nutrition parentérale, préparations sèches ou liquides, magistrales ou hospitalières). Son développement au sein des unités de reconstitution des chimiothérapies s'est vu grandement facilité avec le développement d'automates d'analyses permettant de réaliser des contrôles qualitatifs et quantitatifs rapides et adaptés à l'activité en flux tendu des unités.

La pharmacie de l'hôpital Armand Trousseau a acquis, pour son Unité de Préparation des AntiCancéreux (UPAC), un automate de dosage QCPrep+® composé d'un spectromètre d'absorption UV et d'émission Raman. Après les étapes de mise en place indispensables, notre objectif a été de développer une méthode de contrôle analytique des préparations de chimiothérapies pédiatriques, en seringue ou en poche de dilution.

Dans la première partie nous situerons la place du contrôle analytique dans la sécurisation du circuit des préparations de chimiothérapies injectables. Seront rappelées les généralités sur les préparations de chimiothérapies et présentés les différents types de contrôles réalisables ainsi que des notions de gestion des risques et d'assurance qualité.

Dans une seconde partie, sera exposée la mise en place du contrôle analytique des préparations pédiatriques sur l'automate QCPrep+®. Le fonctionnement de l'automate sera détaillé, tout en apportant des rappels théoriques sur la spectroscopie. La méthode de prélèvement utilisée sera exposée et discutée ainsi que les validations et contrôles réalisés.

Enfin, dans une troisième et dernière partie, nous présenterons et analyserons les résultats des dosages des préparations destinées aux patients réalisés sur la période janvier 2014 à janvier 2015.

Problématique et objectifs

1- Problématique

Le contrôle analytique des préparations de chimiothérapies injectables représente un gain très important en matière de sécurité des processus d'assurance qualité. La Société Française de Pharmacie Oncologique (SFPO), dans ses recommandations de 2012, indique qu'il est indispensable de mettre en place un système de contrôle garantissant la conformité des préparations au niveau qualitatif et quantitatif (recommandation n°19 [5]). Les préparations pédiatriques possèdent la particularité d'être réalisées, pour la grande majorité, dans un volume faible de solvant. C'est ainsi que 65% de la production de l'UPAC de l'hôpital pédiatrique Armand Trousseau correspond à des préparations réalisées dans un volume compris entre 20 et 50 mL. Habituellement, ces préparations ne sont pas contrôlées analytiquement et ce pour deux raisons principales : le volume final, faible, de ces préparations et leur réalisation dans des seringues disposant de graduations permettant de contrôler le volume final.

2- Rationnel

Bien que ces préparations ne soient habituellement pas contrôlées analytiquement, il convient de se poser la question de la pertinence de cette absence de contrôle. Il n'existe pas, au premier abord, de limites techniques à l'analyse par spectrométrie des molécules utilisées en oncologie pédiatrique. De plus, il n'existe pas de textes réglementaires limitant la part de la dose totale pouvant être utilisée pour le contrôle des préparations. Le bénéfice apporté par le contrôle analytique des préparations pédiatrique est grand, représenté essentiellement par la sécurisation du processus de préparation permettant de capter de manière beaucoup plus significative d'éventuelles non-conformités potentiellement préjudiciables pour le patient. Cette volonté d'amélioration des pratiques et de sécurisation des processus est d'autant plus marquée que les préparations sont destinées à une population pédiatrique. Cependant, le risque est représenté ici par des contraintes techniques et analytiques : réussir à mettre en place un contrôle analytique pour toutes les molécules reconstituées et ce en utilisant la plus faible quantité possible de la préparation finale.

3- Objectifs

L'objectif principal de l'étude et des travaux présentés est de :

Mettre en place le contrôle analytique des préparations de chimiothérapie injectables pédiatriques sur l'automate QCPrep+®. Cette mise en place doit pouvoir inclure **le maximum de préparations.**

Afin d'atteindre cet objectif, il convient :

✓ **D'optimiser les méthodes analytiques** afin

- de permettre le contrôle analytique des préparations réalisées en seringues et en poches de dilution de faible volume.
- d'utiliser le minimum de principe actif pour la réalisation du contrôle.
- de permettre le contrôle analytique de toutes les molécules préparées à toutes les concentrations.

Dans un second temps, suite à la mise en place du contrôle analytique, nos objectifs sont :

✓ d'obtenir un **taux de conformité supérieur ou égal à 95%.**

✓ **de former et sensibiliser le personnel** aux BPP, à l'importance de l'homogénéisation et au but du prélèvement.

✓ **de relever et traiter les non-conformités** afin d'améliorer de manière globale l'activité de préparation des chimiothérapies.

PREMIERE PARTIE

Contrôle et Sécurisation du circuit des chimiothérapies

1- Préparations de chimiothérapie injectable

1-1 Définitions et obligations réglementaires

Les préparations de chimiothérapies injectables sont, dans la très grande majorité des cas, des préparations magistrales. Le Code de la Santé Publique les définit ainsi : « *Préparation magistrale, 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* » [6]. Elles sont réalisées selon les BPP en vigueur, actuellement dans leur version 2007 [7]. Ces BPP visent, notamment, à encadrer et apporter des lignes directrices permettant d'assurer la préparation, le contrôle, la gestion de la qualité ainsi que la sous-traitance de l'ensemble des préparations, notamment magistrales, officinales et hospitalières, réalisées dans les établissements disposant d'une Pharmacie à Usage Intérieur (PUI). Selon l'article L. 5121-5 [8], ces BPP sont opposables, toute PUI réalisant des préparations magistrales, officinales ou hospitalières se doit, en conséquent, de les respecter.

Les préparations de chimiothérapies injectables sont des préparations relativement simples. En effet, elles correspondent, dans la très grande majorité des cas, à une étape de dilution et de conditionnement dans un dispositif d'administration : seringue, poche ou diffuseur. Les développements galéniques des différents laboratoires pharmaceutiques tendent à diminuer le nombre de principes actifs nécessitant une étape de reconstitution. Néanmoins, la réalisation de préparations de chimiothérapies injectables reste une activité potentiellement à risque et nécessitant une formation du personnel, des locaux adaptés, une gestion de la qualité et des procédures. Le risque inhérent à ces préparations réside dans la dangerosité des produits manipulés. L'International Agency for Research on Cancer (IARC) classait, en 1997, les médicaments cytotoxiques comme produits pouvant être cancérogènes, mutagènes et tératogènes, classification reprise au niveau français et européen sous l'appellation CMR pour Cancérogène, Mutagène, Reprotoxique.

1-2 Spécificités de l'oncologie pédiatrique

L'oncologie pédiatrique possède des spécificités au niveau de la population de patients, des pathologies ainsi que des médicaments utilisés. La grande particularité de la pédiatrie réside dans l'importance de l'échelle morphologique des jeunes patients. Ainsi, entre un nouveau-né et un adolescent, le poids, la taille ainsi que la surface corporelle peuvent varier du simple au décuple. Ces variations se répercutent sur les doses de médicaments cytotoxiques prescrits et par extension aux volumes et concentrations des préparations réalisées au sein de l'unité de reconstitution. Pour des raisons physiologiques, il est toujours recherché d'administrer le plus faible volume possible de soluté lors des perfusions. Il en découle que la majorité des préparations sont réalisées dans des seringues avec un volume final inférieur à 50 mL. La réalisation de préparations dans ces dispositifs apporte un gain en matière de sécurité et de performance comparé aux préparations réalisées en poche de dilutions disposant de perfuseurs par gravité [9] ou à l'aide d'une pompe. En effet, même à l'aide d'une pompe, lors de l'administration de faibles volumes (20 ou 30 mL), des difficultés de régulation du débit ainsi que de perte de dose au niveau de la tubulure peuvent survenir. Ainsi, l'administration de préparations comme le méthotrexate, pouvant s'administrer sur 24 à 36h, à un faible débit n'est pas compatible avec les poches de dilutions et ce pour des raisons de régularité du débit et de gestion de la fin de perfusion.

Au niveau épidémiologique, les deux grandes populations touchées par des pathologies cancéreuses en pédiatrie sont les enfants de moins de 5 ans et les adolescents de plus de 14 ans. Le cancer chez l'enfant représente 1 à 2% de l'ensemble des cancers [10]. Le nombre de nouveaux cas chez l'enfant de moins de 15 ans est estimé à 1 700 par an. Cinq ans après leur diagnostic, 80 % de ces jeunes patients seront considérés comme guéris [11]. Les pathologies les plus couramment rencontrées sont essentiellement les cancers circulants : leucémies, syndromes myéloprolifératifs et myélodysplasiques (29%), les lymphomes et néoplasmes réticulo-endothéliaux (11,4%) ainsi que les tumeurs du système nerveux central (23,7%) et sympathique (8,2%), les sarcomes des tissus mous et extra-osseux (6,3%) et les tumeurs rénales (5,9%) [12], [13]. Le traitement de ces pathologies repose, en partie, sur des polychimiothérapies séquentielles.

2- Contrôle des préparations

2-1 Aspect réglementaire

Le contrôle des préparations de chimiothérapie est une obligation réglementaire. Les BPP dans leur version de 2007 [7] détaillent, dans le chapitre 2, les généralités d'organisation et d'exigence du contrôle des préparations. Les points fondamentaux sont les suivants :

➤ *« Le contrôle prend en compte l'ensemble des données nécessaires, [...] les articles de conditionnement, les conditions de préparation, l'examen des documents de préparation, la conformité aux spécifications de la préparation terminée et l'examen du conditionnement final. » BPP 2007 page 29.*

➤ *« L'activité de contrôle est indépendante de l'activité de préparation, pour autant que les effectifs de la structure le permettent. Les contrôles sont placés sous l'autorité d'une personne possédant des qualifications requises et une expérience suffisante. » BPP 2007 page 29.*

➤ *« Les installations sont adaptées. Le personnel est qualifié et régulièrement formé aux activités de contrôle. Des procédures écrites sont disponibles pour l'échantillonnage, l'analyse des matières premières et des préparations terminées. Les échantillons sont prélevés selon des méthodes approuvées. Le matériel est qualifié et les méthodes d'analyse sont validées. Des relevés sont établis manuellement et/ou par des appareils d'enregistrement. » BPP 2007 page 29.*

Les généralités établies dans les BPP vis-à-vis du contrôle s'appliquent essentiellement aux matières premières et préparations finies. Les préparations de chimiothérapies étant des préparations magistrales stériles, leur contrôle se limitaient aux caractères organoleptiques (aspect, couleur) et aux contrôles sur la préparation terminée (volume, étiquetage, limpidité, absence de particules...). Des recommandations supplémentaires sont apportées par différentes sociétés savantes à propos de leur reconstitution, contrôle, manutention, stockage. La SFPO, dans ses recommandations de 2012 [5], apporte des précisions sur le contrôle de ces préparations :

➤ *Recommandation n°17 : Un contrôle doit être réalisé, tracé et enregistré pour chaque préparation, à minima un double contrôle visuel.*

➤ *Recommandation n°18 : Le contrôle visuel doit comporter une vérification de l'ensemble des éléments suivants : DCI, concentration, volume prélevé, nature et volume du solvant de reconstitution, nature et volume du solvant de dilution, contenant, tubulure, emballage, étiquetage et péremption, Nom Prénom.*

Dans l'absolu, et réglementairement, un contrôle analytique ne s'applique pas aux préparations magistrales. Cependant, face au caractère particulier des préparations de chimiothérapie, il doit, dans la mesure du possible, être mis en place :

➤ *Recommandation n°19 : Compte tenu des évolutions technologiques, il est indispensable de mettre en place des systèmes de contrôle garantissant la conformité des préparations sur le plan qualitatif et quantitatif. Sous réserve d'une analyse de risque, ces contrôles devront être libératoires.*

2-2 Place du contrôle dans la sécurisation du circuit des chimiothérapies

La sécurisation du circuit des chimiothérapies a pour objectif de protéger le personnel manipulant, l'environnement ainsi que le patient. Vis-à-vis de ce dernier, tout doit être mis en œuvre pour s'assurer que le bon médicament, à la bonne dose soit dispensé et administré au bon moment et par la bonne voie. Le contrôle des préparations offre une valeur ajoutée très importante et indispensable à la sécurisation du circuit.

L'erreur médicale est définie comme étant une ou des complications imprévues survenant à la suite d'un acte ou d'un traitement médical et entraînant des conséquences dommageables sur l'état de santé du patient. Elles représentent la troisième cause de décès aux USA avec 210.000 erreurs évitables estimées par an [14]. L'Organisation Mondiale de la Santé estime quant à elle à 10 millions le nombre de patients, hospitalisés en Europe, subissant des troubles liés au soin, soit un patient hospitalisé sur 10 [15]. En 2009, la Direction de la Recherche, des Etudes, de l'Evaluation et des Statistique (DREES) publiait sa deuxième enquête nationale sur les événements indésirables graves associés aux soins (ENEIS) [16]. Cette dernière estime la survenue d'événements indésirables graves à 60 000 à 130 000 par an dont 15 000 à 60 000 sont évitables. En France, il est très difficile d'évaluer le nombre et l'impact des erreurs médicales. En effet, leur déclaration reste aujourd'hui très faible, essentiellement par peur des sanctions. Les effets secondaires des médicaments sont largement sous déclarés malgré leur obligation. Une revue de la littérature réalisée par Hazel *et al.* en 2006 établissait une sous

notification des effets secondaires de l'ordre de 95% [17]. En 2014, l'Assistance Publique des Hôpitaux de Paris (AP-HP) signait une charte incitant le personnel soignant à déclarer tout évènement indésirable. Elle s'engage par ailleurs à ne pas sanctionner le personnel déclarant un évènement indésirable dans lequel il est impliqué.

En oncologie, ces erreurs médicales peuvent présenter une sévérité et des conséquences plus importantes. En effet, l'état de santé général des patients étant fragile (immunodépression, cachexie, fatigue) ces derniers sont plus sensibles aux effets secondaires des médicaments cytotoxiques. En 2010, une analyse prospective de 6607 prescriptions d'anticancéreux injectables a été réalisée au sein des hospices civils de Lyon afin de mettre en évidence les erreurs médicales pouvant survenir en oncologie [18]. Sur ces 6607 prescriptions, 449 erreurs (6,8%) ont été relevées dont 91% d'erreurs de prescription, 8% d'erreurs pharmaceutiques et 1% d'erreurs d'administration. Parmi ces erreurs, 436 (97,1%) ont été interceptées avant administration de la préparation au patient, 13,4% auraient pu avoir des conséquences temporaires pour le patient et 2,6% auraient pu engager son pronostic vital. Il a été estimé que 4 à 8 décès ont ainsi pu être évités. En matière de coût, ces erreurs, si elles n'avaient pas été interceptées, auraient entraîné 216 jours d'hospitalisation supplémentaires et un coût annuel de 92.207 €.

La réalisation de préparations d'anticancéreux injectables est une activité à risque d'un point de vue du produit en lui-même (agent cytotoxique dangereux pour le manipulateur et pour l'environnement), de la préparation (stérile) ainsi que du patient. En conséquent, une stratégie de maîtrise du risque doit être mise en place lors de la réalisation de ces préparations [19]. Cette dernière a pour objectifs de :

- Réduire la fréquence de survenue des erreurs.
- Intercepter les erreurs avant que l'effet se manifeste, cela se traduisant par un renforcement des procédures de contrôle.
- Réduire les conséquences d'une erreur par la prise en charge des incidents.

La maîtrise du risque s'exprime à plusieurs niveaux :

- Au moment de la prescription : prescription informatisée, standardisée, suivant les référentiels et validée par un médecin et un pharmacien.
- Au moment de la préparation : préparation centralisée dans des locaux adaptés, par du personnel formé et qualifié suivant les Bonnes Pratiques en vigueur (BPP).
- Au moment de l'administration : vérification de la correspondance entre la prescription, la préparation et le patient.

Le contrôle des préparations est un processus primordial intervenant dans la gestion des risques liés à la réalisation des préparations de chimiothérapies injectables. Son objectif est de détecter les erreurs au cours de la fabrication ou une fois la préparation réalisée, avant administration au patient. Il s'agit d'un verrou pharmaceutique indispensable qui peut être mis en place de différentes façons. L'ANSM s'est inspiré de la démarche du National Health Service (NHS) en Grande-Bretagne et publie une liste de 12 effets secondaires qui ne devraient jamais arriver ou « never event » [20]. Dans cette liste, figure le **surdosage en anticancéreux notamment en pédiatrie**, ce qui doit conduire à renforcer la démarche qualité pour améliorer la sécurisation du circuit des chimiothérapies, notamment par la mise en place d'outils de contrôles quantitatifs.

2-3 Les différents types de contrôles

Des différentes réglementations et recommandations découlent plusieurs types de contrôles mis en place par les laboratoires de contrôles des PUI. Le contrôle minimum correspond à un double contrôle visuel réalisé en cours de préparation ainsi qu'un contrôle libératoire, lui aussi visuel, de la préparation finale par le pharmacien. D'autres types de contrôles peuvent être mis en place : le contrôle gravimétrique en cours de fabrication ou sur la préparation terminée, le contrôle visuel automatisé et le contrôle analytique.

2-3-1 Notion de contrôle libératoire

La notion de contrôle libératoire trouve toute son importance pour les préparations de chimiothérapie. Il n'est pas obligatoire mais doit être mis en place de manière préférentielle. Il consiste à mettre en quarantaine toute préparation dont le contrôle, généralement analytique, n'a pas encore prouvé la conformité de la préparation. Ainsi toute préparation libérée et dispensée au service est assurée de correspondre à la bonne molécule, au bon solvant et à la bonne dose. Le développement de techniques analytiques rapides a permis le développement du contrôle libératoire. Cependant, les préparations de chimiothérapie n'étant pas toutes réalisées en avance, son application stricte peut amener à retarder la mise à disposition de la préparation au patient en cas de non-conformité et de la nécessité de refabriquer une préparation. Les recommandations de la SFPO indiquent que le délai d'attente d'un patient, en Hôpital de jour, pour l'administration d'une chimiothérapie ne doit pas excéder une heure après l'accord médical (recommandation n°12 [5]).

2-3-2 Les contrôles visuels

Les contrôles visuels représentent le premier niveau de contrôle de qualité mis en place pour les préparations de chimiothérapie. C'est une solution simple, qui consiste à un double contrôle de toutes les étapes de la réalisation des préparations. Sont ainsi contrôlé par une seconde personne (préparateur en pharmacie hospitalière (PPH) ou pharmacien) l'identité des solvants et du principe actif utilisés ainsi que les volumes retirés et prélevés. Le contrôle visuel est aussi réalisé sur la préparation terminée avant sa libération : conformité de l'étiquetage, aspect de la préparation (couleur, limpidité, absence de particules, absence de fuites), conformité de la tubulure (purge, clamping). Toutes ces étapes sont réalisées en regard du protocole et de la fiche de fabrication. L'inconvénient de ce type de contrôle réside dans le risque intrinsèque, le facteur humain, ne permettant pas de détecter toutes les erreurs. Une récente étude démontre les difficultés et les lacunes du contrôle visuel humain dans l'interception de différents types d'erreurs lors de la réalisation de préparations de chimiothérapies injectables [21]. Vingt-cinq fiches de fabrications comportant différentes erreurs (sous-dosage, surdosage, erreur de voie d'administration, de protocole, de dilution ou de péremption) ont été insérées dans le flux de production par les pharmaciens. Dans un premier temps, 48% de ces 25 erreurs (12/48) n'ont pas été détectées par les préparateurs en pharmacie. Parmi ces 12 erreurs non captées, 3 étaient létales pour le patient. Après une campagne de sensibilisation et de formation des PPH aux différentes erreurs médicamenteuses pouvant survenir en oncologie, 80% des erreurs (20/25) étaient alors relevées. Afin de pallier à ces lacunes, de nouvelles technologies d'automatisation utilisant des systèmes de caméra ont été développées. Le plus simple réside dans l'enregistrement de l'espace de travail permettant, en cas de doute, de visionner l'enregistrement de la préparation. Le système Drugcam® développé par la société française Eurekam® associe un enregistrement vidéo et une détection automatisée des flacons de principe actif ainsi que des volumes prélevés. Ce dispositif, en cours d'implantation dans différentes unités de préparation, ne dispose pas encore de retour d'efficacité suffisant mais semble présenter un complément intéressant aux contrôles qualité déjà existants [22].

2-3-3 Le contrôle gravimétrique

Le contrôle gravimétrique est un principe de contrôle très simple dans son fonctionnement. Déjà utilisé pour la réalisation de préparations magistrales ou hospitalières de formes sèches, il consiste à peser le principe actif et les excipients de la préparation ou directement la préparation finale. Dans son utilisation commune la plus simple, rapide et la moins coûteuse, le contrôle gravimétrique est réalisé sur la préparation finale. Son utilisation comme principe de contrôle est basée sur la connaissance des masses, fixes, des différents éléments constitutifs de la préparation (poche vide, tubulure, bouchon...). L'aspect variable correspond au solvant et au principe actif dont la masse est déduite du volume à partir de la densité. La limite du contrôle gravimétrique, utilisé sur la préparation finale, réside dans son impossibilité à réaliser un contrôle qualitatif et son incapacité à détecter toutes les non-conformités. En effet, l'analyse est semi-quantitative c'est-à-dire que la mesure est réalisée sur la préparation finale et non sur le principe actif. On ne peut déduire de la pesée d'une préparation la quantité de principe actif réellement préparé. De manière générale la densité des différents principes actifs étant assez proche de celles des solvants, un contrôle gravimétrique n'aura pas la capacité de détecter toutes les erreurs. De plus, pour les préparations réalisées avec un faible volume de principe actif, le surremplissage des poches de dilution et la variabilité des volumes réels ne permettent pas de réaliser un contrôle précis. Néanmoins, le contrôle gravimétrique réalisé sur les préparations finales, peut apporter un complément de contrôle intéressant, voire indispensable, pour les préparations ne pouvant pas être contrôlées analytiquement (comme les diffuseurs) ainsi qu'en complément du contrôle analytique.

Le contrôle gravimétrique automatisé s'est développé au cours de ces dernières années en introduisant la pesée directement à l'intérieur des enceintes de préparation permettant de réaliser un contrôle dit « in process ». La solution logicielle la plus couramment utilisée et la plus aboutie est le logiciel Cato® permettant de réaliser un suivi de toutes les étapes de la réalisation des préparations. Le logiciel prend le rôle d'un assistant guidant le préparateur dans les différentes étapes de la préparation. La validation et le passage à l'étape suivante est réalisée par une pesée. L'efficacité de ce type de dispositif a été évalué par Carrez *et al.* et démontre une meilleure efficacité que le double contrôle visuel, 100% des erreurs (5 erreurs pour 151 préparations) ayant été détectées contre 66% (6 pour 143) pour le double contrôle visuel [23].

2-3-4 Le contrôle analytique

Le contrôle analytique des préparations de chimiothérapies injectables s'est rapidement imposé comme une technique de choix permettant un contrôle qualitatif et quantitatif. Le développement et la démocratisation de techniques fiables et rapides a permis d'intégrer le contrôle analytique dans le flux de la production. En effet, bien que le contrôle des préparations a posteriori soit possible [24]–[27], il ne permet pas de détecter une erreur avant administration. La limite majeure du contrôle analytique libératoire réside dans la notion de temps. En effet, dans une optique de sécurisation du circuit et d'amélioration de la prise en charge des patients, le temps dédié au contrôle doit être le plus court possible, de l'ordre de la minute, et ce afin de ne pas retarder la mise à disposition de la préparation. Face à ce prérequis, certaines techniques analytiques comme la chromatographie planaire, bien qu'intéressante par sa capacité à analyser de manière simultanée plusieurs échantillons, est alors difficile à utiliser en regard des temps d'élution relativement longs. Pour rappel, les préparations de chimiothérapie sont des mélanges simples : un seul principe actif dilué dans un solvant à une concentration élevée. Cette particularité rend le contrôle des préparations de chimiothérapies fondamentalement différent de la recherche d'agents anticancéreux dans un milieu biologique dans lequel ils sont présents en faible quantité et où ils doivent être séparés d'une matrice complexe. L'utilisation d'une technique analytique classique comme la chromatographie sur colonne est envisageable mais pose plusieurs contraintes : le temps d'analyse et les spécificités analytiques des différentes molécules. Afin de réduire au maximum le temps d'analyse, les colonnes utilisées doivent être le plus court possible ($< 50\text{mm}$). Les caractéristiques physico-chimiques des molécules nécessitent des éluants et des paramètres de détections spécifiques, contraignant de manière trop importante la rapidité des analyses : le changement d'un solvant d'élution nécessite un temps d'équilibrage de la colonne trop important en regard des temps d'analyses souhaités. Cette contrainte est d'autant plus handicapante que le nombre de molécules à analyser est important : entre 20 et 40 molécules. Face à ces problématiques, l'équipe de Prognon *et al.* a imaginé, en 2005, un automate couplant un carrousel d'injection à un carrousel de colonne permettant de passer rapidement d'une colonne à une autre en fonction de la molécule à analyser [28]. Aux colonnes chromatographiques fut ajouté un système d'analyse en flux continu ou FIA (Flow Injection Analysis). Ce système, dépourvu de colonne, permet une analyse éliminant de nombreuses contraintes d'un système chromatographique. L'identification et la quantification de l'échantillon repose alors uniquement sur la sélectivité spectrale du détecteur à barrette de

diodes : la détection étant réalisée sur le spectre correspondant et la quantification sur le choix adéquat de la longueur d'onde. Cette technique avait déjà été envisagée, seulement sur son aspect analytique et non automatique, par Basuyau *et al.* en 2000 [29].

C'est sur ce principe, que la société Microdom©, développant déjà des outils analytiques pour les secteurs de l'agroalimentaire et viticole, a commercialisé, en 2007, l'automate Multispec®. Cet automate a permis d'offrir, à de nombreux laboratoires de contrôle, un outil « tout-en-un » associant un système de prélèvement, d'analyse qualitative et quantitative, et une solution logicielle [30]–[33]. Le principe d'identification et de quantification se base sur de la FIA couplée à deux spectromètres d'absorption : Ultraviolet (UV) visible et infrarouge (IR). Dans les années 2011/2012, suite à l'arrêt de commercialisation de l'automate Multispec®, la société Icôneservice© a développé un nouvel automate remplaçant la spectrométrie IR par de la spectrométrie d'émission Raman, le QCPrep+®.

Le fonctionnement de ces deux automates de contrôle analytique est basé sur plusieurs principes et caractéristiques :

- Un échantillon devant être représentatif de la préparation réalisée est prélevé.
- L'échantillon est directement injecté dans les cellules de détections UV et IR ou Raman.
- L'analyse se base sur une comparaison des spectres acquis avec des spectres de références.
- L'analyse permet l'identification et la quantification du principe actif ainsi que l'identification du solvant de dilution.
- Un logiciel propose une analyse de spectres ainsi que des calculs de pourcentage de ressemblance et de quantification.
- L'analyse est réalisée en moins de 2 minutes.

Bien que ces automates soient livrés « clef-en-main », c'est-à-dire disposant de banques de spectres et de gammes prêtes à être utilisées, et qu'ils sont simples à utiliser en routine, l'expertise pharmaceutique est indispensable à leur utilisation. En effet, il est nécessaire d'avoir des connaissances en chimie analytique afin d'apporter un esprit critique quant aux identifications et quantifications réalisées par l'automate. De plus, l'actualisation des gammes et des librairies est primordiale afin de s'adapter aux différents solvants, fabricants ou génériques. Cette mise à jour régulière rend rapidement obsolète la notion de livraison « clef-en-main ». La précision ne peut dépasser les $\pm 10\%$, et en utilisation pratique une marge de

$\pm 15\%$ est souvent adaptée. Cette valeur de $\pm 10\%$ est obtenue en additionnant toutes les incertitudes de mesures et d'analyse : incertitude sur la pureté de la matière première, sur les dispositifs de prélèvement (prélèvement du principe actif, du solvant, de l'échantillon), sur l'analyse et sur le remplissage des poches de dilution.

2-3-5 Quels contrôles pour quelles unités ?

Face aux recommandations et aux différentes méthodes de contrôle disponibles, plusieurs enquêtes ont été réalisées sur les méthodes utilisées par les PUI françaises [34], [35] et européennes [36] (cf. tableau 1). L'utilisation des différentes techniques dépend de plusieurs critères : la production annuelle, la taille de l'unité ainsi que les moyens à disposition (locaux et matériels), la présence d'un laboratoire de contrôle et à défaut les connaissances théoriques du pharmacien en analytique.

	Descout <i>et al.</i> 2011 [34]	Hergli <i>et al.</i> 2013 [36]	Frey <i>et al.</i> 2013 [35]
Nombre de PUI	30	39	18
Réalisent des contrôles	29	39	17
En cours de fabrication	27 (90%)	31 (79%)	17 (94%)
- visuel	26 (87%)	31 (79%)	17 (94%)
- gravimétrique	4 (13%)	?	0
- vidéo	2 (7%)	?	0
Sur produit fini	12 (40%)	39 (100%)	17 (94%)
- HPLC	4 (13%)	1 (2,5%)	0
- Automate	8 (27%)	10 (25%)	2 (11%)
- Visuel	?	37 (95%)	15 (83%)

Tableau 1 : Répartition des contrôles en fonction des unités

Ces résultats montrent que pour les contrôles en cours de fabrication, la majorité des unités réalisent un contrôle visuel, les contrôles gravimétriques et par vidéo sont limités à quelques rares unités. Pour le contrôle sur préparation terminée, le contrôle visuel prédomine. Le contrôle analytique (sur automate ou par High Pressure Liquid Chromatography (HPLC)) est réalisé dans 10 à 40% des unités. Dans l'étude de Descout *et al.*, les unités réalisant un contrôle analytique correspondaient à des unités avec une forte activité de production. On relève aussi, au travers de ces études, que certaines unités se contentent d'un seul type de contrôle.

DEUXIEME PARTIE

Mise en place du contrôle des préparations de chimiothérapies pédiatriques

1- Matériel : Automate QCPrep+®

1-1 Choix du matériel

L'automate QCPrep+® est le dernier et seul automate de contrôle analytique des préparations de chimiothérapies actuellement commercialisé. A la différence de son prédécesseur, l'automate Multispec® utilisant un spectromètre infrarouge, l'automate QCPrep+ utilise la spectrométrie Raman. Dans un premier temps, un rappel sur la théorie de la spectroscopie sera réalisé avant d'exposer le fonctionnement de l'automate.

1-2 Rappels sur la théorie de la spectroscopie

1-2-1 Principes généraux

La spectroscopie est un principe analytique regroupant de nombreuses techniques expérimentales. Elle consiste en l'analyse de la décomposition d'un spectre sur une échelle d'énergie. Elle est basée sur l'interaction entre un rayonnement électromagnétique incident et la matière [37].

Le rayonnement électromagnétique se caractérise par sa dualité onde-corpuscule :

- L'onde électromagnétique correspond à la propagation du rayonnement et est caractérisée par sa longueur d'onde λ et sa fréquence ν où :

$$\lambda = \frac{c}{\nu}$$

Avec λ : longueur d'onde en mètre

c : vitesse de la lumière en m.s^{-1}

ν : fréquence en hertz

- Le corpuscule correspond à une particule de masse nulle appelée photon qui est associée à la radiation électromagnétique. L'énergie du photon est égale à :

$$E = h \cdot \nu = \frac{h \cdot c}{\lambda}$$

où h : constante de Planck.

L'interaction entre le rayonnement électromagnétique et la matière se fait par l'intermédiaire du photon. Le transfert de son énergie à la molécule peut provoquer différents phénomènes : des transitions atomiques, des rotations, vibrations, translations de liaisons. L'atome ou la liaison passent alors d'un état d'énergie fondamentale à un état excité. Le passage à un état excité est suivi d'un retour à l'état fondamental et est à l'origine de différents phénomènes : absorption, émission ou diffusion. Ce sont ces phénomènes qui sont analysés et mesurés et sont la source de la spectrométrie.

Le rayonnement électromagnétique couvre une très large plage de longueurs d'ondes : des rayons γ aux ondes radios représentées en figure 1. Le domaine du visible que nous connaissons car observable par l'œil humain correspond à une toute petite partie du spectre électromagnétique.

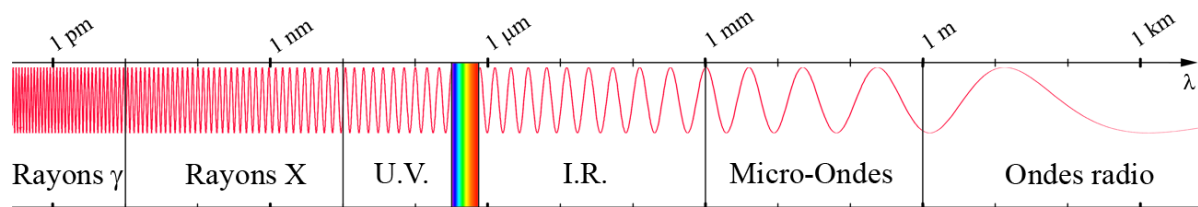


Figure 1 : Spectre électromagnétique

On notera que plus la longueur d'onde est grande, plus la fréquence est faible et plus l'énergie du rayonnement est faible. Cela explique, en partie, la dangerosité de certains rayonnements par rapport à d'autres (rayons γ ou UV par exemple).

