



HAL
open science

Produits de dégradation du glucose dans les solutions glucosées injectables – Caractérisation et modélisation des facteurs influençant leur génération

Julie HAYBRARD

► **To cite this version:**

Julie HAYBRARD. Produits de dégradation du glucose dans les solutions glucosées injectables – Caractérisation et modélisation des facteurs influençant leur génération. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Lille, 2019. Français. NNT: . tel-04490907

HAL Id: tel-04490907

<https://hal.science/tel-04490907v1>

Submitted on 5 Mar 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

REMERCIEMENTS

Monsieur le Professeur Pascal ODOU,

Je vous remercie de m'avoir encadrée pour cette thèse qui restera une belle étape de ma vie. J'ai énormément appris à vos côtés et je vous en suis extrêmement reconnaissante.

Monsieur le Professeur Eric BOULANGER,

Je vous remercie pour tous vos conseils et votre aide tout au long de mon travail de thèse. Soyez assuré de ma reconnaissance et de mon profond respect.

Madame le Professeur Valérie SAUTOU,

Je vous remercie d'avoir accepté d'être rapporteur de mon travail de thèse. Soyez assurée de ma reconnaissance et de mes sincères remerciements.

Monsieur le Professeur Antoine DUPUIS,

Je vous remercie d'avoir répondu présent pour ma thèse et d'avoir accepté le rôle de rapporteur de mon travail. Soyez assuré de ma considération la plus grande.

Madame le Professeur Béatrice DEMORE,

Je vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail. Soyez assurée de ma reconnaissance et de mes profonds remerciements.

Madame le Professeur Laurence GALANTI,

Vous me faites l'honneur d'accepter de juger ce travail. Soyez assurée de ma considération la plus grande.

Monsieur le Professeur Nicolas SIMON,

Je vous remercie pour l'encadrement que vous m'avez apporté et pour les nombreuses relectures effectuées sur mes différents travaux. Je vous suis reconnaissante du temps que vous avez su m'accorder et de votre soutien.

Madame le Docteur Cécile DANIEL,

Je te remercie pour l'encadrement que tu m'as apporté et les bons conseils prodigués. Un grand merci pour les relectures et le soutien pendant ces années de thèse.

Madame le Docteur Christine BARTHELEMY,

Je vous remercie d'avoir été un vrai soutien et une source de conseils. Un immense merci pour votre disponibilité, votre compréhension et vos relectures. Je vous remercie d'avoir toujours gardé votre porte ouverte pour moi malgré la distance.

Au laboratoire de Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière Morgane, Anthony, Héloïse, Stéphanie, Nicole et toutes les personnes permettant à ce laboratoire de vivre une belle aventure,

Un immense merci pour les moments partagés ensemble, les nombreux cafés et pour les longs moments de manips. Un grand merci pour le soutien que vous m'avez apporté pendant cette thèse.

A mes parents, à ma soeur et à ma famille

Merci de votre soutien, de votre écoute, pour tout ce que vous faites pour moi. Je vous remercie de la confiance que vous m'avez accordée.

A Marc-Antoine,

Je te remercie de tout l'amour que tu m'apportes au quotidien. Merci de ton soutien, de ta patience et de ta disponibilité. Merci de me faire vivre une si belle aventure.

Ce travail a fait l'objet :

- d'une publication internationale

« *Factors generating glucose degradation products in sterile glucose solutions for infusion: statistical relevance determination of their impacts* »

J. Haybrard, N. Simon, C. Danel, C. Pinçon, C. Barthélémy, F.J. Tessier, B. Décaudin, E. Boulanger, P. Odou

Sci Rep. 2017 Sep 20;7(1):11932. doi: 10.1038/s41598-017-12296-5. IF₂₀₁₇ : 4.122

- d'une communication orale internationale

« *Degradation products in glucose infusion fluids: what factors influence?* »