Dans le cas de l'analyse spectrométrique des préparations de chimiothérapie, les plages de longueurs d'onde qui nous intéressent sont :

- L'UV-Visible : de 200 à 750nm
- L'infrarouge, spectrométrie IR et Raman : de 750 à 2500nm

1-2-2 Spectrométrie UV-Visible

• Principes généraux

La spectrométrie UV-Visible ou spectrophotométrie d'absorption moléculaire se base sur le principe de l'absorption de la lumière UV-Visible par les molécules analysées. Il est mesuré la densité de photons ou densité optique d'un rayon incident après son passage au travers de la solution analysée. La diminution de l'intensité lumineuse, ou absorbance, est régie par la loi de Beer-Lambert décrivant une proportionnalité entre l'absorbance et la concentration en molécules de la solution analysée [37]–[39].

Comme il a été vu précédemment, les ondes électromagnétiques, ici un faisceau de lumière monochromatique incident d'une longueur d'onde comprise dans la zone spectrale UV-Visible, viennent interagir avec la matière à analyser. Dans le cas de la spectrophotométrie d'absorption moléculaire, l'interaction est une absorption. L'énergie E apportée par la source lumineuse incidente, à savoir le photon, permet à un électron, dans un état énergétique fondamental, de s'élever à un niveau énergétique supérieur ou état excité passant alors d'une orbitale moléculaire de niveau fondamental à une orbitale moléculaire d'un niveau d'énergie supérieur. Le retour à son état fondamental s'accompagne d'une perte d'énergie sous forme de chaleur (ou plus rarement par émission de photons créant alors les phénomènes de fluorescence ou phosphorescence). Cette absorption énergétique entraîne une diminution de l'intensité du rayonnement incident I_0 où $I < I_0$.

Ce phénomène d'absorption peut être vu de différents points de vue :

- **Au niveau moléculaire**, l'excitation des électrons et des différents types de liaisons auxquels ils appartiennent donnent des transitions électroniques caractéristiques.

Par exemple :

- Les orbitales σ que l'on retrouve dans les liaisons carbone/carbone sont des orbitales très stables. L'énergie nécessaire au passage des électrons à un état excité est importante. La transition se situe alors dans le lointain UV vers les 130nm.
- Les atomes porteurs de doublets électroniques libres (O, N, S, Cl) présentent des transitions de type $n - \sigma^*$ d'un niveau énergétique moyen se situant aux alentours des 200nm.
- Les doubles liaisons de type éthylénique isolées donnent des transitions $\pi - \pi^*$ possédant une forte bande d'absorption vers les 170nm.

Les transitions énergétiques des orbitales moléculaires ne peuvent expliquer à elles seules le phénomène d'absorption. Des interactions entre les molécules et leur solvant ainsi qu'entre différentes molécules peuvent modifier les maxima d'absorption ou même permettre à un composé, n'absorbant normalement pas dans l'UV-Visible, d'absorber.

Les groupements appelés chromophores ont un rôle important dans l'absorption dans le domaine du visible. Ces fonctions organiques, entre autres les amines, nitrates ou nitrites et tous les groupements comportant une ou plusieurs doubles liaisons conjuguées, sont responsables d'absorptions spécifiques lorsqu'elles sont isolées (c'est-à-dire séparées d'au moins deux liaisons simples). Lorsqu'elles sont rapprochées elles peuvent interagir entre elles, on parle alors d'effet conjugué des chromophores. Ces interactions décalent l'absorption vers les plus grandes longueurs d'ondes, il s'agit d'un effet bathochrome, et augmentent l'intensité de l'absorption, effet hyperchrome.

▪ **Au niveau quantique**, une molécule possède une énergie totale qui est la somme des énergies électronique $E_{\text{élec}}$ caractéristique des orbitales moléculaires, de vibration E_{vib} et rotation notée E_{rot} . Le rapport de ces 3 énergies, au niveau UV-Visible, s'établit comme suit : 1000:50:1.

L'énergie électronique correspond à la quantité d'énergie nécessaire à une molécule pour faire passer ses électrons d'un état fondamental à un état excité. L'énergie de rotation correspond, comme son nom l'indique, aux mouvements de rotation de la molécule. L'énergie de vibration correspond à l'énergie de déplacement des atomes les uns par rapport aux autres. Bien que minoritaires, les énergies de vibrations et rotations entrent tout de même en jeu dans le phénomène d'absorption UV-Visible et expliquent, en partie, l'aspect du spectre d'absorption. Les transitions vibrationnelles et de rotation s'additionnent aux transitions électroniques formant alors les larges bandes caractéristiques du spectre d'absorption UV-Visible que nous connaissons (figure 2) :

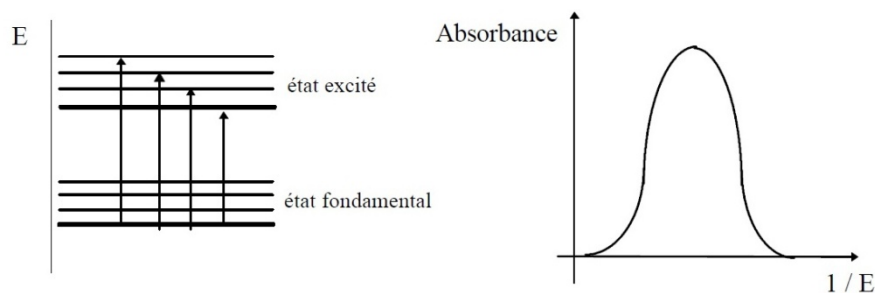
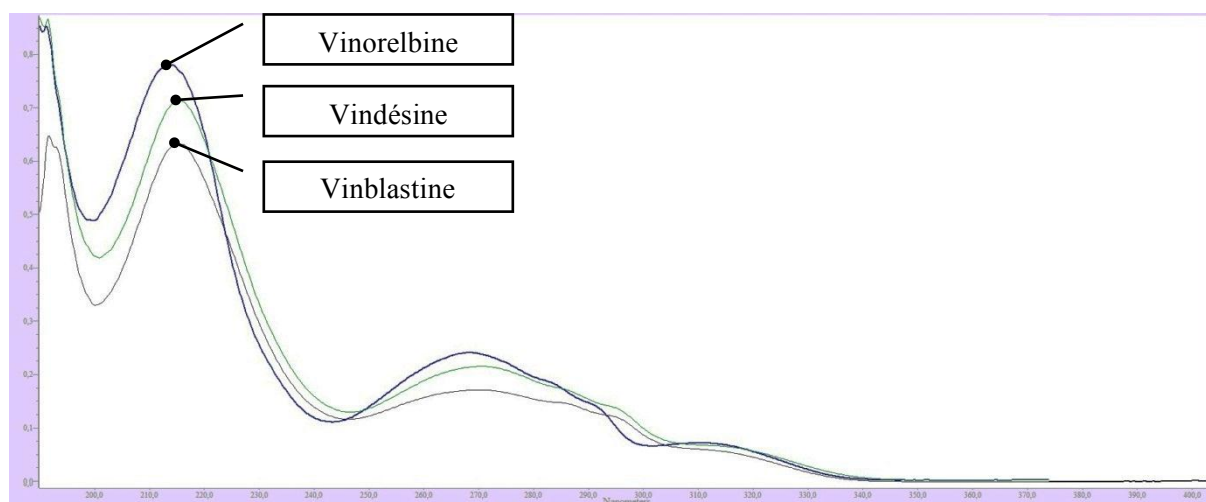


Figure 2 : Représentation du spectre d'absorption mettant en jeu les énergies électronique, de rotation et de vibration

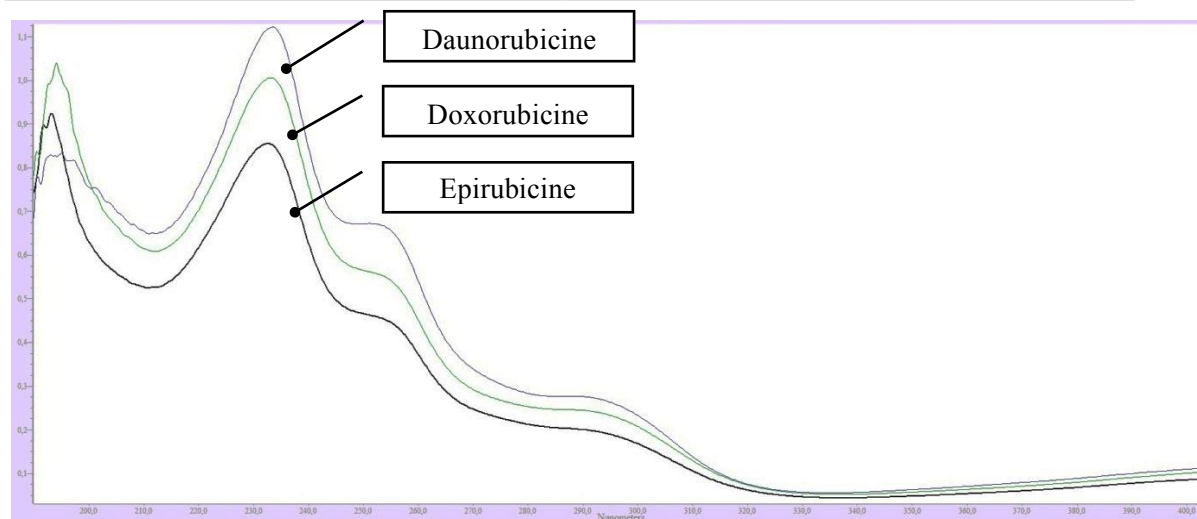
• Domaines d'application

▪ Analyse Qualitative

L'analyse qualitative n'est pas le domaine applicatif de prédilection de la spectrophotométrie d'absorption moléculaire. Comme il a été vu, l'énergie apportée par des rayonnements incidents appartenant au domaine de l'UV-Visible est importante et source de nombreuses transitions énergétiques. Aux phénomènes de transition, vibration et rotation qui peuvent s'observer, s'ajoutent des interactions entre groupements fonctionnels, molécules et solvants. Il en résulte des spectres avec peu de bandes, très larges et qui ne sont pas caractéristiques (graphique 1 et 2). Ces effets représentent une des limites de la spectrophotométrie d'absorption moléculaire : sa faible capacité à tirer des informations sur la structure d'une molécule analysée.



Graphique 1: Comparaison des spectres UV de 3 vinca-alcaloïdes : vinorelbine, vindésine et vinblastine.



Graphique 2 : Comparaison des spectres UV de 3 anthracyclines : daunorubicine, doxorubicine et épirubicine.

Cependant, dans le cadre du contrôle analytique des préparations de cytotoxiques, les molécules analysées possèdent toutes des groupements chromophores et sont, généralement, de structures assez différentes. En comparant un spectre d'une molécule inconnue avec une banque de spectres préalablement enregistrés, il est alors possible d'identifier une molécule. C'est sur ce premier principe que se base l'analyse qualitative des automates de contrôles QCPrep+® et Multispec®.

■ *Analyse Quantitative*

Une des applications majeures de la spectrophotométrie d'absorption moléculaire est la quantification de composés en solution. L'absorption est alors directement reliée à la molécule et au nombre de groupement d'atomes. La loi de Beer-Lambert permet de lier la valeur de l'absorption à la concentration du composé analysé :

$$A = l \times C \times \varepsilon = \log\left(\frac{I_0}{I}\right)$$

A : absorbance (sans unité)

l : longueur de la cuve ou trajet lumineux (en cm)

C : concentration du composé analysé (en mol.L⁻¹)

ε : coefficient d'extinction (L.mol⁻¹.cm⁻¹)

I₀ : intensité de la lumière incidente

I : intensité de la lumière transmise

Il existe ainsi une linéarité entre l'absorbance et la concentration (puisque le trajet de la cuve et le coefficient d'extinction sont des constantes) lorsque les conditions de la loi de Beer-Lambert sont respectées :

- Lumière monochromatique
- Solution diluée et de faible concentration (la linéarité de la loi de Beer-Lambert n'est plus démontrée lors de l'analyse d'échantillons trop concentrés).
- Absence d'interactions rayonnement/composé à analyser et molécule/composé à analyser.
- Absence de fluorescence du composé à analyser.

En pratique, la méthode la plus simple pour déterminer une concentration à partir d'une absorbance mesurée est de tracer une droite d'étalonnage. Sa réalisation fait appel à une solution mère du composé à quantifier et d'une concentration parfaitement connue. La droite est tracée en utilisant plusieurs points à différentes concentrations situées autour de la ou des concentrations à déterminer. La linéarité de la droite tracée et validée permet d'établir un rapport entre la concentration C et l'absorbance A . La concentration d'une solution inconnue pourra alors être déterminée à partir de son absorbance mesurée.

1-2-3 Spectroscopie infrarouge

• Principes généraux

La spectrométrie d'absorption infrarouge fait intervenir un rayonnement incident appartenant au domaine de l'infrarouge [37], [40], [41]. Dans cet ordre de grandeur le rayonnement, de faible énergie, n'a pas d'impact sur les électrons des molécules et ne fait pas intervenir l'énergie électromagnétique. L'énergie qui entre en jeu est principalement l'énergie de vibration, on parlera alors de spectrométrie vibrationnelle.

Au sein d'une molécule, les différentes liaisons entre les atomes peuvent se déformer, s'allonger, vibrer à des fréquences qui leurs sont propres. La vibration d'une liaison peut ainsi être induite par l'absorption de l'énergie d'un photon du rayonnement incident. De la transmission de l'énergie du photon aux liaisons de la molécule, résulte une absorbance et une diminution de l'intensité du rayonnement incident. L'analyse de cette absorption (ou transmittance) pourra ainsi donner des informations sur la molécule. Le spectre d'absorption infrarouge donne une empreinte précise des différents constituants de la molécule et peut

servir de « carte d'identité ». En plus des informations fonctionnelles, elle permet d'obtenir des informations sur la structure des molécules. Il est ainsi possible, à partir d'un spectre, de déduire les groupements fonctionnels d'une molécule inconnue analysée bien que cela nécessite de très bonnes connaissances en spectrométrie infrarouge. Cependant, en pratique, l'identification d'une molécule inconnue se fait par comparaison du spectre avec des spectres de références.

1-2-4 Spectroscopie Raman

• Principes généraux

La spectroscopie RAMAN se base, à la différence de la spectrophotométrie UV-Visible et de la spectrométrie d'absorption infrarouge, sur un phénomène d'émission. Il ne sera pas mesuré et analysé une diminution de l'intensité du rayonnement incident mais une modification du rayonnement. On peut alors considérer cette modification comme une émission d'un nouveau rayonnement [37], [42].

La spectroscopie RAMAN est un phénomène, découvert en Inde dans les années 1930 par sir C.V. Raman. Lorsque des molécules sont bombardées par un rayonnement incident, elles émettent un rayonnement composé de photons de même fréquence : il s'agit d'une émission élastique. Un second rayonnement de très faible intensité, environ 1 photon sur 1 million émis, est composé de photons de fréquence différente : il s'agit d'une émission inélastique. Ce processus d'émission est appelé processus Raman et la modification de la fréquence des photons est appelé l'effet Raman.

A la différence de la spectrométrie infrarouge ou UV-Visible où l'excitation des atomes ou des liaisons se fait entre deux niveaux d'énergie distincts (pour rappel l'excitation peut être réalisée uniquement si l'énergie apportée correspond à la différence entre les deux niveaux), la spectroscopie Raman fait intervenir des niveaux d'énergie « virtuels ». Une partie seulement de l'énergie apportée par le photon est transférée. Ce transfert énergétique partiel, instable n'est pas suffisant pour créer une absorption, les atomes réémettent immédiatement l'énergie transmise. Deux phénomènes peuvent alors se produire : l'énergie acquise est retransmise à un photon de manière élastique : il n'y a pas de changement d'énergie et de fréquence donc pas de modification de la longueur d'onde. Cette diffusion élastique est appelée diffusion Rayleigh et est très majoritaire. La diffusion inélastique ou effet Raman correspond à une diffusion avec une modification d'énergie créant des radiations de Stokes.

Le photon ayant cédé une partie de son énergie se retrouve déficitaire et voit sa fréquence diminuer augmentant donc sa longueur d'onde : il s'agit d'un décalage de Stokes. L'atome ayant capté l'énergie peut la céder à un autre photon qui se retrouve excédentaire en énergie et voit alors sa fréquence augmenter et sa longueur d'onde diminuer : c'est le décalage anti-Stokes. Ce sont ces deux décalages : Stokes et anti-Stokes qui sont analysés, parmi toutes les diffusions Rayleigh.

L'effet Raman peut se produire aussi bien dans l'UV que le visible ou l'infrarouge, il est indépendant de la longueur d'onde excitatrice. L'intensité du signal est meilleure dans l'UV que dans l'infrarouge. Cependant, pour atteindre un niveau d'énergie virtuel il ne faut pas que l'énergie de rayonnement incident permette d'atteindre un niveau excité ce qui entraînerait une absorption. Rappelons que le phénomène Raman est déjà très minoritaire par rapport à la diffusion Rayleigh et qu'une des difficultés techniques est de pouvoir isoler les raies Stokes et anti-Stokes des raies de Rayleigh. Si un effet d'absorption venait à se rajouter à ces phénomènes, la diffusion Raman ne serait pas observable. La figure 3 montre l'exemple de différents spectres Raman observables pour une molécule avec l'apparition d'un effet de fluorescence dans le visible masquant l'émission Raman.

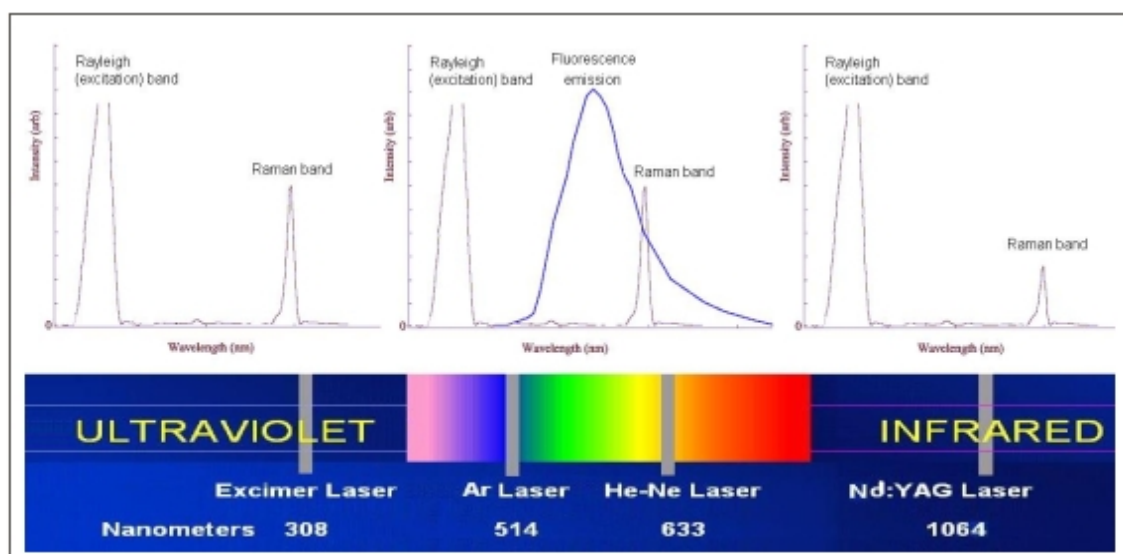


Figure 3 : Exemple de spectre RAMAN en fonction de la longueur d'onde d'excitation [55]

Par conséquent la majorité des analyses Raman se fait dans l'infrarouge, domaine spectral où l'énergie est plus faible que l'UV-Visible et où l'émission peut être observée sans interférences.

• Domaines d'application

▪ Analyse Qualitative

L'identification des molécules dans le Raman fait intervenir, comme pour la spectroscopie d'absorption infrarouge, les énergies de rotation et de vibration qui ont pour particularité de caractériser les atomes et les groupements de manière efficace. L'analyse Raman est par conséquent une très bonne technique d'identification des molécules et permet, aussi, de différencier des isomères. Les informations obtenues par la spectroscopie Raman sont complémentaires de la spectroscopie d'absorption infrarouge. En effet, certaines vibrations se retrouvent uniquement en Raman ou en infrarouge, c'est le principe d'exclusion mutuelle. Pour obtenir un spectre informatif complet d'une molécule, il faudrait faire une analyse infrarouge ET Raman. La figure 4 illustre ce phénomène.

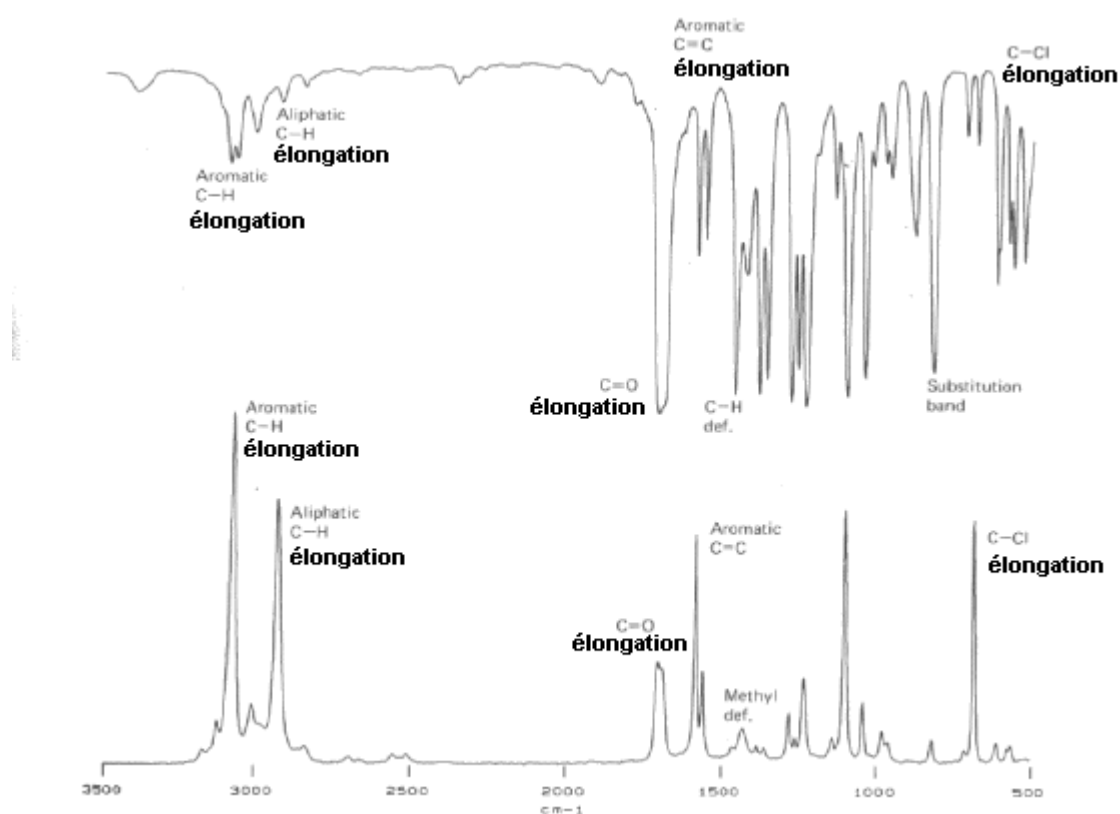


Figure 4 : Spectre IR en transmission (au-dessus) et Spectre Raman (en-dessous) [43]

La spectrométrie Raman offre la possibilité de réaliser des contrôles analytiques non destructifs des préparations de chimiothérapie. L'avantage majeur réside dans l'absence de prélèvement permettant alors de préserver l'intégralité de la préparation, de diminuer les risques pour les opérateurs et de réduire les coûts liés aux consommables [44]–[47].

- *Analyse Quantitative*

Comme pour la spectroscopie d'absorption infrarouge, la quantification dans le RAMAN est possible. Cependant elle n'offre pas de réels avantages comparés à l'UV-Visible et sa mise en œuvre (zone de quantification, linéarité...) est souvent plus compliquée à réaliser.

1-3 Principes de fonctionnement

1-3-1 Présentation

Le contrôle analytique est réalisé à l'aide d'un automate QCPrep+® développé et distribué par la société française Iconeservice©.



Figure 5 : Automate d'analyse QCPrep+®

L'architecture de l'automate est basée sur deux parties distinctes : un passeur d'échantillon et une unité de détection. Le passeur d'échantillon dispose :

- d'un carrousel motorisé de 110 emplacements pour flacon de 2,5mL dont 10 sont dédiés aux dilutions.
- d'une tourelle de prélèvement composé d'une seringue de 2,5mL et d'une aiguille capable de traverser les septums assurant la protection du personnel en diminuant la manipulation et le contact direct avec les cytotoxiques. La seringue à vis micrométrique assure les prélèvements avec une précision de 0,1%. Le système de prélèvement permet de réaliser automatiquement des dilutions.
- d'un système de rinçage et d'élimination des déchets ainsi que d'emplacements pour les solvants de dilution et de nettoyage des circuits.

Le module de détection est composé de deux spectromètres fabriqués par la société BWtek© : un spectromètre d'absorption UV-Visible et un spectromètre d'émission Raman. Les cuves de détections sont disposées en série et l'analyse UV-Visible est réalisée en première. Chaque cuve est remplie par 500µL de solution. Le volume nécessaire à l'analyse est donc de 1mL.

1-3-2 Définitions

- Spectre : C'est une représentation graphique de l'analyse. Dans le cas de la spectrométrie UV et Raman, il s'agit d'un spectre continu. Il est représenté par une courbe établissant le lien entre la longueur d'onde et l'intensité du signal (absorption pour la spectrophotométrie et émission pour la spectrométrie Raman).
- Librairie : la librairie regroupe les spectres de référence préalablement analysés et enregistrés lors des étalonnages ainsi que les paramètres d'identifications (nom de la molécule, laboratoire, solvant, zones spectrales...).
- Librairie spécifique : la librairie spécifique correspond à un regroupement de spectres, et de leurs paramètres d'identifications, souvent de molécules de même famille ou de structure proche. Son rôle est d'offrir un niveau de discrimination supérieur et fait souvent appel à l'analyse Raman. Elle est utilisée en complément de la librairie standard lorsque les paramètres de cette dernière ne sont pas suffisants pour permettre l'identification d'une molécule.
- Gamme d'étalonnage : La gamme d'étalonnage regroupe les paramètres nécessaires à la quantification de l'échantillon (équation de la droite, pente, domaine de linéarité, coefficient de corrélation, ratio performance/déviations...).
- Protocole : Il regroupe les paramètres d'analyses :
 - options d'acquisition : temps d'acquisition, puissance du laser.
 - options de traitement de l'échantillon : volume et vitesse de prélèvement, vitesse d'injection.
 - options d'identification et de quantification : rattachement aux librairies (normales ou spécifiques si besoin), correction de la pente.

1-3-3 Principes généraux

Le pilotage de l'automate est réalisé par le logiciel QCprep qui permet aussi de gérer les protocoles, réaliser les analyses et les gammes d'étalonnage. La mise au point des méthodes et la gestion des librairies sont réalisées à l'aide du logiciel QLANalyst. Il permet de gérer et modifier les gammes d'étalonnage, modifier les zones spectrales, paramétrer et modifier les librairies.

L'identification et la quantification des échantillons sont basées sur un principe de comparaison des spectres acquis avec des spectres préalablement enregistrés et sauvegardés dans une base de données : la bibliothèque de spectres. Ainsi, l'automate n'est capable d'identifier et quantifier que des molécules préalablement analysées. Pour qu'une analyse puisse se réaliser il faut :

- ✓ un spectre d'acquisition de l'échantillon.
- ✓ un protocole indiquant les paramètres d'analyses et les librairies de rattachement (figure 6).
- ✓ une librairie de spectres (générale ou spécifique) : nécessaire à l'identification.
- ✓ une gamme d'étalonnage : nécessaire à la quantification.

Il est possible de définir plusieurs protocoles d'analyse en fonction du type d'échantillon que l'on souhaite analyser. Dans la pratique, nous n'avons utilisé qu'un seul protocole permettant de simplifier l'analyse et d'éviter des erreurs (analyse selon un mauvais protocole par exemple). Dans la majorité des cas les paramètres ne sont pas modifiés mais ils permettent tout de même une certaine liberté pour l'adaptation et la modification des analyses. Par exemple, nous avons pu réaliser des tests sur des volumes de prélèvements plus faibles. Cette possibilité n'existait pas avec le logiciel de pilotage de l'automate Multispec®.

The figure consists of two screenshots of the QCPrep+ software interface, specifically the 'Définition des protocoles' (Protocol Definition) window.

Top Screenshot:

- Protocole:** 21/10/2014 15:51:01, Trouseau
- Titre du protocole:** Trouseau
- Acquisition spectres:**
 - Temps d'acquisition - Banc optique A: 4
 - Temps d'acquisition du dark - Banc optique A: 1
 - Puissance Laser: 99
 - Temps d'acquisition - Banc optique B: 80
 - Nombre d'échantillons max entre deux backgrounds: 10
 - Temps maximum (min) entre deux backgrounds: 0
- Options:**
 - Impression des séries: ☐
 - Titre de l'échantillon Pilote: @@@
- Traitement échantillon:**
 - Code du portoir: 110
 - Volume échantillon: 900
 - Vitesse de prélèvement: 3
 - Vitesse d'injection: 14
 - Volume d'un vial: 2 ml
 - Pompage de la solution de nettoyage pendant le cycle: ☐
- Quitter:** (button with a green arrow icon)

Bottom Screenshot:

- Nom de la librairie générique:** C:\QC Prep Library\Librairie QC Prep 2012 UV.Lbf
- Librairie utilisée pour l'identification du vecteur:** C:\QC Prep Library\Vecteur\Vecteur.Lbf
- Arborescence sélectionnée:**
 - Nom de la librairie spécifique 1: Dauno Doxo
 - Nom de la librairie spécifique 2: @@@
 - Champ N° 1: @@@
 - Champ N° 2: @@@
- Molécule N° 12:**
 - Doxorubicine - Accord 13/01/14
 - Doxorubicine
- Molécule N° 12 (bottom):**
 - Pente: 1
 - Biais: 0
 - Cible: -1
 - Tolérance: 0,1
 - Unités: mg/ml
 - Doxorubicine - Accord 13/01/14

Figure 6 : Paramètres d'un protocole d'analyse

1-3-4 Réalisation d'une gamme d'étalonnage

Le logiciel QCprep dispose d'un assistant très complet pour la réalisation des gammes d'étalonnage. Cette fonctionnalité représente une amélioration par rapport au Multispec®. L'évolution la plus importante réside dans la capacité de l'automate à réaliser les dilutions des points de gamme.

Dans un premier temps, il convient de déterminer le domaine d'analyse des concentrations. Il dépendra des préparations réalisées : la gamme d'étalonnage doit couvrir toutes les concentrations préparées. Dans un second temps, le point de gamme le plus haut doit être préparé par l'opérateur, c'est à partir de cette solution que l'automate réalisera les dilutions. Dans la pratique il est préférable de privilégier une concentration correspondant à la solution commerciale de principe actif. Cela permet d'éviter une dilution manuelle, diminuant ainsi le risque d'erreur. Cependant, comme il n'est pas possible de choisir les points de gamme, l'automate les répartissant de manière homogène entre 0 et la concentration maximale, il sera souvent nécessaire de préparer une solution mère de concentration plus faible que la solution commerciale.

Le logiciel propose une interface simple et intuitive pour la réalisation des gammes (représentée en figure 7). L'opérateur doit renseigner les informations sur la molécule, le nom du laboratoire (permettant de conserver différentes gammes en cas de changement de marché), le solvant de dilution et la concentration de départ. Le logiciel indique, à titre informatif, les volumes de principe actif et de diluant nécessaires. Initialement, la gamme est paramétrée avec 10 points : deux bornes (0 et la concentration de départ) et 8 points répartis de manière homogène. Même s'il n'est pas possible d'en modifier les concentrations il est possible d'en supprimer (pour diminuer la quantité de principe actif nécessaire par exemple).

L'acquisition de l'étalonnage peut se faire en temps réel, directement dans le logiciel QLANalyst. Un second avantage très intéressant proposé par l'automate QCPrep+® est le calcul des paramètres nécessaires à la validation de la gamme (représenté en figure 8). Les valeurs de chaque point de gamme ainsi qu'un calcul d'erreur sont proposés. La linéarité de la gamme est directement déterminée et est contrôlable de manière simple par la présence d'une surface verte sur la droite. Bien que le logiciel propose automatiquement les calculs et un domaine de linéarité, il est possible d'exclure certains points. Si la gamme n'est pas satisfaisante il est aussi possible de choisir une autre zone spectrale de quantification manuellement.

Paramétrage de la dilution

Dilution en cascade

☒ Calculer l'étalonnage en temps réel

Info +

Daunorubicine

Conc. de départ

Eau

5

8 Dilution(s) demandée(s) dans la série

Solution mère utilisée : 5,1 ml

0 0,10 0,25 0,50 1,00

0,23 0,26 0,31 0,42

1,25 1,67 2,50 3,75 5,00

0,47 0,56 0,74 1,01 1,1

Facteur de dilution

1,000

Position et nom du diluant

A

NaCl

Nombre de mélanges

1

☐ Ne pas utiliser le préparateur pour diluer

B Daunorubicine - Eau - 0,0

27 Daunorubicine - Eau - 0,1

28 Daunorubicine - Eau - 0,25

29 Daunorubicine - Eau - 0,5

30 Daunorubicine - Eau - 1,0

31 Daunorubicine - Eau - 1,25

32 Daunorubicine - Eau - 1,667

33 Daunorubicine - Eau - 2,5

34 Daunorubicine - Eau - 3,75

35 Daunorubicine - Eau - 5,0

Figure 7 : Paramétrage d'une gamme d'étalonnage

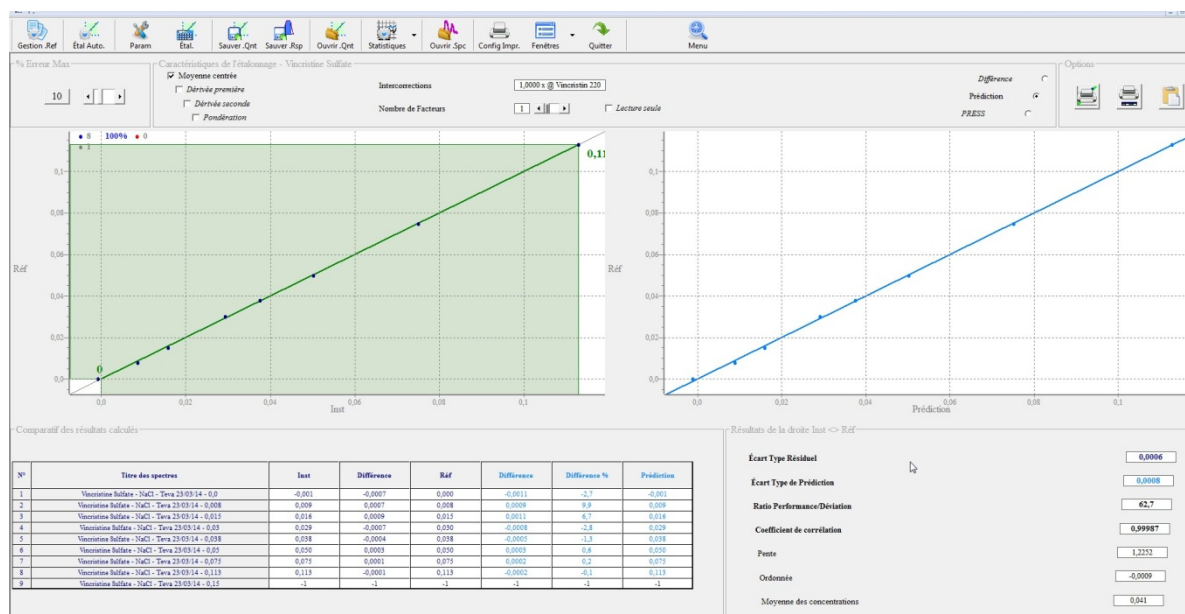


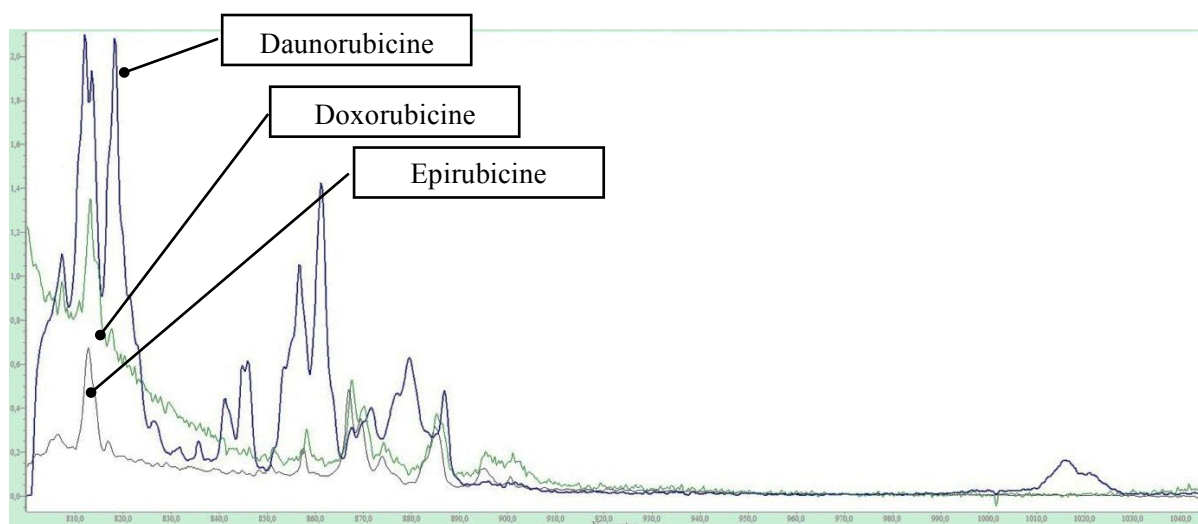
Figure 8 : Acquisition et validation d'une gamme d'étalonnage

1-3-5 Choix des zones spectrales et réalisation d'une librairie spécifique

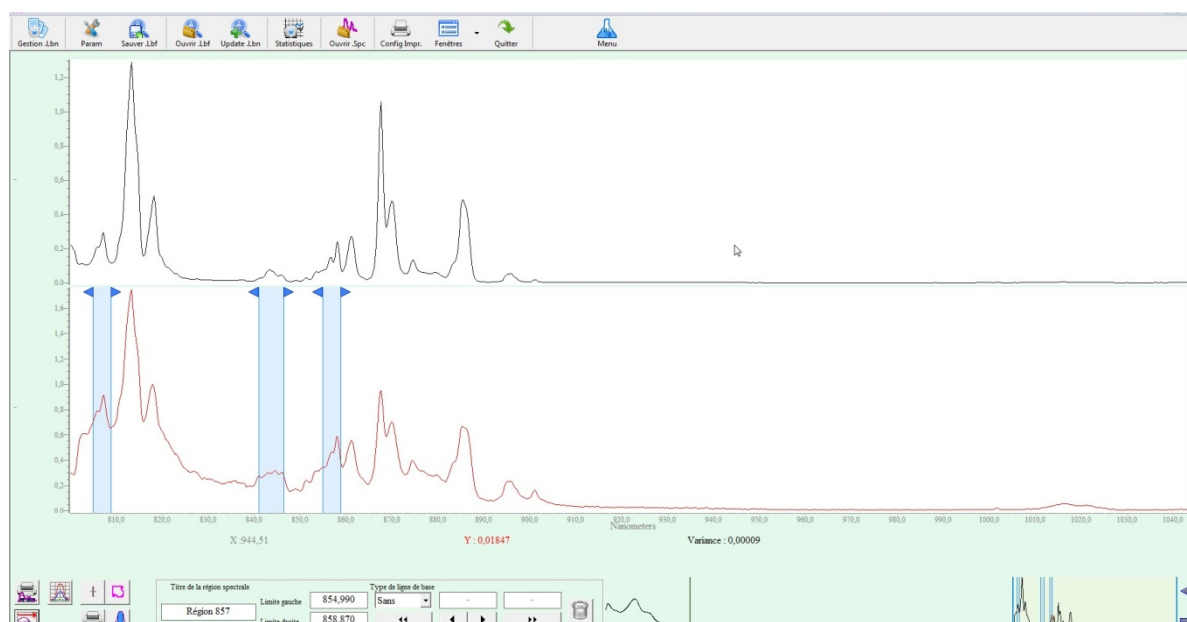
Le choix des zones spectrales est intéressant pour la réalisation d'une librairie spécifique. Lors de la réalisation de la gamme d'étalonnage, le logiciel QCPrep sélectionne automatiquement la zone spectrale dans le domaine de l'UV-Visible correspondant à la variance maximale.

Il arrive, lorsque des molécules possèdent des structures très proches, que le spectre d'absorption UV-Visible ne soit pas assez précis pour permettre une discrimination des molécules. Nous avons retrouvé ce problème avec les anthracyclines : doxorubicine et daunorubicine essentiellement, l'épirubicine étant très peu prescrite en onco-pédiatrie ; les vinca-alcaloïdes : vincristine, vinblastine, vinorelbine, et vindésine ainsi que certains agents alkylants : cyclophosphamide et ifosfamide. Le recours à la spectrométrie Raman est alors indispensable et son utilisation nécessite la création de librairies spécifiques.

La première étape de la création d'une librairie consiste à établir une ou des zones spectrales permettant de différencier les molécules. Le graphique 3 représente les spectres Raman de 3 anthracyclines. Les zones spectrales sélectionnées pour discriminer ces 3 molécules se situent entre 805 et 809nm ; 841 et 846nm ; 855 et 859nm (graphique 4).



Graphique 3 : Comparaison des spectres Raman de 3 anthracyclines : daunorubicine, doxorubicine et épirubicine



Graphique 4 : Zones spectrales de la librairie spécifique des anthracyclines

La seconde étape consiste à lier la librairie spécifique créée aux protocoles d'analyse des anthracyclines. Ainsi, lorsque le logiciel reconnaît un spectre inconnu comme étant de la doxorubicine, daunorubicine ou de l'épirubicine, une analyse complémentaire de comparaison des spectres Raman au niveau des zones spectrales déterminées sera réalisée.

1-3-6 Réalisation d'une analyse

Avant la première analyse, l'automate réalise, au démarrage, un test des bancs optiques permettant de s'assurer du fonctionnement des cellules de détection UV-Visible et Raman.

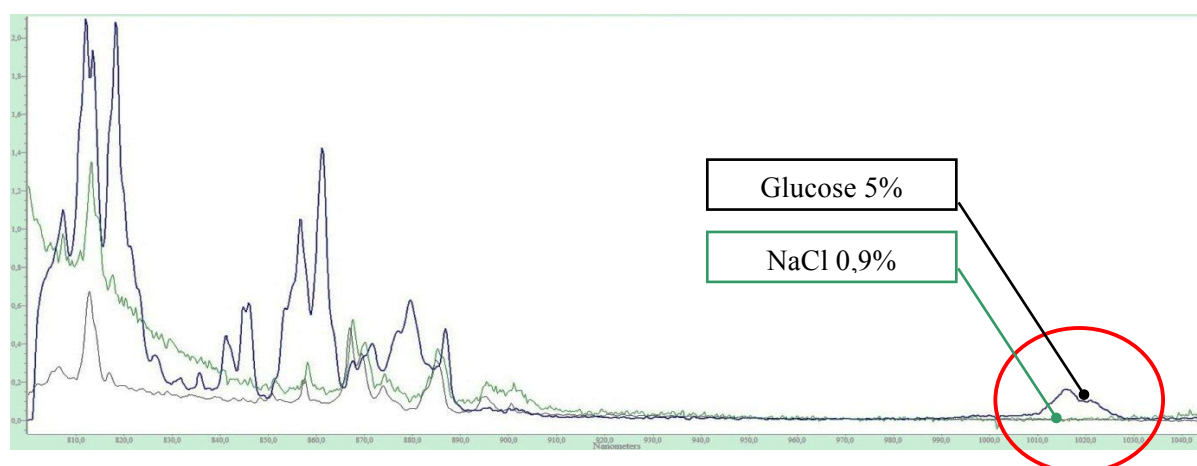
L'analyse débute par l'enregistrement du numéro d'ordonnancier (ou de toute autre information permettant de faire un lien entre l'analyse et la préparation) et l'emplacement du flacon sur le portoir. Il est possible de paramétrer une dilution de l'échantillon en choisissant le solvant de dilution ainsi que le facteur de dilution (de 1,3 à 50). La dernière version de l'automate QCPrep+® possède un scanner de code à barre permettant d'identifier automatiquement un flacon. Avec notre modèle d'automate, l'enregistrement du flacon et son positionnement sur le portoir échantillon reste une étape manuelle qui peut être source d'erreur.

Un cycle d'analyse se déroule de la manière suivante :

- Dilution éventuelle de l'échantillon
- Prélèvement de l'échantillon puis injection dans le puits d'analyse
- Remplissage des cuves UV-Visible puis Raman : acquisition des spectres
- Rinçage + élimination des solutions dans la poubelle CMR.

L'identification est réalisée par comparaison de l'aspect global du spectre UV-Visible acquis avec les spectres présents dans la librairie. La comparaison est basée sur une allure du spectre permettant de s'affranchir de « l'amplitude » et de la concentration. Le logiciel détermine le spectre se rapprochant le plus et établit un pourcentage de ressemblance. Lors de la validation il est important de vérifier l'allure du spectre car l'identification se base uniquement sur une analyse mathématique et dans certains cas elle peut être erronée, par exemple avec des molécules structurellement proches.

L'identification du solvant de dilution est réalisée par spectrométrie Raman dans la zone 1010-1030nm (graphique 5). A ces longueurs d'ondes, le glucose 5% émet dans le Raman alors que le NaCl 0,9% ne donne pas de signal.



Graphique 5 : Identification du solvant de dilution dans le Raman

La quantification est réalisée, après l'identification du spectre de référence, à l'aide de la droite d'étalonnage. Au niveau du logiciel, les résultats sont présentés en indiquant la molécule identifiée, si l'identification a été réalisée à partir de la librairie générale (ID

générique) ou spécifique (ID spécifique), la concentration calculée et le vecteur identifié (figure 9). Un code couleur permet d'identifier le pourcentage de ressemblance. La couleur verte indique un pourcentage de ressemblance supérieur à 94% et orange inférieur à 94%. La couleur violette indique que l'identification de la molécule a été forcée par l'utilisateur. En effet, il est possible de modifier l'identification réalisée par le logiciel. Cette manipulation permet, en cas de soucis sur l'identification, de réaliser tout de même la quantification de l'échantillon. Bien évidemment cette manipulation doit-être réalisée uniquement dans des cas très particuliers et après avoir réalisé un contrôle permettant de s'assurer de la bonne identité du principe actif (contrôle de la fiche de fabrication, numéro de lot, reliquats ...). Les spectres UV-Visible et Raman sont présentés avec les spectres de références. Cette comparaison permet au pharmacien de contrôler de manière visuelle et rapide la bonne identification et la conformité du contrôle réalisé.



Figure 9 : Présentation des résultats d'analyse dans le logiciel QCprep

La validation des résultats et l'archivage sont réalisés sur un fichier Excel® dédié et sécurisé ne stockant aucune information nominative sur les préparations mais uniquement le numéro d'ordonnancier (figure 10). Le logiciel QCPrep est interfacé avec ce fichier et y envoie les résultats de chaque analyse. Notre version de l'automate ne permet pas l'utilisation de code à barres pour récupérer de manière automatique ces informations. Par conséquent, les données des préparations : principe actif, dose, volume final, type de solvant, volume de la tubulure et volume de surremplissage doivent être renseignées afin de calculer la concentration théorique finale de la préparation. Le calcul de cette concentration prend en compte le volume de la tubulure (3 mL) pour les préparations réalisées en poche de dilution, la purge étant réalisée avec la poche finale ainsi que le volume de surremplissage déterminé par mesure du volume moyen de 10 poches. Pour les préparations réalisées en seringue, la

purge de la tubulure est réalisée avec le même solvant de dilution que la préparation et à partir d'une poche dédiée. Par conséquent le volume de purge de la tubulure n'intervient pas dans le calcul de la concentration finale pour ce type de préparations. Au niveau des informations de traçabilité, l'identité du préparateur ayant réalisé la préparation est indiquée. La conformité de la préparation est établie automatiquement par comparaison des informations renseignées avec les résultats de l'analyse. L'apposition du visa du pharmacien verrouille la ligne et empêche toute modification. En cas de non-conformité il est possible d'ajouter un commentaire.

Date	N° Ordo	Prepa..	DCI	Vecteur	Porc.	Volume	VT	AB	RV	VA	Conc. théorique	Conc. analysée	%Ecart	sgRase	ID-DCI	ID-Vecteur	Conformité	Visa	Comment
25/03/2014 11:47	48955	Aurelia	Bleomycine	NaCl	15	51	0	0	0	0	0,2941	0,31	5,4	99,9	Ok	Ok	Conforme	InterSat	
25/03/2014 11:47	48953	Aurelia	Vincristine Sulfate	NaCl	12	21	3	4	0	0	0,0545	0,054	-0,9	100	Ok	Ok	Conforme	InterSat	
25/03/2014 11:47	48945	Sandrina	Inotecan	NaCl	35	51	0	0	0	0	0,686	0,773	12,7	100	Ok	Ok	Conforme	InterSat	
25/03/2014 11:47	48957	Sandrina	Vincristine Sulfate	NaCl	18	51	0	0	0	0	0,3529	0,39	10,5	99,9	Ok	Ok	Conforme	InterSat	
25/03/2014 11:47	48952	Aurelia	Mathotestat	Glucose	120	21	0	0	0	0	5,71429	5,508	-3,6	100	Ok	Ok	Conforme	InterSat	
25/03/2014 12:08	48958	Sandrina	Topotecan	NaCl	0,9	21	0	0	0	0	0,0429	0,045	4,9	95,4	Ok	Ok	Conforme	InterSat	
25/03/2014 12:08	48978	Sandrina	Vincristine Sulfate	NaCl	2	21	3	4	0	0	0,0909	0,09	-1	100	Ok	Ok	Conforme	InterSat	
25/03/2014 12:08	48965	Aurelia	Cytarabine	Glucose	1800	136	3	6	0	0	12,9496	12,839	-0,9	100	Ok	Ok	Conforme	InterSat	
25/03/2014 12:08	48979	Aurelia	Doxorubicine	Glucose	60	51	0	0	0	0	1,1765	1,253	6,5	100	Ok	Ok	Conforme	InterSat	
25/03/2014 12:08	48963	Aurelia	Vincristine Sulfate	NaCl	1,3	21	3	4	0	0	0,0591	0,056	-5,2	99,9	Ok	Ok	Conforme	InterSat	
25/03/2014 15:19	49006	Aurelia	Vinblastine	NaCl	3	21	0	0	0	0	0,1429	0,16	12	100	Ok	Ok	Conforme	InterSat	
25/03/2014 15:19	48901	Aurelia	Cytarabine	Glucose	60	21	0	0	0	0	2,8571	2,74	-4,1	100	Ok	Ok	Conforme	InterSat	
25/03/2014 15:19	48980	Sandrina	Vincristine Sulfate	NaCl	2	21	3	4	0	0	0,0909	0,088	-3,2	100	Ok	Ok	Conforme	InterSat	
25/03/2014 15:19	48842	Aurelia	Vinblastine	NaCl	3,2	21	0	0	0	0	0,1524	0,15	-1,6	100	Ok	Ok	Conforme	InterSat	
25/03/2014 15:19	48983	Sandrina	Cytarabine	Glucose	3400	318	3	10	0	0	10,4615	10,264	-1,9	100	Ok	Ok	Conforme	InterSat	
25/03/2014 15:19	48946	Sandrina	Inotecan	NaCl	35	51	0	0	0	0	0,686	0,769	12,1	100	Ok	Ok	Conforme	InterSat	
25/03/2014 15:19	48981	Aurelia	Cytarabine	Glucose	3400	318	3	10	0	0	10,4615	10,218	-2,3	100	Ok	Ok	Conforme	InterSat	
25/03/2014 16:07	48994	Sandrina	Doxorubicine	Glucose	60	31	0	0	0	0	1,935	1,85	-4,4	100	Ok	Ok	Conforme	InterSat	
25/03/2014 16:07	48992	Sandrina	Vincristine Sulfate	NaCl	2	21	3	4	0	0	0,0909	0,085	-6,5	99,9	Ok	Ok	Conforme	InterSat	
25/03/2014 16:07	48127	Sandrina	Doxorubicine	Glucose	45	51	0	0	0	0	0,8824	0,919	4	100	Ok	Ok	Conforme	InterSat	
25/03/2014 16:07	48123	Aurelia	Vincristine Sulfate	NaCl	2	21	3	4	0	0	0,0909	0,093	2,3	100	Ok	Ok	Conforme	InterSat	
25/03/2014 16:07	47055	Aurelia	Doxorubicine	NaCl	22	31	0	0	0	0	0,7097	0,715	0,7	100	Ok	Ok	Conforme	InterSat	
25/03/2014 16:07	47054	Aurelia	Vindesine	NaCl	2,6	21	0	0	0	0	0,1238	0,115	-7,1	99,8	Ok	Ok	Conforme	InterSat	
30/03/2014 10:45	49007	Aurelia	Asparaginase	NaCl	8300	51	0	0	0	0	172,549	168,82	-2,2	100	Ok	Ok	Conforme	Morand	
30/03/2014 10:45	48967	Sandrina	Cytarabine	Glucose	1800	136	3	6	0	0	12,9496	12,617	-2,6	100	Ok	Ok	Conforme	Morand	
30/03/2014 10:45	49034	Aurelia	Vincristine Sulfate	NaCl	1,2	21	3	5	0	0	0,0522	0,058	11,1	99,7	Ok	Ok	Conforme	Morand	
30/03/2014 10:45	48305	Sandrina	Etoposide Phosphate	Glucose	160	21	0	0	0	0	7,619	7,344	-3,6	100	Ok	Ok	Conforme	Morand	
30/03/2014 10:45	48677	Aurelia	Bevacizumab	NaCl	190	107,6	3	7	0	0	1,703	1,85	8,6	100	Ok	Ok	Conforme	Morand	
30/03/2014 10:45	48966	Sandrina	Cytarabine	Glucose	1800	136	3	6	0	0	12,9496	12,575	-2,9	100	Ok	Ok	Conforme	Morand	

Figure 10 : Présentation des résultats dans le fichier Excel de validation

2- Prérequis à la mise en place du contrôle

Avant de procéder aux différents essais sur les méthodes de prélèvement et d'analyse les plus adaptées à nos préparations, nous nous sommes fixés des prérequis suivants :

- Le volume de l'échantillon doit être le plus faible possible, afin de minimiser la quantité de préparation dédiée au contrôle.
- Le volume final de la préparation doit correspondre à l'étiquetage, pour laisser aux infirmières un moyen de contrôle visuel simple avant administration.

3- Méthodes

3-1 Méthodes de prélèvement

Une diminution du volume de l'échantillon a été envisagée dans un premier temps face à la possibilité, offerte par l'automate, de réaliser des dilutions. Dans un second temps, nous avons cherché à déterminer le plus petit volume nécessaire à l'automate pour réaliser une analyse. Ces volumes, de l'échantillon et de prélèvement, plus faibles, permettent de diminuer la quantité de la préparation dédiée au contrôle. Pour un fonctionnement optimal il est important d'avoir un remplissage du flacon légèrement supérieur au volume prélevé, entre 100 et 200 μ L et ce afin de ne pas prélever d'air. Les critères d'évaluation étaient les suivants :

- **Conformité du résultat d'analyse :** identification de la molécule et du solvant, concentration analysée la plus proche de la concentration théorique.
- **Conformité du prélèvement :** volume prélevé exact, absence de bulles d'air.

Dans un premier temps, nous avons réalisé une préparation test avec 1g de cytarabine dilué dans 250 mL de glucose 5% puis prélevé 7 échantillons de volumes allant de 0,2 à 0,8 mL. Les prélèvements étaient ensuite dilués afin d'obtenir un volume d'analyse suffisant. Par la suite, la détermination du volume minimal, nécessaire à l'automate, a été réalisée sans dilution des prélèvements, en considérant un volume d'échantillon de 1 mL. Nous avons testé 4 volumes de prélèvement : 700, 800, 900 et 1000 μ L. Plusieurs tests identiques et sur différentes molécules ont été réalisés. Des échantillons témoins étaient utilisés avec les paramètres initiaux de l'automate : échantillon de la préparation de 1,2 mL et prélèvement de l'échantillon de 1 mL.

3-2 Méthodes de validation

La validation des gammes d'étalonnages est primordiale lors du développement d'une technique de dosage. Son objectif est d'assurer que les résultats obtenus sur les analyses de routine seront suffisamment fiables et reproductibles.

Différentes caractéristiques peuvent être étudiées lors de la validation d'une méthode de dosage. Ces caractéristiques ne sont pas applicables à toutes les méthodes de dosage et dans notre cas nous nous intéresserons plus particulièrement à la linéarité, l'exactitude, la justesse, la précision, la reproductibilité et la répétabilité. Ces différents paramètres sont définis comme suit :

La linéarité : elle correspond à la capacité de la méthode à rendre un résultat directement proportionnel à la concentration de l'échantillon. Elle est déterminée lors de la réalisation de la gamme d'étalonnage par l'analyse d'échantillons de concentrations différentes et croissantes. Les résultats obtenus permettent de calculer une droite de régression et de déterminer un coefficient de corrélation r^2 . Ce dernier doit être supérieur à 0,995.

L'exactitude : elle correspond à l'étroitesse de l'accord entre la valeur mesurée et sa valeur réelle [48].

La justesse : elle correspond à l'étroitesse de l'accord entre une valeur moyenne, obtenue à partir d'une grande série de mesures et une valeur de référence [48].

L'exactitude et la justesse sont déterminées à l'aide de contrôles qualités réalisés à partir de solution de concentrations parfaitement connues. La réalisation de ces contrôles nécessite une grande rigueur et du matériel de précision (pipettes, verrerie).

La fidélité ou précision : elle correspond à l'étroitesse de l'accord entre des résultats d'essais indépendants obtenus sous des conditions stipulées [48]. La fidélité peut s'exprimer en évaluant soit la **répétabilité** ou la **reproductibilité**.

La reproductibilité : elle correspond à la précision de la méthode lorsqu'elle est évaluée dans différentes conditions. Généralement ces conditions portent sur le laboratoire (reproductibilité inter laboratoire) mais elles peuvent aussi porter sur l'analyste, les jours d'analyses ou le matériel. Dans notre cas la reproductibilité sera évaluée par une analyse sur plusieurs jours permettant d'évaluer la capacité de la méthode de dosage à offrir des résultats les plus proches possibles sur plusieurs journées.

La répétabilité : elle correspond à la précision de la méthode évaluée dans un même laboratoire, sur un même échantillon, avec le même analyste et sur une période de temps courte. La répétabilité permet d'évaluer la précision de la méthode dans des conditions de travail proches de la réalité.

La détermination de ces deux derniers paramètres fait appel au coefficient de variation (CV) qui doit être inférieur à 5%.

3-2-1 Validation des gammes d'étalonnage

Nous avons choisi de réaliser un protocole de validation en se basant sur les recommandations proposées par l'International Conference on Harmonization (ICH) [49].

Ainsi, pour chaque gamme d'étalonnage :

- **3 niveaux de concentrations sont déterminés : bas, milieu, haut.** Ces niveaux doivent couvrir au mieux la gamme d'étalonnage.

- **6 analyses de chaque niveau de concentration sont réalisées au jour 1 afin d'évaluer la répétabilité.** Elle est déterminée en calculant le coefficient de variation (CV_{ra}) à partir de l'écart type (σ_{ra}) et de la moyenne (m_{ra}) de la série tel que :

$$CV_{ra} = 100 \times \sigma_{ra} / m_{ra}$$

- **3 analyses de chaque niveau de concentration sont réalisées aux jours 2 et 3 afin d'évaluer la reproductibilité.** Elle est déterminée en calculant le coefficient de variation (CV_{ro}) à partir de l'écart type (σ_{ro}) et de la moyenne (m_{ro}) des 3 séries tel que :

$$CV_{ro} = 100 \times \sigma_{ro} / m_{ro}$$

3-2-2 Contrôles qualités de routine

Un contrôle hebdomadaire en début de production est réalisé à l'aide d'une solution de caféine fourni par le fabricant. La caféine est un produit stable, non toxique et disposant d'un spectre permettant d'évaluer toute la plage de détection UV et Raman.

4- Résultats

4-1 Résultats des méthodes de prélèvement

Les résultats des tests réalisés sur la diminution du volume de l'échantillon **avec dilution** du prélèvement sont présentés en tableau 2. La concentration théorique de 3,89 mg/mL tient compte du surremplissage de la poche de dilution (10 mL) ainsi que du volume de la tubulure purgée avec le solvant de la poche (3 mL).

Volume prélevé (µL)	Concentration théorique	Dilution	Identification	Concentration mesurée	% d'erreur
200	3.89	1/10	topotecan	-	-
300	3.89	1/10	cytarabine	9,13	+134
400	3.89	1/5	cytarabine	5,492	+41.1
500	3.89	1/4	cytarabine	5,518	+41.8
600	3.89	1/4	cytarabine	5,010	+28.8
700	3.89	1/3	cytarabine	5,178	+33.1
800	3.89	1/2	cytarabine	4,439	+14.1

Tableau 2 : Résultats d'analyse d'une gamme volumique de cytarabine

Les résultats des tests réalisés sur la diminution du volume de prélèvement **sans dilution** sont présentés en tableau 3 :

Volume prélevé (µL)	Identification et quantification UV	Identification RAMAN (solvant et librairie spécifique)	Bulles d'air
700	Conforme	Non conforme	Non
800	Conforme	Conforme	Non
900	Conforme	Conforme	Non
1000	Conforme	Non conforme	Oui

Tableau 3 : Résultats analyses avec diminution du volume de prélèvement

4-2 Validation des méthodes et des gammes

Après modification des paramètres de prélèvement et d'analyse, les gammes de 10 molécules différentes ont été contrôlées et validées. Les résultats de la validation sont présentés dans les tableaux ci-dessous. Sont détaillés l'étendue de la gamme d'étalonnage, le coefficient de corrélation r^2 , les différents niveaux de contrôle, la justesse la répétabilité et reproductibilité.

ASPARAGINASE		<i>NaCl 0,9%</i>	Linéarité : 0 à 450 UI/mL $r^2 = 0,9998$	
Niveau	Concentration théorique	Justesse	Répétabilité	Reproductibilité
Bas	50 UI/mL	-0,12%	97,9%	97,5%
Milieu	100 UI/mL	1,76%	99,1%	99,0%
Haut	200 UI/mL	3,50%	99,7%	99,8%

Tableau 4 : Résultats de la validation de la gamme d'asparaginase

CYCLOPHOSPHAMIDE		<i>NaCl 0,9%</i>	Linéarité : 0 à 10 mg/mL $r^2 = 0,9999$	
Niveau	Concentration théorique	Justesse	Répétabilité	Reproductibilité
Bas	2,5 mg/mL	-4,04%	99,6%	99,9%
Milieu	5 mg/mL	-2,71%	98,3%	98,3%
Haut	10 mg/mL	-2,27%	98,3%	98,4%

Tableau 5 : Résultats de la validation de la gamme de cyclophosphamide

CYTARABINE		<i>Glucose 5%</i>	Linéarité : 0 à 37,5 mg/mL $r^2 = 0,9999$	
Niveau	Concentration théorique	Justesse	Répétabilité	Reproductibilité
Bas	6 mg/mL	-2,60%	99,9%	97,8%
Milieu	10 mg/mL	-1,25%	99,1%	99,0%
Haut	20 mg/mL	-0,38%	99,4%	99,4%

Tableau 6 : Résultats de la validation de la gamme de cytarabine

DOXORUBICINE		<i>NaCl 0,9%</i>	Linéarité : 0,25 à 5 mg/mL r² = 0,9999	
Niveau	Concentration théorique	Justesse	Répétabilité	Reproductibilité
Bas	0,5 mg/mL	-0,31%	99,1%	97,9%
Milieu	1 mg/mL	-0,68%	99,7%	99,5%
Haut	1,5 mg/mL	-0,96%	99,8%	99,6%

Tableau 7 : Résultats de la validation de la gamme de doxorubicine

DAUNORUBICINE		<i>Glucose 5%</i>	Linéarité : 0 à 2 mg/mL r² = 0,9995	
Niveau	Concentration théorique	Justesse	Répétabilité	Reproductibilité
Bas	0,5 mg/mL	-0,24%	99,7%	98,4%
Milieu	1 mg/mL	0,86%	99,9%	98,8%
Haut	1,5 mg/mL	0,67%	99,7%	98,6%

Tableau 8 : Résultats de la validation de la gamme de daunorubicine

IFOSFAMIDE		<i>Glucose 5%</i>	Linéarité : 0 à 30 mg/mL r² = 0,9998	
Niveau	Concentration théorique	Justesse	Répétabilité	Reproductibilité
Bas	4 mg/mL	-1,94%	99,3%	99,7%
Milieu	10 mg/mL	-0,97%	99,3%	99,4%
Haut	20 mg/mL	-1,78%	99,2%	99,1%

Tableau 9 : Résultats de la validation de la gamme d'ifosfamide

METHOTREXATE		<i>Glucose 5%</i>	Linéarité : 0 à 5 mg/mL r² = 0,9996	
Niveau	Concentration théorique	Justesse	Répétabilité	Reproductibilité
Bas	1 mg/mL	-0,59%	99,6%	99,6%
Milieu	2,5 mg/mL	-1,63%	99,0%	99,7%
Haut	4 mg/mL	-1,58%	99,3%	99,8%

Tableau 10 : Résultats de la validation de la gamme de méthotrexate

La linéarité de la gamme de méthotrexate est démontrée jusqu'à 5mg/mL. La majorité des préparations étant réalisé avec une concentration finale supérieure à 5 mg/mL, des dilutions sont réalisées par l'automate (entre 1/2 et 1/20ème) pour les contrôles de ces préparations.

VINCRIStINE		<i>NaCl 0,9%</i>	Linéarité : 0 à 0,1 mg/mL $r^2 = 0,9999$	
Niveau	Concentration théorique	Justesse	Répétabilité	Reproductibilité
Bas	0,025 mg/mL	-4,89%	100,0%	99,2%
Milieu	0,05 mg/mL	-1,11%	100,0%	99,0%
Haut	0,1 mg/mL	-2,89%	99,0%	99,0%

Tableau 11 : Résultats de la validation de la gamme de vincristine

ETOPOSIDE PHOSPHATE		<i>Glucose 5%</i>	Linéarité : 0 à 10 mg/mL $r^2 = 0,9999$	
Niveau	Concentration théorique	Justesse	Répétabilité	Reproductibilité
Bas	2 mg/mL	-2,61%	98,5%	98,3%
Milieu	5 mg/mL	-3.49%	99,4%	99,3%
Haut	10 mg/mL	-2.63%	99,1%	99,0%

Tableau 12 : Résultats de la validation de la gamme d'étoposide phosphate

ETOPOSIDE		<i>Glucose 5%</i>	Linéarité : 0 à 0,5 mg/mL $r^2 = 0,9998$	
Niveau	Concentration théorique	Justesse	Répétabilité	Reproductibilité
Milieu	0,3 mg/mL	-6.2%	99,6%	99,7%

Tableau 13 : Résultats de la validation de la gamme d'étoposide

La validation de la gamme d'étoposide a été réalisée sur un seul niveau de concentration. La justesse, répétabilité et la reproductibilité ont été calculées à partir de 3 séries de 10 échantillons analysées sur 3 jours différents.