J. Haybrard, N. Simon, C. Danel, F.J. Tessier, C. Barthélémy, B. Décaudin, E. Boulanger, P. Odou

International Symposium on Infusion Technologies – Lille – Novembre 2016

- d'une communication orale nationale

« *Faut-il revoir la conservation des solutions injectables de glucose?* »

J. Haybrard, N. Simon, C. Danel, F.J. Tessier, C. Barthélémy, B. Décaudin, E. Boulanger, P. Odou

Hopipharm – Nancy – Mai 2017

Prix de la communication orale, domaine « Technologies Pharmaceutiques »

- d'une communication affichée

« *Stérilisation par la chaleur humide : impact sur la dégradation des solutions glucosées injectables* »

J. Haybrard, N. Simon, C. Danel, F.J. Tessier, C. Barthélémy, B. Décaudin, E. Boulanger, P. Odou

Hopipharm – Nancy – Mai 2017

TABLES DES MATIERES

REMERCIEMENTS	1
TABLES DES MATIERES	3
LISTE DES FIGURES	7
LISTE DES TABLEAUX.....	10
ABREVIATIONS	13
Partie I. INTRODUCTION	16
I. Introduction générale.....	16
II. Solutions glucosées en milieu hospitalier	17
1. Hydratation.....	19
2. Véhicule d'administration	21
3. Source énergétique.....	22
4. Le glucose : agent osmotique – solution de dialyse péritonéale	23
III. Produits de dégradation du glucose	25
1. Les différents produits de dégradation du glucose.....	25
2. Voies de formation des PDG	26
3. Toxicité	29
4. Facteurs influençant la formation des PDG dans les solutions glucosées commercialisées.....	31
a. Stérilisation et stérilité	31
i. Définition et recommandation	31
ii. Méthode de stérilisation appliquée aux solutions glucosées injectables	33
b. Concentration en glucose.....	34
c. Conditions de stockage	35
IV. Objectifs	37

Partie II. IDENTIFICATION ET QUANTIFICATION DES PDG – ANALYSES DES FACTEURS INFLUENÇANT LA FORMATION DES PDG 38

I. Introduction.....	38
II. Matériels et Méthodes	45
A. Caractérisation et quantification des PDG par CLHP-UV	45
1. Produits chimiques et consommables.....	45
a. Réactifs	45
a. Solvants	46
b. Matériels.....	47
2. Chaîne chromatographique	47
3. Conditions chromatographiques	47
4. Préparation des solutions échantillons.....	48
5. Validation de la méthode analytique	50
B. Analyse des facteurs influençant la formation des PDG	52
1. Analyse des solutions glucosées sur le marché français	52
a. Descriptif des solutions glucosées sur le marché français	52
a. Analyse des solutions.....	54
2. Modèle statistique et mise en évidence des facteurs influençant.....	55
3. Modèle cinétique général.....	56
III. Résultats.....	59
A. Caractérisation et quantification des PDG par CLHP-UV	59
1. Descriptif des résultats.....	59
2. Paramètres de validation	59
B. Analyse générale des facteurs influençant la formation des PDG.....	63
1. Résultat de l'analyse des solutions glucosées présentes sur le marché français.....	63
2. Analyse des paramètres influençant la formation des PDG	69
3. Modèle cinétique.....	72
IV. Discussion.....	74

PARTIE III : ETUDE DE L'INFLUENCE DES CONDITIONS DE STERILISATION SUR LA GENERATION DES PRODUITS DE DEGRADATION DU GLUCOSE 80