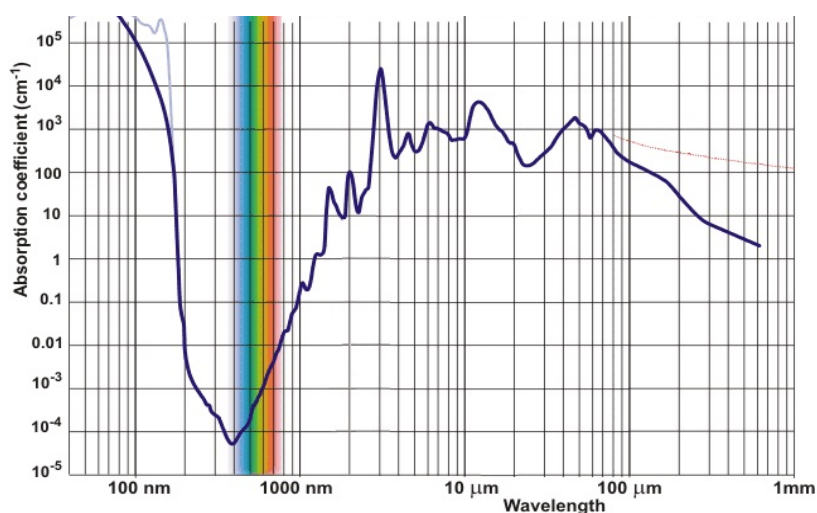
5- Discussion

5-1 Avantages de l'automate QCPrep+®

5-1-1 Améliorations analytiques

Comme il a été vu précédemment, les spectroscopies d'absorption Infrarouge et d'émission Raman sont deux techniques analytiques spectrales d'identification complémentaires. La spectrométrie RAMAN est intéressante sur plusieurs points :

- Elle n'interfère pas avec les solvants de dilution. En effet, l'eau possède l'inconvénient d'absorber en infrarouge avec un maximum d'absorption vers les 3200 nm et deux pics dans le proche infrarouge aux alentours de 1600 et 2000 nm, représentés en graphique 6. Cette absorption ne se retrouve pas en Raman. On estime que le Raman offre 60% d'informations spectrales supplémentaire comparé à l'infrarouge (données constructeur non vérifiées).



Graphique 6: Spectre absorption d'une molécule d'H₂O

- Au niveau matériel, l'infrarouge possède l'inconvénient de devoir être allumé en permanence, à l'inverse du spectromètre Raman qui fonctionne uniquement au cours de l'analyse. En matière d'encombrement, les modules peuvent-être délocalisés et connectés via des fibres optiques facilitant ainsi l'installation et la disposition du matériel.

5-1-2 Amélioration fonctionnelles

En plus d'une amélioration de la qualité d'analyse, l'automate QCPrep+ dispose de la capacité de réaliser des dilutions. L'automatisation permet de s'affranchir de manipulations sous hotte à flux d'air laminaire et de dilutions réalisées par l'opérateur pouvant être potentiellement source d'erreurs. La seule opération humaine est la réalisation du plus haut point de la gamme, l'automate diluant par la suite cette solution pour obtenir les points souhaités.

Au niveau logiciel, des outils de validation ont été implantés. Ces derniers établissent les zones de linéarité de la gamme, calculent différents paramètres (coefficient de corrélation, rapport performance/déviations...) apportant une aide importante lors de la validation.

5-2 Validation des gammes

5-2-1 Choix de la méthode de validation

La revalidation des gammes d'étalonnages a été réalisée suite à la modification du volume d'analyse. Ce dernier a un impact essentiellement sur l'analyse Raman. Les gammes d'étalonnages étant réalisées dans l'UV, il semble par conséquent peu probable que la modification des paramètres ait un impact sur ces dernières. Il existe de nombreuses références publiées au sujet de la validation des techniques de dosage et donc autant de protocoles de validation [49]–[51]. Face au nombre important de contrôles, nous avons choisi de réaliser un protocole allégé de validation en se basant sur les recommandations minimales proposées par l'ICH [49]. Il est ainsi recommandé d'évaluer la répétabilité sur un minimum de 6 déterminations à une seule concentration ou 9 déterminations à plusieurs concentrations couvrant toute la gamme. Les niveaux de concentrations ont été choisis afin de couvrir de manière homogène la gamme d'étalonnage.

5-2-2 Discussion des résultats de validation

Toutes les gammes d'étalonnages contrôlées ont été validées. Néanmoins, pour quelques molécules certains résultats sont à la limite de la non-conformité : le niveau « haut » de l'asparaginase (justesse à +3,5%), le niveau « bas » de la cytarabine (-4,0%), le niveau « bas » de la vincristine (-4,9%). Il en est de même pour le contrôle de la gamme d'étoposide obtenant une justesse de -6,2% sur un niveau de contrôle à 0,3 mg/mL et avec une

répétabilité et reproductibilité supérieures à 99,5%. L'étoposide est très visqueux et sa dilution dans du glucose 5% est source de nombreuses non-conformités. La gamme d'étalonnage est linéaire dans le domaine de stabilité de l'étoposide ([0,2 ; 0,4] mg/mL). Malgré une justesse dépassant les $\pm 5\%$ et au regard des difficultés d'homogénéisation des préparations ainsi que de la linéarité de la gamme d'étalonnage, cette dernière a tout de même été validée.

5-3 Méthode de prélèvement

5-3-1 Choix de la méthode de prélèvement

L'association d'une diminution du volume de l'échantillon et d'une dilution ne satisfait pas nos critères de validation. En effet, la dilution nécessaire au bon remplissage des cuves peut amener la concentration de l'échantillon analysé dans une zone de faible sensibilité analytique. De plus, même en diminuant le volume de l'aliquot à 800 μL (contre les 1,2mL initiaux) nous nous confrontons au problème de la discordance entre le volume final et l'étiquetage. Ainsi cette méthode a été abandonnée.

Les prélèvements de 800 et 900 μL réalisés sans dilution, à partir d'un aliquot de 1 mL, offrent les meilleurs résultats : conformité du résultat d'analyse, absence de bulles d'air lors du prélèvement et volume prélevé conforme. A contrario, le prélèvement de la totalité de l'échantillon (soit 1 mL) n'a pas été possible. La raison de cet échec est la forme du flacon qui ne permet pas de récupérer les derniers μL de l'échantillon. Même en modifiant les paramètres de la seringue (positionnement, longueur de la course, vitesse de prélèvement) les derniers μL prélevés sont de l'air. Cet air injecté dans les cellules d'analyse peut perturber l'analyse Raman en entraînant, notamment, des erreurs d'identification du solvant ou des molécules, nécessitant l'utilisation de bibliothèques spécifiques. A l'inverse, le prélèvement de 700 μL d'échantillon se réalise dans de bonnes conditions (volume prélevé et absence de bulles d'airs). Cependant le volume utilisé pour l'analyse Raman, soit 200 μL pour une cuve de 500 μL , n'est pas suffisant. Les mêmes problèmes d'identifications, solvant et molécules spécifiques, surviennent alors.

La méthode finalement sélectionnée pour réaliser le contrôle des préparations pédiatriques de faible volume (compris en 20 et 50 mL) est le surremplissage. Elle consiste à rajouter une quantité de diluant correspondant au volume de l'aliquot utilisé pour le contrôle. Ainsi, toutes les préparations, de faible volume, sont réalisées en diluant le principe actif avec 1 mL de solvant **supplémentaire**. Après homogénéisation, un échantillon de 1 mL est réalisé et 900 µl seront prélevés par l'automate. Ainsi, le volume de la préparation, après contrôle, n'est pas amputé et reste conforme à la fiche de fabrication et l'étiquetage. De plus, le volume prélevé correspond à la précision des seringues de 20 et 50 mL. La dilution supplémentaire consécutive au surremplissage correspond à une diminution de 2% de la concentration finale pour les préparations de 50 mL et 5% pour celles de 20 mL. Selon les données de stabilité des cytotoxiques manipulés, cette dilution peut être négligée.

L'avantage de cette méthode est que le volume final de la préparation est respecté et les modifications de manipulation sont simples. Cependant, l'inconvénient principal est que la proportion de la dose totale dédiée au contrôle analytique est plus importante que pour le contrôle des préparations en poches de dilution : 4,76% pour les préparations de 20mL et 1,96% pour les préparations de 50mL.

5-3-2 Pourcentage de la dose utilisée pour le contrôle

Le contrôle des préparations étant destructif, la fraction de la dose utilisée pour le contrôle est par conséquent soustraite de la dose prescrite et de la dose que va recevoir le patient. En oncologie adulte et pour les préparations réalisées en poche de dilution avec un volume supérieur à 50 mL, cette fraction est négligée. En effet, elle est généralement inférieure à 1% de la dose totale. Il n'existe pas de réglementation qui encadre ou limite cette fraction mais il est légitime de se poser la question suivante :

« Quelle fraction maximale de la dose totale est-il possible d'accepter médicalement, éthiquement et techniquement, afin d'assurer la sécurité de la réalisation des préparations ? ».

Afin de répondre à cette question il est possible de prendre exemple sur le principe du « dose banding » ou standardisation des doses. Il s'agit d'un concept, apparu au milieu des années 1990 au Royaume-Uni, qui remet en question la prescription des chimiothérapies intraveineuses en fonction du poids du patient ou de sa surface corporelle [52]–[56]. En effet,

la surface corporelle est une unité de prescription qui ne permet pas de réaliser une prescription personnalisée, du fait que son calcul est basé sur des formules non précises et empiriques, qui ne prennent pas en compte les variabilités interindividuelles. Chatelut *et al.* le démontrait en mesurant les paramètres pharmacocinétiques de médicaments cytotoxiques administrés en doses personnalisées et en doses standards [53], sans trouver de différences.

Ainsi, le concept du dose banding utilise le fait qu'il est non pertinent de chercher à prescrire des chimiothérapies intraveineuses au milligramme près et qu'il serait possible de standardiser les doses, afin d'améliorer le processus de préparation et de gagner du temps. Plumridge définit ce concept ainsi : *« il s'agit d'un système dans lequel, après un accord entre les prescripteurs et les pharmaciens, les doses des médicaments anticancéreux injectables calculées sur une base individuelle (surface cutanée) sont arrondies afin de déterminer des intervalles standards. Le maximum de variations entre les doses calculées et les intervalles standards ne doivent pas excéder plus ou moins 5% de la dose initialement calculée. Des séries de seringues ou de perfusions sont préparées par la pharmacie ou par des industriels permettant l'administration de ces doses standards »* [52].

Les objectifs du dose banding sont de réaliser des préparations à doses fixes qui pourront être préparées à l'avance sous forme de préparations hospitalières. La réalisation de ces préparations sous forme de campagnes permet l'automatisation de la préparation et donc une diminution des erreurs et un gain de temps [57]. La production ne se réalise alors plus en flux tendu, la veille pour le lendemain ou pour le jour même. Les stocks disponibles permettent de diminuer de manière significative le temps de mise à disposition de la préparation pour le patient, améliorant sa prise en charge [58], [59]. Afin de déterminer les doses standard et la méthode d'arrondis des doses, une vaste campagne d'investigation a été réalisée en 2008 au Royaume-Unis auprès de 1104 oncologues [60]. Cette enquête, menée par Kaestner *et al.*, avait pour objectif, notamment, de déterminer l'arrondi de dose maximal que les prescripteurs étaient prêts à accepter afin d'améliorer la réalisation des préparations et leur mise à disposition. Les résultats de cette enquête montrèrent que 92% des médecins interrogés étaient prêts à arrondir leur prescription à $\pm 5\%$ et 40% à $\pm 10\%$. C'est à partir de cette enquête que la valeur de $\pm 5\%$ a été communément acceptée pour fixer les doses standards et créer les « fourchettes » de dose. Il est cependant important de préciser que le dose banding n'est pas réalisé en pédiatrie et ce pour des raisons de faisabilité. En effet, il est difficile, voire impossible, de déterminer des doses standards face à la population cible, les âges, poids, tailles et posologies pouvant varier du simple au décuple.

Ainsi nous pouvons nous demander :

« Si pour des raisons organisationnelles, de gain de temps et de confort du patient, les prescripteurs sont prêts à accepter, dans le cadre du dose banding, de diminuer les doses prescrites de 5%, est-il concevable d'accepter une même diminution de 5% afin d'améliorer la sécurité du processus de préparation en permettant de réaliser un contrôle analytique ? »

A notre avis, la réponse à cette question est « oui ». Il ne semble pas irresponsable ou incohérent de diminuer une dose prescrite d'un maximum de 5% afin d'augmenter la sécurité de son processus de reconstitution. Cependant, accepter de diminuer une dose de 5% afin de réaliser le contrôle de la préparation entraîne une différence entre la dose prescrite et la dose analysée pouvant alors aller jusqu'à -20% pour les préparations contrôlées à la limite du seuil de tolérance fixé, pour rappel $\pm 15\%$. Bien que la concentration analysée soit entachée des erreurs d'analyses et de prélèvements, de l'ordre de 10%, il pourrait être intéressant de reconsidérer le seuil de tolérance pour les préparations de faible volume. Ainsi nous pourrions fixer ce seuil à $[-10\% ; +15\%]$ ou $\pm 10\%$ permettant de prendre en considération les -5% de la dose utilisée pour le contrôle.

5-3-3 Autre méthode envisagée : surproduction de l'aliquot

La surproduction de l'aliquot de contrôle consiste à fabriquer en plus la quantité (principe actif et solvant) nécessaire au contrôle analytique. Les avantages de cette méthode sont que le volume final est respecté et que la quantité de principe actif dédié au contrôle analytique n'est pas amputée à la dose prescrite. Ainsi, en partant du fait que le volume nécessaire à la réalisation d'une analyse est de 1,2mL, les préparations doivent être surproduites d'un pourcentage de la dose totale et du volume final correspondant au rapport 1,2/volume final.

Par exemple, une préparation de 50mg d'un cytotoxique X dans un volume final de 50mL sera réalisée en préparant 51.2mg dans un volume final de 51.2mL.

Dans la pratique cette méthode entraîne plusieurs problèmes. Le premier se retrouve au niveau des calculs et des arrondis réalisés. En effet, la précision des plus petites seringues utilisées pour la préparation est de 0,1mL. Dans la très grande majorité des cas, préparer 1,2mL de solution finale en plus entraîne une modification des valeurs rendant les volumes prélevés incompatibles avec la précision du matériel et nécessitant de réaliser des arrondis.

Par exemple une préparation d'une seringue de 4000UI d'asparaginase est réalisée en prélevant 1mL de Kidrolase diluée dans 49mL de NaCl. En cas de surproduction de l'aliquot de contrôle, il faudrait prélever 1.024mL de Kidrolase diluée dans 50.176mL de NaCl 0,9% pour obtenir un volume final de 51,2mL.

Ces nouveaux volumes à prélever ne sont pas réalisables avec le matériel utilisé. Même en considérant un volume de prélèvement de 2mL, les volumes à prélever ne sont toujours pas au niveau de précision des seringues. Ainsi, sans prendre en considération l'aspect économique qui peut se révéler problématique pour des molécules onéreuses, la réalisation de la surproduction de l'aliquot de contrôle est difficilement envisageable au sein de nos unités de fabrication.

5-4 Problématiques liées aux préparations pédiatriques

La problématique majeure des préparations de chimiothérapies pédiatriques réside dans les faibles doses. Les doses de chimiothérapies cytotoxiques étant prescrites en fonction de la surface corporelle (ou parfois du poids), elles peuvent par conséquent être très faibles pour de très jeunes enfants ou des nouveau-nés. Des faibles doses prescrites découlent deux problématiques : le volume de principe actif prélevé et la concentration finale de la préparation.

Pour les volumes inférieurs à 1 mL, fréquents pour les préparations de vinca-alcaloïdes et de cytarabine par exemple, le volume mort des seringues apporte un risque d'erreur important et non négligeable. Pour les seringues de 1 mL utilisées (seringue 3 pièces BBraun©) le volume mort moyen est de 0,05 mL (donnée fabricant). Il représente jusqu'à 25% de la dose pour les plus faibles volumes de principes actifs reconstitués (0,2 mL). Ce volume mort, négligeable pour les seringues d'un volume supérieur à 5 mL, doit être pris en compte pour tous les volumes prélevés inférieurs à 1 mL. De plus Carrez *et al.* démontrait l'existence d'un « ratio volume » qui tendait à augmenter le risque d'erreur des préparations de faible volume [61]. Il a démontré que plus le volume de principe actif était faible comparé au volume de solvant, plus une erreur sur le volume de principe actif avait une influence sur la concentration finale et donc sur le pourcentage d'erreur.

La prescription des médicaments cytotoxiques est réalisée, au niveau de notre logiciel de prescription Phedra® et pour tous les autres logiciels de prescription, en dose massique ou en

unité internationale. Dans certains cas, la correspondance entre la dose et le volume nécessite de réaliser des arrondis. Cette problématique d'arrondis de dose se retrouve essentiellement pour l'asparaginase, prescrite en unité internationale (UI), et possédant une concentration de 4000 UI/mL. Les prescriptions personnalisées, en UI/m², ne permettent pas toujours d'obtenir des volumes compatibles avec nos dispositifs de prélèvements. Les préparations d'asparaginase sont réalisées en seringue avec un volume final de 50 mL. Le volume de principe actif est prélevé avec une seringue de 2,5 mL et le volume de solvant (NaCl 0,9%) est prélevé avec une seringue de 50 mL. La précision des seringues de 2,5 mL étant de 0,1 mL cela impose, théoriquement, de prescrire des doses d'asparaginase par tranches de 400 UI, ce qui est difficilement réalisable. Par conséquent l'approximation sur le volume final des préparations d'asparaginase est augmentée.

Cette problématique peut être traitée de différentes manières. Soit en standardisant les prescriptions d'asparaginase et en imposant une prescription par tranches de 400 UI, correspondant à un arrondi de dose de 4,76% au maximum. Soit en modifiant les procédures de réalisation de ces préparations. Actuellement les doses ne sont pas standardisées et sont arrondies par le pharmacien en accord avec le prescripteur. Cependant dans la majorité des cas, et même si le taux de conformité de ces préparations est supérieur à 96%, ces arrondis et approximations ne permettent pas toujours d'obtenir des volumes compatibles avec la précision des seringues et introduisent un biais supplémentaire sur le calcul de la concentration théorique de la préparation.

5-5 Contrôles qualités de routine

Les contrôles qualités de routine correspondent à une démarche de vérification régulière du bon fonctionnement du matériel, permettant de garantir la fiabilité des résultats. L'objectif de ces contrôles est de mettre en évidence d'éventuelles dérives. Dans le cas de l'automate de contrôle QCPrep+, les dérives observables portent essentiellement sur les cellules de détections et sont révélatrices d'un défaut matériel.

Ces contrôles qualité de routine sont définis par plusieurs textes, notamment dans la certification ISO 9001, section 7.6: Maîtrise des dispositifs de laboratoire [62] qui indique que « *Les équipements de mesure doivent être étalonnés ou vérifiés à intervalles spécifiés* », ou encore dans les BPP 2007 et Bonnes Pratiques de Fabrication :

« Les documents relatifs au contrôle de la qualité sont disponibles :

- résultats des validations des méthodes d'analyse.*
- procédures et enregistrements concernant l'étalonnage des instruments et la maintenance du matériel. »*

Les recommandations du fabricant sont de réaliser une analyse hebdomadaire d'un échantillon de caféine permettant alors d'évaluer la réponse UV et Raman. La caféine est un produit stable, non toxique et disposant d'un spectre permettant d'évaluer toute la plage de détection UV et Raman. A l'inverse des contrôles réalisés par chromatographie sur colonne, où des dérives sont plus régulièrement observées (essentiellement à cause de la constante évolution de la capacité de rétention), les contrôles de caféine réalisés sur le QCPrep+® ont uniquement pour fonction de vérifier le bon état de fonctionnement de l'automate et des cellules de détection. Il est possible de se questionner sur la pertinence d'utiliser comme contrôle qualité un produit n'étant pas analysé en routine et s'il ne serait pas plus efficient de réaliser ces contrôles sur les molécules réalisées au sein de l'unité de préparation. Ces contrôles qualités utilisant des molécules cytotoxiques doivent être mis en place afin de mettre en évidence d'éventuelles dérives des techniques analytiques. Les molécules contrôlées doivent idéalement être prêtes à l'emploi (pour ne pas ajouter un risque d'erreur lié à l'étape de reconstitution) et peu onéreuses. Ces contrôles pourront être réalisés de manière hebdomadaire ou mensuelle et en plus des contrôles de caféine alors réalisés de manière quotidienne.

TROISIEME PARTIE

Contrôle des préparations de chimiothérapie destinées aux patients

1- Introduction

1-1 Présentation de l'UPAC de l'hôpital Armand Trousseau

L'hôpital pédiatrique Armand Trousseau appartient au groupement des Hôpitaux Universitaires de l'Est Parisien de l'Assistance Publique des Hôpitaux de Paris (AP-HP). La PUI réalise, en plus de ses missions obligatoires, des activités de préparation des chimiothérapies, de nutrition parentérale, de stérilisation, de rétrocession et dispose d'un préparatoire réalisant un grand nombre de préparations pédiatriques magistrales et hospitalières. L'UPAC dispose d'un isolateur double poste dans une Zone à Atmosphère Contrôlée (ZAC) de classe C. L'unité est localisée au plus près du patient, directement au sein du service d'onco-hématologie. L'unité réalise une moyenne de 7000 préparations de chimiothérapies injectables par an pour la prise en charge de pathologies cancéreuses chez l'enfant et l'adolescent.

1-2 Détails des molécules contrôlées

Les principales molécules utilisées dans les protocoles de chimiothérapies injectables et qui représentent donc une grande partie des contrôles réalisés, sont détaillées ci-dessous.

- La **L-asparaginase**, enzyme de nature protéique extraite de culture d'*E. Coli* (pour la Kidrolase®). L'asparagine, acide aminé constituant de base de la substance protéique cellulaire mais qui n'est pas synthétisé par les cellules leucémiques. Ces dernières puisent alors dans le milieu extracellulaire l'asparagine nécessaire à leur développement. La L-asparaginase intervient en entraînant une déplétion en asparagine du milieu extracellulaire ayant pour conséquence la destruction des cellules leucémiques. Du fait de sa méthode de synthèse, la L-asparaginase est un principe actif hautement allergène pouvant entraîner le développement d'anticorps neutralisant l'action de cette enzyme [63], [64]. L'utilisation de différentes formes d'asparaginase : soit issue d'une autre souche de bactérie (Erwinia®) [65], [66], soit pegylée (Oncaspar® - ATU nominative) [66], [67] permet de conserver une efficacité du principe actif et thérapeutique même chez les patients présentant une hypersensibilité ou le développement d'une résistance. L'asparaginase est un traitement de première ligne dans les Leucémies Aigues Lymphoblastiques (LAL) (protocoles FRALLE 2000, CALL-FB01 et Interfant 2006 pour les enfants de moins de 1 ans) et dans les

Lymphomes lymphoblastiques (protocole Euro-LB02). La posologie habituelle est de 6000UI/m² préparée en seringue avec un volume finale de 50 mL de chlorure de sodium 0,9% (NaCl 0,9%) et administrée par voie intraveineuse lente (IVL).

● La **cytarabine** est un antimétabolite spécifique de la phase S du cycle cellulaire. Il s'agit d'une prodrogue dont le métabolite actif est l'ARA-CTP qui s'incorpore à l'ADN des cellules et bloque leur division, entraînant leur apoptose. Il s'agit du principal mécanisme d'action, la cytotoxicité de cette molécule s'exprimant, dans une moindre mesure, par une inhibition de l'ADN polymérase et par une perturbation de la voie des kinases. Elle peut être utilisée via différentes voies d'administration : en intraveineuse lente sur 3h ou en continue sur 12h ou 24h, en sous-cutané ou encore par voie intrathécale (IT) en association ou non (avec du méthotrexate et/ou un corticoïde) en prophylaxie des atteintes cérébrales et afin d'obtenir une concentration thérapeutique efficace au niveau du système nerveux central, la biodisponibilité cérébrale étant de l'ordre de 40%. La cytarabine est un traitement de première ligne des LAL et des leucémies aigues myéloblastiques (LAM). Elle est aussi prescrite dans le traitement des lymphomes lymphoblastiques. Les posologies sont variées : de 75mg/m² à 3g/m². Elle est prescrite à haute dose afin d'outrepasser la résistance développée par les cellules leucémiques vis-à-vis de la cytarabine utilisée à faible dose [68], [69]. Les préparations sont donc réalisées dans des conditionnements différents selon le protocole :

- en seringues dans un volume final de 48 mL pour les administrations en continue sur 12h.
- en seringue dans un volume final de 20 mL pour les administrations en « push » sur 30 minutes.
- en poche de dilution pour les hautes doses.

La dilution est réalisée dans du glucose 5% et la conservation se réalise à température ambiante sans particularités vis-à-vis de la lumière.

- **L'étoposide** ou VP16 est un dérivé semi-synthétique de la podophyllotoxine inhibant l'entrée en mitose des cellules cancéreuses par action sur la topo-isomérase II. L'étoposide se présente sous deux formes : l'étoposide base et l'étoposide phosphate. L'étoposide phosphate (Etopophos®) et un dérivé de l'étoposide base présentant une plus grande solubilité. En effet, ce dernier est une molécule très lipophile possédant la particularité d'être difficile à homogénéiser et présentant un domaine de stabilité très étroit, entre 0,2 mg/mL et 0,4 mg/mL. La conséquence directe est la nécessité de réaliser des préparations dans un grand volume de solvant afin d'obtenir une concentration de la préparation appartenant au domaine de stabilité. L'étoposide est prescrit dans de la prise en charge de nombreuses pathologies : les LAL, la maladie de Hodgkin, les neuroblastomes, les néphroblastomes, les ostéosarcomes... Les posologies sont comprises entre 75mg/m² et 200mg/m². Les préparations sont réalisées dans du glucose 5% ou plus rarement dans du NaCl 0,9%, en poche de dilution avec un volume final compris généralement entre 150 et 750mL et administré sur 1 ou 2 heures. L'étoposide phosphate est prescrit à la même dose mais les préparations sont réalisées en seringue avec un volume final de 20 mL et administrées sur 15 minutes.

- Le **méthotrexate** appartient à la famille des antimétabolites, c'est un analogue de l'acide folique. C'est un inhibiteur compétitif de la dihydrofolate-réductase, enzyme réduisant l'acide dihydrofolique en différents acides tétrahydrofoliques nécessaires à la synthèse de l'ADN. Le méthotrexate possède la particularité d'être de couleur jaune-orangée. En hématologie pédiatrie, il est essentiellement prescrit en perfusion continue sur 24h, mais aussi en injection de courte durée (15 minutes), par voie intrathécale sous forme simple (méthotrexate seul) ou triple (méthotrexate + cytarabine + prednisone). On le retrouve dans le traitement de première ligne des LAL et des lymphomes lymphoblastiques à la posologie de 5g/m² sur 24h ; des LAL en rechute à la posologie de 1g/m² sur 36h ; des lymphomes B aux posologies de 3g/m² sur 3h et 8g/m² sur 4h ou 24h et des ostéosarcomes à la posologie de 12g/m². La dilution est réalisée dans du glucose 5%. Le méthotrexate peut être préparé en poche de dilution pour les doses importantes ou en seringues d'un volume final de 44 mL, 48 mL ou 50 mL pour l'administration continue sur 24h ou 36h.

● La **vincristine** appartient à la famille des vinca-alcaloïdes ou poisons du fuseau. Ces molécules se fixent à la tubuline empêchant sa polymérisation et la création des microtubules. La division mitotique des cellules se retrouve alors bloquée en métaphase. La vincristine est le vinca-alcaloïde le plus utilisé en onco-hématologie pédiatrique. Il s'agit d'une molécule de base pour la prise en charge des pathologies cancéreuses : LAL, LAM, lymphomes, maladie de Hodgkin, neuroblastomes, néphroblastomes, sarcomes. Elle est prescrite à une posologie standard de 1,5 mg/m² avec un maximum de 2 mg. Ses effets secondaires, essentiellement neurologiques (neuropathies périphériques, atteintes du système neurovégétatif, effets neurologiques centraux), peuvent-être importants et entraîner un arrêt du traitement. Cette toxicité peut être fatale en cas d'administration accidentelle par voie intrathécale et quelques cas sont rapportés dans la littérature [70]–[73]. Face à leur fréquence et leur mortalité (7 cas mortels en France entre 2000 et 2006), l'ANSM a établi, en 2007, des recommandations visant à sécuriser le circuit de préparation et d'administration des vinca-alcaloïdes [74]. Elles visent essentiellement à :

- reconstituer les préparations dans des poches de dilution et non en seringues.
- Séparer le circuit d'administration des vinca-alcaloïde des autres préparations de chimiothérapie fréquemment associées, comme le méthotrexate intrathécale.
- Mettre en place des signalétiques, dans les postes de soin et sur les préparations, indiquant la contre-indication absolue d'administration par voie intrathécale.

Par conséquent, la vincristine est reconstituée en poche de dilution avec un volume final de 20 mL.

● La **doxorubicine** et la **daunorubicine** appartiennent à la famille des anthracyclines, molécules s'intercalant entre les bases d'ADN empêchant par conséquent sa réplication. Les anthracyclines inhibent la topoisomérase II responsable du maintien de la structure de l'ADN au cours de sa réplication. La famille des anthracyclines est constituée d'autres molécules comme l'idarubicine et l'épirubicine, plus rarement prescrites en pédiatrie. Cette famille de molécules possède la particularité d'être de couleur rouge, caractère organoleptique permettant leur identification. Il existe une forme liposomale de la daunorubicine permettant de diminuer la survenue et l'intensité des effets secondaires ainsi que de disposer d'une plus grande spécificité sur les cellules leucémiques. La daunorubicine est prescrite dans les LAL

aux posologies de 30 à 40mg/m², les LAL en rechute et les LAM à la posologie de 35mg/m², et dans les lymphomes lymphoblastiques à la posologie de 30mg/m². La doxorubicine est utilisée dans la maladie de Hodgkin à la posologie de 40mg/m², les lymphomes lymphoblastiques à la posologie de 30mg/m², dans le néphroblastome à la posologie de 50mg/m² et dans les sarcomes. La doxorubicine et la daunorubicine sont essentiellement préparées en seringue dans du glucose 5% avec des volumes finaux de 30 ou 40 mL. Cependant en fonction de la dose et du patient elles peuvent être réalisées dans des poches de dilutions et dans du NaCl 0,9%.

- Le **cyclophosphamide** et l'**ifosfamide** sont des agents alkylants appartenant à la famille des oxazophosphorines. Ces molécules interagissent directement avec l'ADN en formant des liaisons covalentes entre les bases. Ces liaisons entraînent des modifications profondes de la structure de l'ADN et créent des « ponts » intra ou interbrins avec, pour finalité, une inhibition de la transcription et de la réplication de l'ADN et l'apoptose cellulaire. Le cyclophosphamide est indiqué dans les LAL à des posologies allant de 300 à 1500mg/m². Il est également prescrit dans la maladie de Hodgkin les lymphomes lymphoblastiques, les neuroblastomes, le sarcome d'Ewing et les néphroblastomes. L'ifosfamide est prescrit à faible dose dans la prise en charge du lymphome anaplasique (ALCL) ainsi qu'à haute dose (3g/m²) dans les sarcomes. Les préparations d'ifosfamide sont réalisées en poche de dilution dans du glucose 5%. Le cyclophosphamide est reconstitué dans des seringues avec un volume final de 50mL ou dans des poches de dilution en fonction de la dose prescrite. La dilution se réalise dans du glucose 5% ou du NaCl 0,9%.

2- Matériel & Méthode

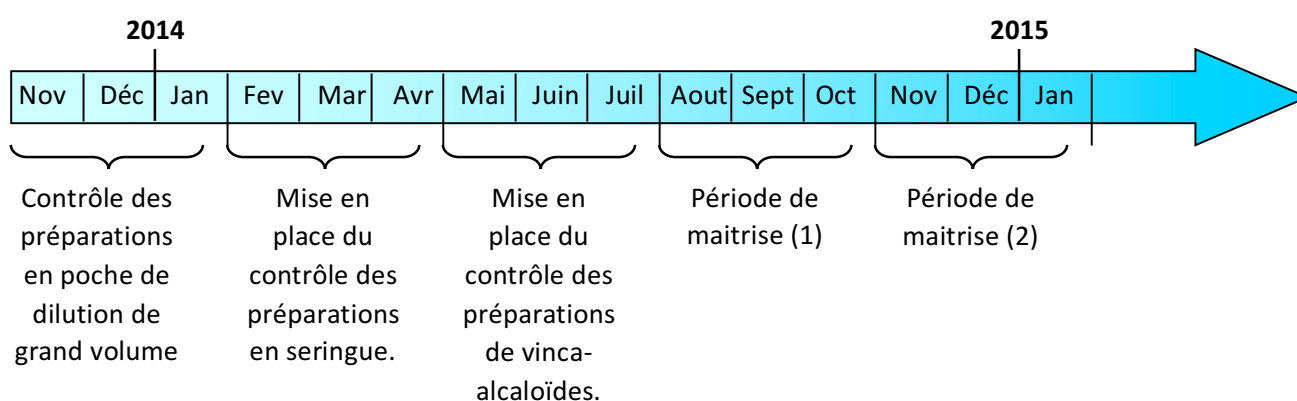
2-1 Conditions de préparation

Compte tenu des résultats précédents, nous avons choisi pour :

- **Les préparations de faibles volumes** (réalisées en poche de dilution ou en seringue avec un volume compris entre 20 et 50 mL) : l'échantillon sera réalisé, après homogénéisation, sur un **prélèvement de 1 mL et l'analyse sur 900 µL**.
- Les préparations de **grand volume** (réalisées en poche de dilution avec un volume supérieur à 50 mL) : dans une optique d'harmonisation des pratiques, l'échantillon sera aussi réalisé, après homogénéisation, sur un **prélèvement de 1 mL et l'analyse sur 900 µL**.
- Les préparations d'un **volume inférieur à 20 mL** : ces préparations ne sont pas contrôlées analytiquement. Par conséquent, **aucun prélèvement ne sera réalisé**.