I. Introduction	80
1. Principe de la stérilisation par la chaleur.....	80
2. Conséquences de la stérilisation par la chaleur humide sur les solutions de glucose stérilisées	85
II. Matériels et Méthodes	87
1. Conditions de stérilisation	87
2. Préparation des échantillons de solutions glucosées à 5, 10, 30 et 50%....	90
3. Méthode analytique.....	91
4. Analyse statistique	91
III. Résultats.....	93
1. Analyse descriptive	93
a. Solution sans stérilisation	93
a. Solution traitée par la filtration stérilisante	98
b. Solutions stérilisées par la chaleur humide	100
c. La concentration initiale	101
d. La durée de la stérilisation.....	101
e. La température de stérilisation	102
f. Valeur stérilisatrice F_0	103
g. Impact de l'autoclave.....	108
2. Analyse statistique des paramètres influençant la formation des PDG au cours de la stérilisation	109
3. Modélisation mathématique	111
4. Détermination d'un modèle mathématique	113
IV. Discussion	116
a. Effet de la température	117
b. Effet de la durée du cycle	118
c. Concentration de glucose	119
d. L'autoclave	119

e. Modélisation	121
Partie IV. DISCUSSION GENERALE	122
1. Le contexte et la problématique	122
2. Méthode de dosage et analyse du marché français.....	122
3. Etude de la stérilisation	125
4. Axe d'optimisation.....	126
Partie V. CONCLUSION	132
BIBLIOGRAPHIE	133
PUBLICATION SCIENTIFIQUE	144

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Schéma de la dégradation du glucose dans des conditions de stockage à hautes températures ^[3,45] ou de stérilisation ^[46]	26
Figure 2 : Réaction de Maillard conduisant à la formation des AGEs (<i>Advanced Glycation End products</i>) après fixation d'un sucre, comme le glucose, sur une fonction amine libre -NH ₂ , d'après Wautier <i>et al.</i> ^[48]	27
Figure 3 : Voies de formation des AGEs décrites par Boulanger <i>et al.</i> ^[24]	28
Figure 4 : Protocole de validation de la gamme de dosage sur trois jours.....	50
Figure 5 : Modèle de la dégradation du glucose. G, H et F sont les quantités en glucose, en 5-HMF et en 2-FA, respectivement. G ₀ , H ₀ et F ₀ sont des quantités initiales en glucose, en 5-HMF et en 2-FA, respectivement. k est la constante de dégradation du glucose, k ₁ la constante de formation du 5-HMF et k ₂ celle du 2-FA.....	57
Figure 6 : Chromatogramme d'une solution d'un mélange de 5-HMF et 2-FA.....	59
Figure 7 : Justesse de la méthode de validation pour le 5-HMF (A) et pour le 2-FA (B). La courbe en pointillé rouge représente la droite de régression linéaire de référence.	62
Figure 8 : Diagramme de recouvrement pour le 5-HMF (A) et pour le 2-FA (B). Les limites des biais sont fixées à ±10% (droites en orange).....	63
Figure 9 : Modèles de prédiction de la formation du 5-HMF (A) et de la formation du 2-FA (B). Relation linéaire entre ln(vitesse de formation des PDG) et la prédiction de ln(vitesse de formation des PDG). Les points bleus sont les valeurs mesurées et les lignes grises continues encadrant les valeurs représentent l'intervalle de confiance à 95%.	69
Figure 10 : Impact du type de matériau du contenant sur la vitesse de formation du 5-HMF (■) et 2-FA (●). La barre d'erreur indique les déviations standards.....	70