2-2 Analyse des résultats de conformité

La comparaison et l'analyse des résultats ont été réalisées en regroupant les données par périodes de 3 mois :



▪ **Novembre, Décembre 2013 et Janvier 2014** : Seules les préparations en poches de dilution d'un volume supérieur à 50 mL étaient contrôlées analytiquement.

▪ **Février, Mars et Avril 2014** : Mise en place du contrôle analytique des préparations réalisées en seringue. La méthode a été déterminée à la fin du mois de janvier 2014.

▪ **Mai, Juin et Juillet 2014** : Mise en place du contrôle analytique des préparations de vinca-alcaloïdes. Le contrôle de ces préparations a été débuté suite à la maîtrise du contrôle des seringues.

▪ **Aout, Septembre et Octobre 2014** : Période de maîtrise des nouveaux protocoles de prélèvement et analyse des préparations en seringue et des vinca-alcaloïdes.

▪ **Novembre, Décembre 2014 et Janvier 2015** : 2^{ème} période de maîtrise des nouveaux protocoles de prélèvement et analyse des préparations réalisées en seringue et des vinca-alcaloïdes.

Durant ces périodes, nous avons étudié :

- Le **nombre** et la **nature** des contrôles réalisés.
- **La répartition des contrôles** en fonction des molécules et des périodes.
- Les **taux de conformité** :
 - Global
 - Par type de préparation
 - Par molécule
 - Par manipulateur
- **La répartition des valeurs des taux de conformités** des préparations conformes.

2-3 Relevé et analyse des non-conformités

Le relevé et l'analyse des non-conformités a été majoritairement fait de manière prospective, après l'obtention d'un résultat de dosage non-conforme ou la libération d'une préparation considérée comme non-conforme. La recherche des causes a été réalisée directement après relevé de la non-conformité, auprès des PPH et à l'aide de la prescription, de la fiche de fabrication et des résultats du contrôle analytique.

Pour leur analyse, les causes de non-conformités ont été réparties en 6 grands groupes :

- **Défaut d'analyse** : non-conformité provenant d'un défaut d'analyse de l'automate (prélèvement, acquisition des spectres).

- **Protocole** : non-conformité provenant de la mauvaise sélection du protocole. Elles correspondent essentiellement à la période de développement du contrôle des préparations de vinca-alcaloïdes où des tests étaient réalisés sur un prélèvement de 500µL. Ce prélèvement nécessitait l'utilisation d'un protocole spécifique.

- **Homogénéisation** : non-conformité issue d'un défaut d'homogénéisation de la préparation. Déterminée lors du second contrôle analytique.

- **Préparation** : non-conformité provenant d'un défaut de manipulation (identité ou volume de solvant, identité ou volume de principe actif).

- **Gamme** : non-conformité issue d'une anomalie ou d'un défaut de gamme. Ces non-conformités sont essentiellement dues aux quantifications réalisées hors-gamme pour des préparations de très faible concentration.

- **Non-identifiable** : non-conformité dont l'origine n'a pu être déterminé. Elles sont essentiellement dues à un manque d'informations lors de l'analyse rétrospective des non-conformités.

2-4 Test statistique de comparaison des résultats

Le test statistique utilisé pour la comparaison des pourcentages observés est un test d'homogénéité. Les échantillons étant de grande taille ($n > 30$), le test suit la loi normale centrée réduite et il est possible de calculer la statistique u correspondant à la différence des pourcentages observés. Le risque α est fixé à 5%.

Les hypothèses sont les suivantes :

H_0 : les deux pourcentages observés sont identiques

H_1 : il existe une différence entre les deux pourcentages observés

La statistique u se calcule de la manière suivante :

$$u = \frac{f_1 - f_2}{\sqrt{p(1-p)\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right)}}$$

En ayant préalablement calculé la proportion commune.

$$p = \frac{n_1 f_1 + n_2 f_2}{n_1 + n_2}$$

Avec

f_1 : pourcentage n°1, taux de conformité observé pour l'échantillon n°1 / n_1 : effectif de l'échantillon n°1

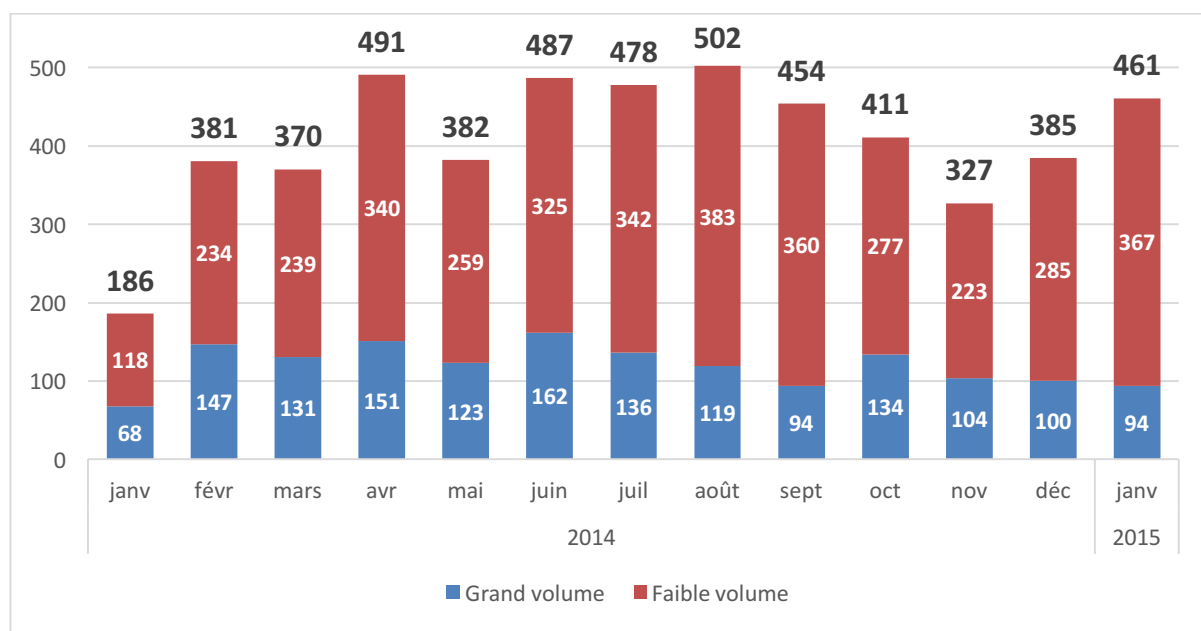
f_2 : pourcentage n°2, taux de conformité observé pour l'échantillon n°2 / n_2 : effectif de l'échantillon n°2

p : proportion commune

3- Résultats

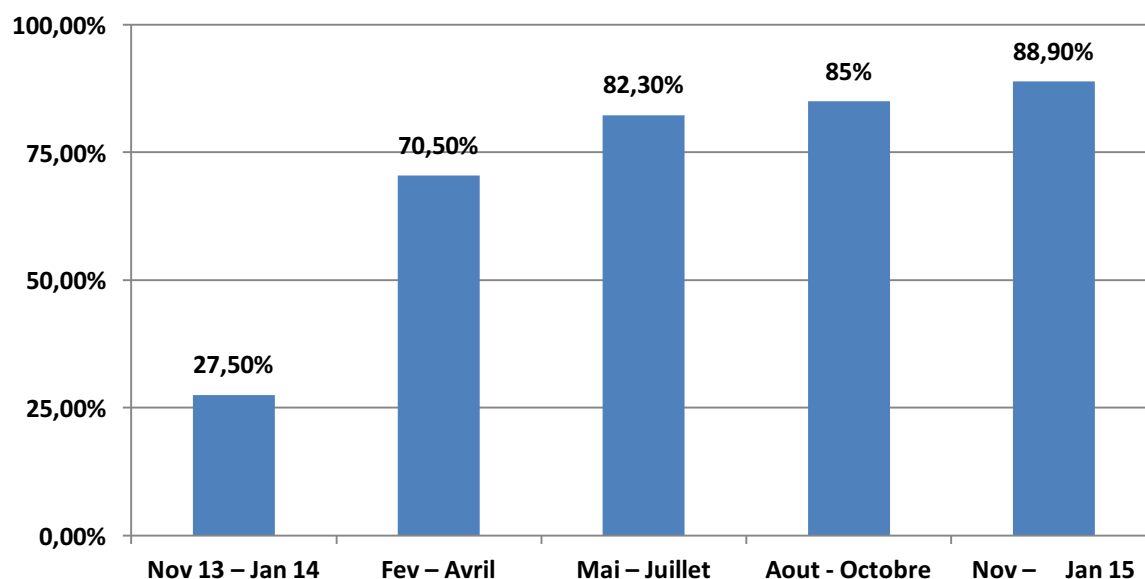
3-1 Nombre et nature des contrôles réalisés

Le nombre de contrôles réalisés est représenté en graphique 7, soit une moyenne de 427 ± 58 contrôles par mois sur la période février 2014 à janvier 2015. L'augmentation importante du nombre de préparations contrôlées s'observe dès le mois de février 2014 avec le contrôle des préparations réalisées en seringue. A partir du mois d'avril 2014 et la mise en place du contrôle des préparations de vinca-alcaloïdes, 500 contrôles mensuels sont réalisés. Une diminution s'observe sur les mois d'octobre à novembre 2014, correspondant à une diminution des prescriptions.



Graphique 7 : Nombre de contrôles réalisés par mois

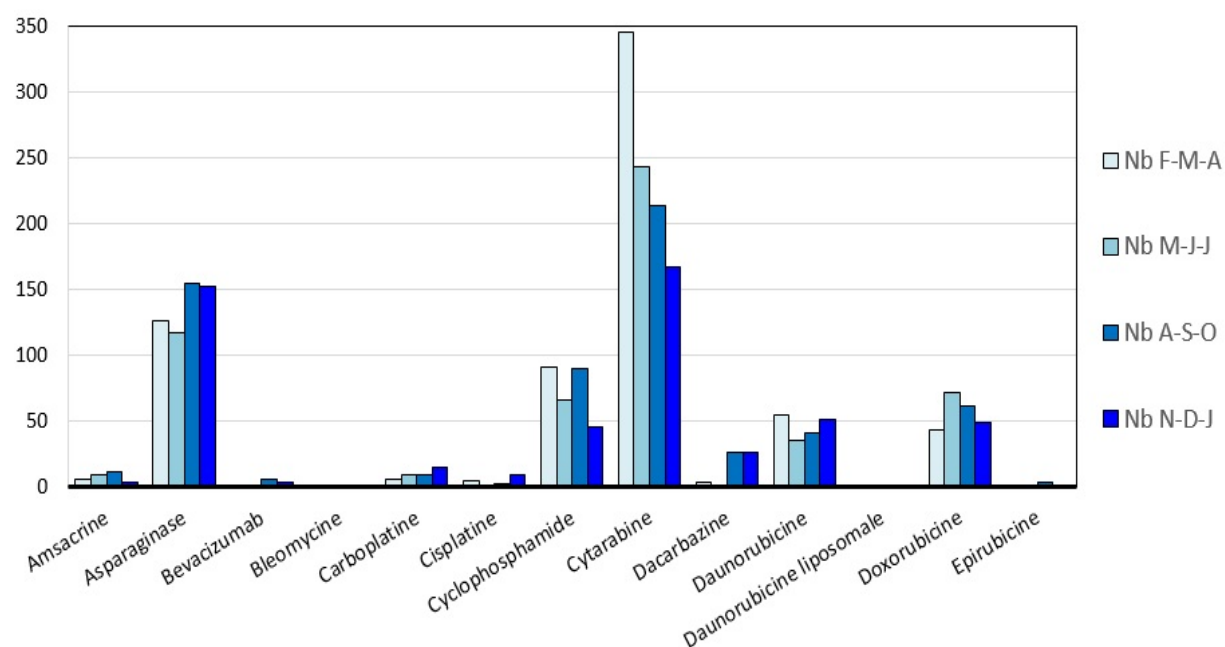
Avant janvier 2014, seules les préparations en poches de dilution, d'un volume supérieur à 50 mL, étaient contrôlées. Ainsi sur la période « novembre-décembre 2013-janvier 2014 » (jusqu'à la mise en place du contrôle des seringues) 482 contrôles avaient été réalisés représentant 27,5% de notre production (représenté en graphique 8). Le reste des préparations étaient contrôlées visuellement : double contrôle par les préparateurs et contrôle de la fiche de fabrication et de la préparation finale par le pharmacien.



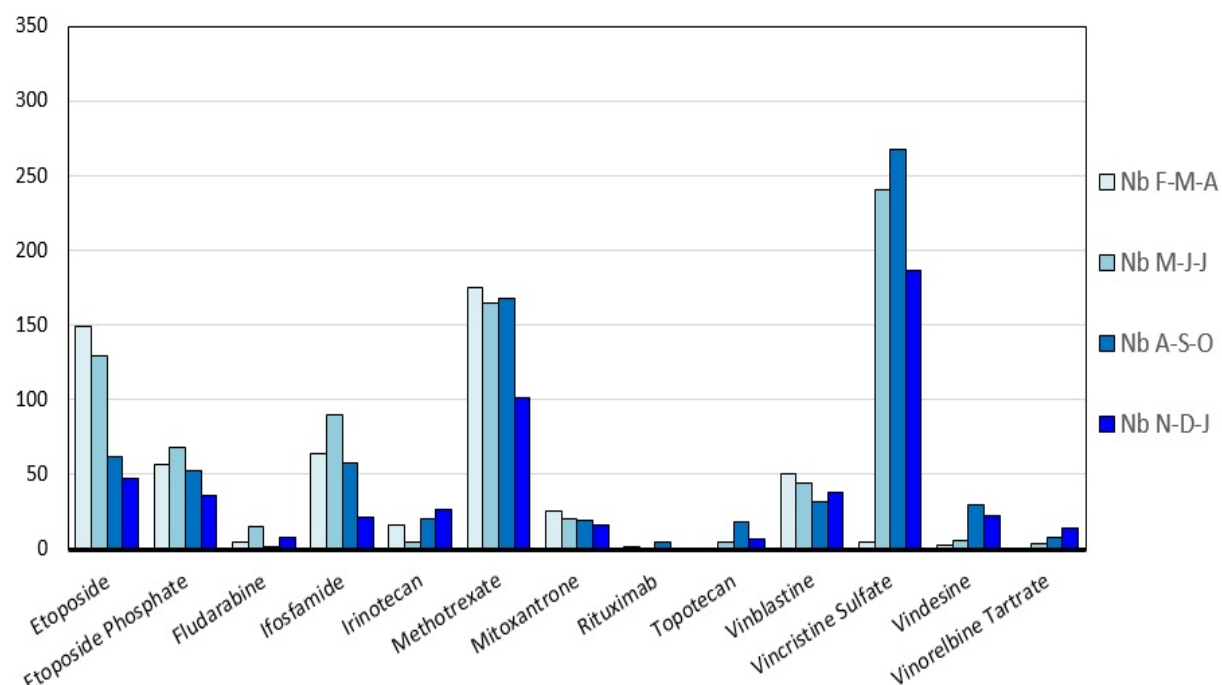
Graphique 8 : Proportion de la production contrôlée analytiquement

La mise en place du contrôle analytique des seringues a permis d'augmenter de manière significative la part de la production contrôlée analytiquement. Ainsi sur la période « février-mars-avril 2014 » 1242 préparations ont été contrôlées représentant 70,5% de la production. Par la suite, avec la mise en place du contrôle des préparations de vinca-alcaloïdes, la part de la production contrôlée analytiquement a été augmentée à 82,3%, 85% et 88,9% respectivement pour les périodes « mai-juillet 2014 », « Aout-septembre 2014 » et « novembre-janvier 2015-2014 ». Les 10% de la production non contrôlés analytiquement correspondent aux préparations en seringues avec un volume final inférieur à 20 mL : actinomycine, méthotrexate (IM et SC), cytarabine en SC, asparaginase en IM, à certaines préparations d'essais clinique, à des médicaments utilisés purs (cladribine, nélarabine) et à certains médicaments coûteux ou rarement utilisés.

La répartition des contrôles en fonction des molécules et des périodes est représentée sur les graphiques 9 et 10. Les molécules les plus contrôlées, et donc fabriquées, sont : l'asparaginase, la cytarabine, l'étoposide (sous forme d'étoposide base), le méthotrexate et la vincristine avec plus de 100 contrôles réalisés par trimestre.



Graphique 9 : Nombre de préparations contrôlées par molécules (1)



Graphique 10 : Nombre de préparations contrôlées par molécules (2)

F-M-A : Février – Mars – Avril 2014

M-J-J : Mai – Juin – Juillet 2014

A-S-O : Aout – Septembre – Octobre 2014

N-D-J : Novembre – Décembre – Janvier 2015

3-2 Taux de conformité

Une préparation est définie comme conforme lorsque :

- ✓ La molécule est identifiée par l'automate avec une certitude supérieure à 94%. En cas de doutes ou de ressemblance inférieure à 94% un double contrôle doit être réalisé.
- ✓ Le bon solvant de dilution est identifié par l'automate.
- ✓ La concentration en principe actif mesurée appartient à la fourchette de $\pm 15\%$ de la concentration théorique de la préparation.
- ✓ Le contrôle visuel de la préparation est conforme : limpidité, couleur, absence de particules, intégrité de l'emballage, étiquetage correct, tubulure purgée et clampée.

3-2-1 Global

Le taux de conformité global correspond au nombre de préparations conformes rapporté au nombre de préparations contrôlées. Il intègre toutes les préparations contrôlées par l'automate QCPrep+ indépendamment du dispositif ou du volume final.

A partir de la mise en place du contrôle des préparations réalisées en seringue, le taux de conformité global, représenté dans les tableaux 14 et 15, est en constante augmentation. Il passe de 85% en février 2014 à 96,7% en décembre 2014 pour un nombre de contrôles constant ou en légère augmentation. On observe une diminution pour le mois de janvier 2015. Cependant la différence observée entre les périodes août-sept-oct-14 et nov-déc-janv-15 n'est pas significative ($p=0,27$).

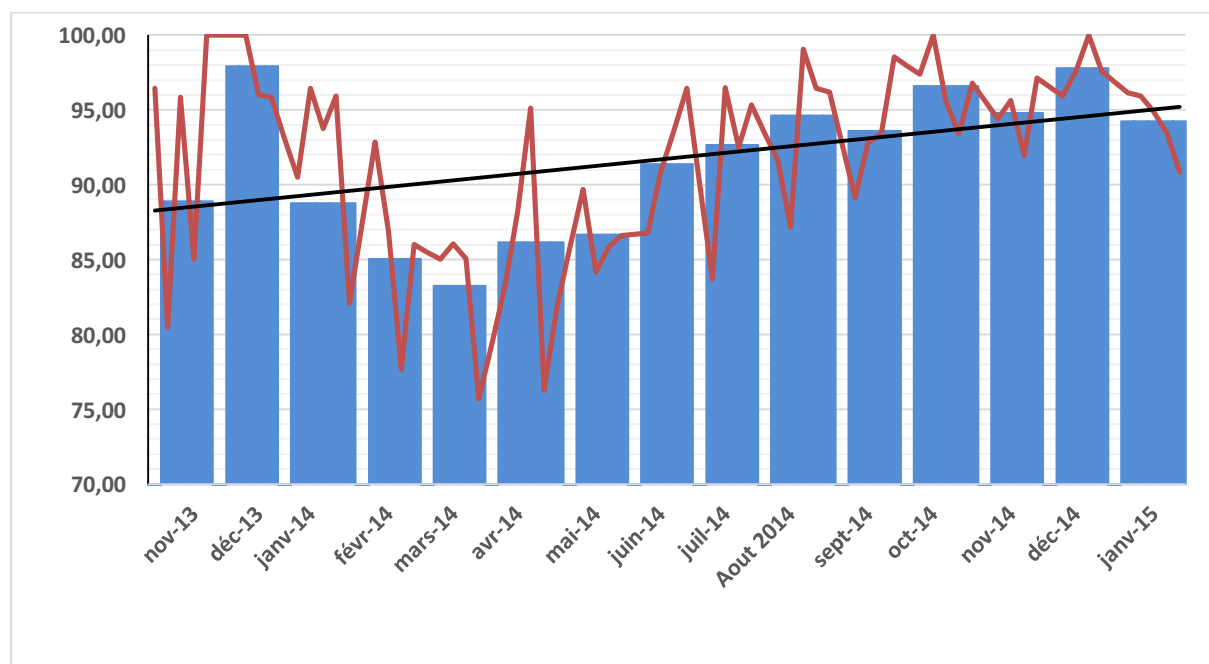
Période	Nombre de préparations contrôlées	Taux conformité
Févr-mars-avr-14	1242	84,9 % (1055)
Mai-juin-juil-14	1347	90,5 % (1219)
Août-sept-oct-14	1367	94,9 % (1297)
Nov-déc-14 Janv-15	1192	93,9% (1119)

Tableau 14 : Taux de conformité global par période

Période	Nombre de préparations contrôlées	Taux conformité
févr-14	381	85,0 % (324)
mars-14	370	83,2 % (308)
avr-14	491	86,1 % (423)
mai-14	382	86,6 % (331)
juin-14	487	91,4 % (445)
juil-14	478	92,7 % (443)
août-14	502	94,6 % (478)
sept-14	454	93,6 % (425)
oct-14	411	96,6 % (397)
Nov-14	329	94,2% (310)
Déc-14	393	96,7% (376)
Janv-15	470	92,1% (433)

Tableau 15 : Taux de conformité global mensuel

La représentation graphique confirme cette augmentation.



Graphique 11 : Taux de conformité global sur la période mars 2014 – janvier 2015

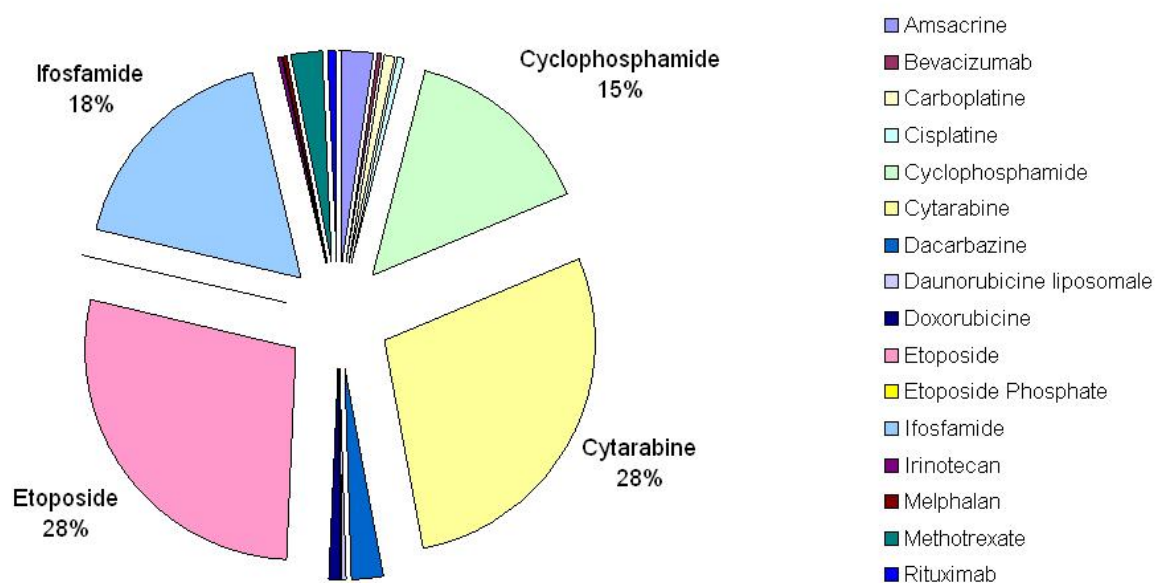
Colonne : taux de conformité par mois

Ligne : taux de conformité par semaine

3-2-2 Par type de préparation

a- Préparations en poche de dilution avec un volume $\geq$ à 50 mL

Les préparations en poche de dilution avec un volume supérieur à 50 mL correspondent essentiellement à 4 molécules : le cyclophosphamide, l'ifosfamide, la cytarabine en protocole « haute dose » et l'étoposide, soit 89% des préparations réalisées en poches avec un volume supérieur à 50 mL. La répartition des molécules est représentée en graphique 12.



Graphique 12 : Répartition des préparations en poche de dilution avec un volume final > 50mL

La réalisation de ces préparations en poche est essentiellement due à des contraintes physico-chimiques (stabilité) ou de doses. L'étoposide possède un domaine de stabilité compris entre 0,2 et 0,4 mg/mL, difficilement compatible avec les volumes des seringues, malgré les doses pédiatriques. L'ifosfamide est essentiellement utilisé dans les protocoles OS 2006 et EURO EWING. La posologie de 3g/m² rend difficile la réalisation de ces préparations en seringue. De plus ces molécules nécessitent une hydratation importante expliquant, en partie, leur dilution dans un volume important de solvant.

Dès l'acquisition de l'automate, les préparations réalisées en poche de dilution, avec un grand volume, ont été contrôlées analytiquement. Leur volume important n'entraîne pas de contraintes sur le pourcentage de dose dédié au contrôle. Cependant, malgré ces grands volumes et la relative facilitée à homogénéiser ces préparations, le taux de conformité au premier prélèvement est moins bon que celui des préparations réalisées en seringue, mais il se normalise au second prélèvement. En effet, sur la période de mai à juillet 2014, les taux de conformité au premier prélèvement étaient de 81,5% vs. 93,4% pour les préparations réalisées en seringue ($p<0,001$) et 91% vs. 93,4% au second prélèvement ($p=0,18$). L'amélioration du taux de conformité dès le premier prélèvement s'observe à partir du mois de mai 2014 et est significative à partir du mois d'août 2014 (96,6% vs. 81,5% $p<0.001$).

	Global	Fév. – Avril 2014	Mai – Juil. 2014	Aout – Oct. 2014	Nov. – Janv. 2015
Nombre de contrôles	1545	429	421	347	308
Conformité au 1^{er} prélèvement	1375 (89,0%)	326 (76,0%)	343 (81,5%)	335 (96,6%)	278 (90,3%)
Conformité au 2nd prélèvement	1415 (91,6%)	366 (85,3%)	383 (91,0%)	342 (98,6%)	288 (93,5%)

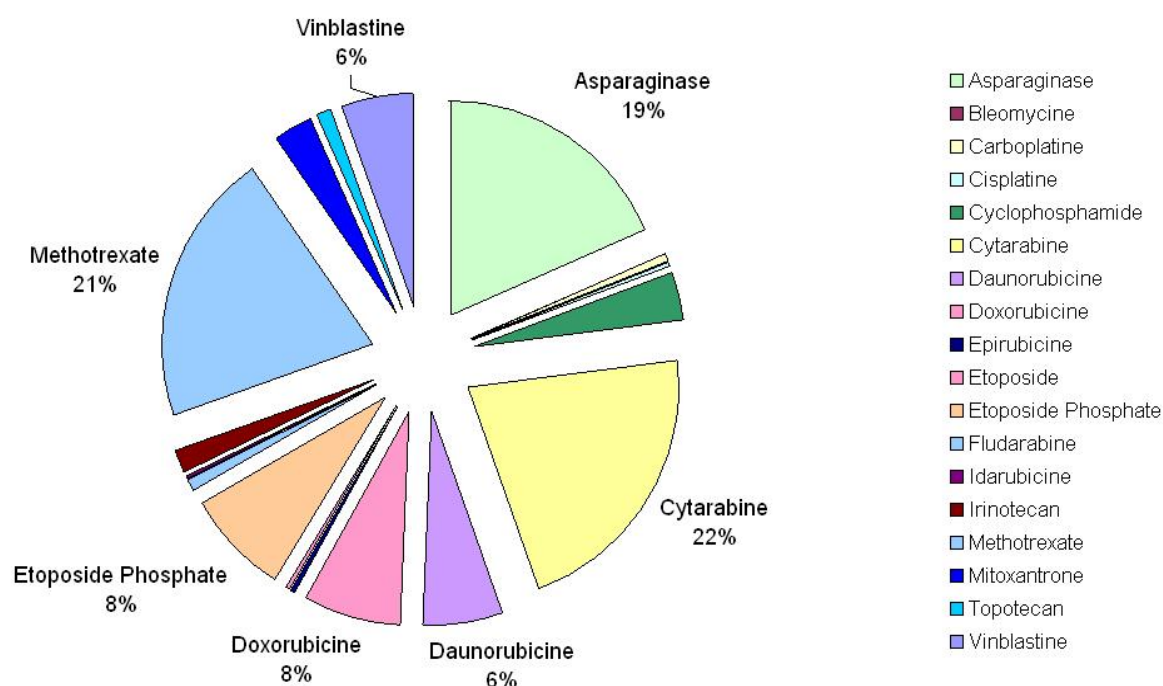
Tableau 16 : Résultat de conformité des préparations réalisées en poche de dilution supérieure à 50 mL

b- Taux de conformité des préparations de faible volume

A la différence des préparations réalisées en poche de dilution avec un volume supérieur à 50 mL, il n'est pas possible de réaliser un second prélèvement de contrôle pour les préparations de faible volume en cas de non-conformité. Par conséquent les résultats présentés correspondent uniquement à ceux des premiers prélèvements.

○ **Préparations réalisées en seringue**

Les 3 molécules les plus utilisées et qui représentent 70% de la production des préparations en seringue sont la cytarabine, le méthotrexate et l'asparaginase. Ensuite viennent l'étoposide phosphate, la doxorubicine, la daunorubicine et la vinblastine représentant respectivement 8%, 6%, 8% et 6% de la production en seringue. Ces 6 molécules représentent alors 90% de la production des préparations en seringue. La répartition est représentée en graphique 13.



Graphique 13 : Répartition des contrôles des préparations réalisées en seringue

Les premières préparations contrôlées, en janvier 2014, ainsi que celles sur la période « février-mars-avril » obtiennent un taux de conformité de l'ordre de 85% (86,3% pour les 134 premiers contrôles à la fin du mois de janvier 2014 et 85,2% sur les 3 mois suivants). Le taux de conformité s'est lentement amélioré et a dépassé les 90% en mai 2014 puis les 95% en juillet 2014. La diminution du taux de conformité sur la période novembre-janvier 2015 suit la tendance du taux de conformité global et des autres préparations.

	Jan	Fév.	Mars	Avril	Mai	Juin	Juillet	Aout-Oct. 14	Nov. 14 Jan 15
Nombre de préparations	139	230	239	333	210	224	243	715	621
Conformes	120 86,3%	192 83,4%	201 84,1%	290 87,1%	191 90,9%	210 93,8%	231 95,1%	694 97,0%	588 94,7%
Nombre de préparations	139	802			677			715	621
Conformes	120 86,3%	683 85,2%			632 93,3%			694 97,0%	588 94,7%

Tableau 17 : Résultat de conformité des préparations réalisées en seringue

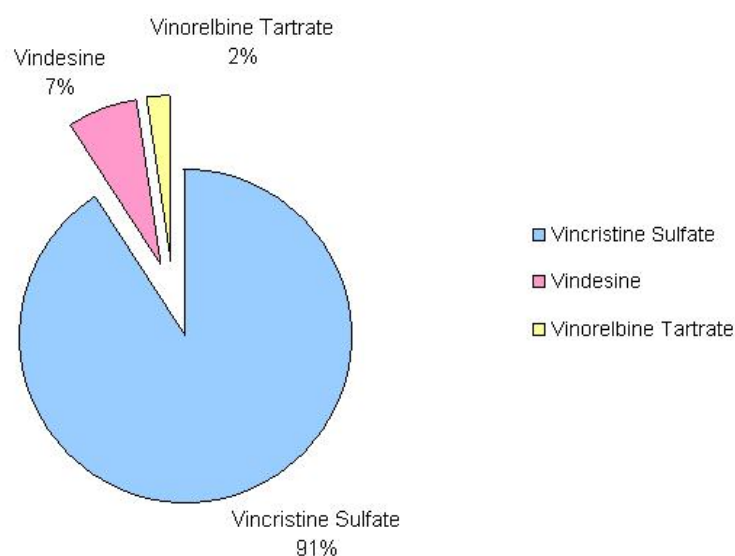
Les résultats des taux de conformité entre les préparations réalisées en seringue et en poche de dilution, avec un volume supérieur à 50mL, ont été comparés (tableau 18) et ne montrent pas de différences significatives.