Figure 11 : Impact du fournisseur sur la vitesse de formation du 5-HMF (■) et 2-FA (●). La barre d'erreur indique les déviations standards.	71
Figure 12 : Diagramme d'état de l'eau en fonction de la température et de la pression ^[98]	82
Figure 13 : Table de Regnault : corrélation Pression/Température en vapeur saturée ^[99]	82
Figure 14 : Autoclave industriel permettant de réaliser des cycles de stérilisation par la chaleur humide ^[100]	83
Figure 15 : Description des différentes phases se déroulant lors d'un cycle de stérilisation par la chaleur humide ^[70]	84
Figure 16 : Autoclave VAPOUR-Line® (VWR, Radnor, Pennsylvanie, Etats-Unis)..	88
Figure 17 : Autoclave Lequeux® (Getinge, Courtaboeuf – Les Ulis, France)	89
Figure 18 : Description des conditions opératoires de l'étude de stérilisation : les cycles C ₁ , C ₄ , C ₅ , C ₆ , C ₇ et C ₉ ont été réalisés à l'aide de l'autoclave VAPOUR-Line® (V) et les cycles C ₂ , C ₃ , C ₁₀ ont été réalisés à l'aide de l'autoclave Lequeux® (L).	90
Figure 19 : Influence de la stérilisation sur les concentrations initiales en 5-HMF (H ₀). Les concentrations sont exprimées en µM.	96
Figure 20 : Influence de la stérilisation sur les concentrations initiales en 2-FA (FA ₀). Les concentrations sont exprimées en µM.	97
Figure 21 : Impact de la filtration stérilisante sur la formation du 5-HMF (nM).....	98
Figure 22 : Influence de la durée du cycle de stérilisation. Les conditions expérimentales sont : C ₁ : 111°C/30 min (F ₀ =3), C ₂ : 111°C/90 min (F ₀ =9) et C ₃ : 111°C/200 min (F ₀ =20) en fonction des concentrations initiales en glucose sur la formation du 5-HMF en µM (A) et du 2-FA en nM (B).....	102
Figure 23 : Influence de la température du cycle de stérilisation. C ₁ : 111°C – 30 min (F ₀ = 3), C ₄ : 116°C – 30 min (F ₀ = 9,5) et C ₇ : 121°C – 30 min (F ₀ = 30) en fonction	

des concentrations initiales en glucose sur la formation du 5-HMF (A) et du 2-FA (B).....	103
Figure 24 : Comparaison des conditions de stérilisation pour un F_0 de 9 (C_2 : 111°C – 90 min et C_5 : 121°C – 9 min) en fonction des concentrations initiales en glucose sur la formation du 5-HMF (μM) (A) et du 2-FA (nM) (B).....	104
Figure 25 : Comparaison des conditions de stérilisation pour un F_0 de 20 (C_3 : 111°C – 200 min et C_6 : 121°C – 20 min) en fonction des concentrations initiales en glucose sur la formation du 5-HMF (μM) (A) et du 2-FA (nM) (B).....	104
Figure 26 : Influence du F_0 par comparaison sur la quantité en 5-HMF et 2-FA. Les cycles présentés sont les cycles C_1 : 111°C – 30 min ($F_0 = 3$), C_6 : 121°C – 20 min ($F_0 = 20$) et C_8 : 134°C – 3 min ($F_0 = 60$) en fonction des concentrations initiales en glucose sur la formation du 5-HMF (A) et du 2-FA (B).	107
Figure 27 : Modèle de prédiction pour la formation du 5-HMF (A) et du 2-FA (B)..	109
Figure 28 : Représentation schématique de la formation des PDG	113
Figure 29 : Représentation schématique de la cinétique de dégradation du glucose. G, H et FA sont respectivement le glucose, le 5-HMF et le 2-FA. $[G_0]$, $[H_0]$ et $[FA_0]$ sont les concentrations initiales en glucose, 5-HMF et 2-FA. k_H et k_{FA} sont les constantes de vitesse de formation de 5-HMF et du 2-FA respectivement.	114
Figure 30 : Schéma récapitulatif des zones de stockage des SGI durant leur cycle de vie.....	128
Figure 31 : Concentration en 5-HMF (μM) dans une solution de G5% et de G50% sur 90 jours après stérilisation par le cycle C_8 (134°C – 3 min).	129
Figure 32 : Pourcentage d'augmentation du 5-HMF en fonction du mode de stockage pour des solutions de G5% et G50% après stérilisation par le cycle C_8 (134°C – 3 min). L'encadré rouge indique les augmentations maximales retrouvées et l'encadré bleu, les augmentations minimales.	130