	Fév. Avril 14	Mi-Juil. 14	Aout-Oct. 14	Nov. – Janv. 15
Conformité poches	85,3%	91,0%	98,6%	93,5%
Conformité seringue	85,2%	93,3%	97,0%	94,7%
<i>p value</i>	0,90	0,16	0,16	0,52

Tableau 18 : Comparaison statistique des taux de conformité entre préparations en poche et seringue

○ *Préparations de vinca-alcaloïdes*

Les préparations de vinca-alcaloïdes sont réalisées en poche de dilution avec un volume final de 20 mL pour la vincristine et vindésine et 50 mL pour la vinorelbine. Nous avons rencontré des difficultés lors de la mise en place du contrôle de ces préparations, notamment au niveau de l'homogénéisation. Les préparations de vincristine représentent 91% des préparations de vinca-alcaloïdes réalisées et contrôlées. Les préparations de vindésine et vinorelbine représentent une part beaucoup plus faible avec, respectivement, 7% et 2% des contrôles réalisés (graphique 14).



Graphique 14 : Répartition des contrôles des préparations de vinca-alcaloïdes

Lors de la mise en place du contrôle de ces préparations, en mai 2014, le taux de conformité, était de 73,7% puis a progressivement augmenté pour atteindre 86% au mois d'août puis 91,7% sur la période novembre-janvier 2015 (présenté dans le tableau 19).

	Mai	Juin	Juillet	Aout	Sept	Oct.	Nov. 14 – Janv. 15
Nombre de préparations	49	101	99	115	111	79	265
Conformes	36 (73,7%)	83 (82,2%)	85 (85,8%)	99 (86,1%)	95 (85,6%)	67 (84,8%)	243 (91,7%)
Nombre de préparations	249			305			265
Conformes	204 (81,9%)			261 (85,5%)			243 (91,7%)

Tableau 19: Résultat de conformité des préparations de vinca-alcaloïdes

La comparaison des résultats des taux de conformité entre les préparations de vinca-alcaloïdes et les autres préparations de faible volume est présentée ci-dessous.

	Mi-Juil. 14	Aout-Oct. 14	Nov. – Janv. 15
Conformité seringues	93,4%	97,2%	94,6%
Conformité vinca-alcaloïdes	81,9%	85,5%	91,7%
<i>p value</i>	< 0,001	< 0,001	0,14

Tableau 20 : Comparaison statistique des taux de conformité entre préparations en seringue et préparations de vinca-alcaloïdes

3-2-3 Par molécule

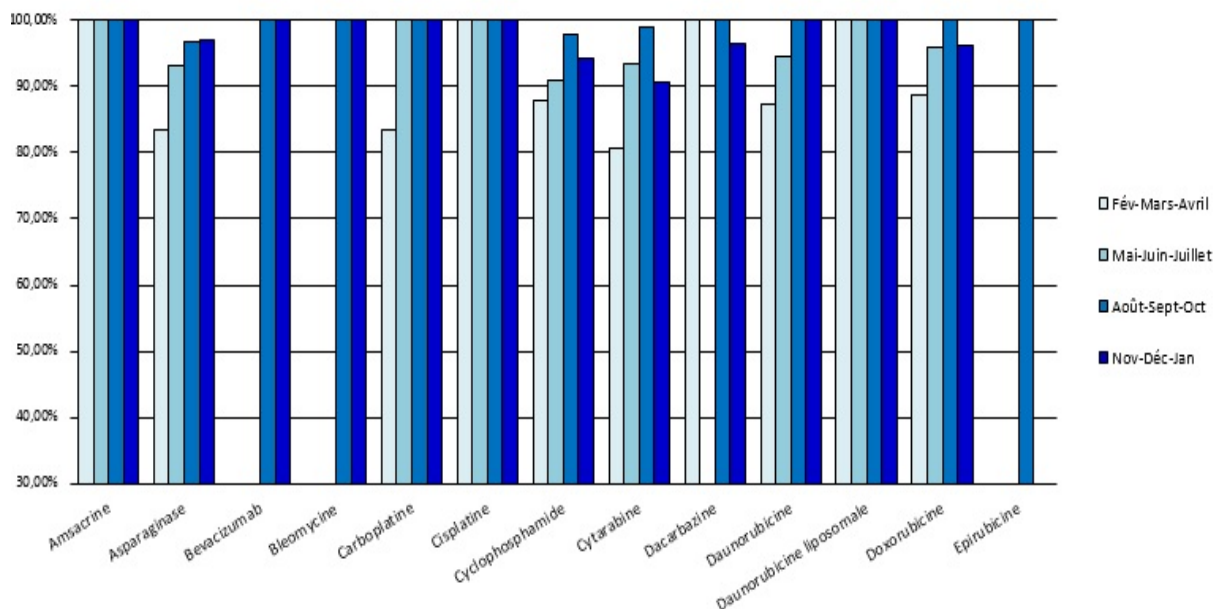
L'analyse des taux de conformité en fonction des molécules permet de mettre en évidence des anomalies et problèmes inhérents à ces dernières.

Sur la période « février-mars-avril », les taux de conformité de 13 molécules étaient inférieurs à 95% : asparaginase, cyclophosphamide, cytarabine, daunorubicine, doxorubicine, étoposide, étoposide phosphate, ifosfamide, irinotecan, méthotrexate, vinblastine, vincristine et vindésine (tableau 21). Les seules molécules répondant à nos objectifs fixés (conformité supérieure à 95%) étaient des molécules moins utilisées (amsacrine, cisplatine, fludarabine, dacarbazine...). Ces résultats se sont améliorés sur les deux périodes suivantes pour la totalité des molécules analysées. Sur la période « août-septembre-octobre », seules 4 molécules conservaient un taux encore en dessous de nos objectifs. Il s'agissait de l'étoposide phosphate, la vincristine, vindésine et vinblastine. Les moins bons résultats de la période novembre-janvier 2015, déjà évoqués auparavant, concernaient essentiellement une diminution significative du taux de conformité de la cytarabine 90,64% vs. 99,10% ($p<0,001$) et de l'étoposide 91,23% vs. 98,40% ($p<0,1$).

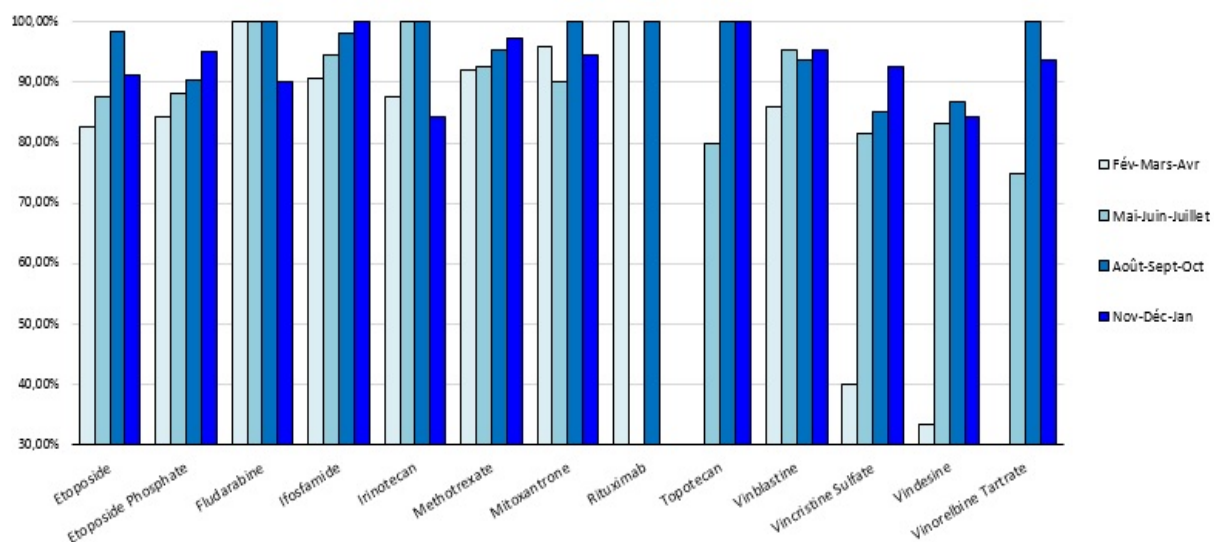
	Février-Mars-Avril		Mai-Juin-Juillet		Août-Sept-Oct		N-D-J	
	Taux conformité	nombre de préparations	Taux conformité	nombre de préparations	Taux conformité	nombre de préparations	Taux conformité	nombre de préparations
Amsacrine	100,0%	6	100,0%	9	100,0%	12	100,00%	4
Asparaginase	83,3%	126	93,2%	117	96,8%	155	96,91%	152
Bevacizumab	/	/	/	/	100,0%	6	100,00%	4
Bleomycine	/	/	/	/	100,0%	2	100,00%	1
Carboplatine	83,3%	6	100,0%	9	100,0%	9	100,00%	15
Cisplatine	100,0%	5	100,0%	1	100,0%	3	100,00%	10
Cyclophosphamide	87,9%	91	90,9%	66	97,8%	90	94,23%	46
Cytarabine	80,6%	346	93,4%	243	99,1%	214	90,64%	167
Dacarbazine	100,0%	4	/		100,0%	27	96,43%	26
Daunorubicine	87,3%	55	94,4%	36	100,0%	41	100,00%	52
Daunorubicine liposomale	100,0%	2	100,0%	2	100,0%	1	100,00%	2
Doxorubicine	88,6%	44	95,8%	72	100,0%	62	96,23%	49
Epirubicine	/	/	/		100,0%	4	/	/
Etoposide	82,6%	149	87,6%	129	98,4%	62	91,23%	47
Etoposide Phosphate	84,2%	57	88,2%	68	90,4%	52	95,00%	36
Fludarabine	100,0%	5	100,0%	15	100,0%	2	90,00%	8
Ifosfamide	90,6%	64	94,4%	90	98,3%	58	100,00%	21
Irinotecan	87,5%	16	100,0%	5	100,0%	20	84,21%	27
Méthotrexate	92,0%	175	92,7%	165	95,2%	168	97,20%	101
Mitoxantrone	96,0%	25	90,0%	20	100,0%	19	94,44%	16
Rituximab	100,0%	2	/		100,0%	5	/	/
Topotecan	/	/	80,0%	5	100,0%	18	100,00%	7
Vinblastine	86,0%	50	95,5%	44	93,8%	32	95,24%	38
Vincristine Sulfate	40,0%	5	81,7%	240	85,0%	267	92,63%	186
Vindésine	33,3%	3	83,3%	6	86,7%	30	84,38%	23
Vinorelbine Tartrate	/	/	75,0%	4	100,0%	8	93,75%	14

Tableau 21 : Taux de conformité détaillé par molécule et par période

L'évolution des taux de conformité par molécules et par période est représentée en graphiques 15 et 16.



Graphique 15 : Taux de conformités représentés par molécules et par périodes (1)



Graphique 16 : Taux de conformités représentés par molécules et par périodes (2)

3-2-4 Par préparateur

La traçabilité de l'identité des manipulateurs a été mise en place en mai 2014. Lors du contrôle de la préparation par le pharmacien, le nom du manipulateur peut être renseigné dans le fichier Excel de validation de l'automate QCPrep+.

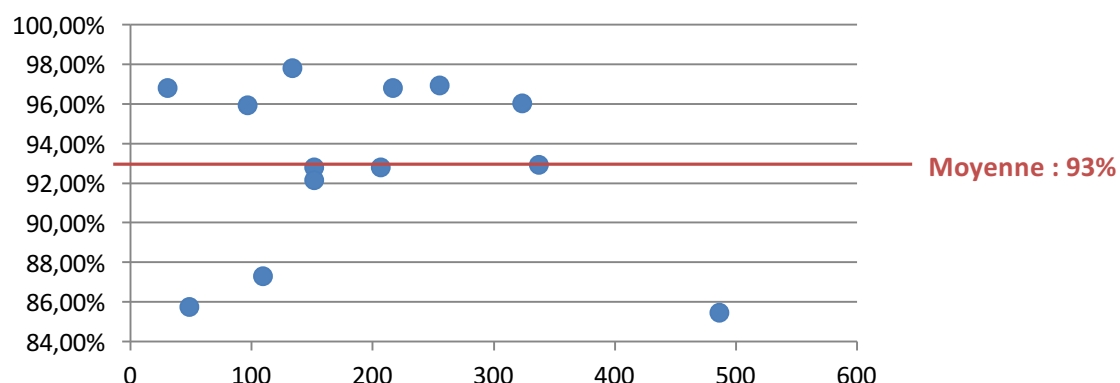
Les résultats, présentés dans le tableau 22, montrent que le nombre de préparations réalisées et les taux de conformité sont très disparates pour chaque préparateur.

Préparateur	Février -> Octobre 2014		Aout - Septembre - Octobre		Novembre-décembre-Jan	
	Nombre de préparations	Conformité	Nombre de préparations	Conformité	Nombre de préparations	Conformité
1	338	92,9%	164	93,3%	184	98,9%
2	207	92,8%	98	96,9%	127	94,5%
3	49	85,7%	49	85,7%	36	83,3%
4	487	85,4%	222	91,9%	185	94,1%
5	152	92,8%	38	89,5%	-	-
6	217	96,8%	141	98,6%	11	100,0%
7	134	97,8%	126	97,6%	139	94,2%
8	31	96,8%	5	100,0%	29	93,1%
9	110	87,3%	94	89,4%	106	91,5%
10	152	92,1%	-	-	73	93,2%
11	256	96,9%	154	97,4%	74	98,6%
12	324	96,0%	230	97,0%	119	91,6%
13	97	95,9%	41	100,0%	-	-
14*	-	-	-	-	89	88,8%

Tableau 22 : Résultats de conformité en fonction des manipulateurs

En rouge, sont présentés les résultats inférieurs à 90% de conformité. En vert, les taux de conformité ayant augmenté de manière significative comparativement à la période précédente (risque $\alpha=5\%$) et en orange ceux ayant significativement diminués. Ainsi, le nombre de préparations réalisées par le préparateur 4, pendant la période de février à octobre, est de 487 soit 54 préparations par mois lorsque le nombre de préparations est de 31 pour le préparateur 8. Au niveau des taux de conformité, sur la période de février à octobre 2014, 3 préparateurs présentaient des taux significativement moins bons que le reste de l'équipe et inférieurs à 90%.

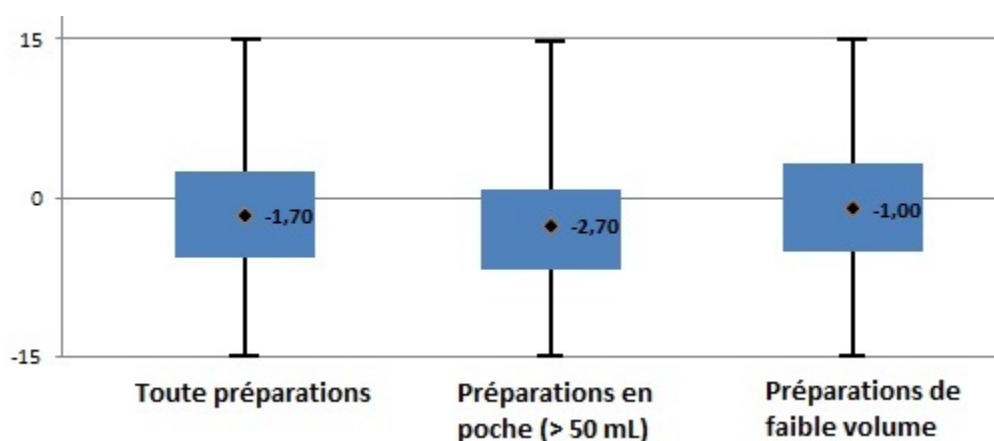
Le graphique 17 représente le taux de conformité en fonction du nombre de préparations réalisées. Il ne permet pas de mettre en évidence un éventuel lien entre activité et efficacité.



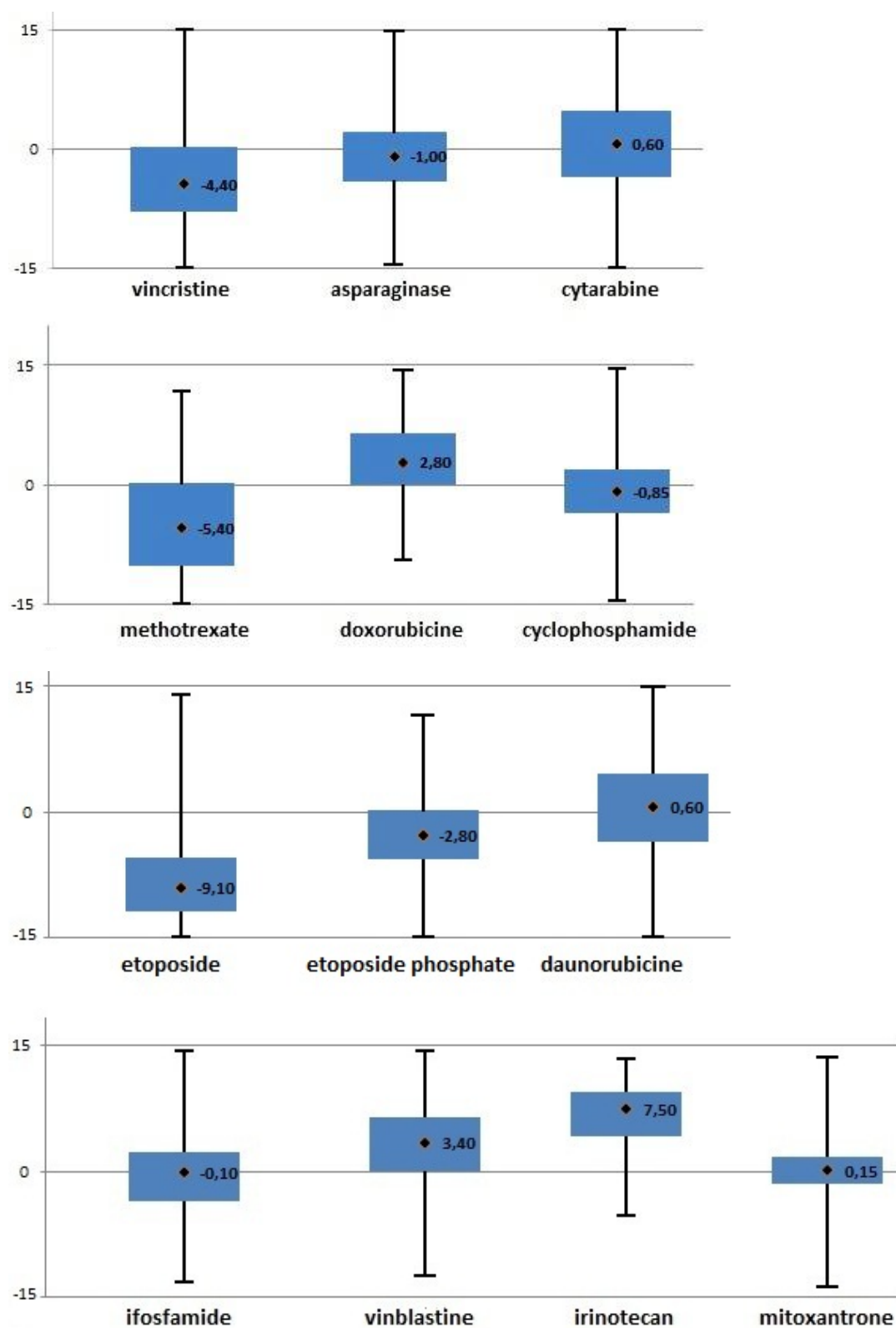
Graphique 17 : Taux de conformité en fonction du nombre de préparations réalisées

3-3 Répartition des taux de conformité

Les répartitions par « type de préparation » et « par molécules » des taux de conformités des préparations conformes sont représentées, respectivement, en graphique 18 et 19 en utilisant la représentation en « box-plot ». Les segments correspondent à l'étendu des résultats avec les maximums et minimums. La boîte regroupe le 1^{er} et 3^{em} quartile soit 50% des résultats. Le point à l'intérieur de la boîte correspond à la médiane.



Graphique 18 : Répartition des taux de conformité par type de préparations



Graphique 19 : Répartition des taux de conformité par molécule

Les résultats de conformité toutes préparations confondues ont tendance à se répartir entre -5% et +2% (graphique 18). Ainsi 50% des contrôles conformes réalisés durant l'année 2014 se trouvent dans la fourchette [-5,7% ; +2,0%]. En ce qui concerne les résultats des préparations en poches de dilution avec un volume supérieur à 50 mL, 50% se trouvent entre [-6,0% ; +0,8%] et entre [-5,1% ; +3,3%] pour les préparations de faible volume.

La répartition des résultats des taux de conformité montre différents profils en fonction des molécules. Les résultats des contrôles des préparations de mitoxantrone se répartissent autour de 0,15% et 50% se retrouvent dans la fourchette [-1,6% ; +1,6%]. Les taux de conformité des préparations d'ifosfamide, daunorubicine, cyclophosphamide, cytarabine et asparaginase se répartissent entre -5,0% et 0% avec une médiane proche de 0%. Les taux de conformité des préparations de vincristine, méthotrexate et étoposide phosphate se répartissent entre -10% et 0% avec une médiane proche de -5,0%. A l'inverse, les résultats de la doxorubicine et vinblastine se répartissent entre 0% et +10% avec une médiane proche de +5,0%. La répartition des taux de conformités des contrôles des préparations d'irinotecan et d'étoposide sont éloignés de 0% avec, respectivement, des médianes de 7,5% et -9,1% et des fourchettes de [+5,4% ; +9,5%] et [-11,9% ; -6,3%].

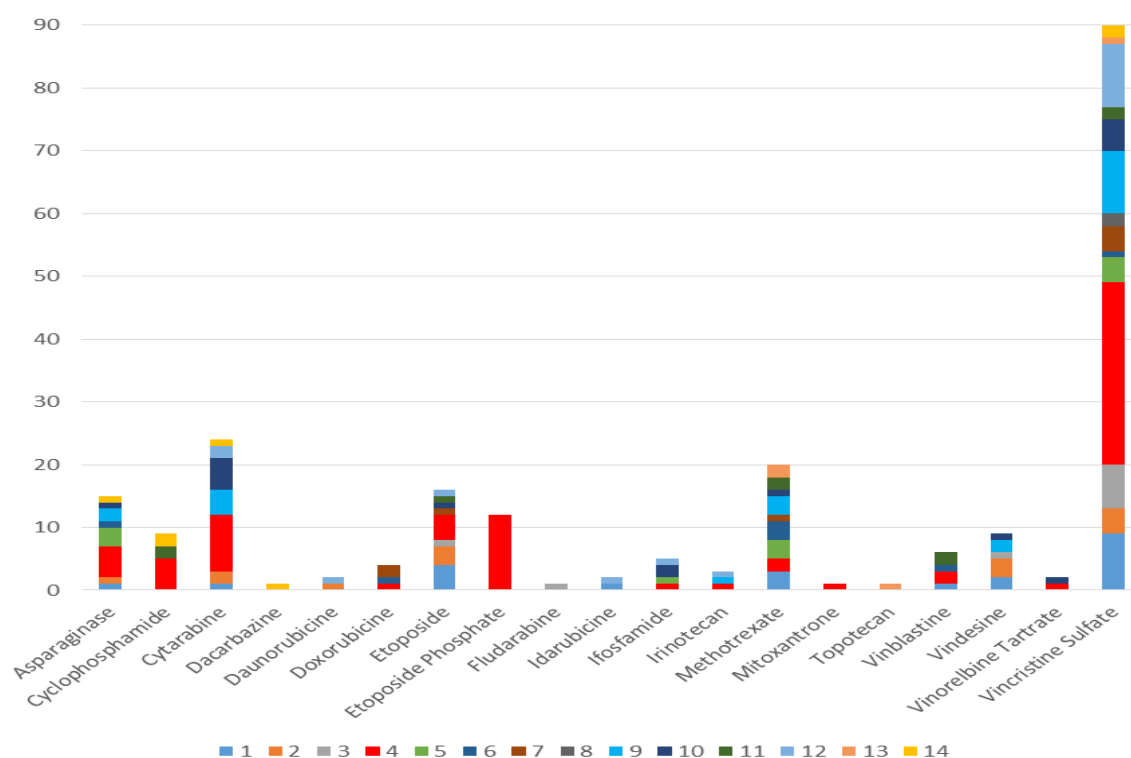
3-4 Non-conformités

Les résultats des non-conformités, présentés dans le tableau 23, montrent que la majorité des non-conformités n'ont pu être identifiées (309/404) sur la période de février à octobre 2014, soit 76,4%. Les principales non-conformités sont de type « défaut d'analyse », « homogénéisation » et « préparation ».

	Préparations en poches volume > 50 mL	Préparations de faible volume	Total
Défaut d'analyse	8 (7,2%)	27 (9,2%)	35 (8,7%)
Protocole	5 (4,6%)	4 (1,5%)	9 (2,3%)
Homogénéisation	11 (9,9%)	10 (3,4%)	21 (5,2%)
Préparation	7 (6,3%)	16 (5,5%)	23 (5,7%)
Gamme	1 (0,9%)	6 (2%)	7 (1,7%)
Non identifié	80 (71,1%)	229 (78,4%)	309 (76,4%)
Total	112	292	404

Tableau 23 : Répartition des non-conformités

Le graphique 20 présente la répartition des non-conformités par molécule en fonction des préparateurs (sur la période mai à octobre 2014).



Graphique 20 : Répartition des non-conformités en fonction des molécules et des préparateurs

4- Discussion

L'adaptation des protocoles de contrôle s'est déroulée sur une période de plusieurs mois, de décembre 2013 à juin 2014. Les premiers tests de diminution des volumes de prélèvement ont été réalisés sur la période de décembre 2013 et janvier 2014. Dans un premier temps et en regard de notre production, constituée de 45% de préparations en seringues, nous avons fait le choix de développer le contrôle analytique de ces préparations. Le protocole a été mis en place à la fin du mois de janvier 2014. Le contrôle des préparations de vinca-alcaloïdes, représentant 20% de notre production, a été mis en place à partir de la fin du mois de mai 2014, période à partir de laquelle les procédures de prélèvement et les résultats des contrôles des préparations en seringues étaient satisfaisants.

La part de notre production contrôlée analytiquement, 85% en aout 2014 puis 90% sur la période de novembre à janvier 2015, est importante et est le reflet des efforts engagés pour améliorer la qualité et la sécurité de notre process de fabrication. La grande majorité des contrôles est réalisée sur un petit nombre de molécules qui représentent la plus grande partie de notre production. Les préparations restantes non contrôlées analytiquement (préparations avec un volume final inférieur à 20 mL, préparations de principes actifs non dilués ou rarement utilisés), le sont par contraintes organisationnelles ou techniques. En effet, malgré les adaptations mises en place, il est très difficile de réaliser un contrôle analytique des préparations de très faible volume, soit d'un volume inférieur à 20 mL. L'utilisation de méthodes non destructives, comme la spectrométrie Raman utilisée directement sur la préparation finale sans réaliser de prélèvement, pourraient être des pistes à envisager [45] ainsi que le contrôle par système vidéo.

4-1 Discussion sur les résultats de conformité

▪ Objectif

Le développement de la démarche qualité au sein des structures hospitalière a permis de développer une culture de relevé et d'analyse des non-conformités. Si la littérature, sur les erreurs de fabrication au sein des unités centralisées, reste assez pauvre, plusieurs études ont montré une diminution des erreurs de manipulation et de préparation [75]–[77] comparativement à la reconstitution au sein des unités de soins. En ce qui concerne les erreurs

propre aux unités de préparation, il convient de distinguer les études utilisant comme méthodologie le contrôle visuel ou gravimétrique des études utilisant un contrôle analytique. Il est intéressant aussi de relever que les taux de non-conformités varient entre elles. Ainsi dans les années 2000, le taux de non-conformité était de 9% dont 2% d'erreurs critiques pour Flynn *et al.* [78], 2% pour Escoms *et al.* [79] ou encore 0,45% pour Limat *et al.* [80]. Il en est de même pour les non-conformités analysées par des techniques analytiques : en 2005 Feyel *et al.* obtenaient un taux de 4,2% à l'Hôpital Européen George Pompidou [81], en 2012 le taux était de 0,88% dont 50% de non-conformités d'homogénéisation et avec 0,27% de non-conformités critiques [82]. Ces quelques résultats montrent que le taux évalué par une technique analytique reste inférieur à 5% avec des variations allant de 0,5% à 4,8% [83]–[85]. Ainsi, notre objectif était d'obtenir un taux de conformité global supérieur à 95%. Il a été atteint en août 2014 soit 7 mois après la mise en place du contrôle analytique.

▪ Analyse des résultats

L'analyse des résultats de conformité permet de mettre en évidence une amélioration significative, sur la période d'étude, du taux de conformité global et ceux des différents types de préparations. Ainsi, celui des préparations réalisées en poche, avec un volume supérieur à 50 mL, est passé de 85,3% en février 2014 à 98,6% en Août 2014 ; de 83% à 97% sur la même période pour les préparations réalisées en seringue et de 73,7% à 91,7% pour les préparations de vinca-alcaloïdes. Il n'existe pas de différences significatives entre les taux de conformité des préparations réalisées en poche, avec un volume final supérieur à 50 mL, et celles réalisées en seringues. Ce résultat confirme que notre méthode de dosage des préparations de faibles volumes ne souffre pas de biais analytiques.

Ces améliorations ont été plus ou moins longues à obtenir en fonction du type de préparation. Par exemple, il a fallu 7 mois pour obtenir un taux de conformité supérieur à 90% pour les préparations de vinca-alcaloïdes contre 4 mois pour les préparations réalisées en seringue. Les améliorations s'expliquent par le travail de fond réalisé sur les procédures de prélèvement et d'homogénéisation. Le temps nécessaire à atteindre nos objectifs de conformité s'explique, en grande partie, par l'organisation de la PUI. Les PPH ne sont pas affectés à une mission spécifique mais réalisent des rotations de poste de manière hebdomadaire. A l'exception de quelques personnes, ils sont tous formés à la manipulation et réalisation des préparations de cytotoxiques. De plus, l'activité de l'unité nécessite uniquement 2 préparateurs par semaine. Ainsi et en fonction des plannings, un PPH manipule

au sein de l'unité une semaine toutes les 5 semaines avec un écart type allant de 1 semaine toutes les 2 semaines pour certains et jusqu'à 1 semaine toutes les 8 semaines pour d'autres. En conséquence, l'obtention des connaissances et compétences sur de nouvelles procédures nécessite une durée plus importante que pour une unité disposant de préparateurs dédiés, manipulant quotidiennement et avec une production plus importante. Malgré un maintien sur les 2 mois suivants et au cours du mois de décembre 2014, l'obtention d'un taux de conformité supérieur à 95% n'est jamais définitivement acquis et nécessite des efforts constants.

Néanmoins, il perdure des problèmes et des limites de notre méthode, révélés par ces résultats de conformité. Ainsi, en cas de non-conformité d'une préparation de grand volume, il est possible de réaliser un second prélèvement de contrôle, sans grande incidence sur la dose finale administrée au patient. Ce second prélèvement n'est pas possible pour les préparations de faible volume qui sont alors détruites et refabriquées. En matière d'organisation, la conservation des préparations de grand volume en quarantaine au sein de l'isolateur est compliquée, notamment au niveau du stockage et de la gestion de l'espace. Le stockage au sein des isolateurs a été conseillé après la mise en évidence de la capacité de l'acide péracétique, utilisé comme agent stérilisant, à pénétrer au travers des poches de dilutions [86], [87]. Cependant, d'autres auteurs ont montré qu'après 3 cycles de stérilisation, les poches de dilutions, protégées par un suremballage, sont imperméables aux agents stérilisants [88]. Ainsi la restérilisation d'une poche non conforme nécessitant un nouveau prélèvement est possible, permettant alors un stockage en dehors de l'isolateur.

La bonne homogénéisation des préparations est une condition sinéquanone à la réalisation d'un contrôle par échantillonnage : le prélèvement réalisé doit-être représentatif de la préparation à contrôler. Comme évoqué précédemment, la mauvaise homogénéisation des préparations est l'une des principales causes de non-conformité et un travail important a été développé sur ce sujet. Dans la pratique elle se traduit par une non-conformité sur les résultats de calcul de la concentration qui se normalisent après nouvelle homogénéisation et reprélèvement de la préparation. Nous avons réalisé des simulations à l'aide de bleu de méthylène afin de comprendre le comportement des solutions de vinca-alcaloïde lors de la préparation et améliorer nos procédures. Deux simulations ont été réalisées en administrant, via la tubulure, 0,5 mL et 1 mL de bleu de méthylène dans 19,5 mL et 19 mL de NaCl 0,9% (annexes 1 et 2). L'homogénéisation de la préparation était appréciée visuellement après réalisation de différentes techniques : « aller-retour » avec une seringue de 1 mL et

retournement de la préparation. Une gamme de quantification du bleu de méthylène a été réalisée sur l'automate QCPrep+. Au niveau du site d'injection de la tubulure, des prélèvements de 1 mL ont été réalisés afin de mesurer la concentration en bleu de méthylène. Initialement, l'air des poches de dilution était purgé. Cette purge rendait l'homogénéisation beaucoup plus difficile. L'utilisation d'une seringue de 1 mL (utilisée pour le prélèvement de l'échantillon) n'était alors pas suffisante, des retournements de la poche étaient nécessaires. L'homogénéisation de la tubulure a pu être évaluée de manière visuelle et quantitative. Ainsi il a été démontré que, malgré les retournements de la préparation, l'absence de vidange de la tubulure avant prélèvement de l'échantillon entraînait une augmentation de la concentration en bleu de méthylène de 44%. Ces simulations nous ont permis de modifier nos protocoles d'homogénéisation des préparations de vinca-alkaloïdes réalisées en poches de dilution avec un volume final de 20 mL. Par extension et afin de standardiser nos pratiques, cette procédure s'applique à toutes les préparations. Ainsi le cycle d'homogénéisation est le suivant :

- **5 « allers-retours »** avec une seringue n'ayant pas servi à l'injection du principe actif.
- **5 retournements lents** de la préparation.
- **5 « allers-retours ».**

De manière générale, la formation des préparateurs sur les procédures d'homogénéisation est indispensable. Nous nous sommes rendu compte qu'il n'y avait pas de pratique commune et que chaque préparateur homogénéisait selon la technique qui lui semblait la meilleure. La mise en place d'une procédure et de formations nous a permis d'améliorer de manière significative nos non-conformités d'homogénéisation, notamment sur les préparations d'étoposide. Ces dernières se sont traduites par une formation pratique rappelant les intérêts de l'homogénéisation ainsi que la présentation des études de simulation avec le bleu de méthylène. Un accompagnement des préparateurs présentant les moins bons taux de conformité a été réalisé pendant les périodes de production, l'interne ou le pharmacien était présent dans l'unité de production et s'assurait, avec le préparateur, de la bonne réalisation des étapes d'homogénéisation et de prélèvement. Enfin, des affiches rappelant les différentes étapes ont été disposées à différents emplacements de l'unité (annexe 3 et 4).

L'analyse plus fine des résultats de conformité permet de mettre en évidence des disparités entre les molécules analysées ainsi qu'entre les manipulateurs.

On observe ainsi, pour l'évolution des taux de conformité par molécule et par période (graphique 15 et 16), des améliorations importantes des taux de conformités pour des molécules comme l'étoposide, 82,6% vs. 98,4% ($p=0,0017$), et l'asparaginase, 83,3% à 96,9% ($p<0,001$). Ces améliorations sont en lien avec le travail réalisé sur l'homogénéisation, notamment pour l'étoposide qui est une molécule très visqueuse. On observe aussi la diminution générale des taux de conformité de nombreuses molécules entre les périodes août à octobre 2014 et novembre à janvier 2015. Cette diminution s'observe pour les préparations de cyclophosphamide, de cytarabine, de doxorubicine, d'étoposide, d'irinotecan, de méthotrexate, de vinorelbine et de vindésine. L'étoposide phosphate, à la différence de l'étoposide, ne présente pas de difficultés d'homogénéisation et est préparé en seringue de 20 mL. Cependant son taux de conformité encore bas semble s'expliquer par un facteur humain. La répartition des non-conformités en fonction des manipulateurs (graphique 20) montre la présence et la proportion des non-conformités du préparateur 4 pour la majorité des molécules. Pour l'étoposide phosphate, 100% des non-conformités sont réalisées par ce préparateur, 35% pour la vincristine et la cytarabine, 40% pour l'étoposide, 45% pour l'asparaginase et 71% pour le cyclophosphamide. Ces résultats permettent, en effet, d'orienter l'origine des non-conformités vers un aspect humain plutôt qu'une origine analytique ou fonctionnelle. Après entretien et recherche des causes auprès du préparateur concerné, il s'avère que les non-conformités seraient en grande partie dues à une manipulation et préparation trop rapide entraînant un défaut d'homogénéisation. Seules les non-conformités observées pour les préparations de méthotrexate semblent se répartir de manière homogène entre tous les préparateurs. Ce résultat nécessite une recherche des causes pouvant alors se porter sur une origine analytique, matérielle ou protocolaire

La répartition des taux de conformité en fonction du nombre de préparations réalisées par préparateur ne montre pas de lien entre activité et conformité. Les deux préparateurs réalisant le plus et le moins de préparations possèdent les moins bons taux de conformité (graphique 17). Cependant, un taux de conformité supérieur à 96% est observé pour un préparateur ayant réalisé moins de 50 préparations. La majorité des préparateurs possèdent un taux de conformité supérieur à 92%. Ces résultats ne semblent pas mettre en cause l'organisation de la PUI et la rotation des PPH dans les résultats de conformité. Néanmoins, pour 2 préparateurs ayant réalisés moins de 100 préparations sur la période et possédant un taux de conformité

inférieur à 88%, il est possible d'envisager qu'une augmentation de leur activité pourrait améliorer leurs taux de conformité.

La diminution des taux, observée sur les mois de novembre et janvier 2015, semble s'expliquer par une baisse générale. Pour 5 préparateurs il existe une diminution du taux de conformité, bien qu'elle ne soit significative que dans un cas. Nous avons accueilli une nouvelle préparatrice (n°14) à partir du mois de janvier 2015. Ses résultats de conformité se traduisent par un taux inférieur à notre objectif premier participant alors à la diminution des résultats pour cette période. Néanmoins les non-conformités relevées pour cette préparatrice sont à imputer à l'acquisition des procédures et protocoles. Il sera intéressant d'observer les résultats dans les mois à venir.

4-2 Discussion sur la répartition des taux de conformité

La répartition idéale des taux de conformité doit avoir une médiane le plus proche de 0% et une boîte la plus étroite possible correspondant à une concentration de 50% des résultats dans un intervalle réduit. Les résultats de conformité de la mitoxantrone correspondent à ce profil. La majorité des contrôles réalisés se situent dans une fourchette négative, entre -5,7% et +2,0% avec une médiane de -1,7%. Ce profil est plus représentatif des préparations de grand volume, avec une médiane à -2,7% et les intervalles de la boîte compris entre -6,0% et 0,8%, que des préparations de faible volume, plus centrés autour de 0%. Ces résultats montrent que la majorité des préparations réalisées sont sous dosées.

Des résultats par molécules se détachent 3 profils de répartition :

- Centrés sur 0% avec une amplitude de répartition de la boîte plus ou moins grande. On retrouve l'asparaginase, la cytarabine, le cyclophosphamide, la daunorubicine, l'ifosfamide et la mitoxantrone.
- Répartis majoritairement en dessous de 0%. On retrouve la vincristine, le méthotrexate et l'étoposide.
- Répartis majoritairement au-dessus de 0% : doxorubicine, vinblastine et irinotecan.

Pour l'étoposide et l'irinotecan, à la différence des autres molécules où la fourchette de répartition de la majorité des résultats englobe 0%, la majorité des résultats se répartissent dans une zone éloignée de 0%. L'amplitude des résultats, maximums et minimums, sont pour la quasi-totalité des molécules de -15% et +15%, ce qui reste logique et cohérent. Cependant, celles ayant leurs résultats de conformités se répartissant majoritairement au-dessus de 0% (doxorubicine, vinblastine et irinotecan) possèdent des minimums moins importants : -9,40% pour la doxorubicine, -12,50% pour la vinblastine et -4,10% pour l'irinotecan.

La répartition des résultats de conformité très décentrés de 0% ou avec une amplitude de la boîte importante peuvent être la résultante des différentes difficultés analytiques ou de manipulation. Ainsi, les résultats des préparations d'étoposide montrent une difficulté à obtenir des résultats proches de 0% ou même 5% et 75% des contrôles réalisés conformes sont compris entre -6,3% et -15%. Ces résultats se retrouvent au niveau de la validation de la gamme d'étalonnage où la précision des contrôles qualités était de l'ordre de -6%. L'origine de ces problèmes est analytique avec une difficulté pour l'automate à offrir une précision inférieure à $\pm 5\%$. Ceci étant peut être en lien avec la viscosité élevée du produit. Pour les préparations de vincristine et méthotrexate, l'amplitude de la boîte est grande et surtout désaxée par rapport à 0%. Ces résultats sont en faveur de difficultés lors de l'homogénéisation et de résultats peu reproductibles.

4-3 Application de la recommandation de la SFPO

La SFPO dans ses recommandations de 2012 [5], indique :

« Recommandation n°20 : En cas de contrôles analytiques, l'écart limite acceptable doit tendre vers plus ou moins 10 % de la quantité théorique. Des alertes doivent être mises en place pour garantir les dérives de méthodes analytiques. »

Cette recommandation fixe le seuil de tolérance acceptable à la limite mathématique de la précision du contrôle. En effet, comme nous l'avons déjà indiqué, le cumul de toutes les erreurs des différentes étapes et appareils de mesures ne permet pas d'obtenir une meilleure précision que $\pm 10\%$. En pratique, nous avons ré-analysés tous les résultats des contrôles de la période « aout-septembre-octobre », pour les préparations de faible volume, en utilisant un seuil de tolérance à $\pm 10\%$, représenté dans le tableau 24.

		$\pm 15\%$	$\pm 10\%$	-10%; +15%
Total	Nombre de contrôles	1367		
	Conforme	1297 (94,9%)	1142 (83,5%)	1202 (87,9%)
Préparations faible volume	Nombre de contrôles	1020		
	Conforme	955 (93,6%)	835 (81,8%)	885 (86,8%)
Préparations faible volume sans vincristine	Nombre de contrôles	753		
	Conforme	728 (96,7%)	669 (88,8%)	708 (94,0%)

Tableau 24 : Comparaison des résultats de conformité avec des seuils de tolérance de $\pm 15\%$ et $\pm 10\%$ sur la période aout-octobre 2014

Ces résultats montrent que l'application de la recommandation de la SFPO a un impact important sur nos résultats de conformité. Le taux de conformité global, toutes préparations confondues passe de 94,9% à 83,5% ($p < 0.0001$). Le seuil de [-10% ; +15%] entraîne une diminution plus modérée du taux de conformité révélant une tendance à avoir plus de résultats dans la fourchette [-15% ; -10%] que [+10% ; +15%] et semblent correspondre essentiellement aux préparations de vincristine et par extension aux vinca-alcaloïdes. Néanmoins, les résultats restent inférieurs à nos objectifs. A titre de comparaison, cette recommandation semble applicable au sein d'unités d'oncologie adulte comme celle de l'hôpital Saint-Louis à Paris [89]. Une réanalyse des taux de conformité effectuée sur l'année 2014 établissait que 1,7% des préparations contrôlées avaient un taux de conformité compris

entre $\pm 10\%$ et $\pm 15\%$ et que l'application de cette recommandation entraînerait une augmentation des non-conformités de 0,9% à 3,0%. La modification de notre seuil de tolérance reste aujourd'hui une question en suspens. Toutefois le respect des recommandations de la SFPO fait partie de nos objectifs mais nécessite un travail important sur nos procédures d'homogénéisation et de formation.

4-4 Non-conformités

4-4-1 Place de l'analyse des non-conformités dans la sécurisation du circuit des chimiothérapies injectables

L'analyse des non-conformités est primordiale dans le processus d'assurance qualité et s'inscrit dans une démarche d'amélioration continue des pratiques. Elle permet de relever et d'identifier les dysfonctionnements, de les comprendre et de mettre en place des mesures permettant de les éviter. La recherche des causes d'une non-conformité doit se faire de manière systématique. Les raisons peuvent-être multiples, conséquences d'anomalies matérielles, de manipulations ou de formation du personnel. Elles peuvent aussi être dues à des dysfonctionnements majeurs des processus de préparation, de contrôle ou à des erreurs ponctuelles normalement évitables (erreur d'inattention, stress, nouvelles procédures, anomalie matérielle nécessitant une maintenance...). Dans tous les cas elles doivent être relevées et analysées.

Nous pouvons distinguer deux grands types de non-conformités :

- les non-conformités portant sur la molécule et son contrôle analytique.
- les non-conformités portant sur un défaut de la préparation hors contrôle : défaut d'étiquetage, purge ou clampage de la tubulure...

Par la suite, les non-conformités doivent-être classées de manière plus fine : étiquetage, homogénéisation, prélèvement, analyse UV, analyse Raman, analyse hors gamme... Leur analyse peut se faire immédiatement après le relevé ou de manière rétrospective. Les avantages d'une analyse immédiate sont de permettre un relevé rapide d'un

dysfonctionnement majeur des processus de préparation ou de contrôle et de disposer de toutes les informations nécessaires à l'analyse (reliquats, souvenirs des préparateurs) ainsi que d'éliminer une éventuelle fausse non-conformité permettant de libérer la préparation au lieu de la détruire. L'inconvénient principal de cette pratique est qu'elle nécessite du temps et peut être parfois incompatible avec l'activité en flux tendu de l'unité. Il est alors possible de réaliser une analyse rétrospective qui a l'avantage de ne pas avoir d'impact sur l'activité de production, mais dont l'inconvénient principal est qu'il est parfois difficile de récupérer toutes les informations nécessaires. Par la suite, une analyse plus approfondie pourra être réalisée en intégrant un calcul d'indice de criticité, mettant en lien le risque de survenu d'une non-conformité et sa sévérité, pour prioriser les actions à mener [82], [90] ou établir une cartographie des risques avec une méthode AMDEC par exemple [91]. Enfin, pour chaque non-conformité analysée et cause relevée, des modifications des procédures et des formations doivent être mise en place afin d'éviter toute nouvelle survenue.

La recherche des causes implique plusieurs niveaux d'enquêtes qui ne sont pas tous réalisés en fonction de la non-conformité, de la préparation ou du temps disponible. L'analyse fait appel au croisement de plusieurs d'informations pour essayer de déterminer s'il s'agit d'une vraie non-conformité et ensuite de lui imputer une cause. Les non-conformités portant sur un défaut des préparations (hors contrôle) sont assez simples à mettre en évidence et de manière générale les conséquences et le niveau de criticité sont assez faibles. De manière non exhaustive on peut relever quelque unes de ces non-conformités :

- Anomalie sur la tubulure : mauvaise purge, absence de clampage
- Anomalie sur le dispositif final : préparation réalisée en seringue à la place d'une poche de dilution.
- Sac d'emballage mal scellé ou troué
- Fuite

A l'exception de certaines non-conformités qui peuvent-être considérées comme « critiques », par exemple une fuite, et entraînant la destruction de la préparation et sa refabrication, la majorité des non-conformités sur les préparations sont corrigées immédiatement et permettent leur libération. Par exemple, une erreur d'étiquetage pourra être corrigée par un réétiquetage, une tubulure pourra être purgée à nouveau ou clampée. Nous

n'avons pas réalisé de relevé exhaustif de ces non-conformités. En cas de survenue trop importante de certaines non-conformités, une sensibilisation auprès des préparateurs est réalisée afin de rappeler les bonnes pratiques et procédures en vigueur au sein de l'unité.

Si les non-conformités portant sur la molécule et son contrôle analytique peuvent-être plus complexes à analyser, elles sont potentiellement source d'anomalies graves. En matière de criticité, les erreurs les plus importantes et qui doivent-être identifiées de manière systématiques sont l'erreur de molécule et l'erreur de dose. Dans une moindre mesure nous retrouvons aussi une erreur sur le volume final de la préparation. C'est notamment pour permettre le relevé de ces erreurs que le contrôle analytique a été mis en place.

Les causes de ces non-conformités peuvent-être multiples :

- **L'erreur vraie** : qui correspond à la préparation de la mauvaise molécule ou d'une mauvaise quantité.
- **L'erreur analytique** : qui correspond à une anomalie lors du processus de contrôle (analyse hors gamme, volume d'échantillon trop faible, interférences...).
- **L'erreur matérielle** : qui correspond à un dysfonctionnement de l'automate (absence de prélèvement, contaminations croisées...).

La possibilité de réaliser un second prélèvement de contrôle, pour les préparations réalisées en poche de dilution avec un grand volume, permet de confirmer ou d'infirmer la première non-conformité analytique relevée. Pour les préparations de faibles volumes (inférieur à 50 mL) l'impossibilité de réaliser un second prélèvement rend l'analyse des non-conformités plus délicates et conduit souvent, faute de preuves suffisantes et par principe de précaution, à détruire la préparation.

En cas de non-conformité portant sur la molécule et son contrôle analytique, afin de déterminer son origine, plusieurs points sont à vérifier :

- **le prélèvement** : vérifier si l'échantillon a été prélevé en totalité. Il peut ne pas être prélevé ou prélevé en partie, ce qui peut aboutir à une analyse réalisée dans de mauvaises conditions avec des résultats aberrants. Une anomalie à ce niveau relève d'un défaut matériel nécessitant une maintenance.

- **les spectres** : la bonne acquisition des spectres Raman et UV doit être vérifiée ainsi que la correspondance faites par le logiciel QCPrep entre le spectre acquis, le spectre de référence et la gamme d'étalonnage utilisée. Dans notre pratique, plusieurs anomalies sur l'acquisition ou le traitement des spectres ont abouti à de fausses non-conformités. Il est possible de forcer l'identification d'une molécule permettant alors de quantifier l'échantillon avec la gamme correspondante. Cette possibilité est à utiliser avec prudence puisqu'elle retire au contrôle analytique sa capacité à identifier la molécule et une potentielle erreur.

- **le caractère organoleptique de la préparation** : La couleur de la préparation est une caractéristique qui peut être facilement contrôlée et qui offre des informations intéressantes sur l'identité d'une molécule. Par exemple, le méthotrexate de couleur jaune orangé et la mitoxantrone de couleur bleue, peuvent facilement être discriminées des autres molécules en cas de doutes sur leur identification. Cependant, les anthracyclines ne peuvent- être discriminées par leur couleur car elles sont toutes de couleur rouge. Ce caractère, bien que non absolu et ne permettant pas à lui seul d'identifier une molécule, offre un faisceau de preuves simple à évaluer.

- **les caractères physicochimiques de la préparation** : ce cas s'est présenté au sein de notre unité et représente une non-conformité de molécule potentiellement grave identifiée au cours de l'année 2014. Une erreur de préparation des paniers et une faute d'inattention des préparateurs a abouti à la réalisation d'une préparation d'étoposide à la place de cytarabine. L'erreur, identifiée par le contrôle analytique, a pu être confirmée par la présence de mousse au niveau de la préparation, propriété non spécifique de l'étoposide mais qui n'est pas partagée avec la cytarabine. Ainsi la recherche de certains caractères physicochimique peut permettre de confirmer une non-conformité.

- **la pesée**

- **les reliquats** : La vérification du volume de principe actif restant, en cas de conservation, peut permettre d'expliquer une non-conformité de concentration.

- **la fiche de fabrication**

Tous ces éléments de vérifications ne doivent pas être utilisés isolément pour affirmer ou infirmer une non-conformité. De manière générale, ces vérifications permettent de confirmer une non-conformité plutôt que de l'infirmer.

Dans tous les cas, quelques principes généraux sont à respecter :

- Pour les préparations réalisées en poche de dilution, quel que soit le volume final, **une pesée devra-être réalisée**. Elle permet de donner un ordre de grandeur de la masse de la poche, et donc du volume attendu et permet d'orienter la confirmation d'une non-conformité de concentration.
- En cas de non-conformité, **toute préparation doit-être reprélevée** sauf en cas d'impossibilité. Ce principe général ne peut donc s'appliquer aux préparations réalisées en seringue ou en poche de dilution avec un volume inférieur à 50 mL et représente une des limites de notre méthode mise en place pour contrôler les préparations de faible volume.
- **En cas de non-conformité confirmée par une seconde analyse** et en l'absence d'arguments forts en faveur d'une fausse non-conformité, la préparation doit-être **détruite et refabriquée**.
- **En cas de doutes sur la conformité** d'une préparation, cette dernière doit-être **détruite et refabriquée**.
- En cas de non-conformité portant sur le solvant de dilution, la préparation peut être libérée et dispensée au patient en cas d'urgence et si les données de stabilité le permettent et si le médecin prescripteur a donné son accord.

4-4-2 Discussion sur l'analyse des non-conformités relevées durant l'année 2014

L'analyse des non-conformités n'a pas été mise en place de manière systématique dès l'utilisation de l'automate QCPrep+ en routine mais les principales non-conformités sont enregistrées depuis 2013. Pour le renseignement des informations, le fichier Excel® de validation du logiciel QCPrep propose un menu déroulant avec différentes causes mais qui n'est pas propice au renseignement détaillé.

Pour la très grande majorité des non-conformités, soit 76,4%, la cause n'a pu être identifiée. Le faible tût de renseignement et l'incapacité de réaliser un second prélèvement pour les préparations de faible volume explique ce résultat. Les non-conformités de type « matériel » représentent la part la plus importante, soit 36,8% de celles identifiées et 8,7% de la totalité. Elles ont été à l'origine de plusieurs maintenances et correspondent essentiellement à des défauts de prélèvements. Les non-conformités de « protocole » et de gamme restent anecdotiques et correspondent essentiellement à des anomalies évitables lors de la mise en place des protocoles de contrôle. Les non-conformités « d'homogénéisation » sont facilement améliorables. Elles ne présentent pas une criticité importante mais sont source de perte de temps. A l'inverse, celles portant sur la molécule et son contrôle analytique sont plus problématiques car elles représentent des anomalies potentiellement graves et préjudiciables pour le patient en cas de non détection à la libération.

4-5 Problèmes rencontrés

Différents problèmes ont été rencontrés au cours de la mise en place du contrôle analytique et de l'utilisation de l'automate QCPrep+. Ils étaient soit liés directement au contrôle analytique lui-même et à sa mise en place, soit aux adaptations et protocoles que nous avons mis en place afin de contrôler les préparations pédiatriques. Les principaux problèmes ainsi que les solutions mises en place sont détaillés ci-dessous.

4-5-1 Solvant de dilution

Le choix du solvant de dilution est conditionné par plusieurs critères : la stabilité de la molécule ainsi que la physiologie des patients. Les grands volumes de NaCl 0,9% représentant un apport sodé non négligeable qui peut être problématique pour les plus jeunes patients. Dans ce cas, le glucose 5% sera privilégié. Il est cependant possible de réaliser des préparations dans un autre solvant que celui habituellement préparé. Cette modification de solvant a été la source d'une mauvaise quantification de préparations d'étoposide réalisées dans du NaCl 0,9% à la place du glucose 5% habituellement utilisé. Dans notre banque, nous disposons uniquement d'une gamme d'étalonnage dans du glucose 5%. La quantification des préparations réalisées dans du NaCl 0,9% à l'aide de la gamme réalisée dans du glucose 5% entraînait une surévaluation de la concentration de l'ordre de +50 %. Ainsi, certaines préparations initialement contrôlées comme non-conformes étaient finalement conformes. Une attention particulière a été apportée sur les préparations pouvant être réalisées ponctuellement dans un autre solvant que celui des protocoles couramment utilisés. Des gammes complémentaires dans les 2 solvants de dilutions utilisés en oncopédiatrie ont été réalisées.

4-5-2 Diminution du volume d'analyse

La diminution du volume d'analyse nécessaire à la réalisation du contrôle des préparations de faible volume peut entraîner des non-conformités. Dans certains rares cas, dont nous n'avons pas pu déterminer la cause, un prélèvement partiel de l'échantillon entraîne un remplissage insuffisant de la cuve Raman. Ce mauvais remplissage ne permet pas de réaliser l'acquisition du spectre dans de bonnes conditions. Sur la période de février à octobre 2014, le nombre de cas d'erreur de prélèvement est estimé à moins de 30 soit environ 0,7% des préparations analysées. En pratique cela se traduit par l'impossibilité d'identifier le solvant de dilution de la préparation ainsi que les molécules nécessitant une analyse Raman pour être discriminées comme par exemple les anthracyclines.

4-5-3 Dilution des échantillons et contamination de l'environnement

Comme il a été vu précédemment, l'automate QCPrep+© introduit la possibilité de réaliser automatiquement des dilutions. Cette fonctionnalité est intéressante pour réaliser le contrôle de molécules ne disposant pas d'une gamme d'étalonnage linéaire sur toute l'étendue de concentration des préparations réalisées. C'est le cas du méthotrexate pour lequel la gamme d'étalonnage est linéaire de 0 à 5 mg/mL et la plage de concentration des préparations réalisées s'étend de 1 à 90 mg/mL. Afin de réaliser ses dilutions, l'automate QCPrep+ prélève dans un premier temps le volume nécessaire de la préparation à contrôler qu'il transfère dans un flacon vide puis, dans un second temps, le volume de solvant afin de réaliser la dilution. L'homogénéisation est réalisée par plusieurs prélèvements et injection dans le même flacon.

Au cours des analyses des préparations de méthotrexate nécessitant des dilutions allant du 1/2 au 1/20ème, de nombreux cas de contaminations ont pu être observées. Ces contaminations se retrouvent au niveau du flacon, du butoir de la seringue, des différents sites d'injections et prélèvements (injection échantillon, poubelle, prélèvement solution de rinçage) (annexe 5).

En plus des contaminations de l'environnement, nous avons observé des contaminations d'autres échantillons succédant l'analyse du méthotrexate (annexe 6). Le flacon en deuxième position, à partir de la gauche, est un échantillon d'une préparation de vincristine disposé 4 analyses après celle d'une préparation de méthotrexate nécessitant une dilution. Cet échantillon est habituellement incolore. On observe une légère coloration jaune qui atteste, visuellement, d'une contamination. Au niveau de l'analyse par l'automate, le spectre obtenu est le signe d'un mélange entre de la vincristine et du méthotrexate et ne permet pas de réaliser une identification et quantification.

Ces contaminations représentent un risque d'exposition pour l'environnement et le manipulateur ainsi qu'un risque important et démontré de contaminations croisées. A ce jour, malgré une maintenance technique, il n'existe pas d'explication et de solution à ce problème de contamination suite aux dilutions d'échantillons.

Conclusion

Le principal objectif de ce travail, initié en janvier 2014, était d'améliorer la sécurité des patients traités par anticancéreux injectables. Le contrôle analytique des préparations pédiatriques de chimiothérapies anticancéreuses apporte, en effet, une amélioration majeure dans le suivi de la qualité de ces préparations.

Pour atteindre cet objectif, le premier travail a été réalisé sur l'adaptation du contrôle analytique aux problématiques des préparations pédiatriques, à savoir les faibles volumes et les faibles doses de médicaments cytotoxiques utilisés. La méthode retenue pour permettre le contrôle des préparations de faible volume est basée sur le surremplissage de chaque préparation avec 1 mL de solvant supplémentaire. Elle représente le meilleur compromis entre sécurité et faisabilité. Son optimisation, au travers nos retours d'expériences et de l'étude des problèmes rencontrés nous permet aujourd'hui de disposer d'une technique analytique fiable.

Les adaptations sur la méthode de dosage et sur nos procédures de préparation et de contrôle nous permettent de contrôler 85% de notre production (moyenne sur l'année 2014) et jusqu'à 89% en janvier 2015. A la fin de l'année 2013, le contrôle analytique était réalisé uniquement sur 27,5% de notre production. En matière de résultat de conformité, notre objectif de 95% a été atteint durant l'été 2014 soit 7 mois après le début du projet. L'analyse fine des résultats nous a permis de mettre en évidence des difficultés de manipulation ou de contrôle avec certaines molécules comme l'étoposide ou les vinca-alcaloïdes. La prise en considération de ces difficultés, et la recherche de solutions, nous ont permis d'améliorer nos procédures d'homogénéisation et nos techniques de contrôle. La prise en charge individuelle et continue des préparateurs en pharmacie hospitalière, leur a permis d'améliorer leurs connaissances et leur niveau de maîtrise de la reconstitution des médicaments cytotoxiques.

La sécurité des patients passe avant tout par la détection des vraies non-conformités pouvant engendrer des toxicités supplémentaires, une efficacité moindre de la chimiothérapie ou mettre en jeu la santé des patients. Le contrôle analytique, couplé aux autres méthodes de contrôle, permet de détecter ce type de non-conformités qui peut être une erreur sur le médicament, sur la dose ou sur le solvant de dilution. Ces non-conformités font l'objet de CREX ou de réunions de l'équipe permettant de mettre en place des axes d'amélioration pour éviter toute nouvelle survenue. Le relevé systématique des non-conformités qui a été mis en

place fait donc partie du système d'amélioration de notre process de fabrication et de contrôle des chimiothérapies.

Néanmoins, la méthode utilisée pour le contrôle des préparations de chimiothérapies injectables pédiatriques souffre de quelques limites. Le pourcentage de la dose utilisée pour le contrôle est encore important, entre 1,9% et 4,8% pour les volumes compris entre 50 et 20 mL. Cette perte de dose est inhérente à toutes méthodes de dosages couramment utilisées. Ici la limite vient du faible volume des préparations et du volume important nécessaire à l'analyse. Bien qu'il n'existe pas de recommandations officielles, il est nécessaire de se positionner sur la fraction maximale de la dose prescrite pouvant être dédiée au contrôle et à la sécurisation des processus. Un début de réponse peut être trouvé dans le principe du « dose banding » permettant la réalisation de préparations hospitalières de chimiothérapies injectables et qui accepte d'arrondir les doses prescrites jusqu'à $\pm 10\%$. Une autre limite de la méthode découle de la nécessité d'un volume d'analyse conséquent : en cas de non-conformité, le reprélèvement des préparations de faible volume n'est pas possible. Dans ce cas, l'analyse de l'origine des non-conformités est rendue plus difficile et permet moins facilement d'exclure de fausses non-conformités liées à un défaut d'homogénéisation par exemple. Ainsi la plupart des non-conformités aboutissent à une destruction de la préparation.

Les travaux développés au sein de l'UPAC de l'hôpital pédiatrique Armand-Trousseau ont pu être communiqué auprès de la communauté scientifique [92], [93] et un article scientifique est en cours de rédaction.

En conclusion, notre volonté de disposer d'un niveau de sécurité des préparations pédiatriques de chimiothérapie anticancéreuses injectables équivalent à celui des préparations adultes a été atteint au travers des travaux réalisés.

Bibliographie

- [1] « ASHP technical assistance bulletin on handling cytotoxic and hazardous drugs », *Am. J. Hosp. Pharm.*, vol. 47, n° 5, p. 1033-1049, mai 1990.
- [2] International Society of Oncology Pharmacy Practicioners Standards Committee, « ISOPP standards of practice. Safe handling of cytotoxics », *J. Oncol. Pharm. Pract. Off. Publ. Int. Soc. Oncol. Pharm. Pract.*, vol. 13 Suppl, p. 1-81, 2007.
- [3] R. E. YODAIKEN et D. BENNETT, « OSHA work-practice guidelines for personnel dealing with cytotoxic (antineoplastic) drugs. Occupational Safety and Health Administration », *Am. J. Hosp. Pharm.*, vol. 43, n° 5, p. 1193-1204, mai 1986.
- [4] ANSM, « bonnes pratique de préparation », 21-nov-2007. [En ligne]. Disponible sur: http://ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/a5d6ae4b3d5fdee013ca463462b7b296.pdf. [Consulté le: 08-déc-2014].
- [5] BLANC-LEGIER, CARVALHO, DAOUPHARS, DESMARIS, L. ESCALUP, HELVIG, NOIREZ, MADELAINE, PINGUET, PIVOT, PREBAY, TABARY et TOURNAMILLE, « Recommandations SFPO 2012 », 2012, vol. 1, p. 12.
- [6] « Code de la santé publique - Article L5121-1 | Legifrance. » [En ligne]. Disponible sur: <http://www.legifrance.gouv.fr/affichCodeArticle.do?idArticle=LEGIARTI000026499732&cidTexte=LEGITEXT000006072665>. [Consulté le: 13-août-2014].
- [7] AFSSAPS, *Bonnes Pratiques de Préparation 2007*. 2007.
- [8] *Code de la santé publique - Article L5121-5*, vol. L5121-5.
- [9] GERPAC et Europharmat, « GUIDE DE RECOMMANDATIONS DE DISPOSITIFS MÉDICAUX Préparation & Administration des Médicaments à Risques pour le Personnel et l'Environnement. » juill-2007.
- [10] INCA, « Les cancers de l'enfant », 2014.
- [11] INCA, « Le point sur : la recherche sur les cancers des enfants. »
- [12] INCA, « Incidence, mortalité et survie des cancers chez les enfants de moins de 15 ans. »
- [13] R. THERRIEN, « Le cancer chez l'enfant », vol. 46, n° 3, sept. 2013.
- [14] J. T. JAMES, « A new, evidence-based estimate of patient harms associated with hospital care », *J. Patient Saf.*, vol. 9, n° 3, p. 122-128, sept. 2013.
- [15] OMS, « OMS | Sécurité des patients: l'OMS appelle à intensifier la recherche », *WHO*. [En ligne]. Disponible sur: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2007/pr52/fr/>. [Consulté le: 18-juin-2015].
- [16] DREES, « Les événements indésirables graves associés aux soins observés dans les établissements de santé », *Doss. Solidar. Santé*, n° 17, p. 1-18, 2010.
- [17] L. HAZELL et S. A. W. SHAKIR « Under-reporting of adverse drug reactions : a systematic review », *Drug Saf.*, vol. 29, n° 5, p. 385-396, 2006.

- [18] F. RANCHON, G. SALLES, H.-M. SPÄTH, V. SCHWIERTZ, N. VANTARD, S. PARAT, F. BROUSSAIS, B. YOU, S. TARTAS, P. J. SOUQUET, C. DUSSART, C. FALANDRY, E. HENIN, G. FREYER et C. RIOUFOL « Chemotherapeutic errors in hospitalised cancer patients: attributable damage and extra costs », *BMC Cancer*, vol. 11, p. 478, 2011.
- [19] P. BONNABRY, « Sécurisation du circuit des chimiothérapies : de la prescription à l'administration », présenté à la Journée de la pharmacie oncologique, Rabat, 14-sept-2013.
- [20] ANSM, « Les événements qui ne devraient jamais arriver - Never Events. ».
- [21] L. SARFATI, F. RANCHON, N. VANTARD, V. SCHWIERTZ, N. GAUTHIER, S. HE, E. KIOURIS, C. GOURC-BERTHOD, M. G. GUÉDAT, C. ALLOUX, M.-P. GUSTIN, B. YOU, V. TRILLET-LENOIR, G. FREYER et C. RIOUFOL « SIMMEON-Prep study: SIMulation of Medication Errors in ONcology: prevention of antineoplastic preparation errors », *J. Clin. Pharm. Ther.*, vol. 40, n° 1, p. 55-62, févr. 2015.
- [22] B. DALIFARD, « Reconnaissance des flacons d'Erbix®[®], de Cisplatine et de Navelbine® par analyse vidéo : Validation en conditions réelles de l'identification des flacons », présenté au congrès du GERPAC, 2012.
- [23] L. CARREZ, « Fiabilité de la préparation des chimiothérapies : double contrôle ou systèmes gravimétriques », Diplôme de Master of Advanced Studies (MAS) en pharmacie hospitalière, Genève, 2013.
- [24] J. BOULIGAND, A. PACI, L. MERCIER, G. VASSAL et P. BOURGET « High-performance thin-layer chromatography with a derivatization procedure, a suitable method for the identification and the quantitation of busulfan in various pharmaceutical products », *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 34, n° 3, p. 525-530, févr. 2004.
- [25] M. BOUMA, B. NUIJEN, M. T. JANSEN, G. SAVA, F. PICOTTI, A. FLAIBANI, A. BULT et J. H. BEIJNEN « Development of a LC method for pharmaceutical quality control of the antimetastatic ruthenium complex NAMI-A », *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 31, n° 2, p. 215-228, févr. 2003.
- [26] P. BOURGET, A. PACI, J. B. REY, L. MERCIER et S. DEMIRDJIAN « Contribution of high-performance thin-layer chromatography to a pharmaceutical quality assurance programme in a hospital chemotherapy manufacturing unit », *Eur. J. Pharm. Biopharm. Off. J.*, vol. 56, n° 3, p. 445-451, nov. 2003.
- [27] A. PACI, L. MERCIER et P. BOURGET « Identification and quantitation of antineoplastic compounds in chemotherapeutic infusion bags by use of HPTLC: application to the vinca-alkaloids », *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 30, n° 5, p. 1603-1610, janv. 2003.
- [28] L. HAVARD, B. BONAN, J. M. HUEN, Y. ROCHE et P. PROGNON « Le contrôle de qualité en unité centralisée de reconstitution des cytotoxiques : mythe ou réalité ? », *STP Pharma Prat.*, vol. 15, n° 2, p. 148-160, 2005.
- [29] F. BASUYAU et P. BRUNELLE « Comparaison de deux mesures physiques rapides pour le contrôle de la dose des préparations injectables de médicaments anticancéreux avant administration : application au 5-fluorouracile », *J. Pharm. Clin.*, vol. 19, n° 1, p. 5-8, 2000.
- [30] A. CAMUT « impact de la mise en place d'une méthode analytique de contrôle des préparations d'anticancéreux : l'expérience Messine. », présenté au congrès de la SFPO, 2009.
- [31] B. LELIEVRE « Contrôles qualitatifs et quantitatifs des chimiothérapies avant administration », présenté au congrès du GERPAC, 2007.

- [32] J. AUBERT, « Acquisition et mise en place d'un automate de contrôles analytiques des préparations injectables de cytotoxiques dans une unité de biopharmacie oncologique. Impact qualité et conséquences sur l'organisation de l'unité. » Thèse de doctorat d'état en pharmacie, Tours, 2009.
- [33] C. BAZIN, « Contrôle systématique des préparations de chimiothérapie bilan a 6 mois », présenté au congrès de la SFPO, 2009.
- [34] J. DESCOUT, « Analyse des différentes méthodes de contrôle des chimiothérapies anticancéreuses de 30 hôpitaux français », présenté au congrès du GERPAC, 2011.
- [35] F. FREY, « Enquête sur les contrôles réalisés lors de la préparation des chimiothérapies », présenté au Collège des Pharmaciens Oncologues de Bretagne, 2014.
- [36] M. HERGLI, « Contrôles des préparations hospitalières, chimiothérapies et nutriments parentéraux : quelles pratiques en 2013 dans les pharmacies à usage intérieur d'établissements de santé en France, Suisse et Belgique ? », présenté au congrès HOPIPHARM, La Rochelle, 2014.
- [37] J. M. HOLLAS, *Modern spectroscopy*, 2nd ed. Chichester ; New York: Wiley, 1992.
- [38] P. GALEZ, « SPECTROMÉTRIE UV / VISIBLE. » DUT Mesures Physiques Université Annecy - Techniques spectroscopiques d'analyse.
- [39] Ecole des mines Saint Etienne et Centre SPIN, génie des procédés, « Spectroscopie UV-Visible. ».
- [40] Ecole des mines Saint Etienne et Centre SPIN, génie des procédés, « Spectroscopie infrarouge. ».
- [41] Le moniteur hospitalier, « La spectroscopie infrarouge », n° 261, 01-déc-2013.
- [42] Ecole des mines Saint Etienne et Centre SPIN, génie des procédés, « Spectroscopie Raman. » .
- [43] P. HENDRA, C. JONES, et G. WARNES, *Fourier transform Raman spectroscopy: instrumentation and chemical applications*. Ellis Horwood, 1991.
- [44] B. CASSARD, « La Spectroscopie Raman, une solution ultra-rapide et non destructrice pour le Contrôle de Qualité Analytique des solutions injectables ; application aux oxazaphosphorines », présenté au congrès du GERPAC, 2009.
- [45] A. AMIN, « Nouvelle avancée applicative de la Spectroscopie Raman au Contrôle de Qualité Analytique de solutions injectables d'anthracyclines », présenté au congrès du GERPAC, 2010.
- [46] P. BOURGET, A. AMIN, A. MORICEAU, B. CASSARD, F. VIDAL et R. CLEMENT « La Spectroscopie Raman (SR) : un nouvel outil adapté au contrôle de qualité analytique des préparations injectables en milieu de soins. Comparaison de la SR aux techniques CLHP et UV/visible-IRTF appliquée à la classe des anthracyclines en cancérologie », *Pathol. Biol.*, vol. 60, n° 6, p. 369-379, déc. 2012.
- [47] A. AMIN, « La spectroscopie RAMAN appliquée au contrôle de qualité analytique des médicaments injectables : évaluation analytique et économique comparative vs CLHP et UV/visible-IRTF », présenté au congrès de la SFPC, 2014.
- [48] ISO, « ISO 5725-1:1994. Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure », révision en 2012 1994.
- [49] International Conference on Harmonisation, « VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES : TEXT AND METHODOLOGY Q2(R1) », ICH, Version 4, oct. 1994.

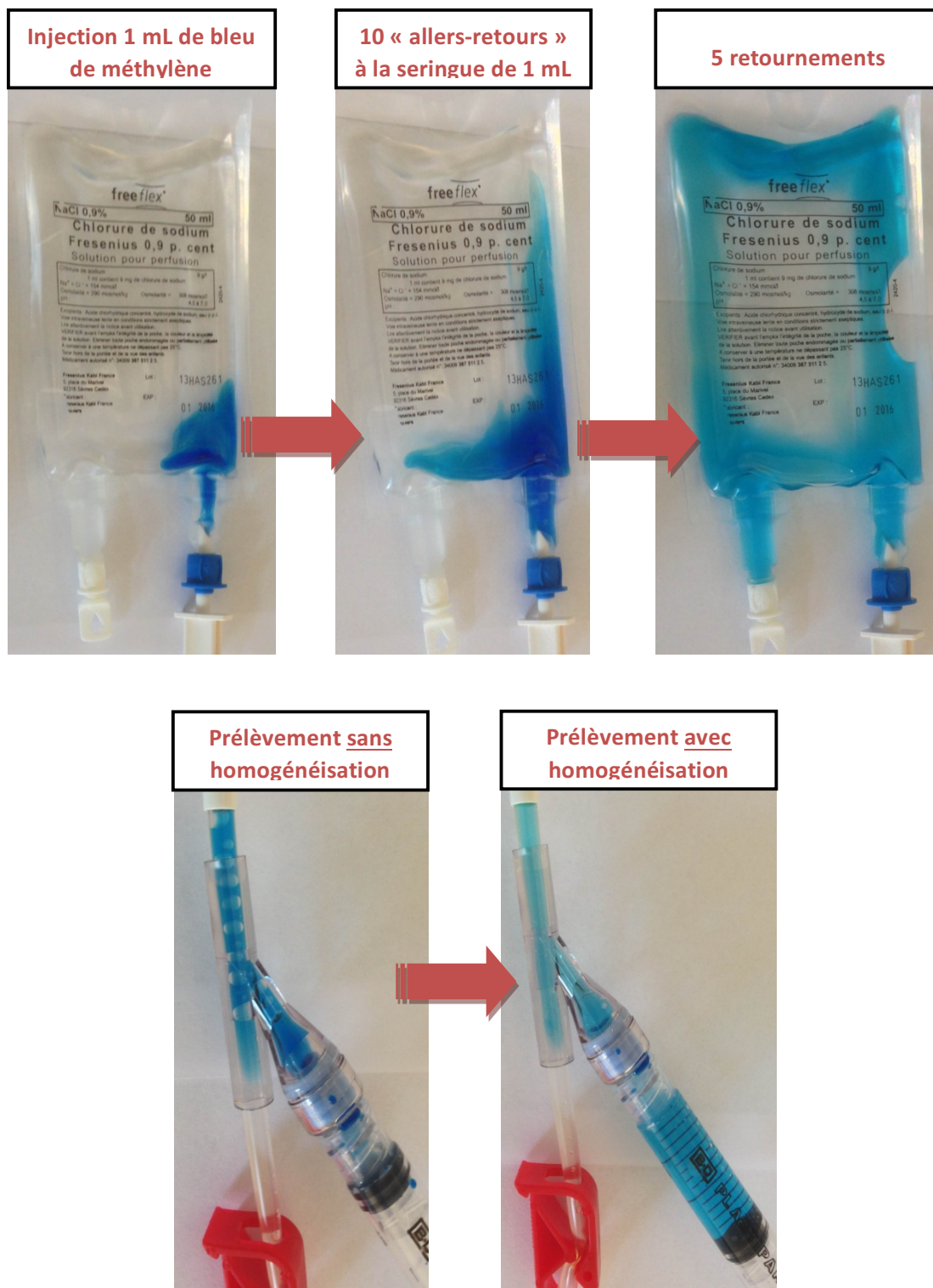
- [50] M. THOMPSON, S. L. R. ELLISON et R. WOOD « Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report) », *Pure Appl. Chem.*, vol. 74, n° 5, p. 835-855, janv. 2002.
- [51] B. N. TAYLOR et C. E. KUYATT, « Guidelines for Evaluating and Expressing the Uncertainty of NIST Measurement Results », 1994.
- [52] R. J. PLUMRIDGE et G. J. SEWELL « Dose-banding of cytotoxic drugs: a new concept in cancer chemotherapy », *Am. J. Health-Syst. Pharm. AJHP Off. J. Am. Soc. Health-Syst. Pharm.*, vol. 58, n° 18, p. 1760-1764, sept. 2001.
- [53] E. CHATELUT, M. L. WHITE-KONING, R. H. MATHIJSEN, F. PUISSET, S. D. BAKER et A. SPARREBOOM « Dose banding as an alternative to body surface area-based dosing of chemotherapeutic agents », *Br. J. Cancer*, vol. 107, n° 7, p. 1100-1106, sept. 2012.
- [54] L. B. CROCHOW, C. BARALDI, et D. NOE, « Is dose normalization to weight or body surface area useful in adults? », *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 82, n° 4, p. 323-325, 1990.
- [55] A. FELICI, J. VERWEIJ et A. SPARREBOOM, « Dosing strategies for anticancer drugs: the good, the bad and body-surface area », *Eur. J. Cancer Oxf. Engl. 1990*, vol. 38, n° 13, p. 1677-1684, sept. 2002.
- [56] A.-L. POULIQUEN, L. ESCALUP, N. JOURDAN, P. COTTU, P. FAURE et I. MADELAINE-CHAMBRIN « Dose standardisation of anticancer drugs », *Int. J. Clin. Pharm.*, vol. 33, n° 2, p. 221-228, avr. 2011.
- [57] G. J. SEWELL « The clinical impact of dose banding », présenté au congrès du GERPAC, 2006.
- [58] R. T. ANDERSON, F. T. CAMACHO et R. BALKRISHNAN « Willing to wait?: the influence of patient wait time on satisfaction with primary care », *BMC Health Serv. Res.*, vol. 7, p. 31, 2007.
- [59] I. GOURDJI, L. MCVEY et C. LOISELLE « Patients' satisfaction and importance ratings of quality in an outpatient oncology center », *J. Nurs. Care Qual.*, vol. 18, n° 1, p. 43-55, mars 2003.
- [60] S. A. KAESTNER ET G. J. SEWELL « A National Survey Investigating UK Prescribers' Opinions on Chemotherapy Dosing and 'Dose-Banding' », *Clin. Oncol.*, vol. 21, n° 4, p. 320-328, mai 2009.
- [61] L. CARREZ, « Fiabilité de la préparation des chimiothérapies : double contrôle ou système gravimétrique ? », présenté au congrès du GERPAC, 2013.
- [62] ISO, « ISO 9001 : Management de la qualité. »
- [63] H. E. REIS, W. BRAUN et C. G. SCHMIDT « The antigenicity of E. coli asparaginase », *Rev. Fr. Études Clin. Biol.*, vol. 14, n° 9, p. 906-909, nov. 1969.
- [64] B. L. ASSELIN et V. FISHER « Impact of clinical and subclinical hypersensitivity to asparaginase in acute lymphoblastic leukemia », *Clin. J. Oncol. Nurs.*, vol. 18, n° 6, p. 107-112, déc. 2014.
- [65] W. L. SALZER, B. L. ASSELIN, P. V. PLOURDE, T. CORN et S. P. HUNGER « Development of asparaginase *Erwinia chrysanthemi* for the treatment of acute lymphoblastic leukemia », *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1329, p. 81-92, nov. 2014.
- [66] C. A. FERNANDEZ, E. STEWART, J. C. PANETTA, M. R. WILKINSON, A. R. MORRISON, F. D. FINKELMAN, J. T. SANDLUND, C. H. PUI, S. JEHA, M. V. RELLING et P. K. CAMPBELL « Successful challenges using native E. coli asparaginase after hypersensitivity reactions to PEGylated E. coli asparaginase », *Cancer Chemother. Pharmacol.*, vol. 73, n° 6, p. 1307-1313, juin 2014.

- [67] L. LIU et X.-T. XIE « [Advances on the role of pegaspargase in the treatment of childhood leukemia] » *J. Contemp. Pediatr.*, vol. 16, n° 2, p. 155-160, févr. 2014.
- [68] R. H. HERZIG, S. N. WOLFF, H. M. LAZARUS, G. L. PHILLIPS, C. KARANES et G. P. HERZIG « High-dose cytosine arabinoside therapy for refractory leukemia », *Blood*, vol. 62, n° 2, p. 361-369, août 1983.
- [69] B. S. KRAMER, F. R. APPELBAUM, G. P. HERZIG, R. G. GRAW et A. S. LEVINE « Treatment of refractory acute leukemia with high-dose chemotherapy », *Cancer Treat. Rep.*, vol. 61, n° 7, p. 1397-1398, oct. 1977.
- [70] W. G. GAIDYS, J. D. DICKERMAN, C. L. WALTERS et P. C. YOUNG « Intrathecal vincristine. Report of a fatal case despite CNS washout », *Cancer*, vol. 52, n° 5, p. 799-801, sept. 1983.
- [71] D. A. SHEPHERD, C. P. STEUBER, K. A. STARLING et D. J. FERNBACH « Accidental intrathecal administration of vincristine », *Med. Pediatr. Oncol.*, vol. 5, n° 1, p. 85-88, janv. 1978.
- [72] M. E. WILLIAMS, A. N. WALKER, J. P. BRACIKOWSKI, L. GARNER, K. D. WILSON et J. T. CARPENTER « Ascending myeloencephalopathy due to intrathecal vincristine sulfate. A fatal chemotherapeutic error », *Cancer*, vol. 51, n° 11, p. 2041-2047, juin 1983.
- [73] « Intrathecal Vincristine: An Analysis of Reasons for Recurren... : Journal of Pediatric Hematology/Oncology », LWW. [En ligne]. Disponible sur: http://journals.lww.com/jpho-online/Fulltext/1998/11000/Intrathecal_Vincristine__An_Analysis_of_Reasons.22.aspx. [Consulté le: 14-févr-2015].
- [74] ANSM, *Recommandations destinées à prévenir les risques d'erreur d'administration intrathécale de vinca-alcaloïdes*. 2007.
- [75] A. DAUPHIN, « Arguments en faveur d'une centralisation de la reconstitution », in *Médicaments anticancéreux : de la préparation à l'administration*, Médicales Internationales., 1995, p. 1107-8.
- [76] S. LIMAT, J. P. DROUHIN, K. DEMESMAY, E. TISSOT, M. JACQUET et M. C. WORONOF-LÉMSI « Incidence and risk factors of preparation errors in a centralized cytotoxic preparation unit », *Pharm. World Sci.*, vol. 23, n° 3, p. 102-106, 2001.
- [77] E. PELUS, M. DELLANEGRA, D. CHARLETY, N. MAGNIN, N. PETIT et I. MEYLAN « Unité de préparation centralisée des cytotoxiques : de la mise en place à l'assurance-qualité », *J. Pharm. Clin.*, vol. 17, n° 2, p. 97-102, août 1998.
- [78] E. A. FLYNN, R. E. PEARSON et K. N. BARKER « Observational study of accuracy in compounding i.v. admixtures at five hospitals », *Am. J. Health-Syst. Pharm. AJHP Off. J. Am. Soc. Health-Syst. Pharm.*, vol. 54, n° 8, p. 904-912, avr. 1997.
- [79] M. C. ESCOMS, M. J. CABAÑAS, M. OLIVERAS, E. HIDALGO et C. BARROSO « Errors evolution and analysis in antineoplastic drug preparation during one year », *Pharm. World Sci. PWS*, vol. 18, n° 5, p. 178-181, oct. 1996.
- [80] S. LIMAT, « Iatrogenie médicamenteuse liée à la preparation », présenté au congrès du GERPAC, 2000.
- [81] A. FEYEL « Contrôle des fabrications stériles : analyse critique non conformités et des normes d'acceptation », présenté au congrès du GERPAC, 2005.
- [82] S. HE « Analyse et gestion des non conformités du laboratoire de contrôle des chimiothérapies de l'Hôpital Européen Georges Pompidou », présenté au congrès du GERPAC, 2012.

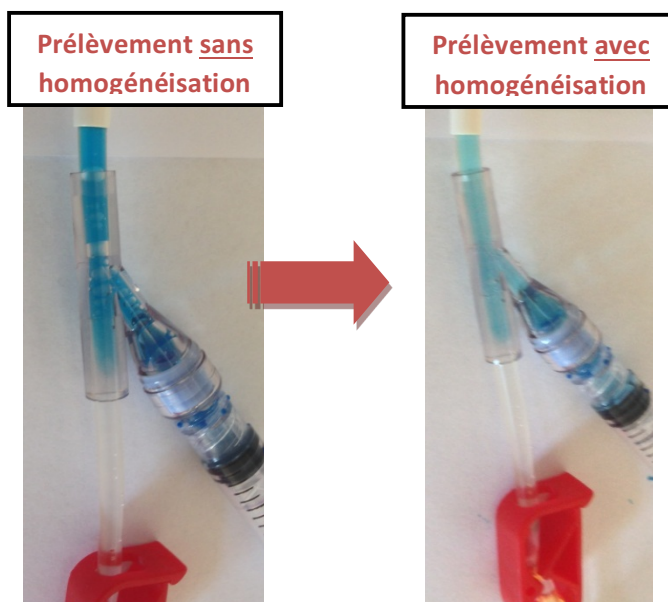
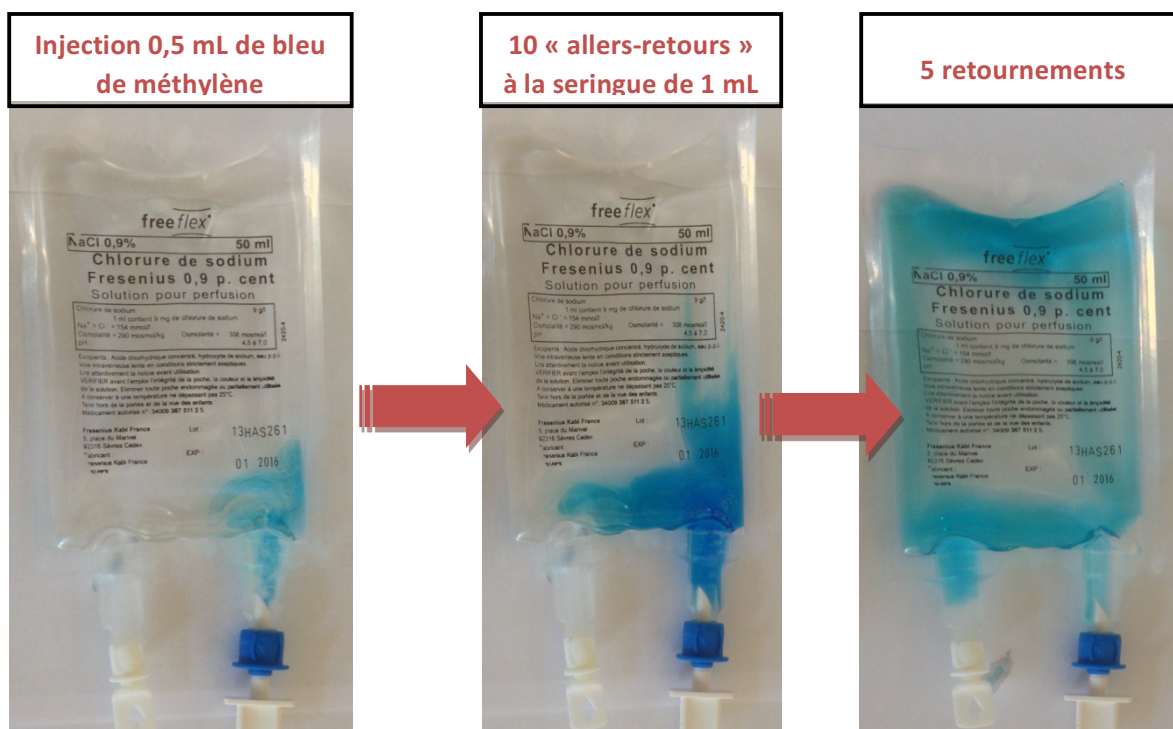
- [83] M. LEROY, « Contrôle des anticorps monoclonaux (AcM) au sein d'une Unité de Préparation et Contrôle des anticancéreux (UPC) : bilan après 9 mois d'activité », présenté au congrès du GERPAC, 2014.
- [84] E. FAYE, « Contrôle analytique en postproduction des préparations de chimiothérapie au Centre Jean Perrin », présenté au congrès du GERPAC, 2008.
- [85] A. MAIRE, « Contrôle analytique des chimiothérapies anticancéreuses injectables : 6 mois d'expérience au CHRU de Tours », présenté au congrès de la SFPO, 2012.
- [86] M. BAYLAC, L. ESCALUP, T. LEBRETON, S. CRAUSTE-MANCIET, J. C. DARBORD et D. BROSSARD « Impact de l'acide peracétique gazeux sur les matériels introduits en isolateur », *Pharmacie hospitalière française*, 1997, p. 22-24.
- [87] B. BONAN, « Etude de la perméation de l'acide peracétique dans les tubulures de perfusion pré-purgées », présenté au congrès du GERPAC, 2003.
- [88] S. EDET, « Passage de l'agent stérilisant dans les poches : méthode simplifiée d'évaluation en routine », présenté au congrès du GERPAC, 2010.
- [89] C. MENARD, « Faisabilité de l'application des dernières recommandations émises à plus ou moins 10% sur le contrôle analytique des anticancéreux », présenté au congrès de l'APHIF, 2014.
- [90] M. FAMIN, « Analyse des Non-Conformités (NC) de l'unité de reconstitution des chimiothérapies (URC) sur deux années (2003-2004) », présenté au congrès du GERPAC, 2005.
- [91] A. HUGON, « Management du risque à l'hôpital : Application de la méthode AMDEC au circuit d'une chimiothérapie (Analyse des Modes des Défaillances Et leur Criticité) », présenté au congrès du GERPAC, 2012.
- [92] T. CHOUQUET, « Development of analytical controle for low-volume cytotoxic preparations destined to pediatric patients. », présenté au congrès de l'ECOP, 2014.
- [93] T. CHOUQUET, « Mise en place du contrôle analytique des préparations de chimiothérapies injectables de faible volume. », présenté au congrès du GERPAC, 2014.

Annexes

Annexe 1 : Simulation d'homogénéisation de la tubulure avec 1 mL de bleu de méthylène, avant prélèvement.



Annexe 2 : Simulation d'homogénéisation de la tubulure avec 0,5 mL de bleu de méthylène, avant prélèvement.

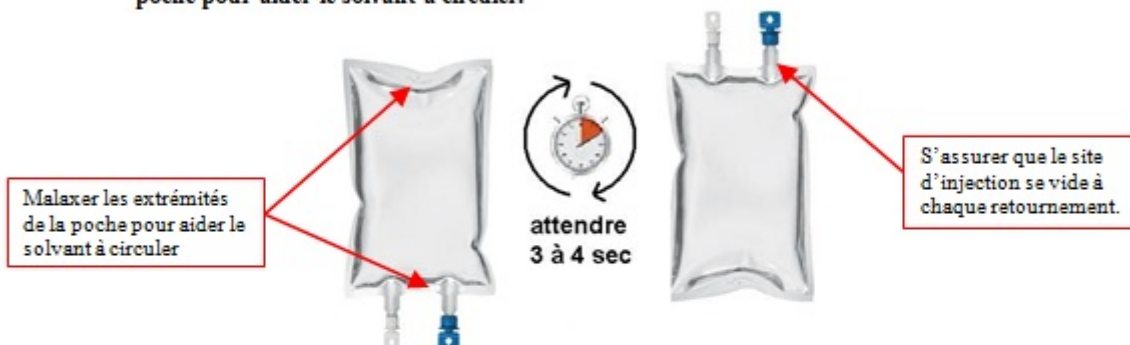


Annexe 3 : Affiche de rappel sur les procédures d'homogénéisation et prélèvement.

HOMOGENEISATION ET PRELEVEMENT

► Homogénéisation :

- Homogénéiser $\neq$ agiter ou secouer
- La meilleure manière d'homogénéiser est de procéder par **retournement lent** de la poche :
 - Positionner la poche à la **verticale**.
 - **Attendre quelques secondes** entre chaque retournement surtout pour les produit visqueux (étoposide par ex).
 - Vérifier que le site d'injection **bleu se vide** à chaque retournement.
 - Pour les poches de faible volume (vincristine), il faut « **malaxer** » les extrémités de la poche pour aider le solvant à circuler.



• ALLER/RETOUR :

- 2 ou 3 suffisent.
- **utiliser un volume suffisant** c'est-à-dire le plus grand volume possible avec votre seringue. [faire des allers/retours avec des volume faibles (0,2 ou 0,5mL) est inutile]
- ne **PAS** faire d'ALLER/RETOUR pour les **très faibles volumes** de chimiothérapie : $V < 0,4\text{mL}$ (faible dose d'aracytine ou vincristine par exemple).

► Prélèvement :

• Volumes :

- Poches $\geq 50\text{mL}$: prélever **1 mL**
 - Poches ou seringues $< 50\text{mL}$: prélever **1 mL**
 - Poches ou seringues $< 20\text{mL}$: **NE PAS PRELEVER** (SC et IM, Actinomycine 10mL)
- + Ne pas prélever : Nélarabine, Vidaza, vindesine, Erwiniaze, Oncaspar, Leukotak, Busilvex, Depocyte, Evoltra...

• Méthode :

- Prendre une **nouvelle seringue** pour chaque prélèvement.
- Faire **2 ou 3 aller/retour** **avant** chaque prélèvement pour homogénéiser la tubulure.

• Attention pour les préparations de volume $< 50\text{mL}$:

- Préparer un volume final, avant prélèvement, de **51mL, 21mL, 31mL, 45mL ...**
- Pour les seringues : rajouter 1mL de solvant
- Pour les poches : purger 1mL en moins.

Annexe 4 : Affiche mémo de rappel sur les procédures d'homogénéisation et prélèvement.

MEMO HOMOGENEISATION & PRELEVEMENT



- Purger la tubulure, laisser un peu d'air dans la poche pour faciliter l'homogénéisation.
- **aller/retour x2 ou 3** : après avoir injecté la chimio
- **Retournement poche x5** : lentement, position verticale et vider site injection
- Prendre une **nouvelle seringue** pour prélever
- **aller/retour x2 ou 3** : avant de prélever
- **Prélever 1 mL**



- Purger la tubulure, laisser un peu d'air dans la poche pour faciliter l'homogénéisation.
- **aller/retour x2 ou 3** : après avoir injecté la chimio
- **Retournement poche x5** : lentement, position verticale et vider site injection. « malaxer » la poche pour aider le solvant à circuler.
- Prendre une **nouvelle seringue** pour prélever
- **aller/retour x2 ou 3** : avant de prélever
- **Prélever 1 mL**



- **Prélever 1mL de solvant supplémentaire.**
Volume de la préparation avant prélèvement = 51mL, 21mL, 31mL, 45mL ...
- **aller/retour x2 ou 3** : après avoir injecté la chimio
- **Retournement seringue x5** : en prélevant environ 10mL d'air.
- Prendre une **nouvelle seringue** pour prélever
- il n'est pas nécessaire de faire des aller/retours avant de prélever.
- **Prélever 1.0mL**

Poche < 20mL
Seringues < 20mL

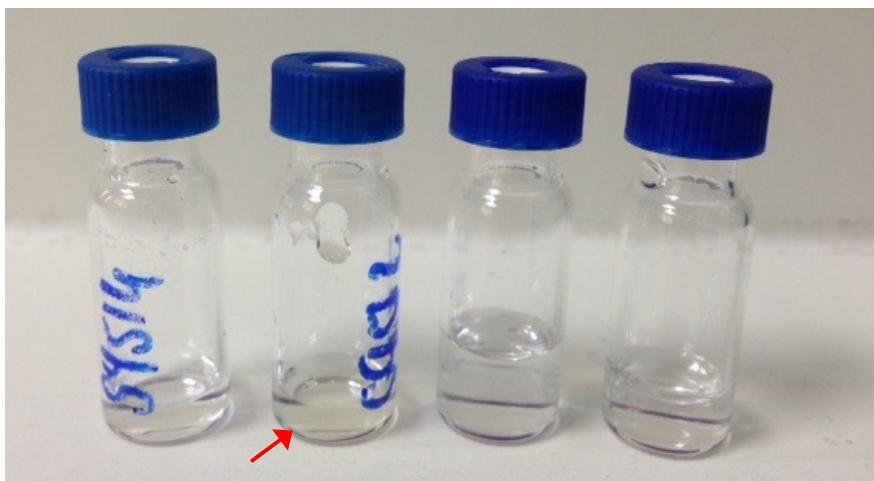
Depocyte
Litak
Mylotarg
Nelarabine
Oncaspar et Erwiniasé
Vidaza
Vindésine

- **NE PAS PRELEVER**

Annexe 5 : Photos des contaminations de l'environnement par l'automate QCPrep+ : septum d'un échantillon, puits d'injection et de rinçage, projections.



Annexe 6 : Photos d'une contamination croisée entre flacons.



Résumé

Les chimiothérapies anticancéreuses sont des préparations à haut risque de toxicité pour le patient. L'ANSM classe le surdosage des médicaments anticancéreux comme l'un des douze événements qui ne devraient jamais arriver (never event) lors d'une hospitalisation. Dans une démarche d'assurance qualité et de prévention de ces risques, différentes méthodes de contrôles, comme le contrôle analytique, existent. En oncologie pédiatrique, les faibles doses de médicaments cytotoxiques préparées et le faible volume final des préparations rendent difficile le développement d'un contrôle analytique. Ainsi, ces préparations ne sont habituellement pas contrôlées analytiquement au sein des laboratoires de contrôle. Suite à l'acquisition d'un automate QCPrep+, nous avons mis en place le contrôle analytique de ces préparations. La méthode retenue consiste à surremplir les préparations avec 1 mL de solvant supplémentaire puis, après homogénéisation, de prélever un échantillon de 1 mL qui servira au contrôle analytique. Le volume prélevé par l'automate a été modifié à 900 µL. Après validation de nos gammes d'étalonnages, les préparations destinées aux patients ont été contrôlées à partir du mois de janvier 2014 jusqu'au mois de janvier 2015. Cette mise en place nous a permis de contrôler 88,9% des 7000 préparations réalisées par an, dont 66% sont réalisées en seringues. Le taux de conformité global des préparations s'est stabilisé à 94,9% à partir du mois d'août 2014. Il n'existe pas de différences significatives entre les taux de conformité des préparations de faible volume et celles réalisées en poche de dilution avec un volume final supérieur à 50 mL. L'analyse fine des taux de conformité a mis en évidence des difficultés avec certaines molécules comme les vinca-alcaloïdes et l'étoposide ainsi que des disparités de résultats entre les manipulateurs. Il existe cependant quelques limites à ce contrôle comme l'impossibilité de réaliser un second prélèvement et une fraction de la dose totale utilisée pour le contrôle analytique importante (entre 2 et 5%). Néanmoins ce travail nous permet d'assurer le contrôle analytique des préparations de chimiothérapies pédiatrique et d'offrir un niveau de sécurité équivalent à celui des préparations destinées aux patients adultes.

DISCIPLINE

Pharmacie

MOTS CLES

Oncologie pédiatrique, Pharmacotechnie, Contrôle analytique

ADRESSE DE L'AUTEUR

CHOUQUET Thibaut
9 rue Adolphe Focillon
75014 Paris