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Descriptif des deux AGEs les plus étudiés.	29
Tableau 2 : Méthodes CLHP-UV d'identification et quantification des PDG décrites dans la littérature. NC : non communiqué. 2-FA : 2-furaldéhyde, 3-DG : 3-déoxyglucosone, 3,4-DGE : 3,4-didéoxyglucosone-3-ène, 5-HMF : 5-hydroxyméthylfurfural, AA : Acétaldéhyde, GO : Glyoxal, MGO : Méthylglyoxal, 2,4-DNPH : 2,4-Dinitrophénylhydrazine. CLHP-UV : chromatographie liquide haute performance - détection Ultra Violet. LDQ : Limite De Quantification, LDD : Limite De Détection. NC : Non Communiqué	40
Tableau 3 : Méthodes LC-MS d'identification et quantification des PDG décrites dans la littérature. 2-FA : 2-furaldéhyde, 3-DG : 3-déoxyglucosone, 3,4-DGE : 3,4-didéoxyglucosone-3-ène, 5-HMF : 5-hydroxyméthylfurfural, AA : Acétaldéhyde, GO : Glyoxal, MGO : Méthylglyoxal, DMPD : 4,5-diméthyl-1,2-phénylènediamine. LDQ : Limite De Quantification, LDD : Limite De Détection. NC : Non Communiqué	42
Tableau 4 : Caractéristiques du glucose et des PDG utilisés. CAS : <i>Chemical Abstract Service</i> ; MM : masse molaire.	46
Tableau 5 : Préparation des solutions mères de 5-HMF (8 mM, équivalent à 1 000 mg/L) et de 2-FA (104 mM, équivalent à 10 000 mg/L)	49
Tableau 6 : Concentrations des PDG dans les solutions filles utilisées lors de la validation de la méthode de dosage (en nM).....	49
Tableau 7 : Description des solutions glucosées du marché français étudiées. Tous les fournisseurs ont confirmé utiliser la stérilisation par la chaleur humide mais tous n'ont pas communiqué leur processus. A: non communiqué, B: non communiqué, C: $F_0 \geq 11$, D: $F_0 \geq 15$ (estimé entre 42 et 45), D': $F_0 \geq 15$ (estimé à 20), E: $F_0 = 15$	53
Tableau 8 : Equations de la dégradation du glucose et de la formation des PDG. G, H et F sont les quantités de glucose, 5-HMF et 2-FA, respectivement. G_0 , H_0 et F_0 sont les quantités initiales en glucose, 5-HMF and 2-FA, respectivement. k est la constante de vitesse de dégradation du glucose, k_1 et k_2 sont les constantes de vitesse de formation du 5-HMF et du 2-FA, respectivement.....	57

Tableau 9 : Paramètre β_2 de chaque série pour le 5-HMF et le 2-FA. Les résultats sont présentés par moyenne \pm écart-type. Résultats du test de Student ($\alpha = 0,05$; 5 DDL). Différence : entre la moyenne des β_2 et 0.	60
Tableau 10 : Paramètres de régression de la méthode pour le 5-HMF et le 2-FA. Les paramètres donnés sont : le coefficient de détermination (r^2), la pente de la droite (β_1), l'ordonnée à l'origine (α) les limites de détection (LDD) et de quantification (LDQ).....	61
Tableau 11 : Quantités des PDG dans les solutions du marché français pour les concentrations en glucose de 2,5 et 5%. Chaque échantillon a été analysé en triplicate. Les quantités de PDG sont données en moyenne \pm écart-type et exprimées en mg pour le 5-HMF et en μg pour le 2-FA. G (%) : Concentration en glucose en g/100mL; Supp.: Fournisseur ; Vol. : Volume ; Cont. : Contenant. Les valeurs extrêmes pour un fournisseur sont indiquées en italique et en gras. *En dehors des gammes de validation.....	65
Tableau 12 : Quantités des PDG dans les solutions du marché français pour les concentrations en glucose de 10, 15, 20, 30, 50 et 70%. Chaque échantillon a été analysé en triplicate. Les quantités de PDG sont données en moyenne \pm écart-type et exprimées en mg pour le 5-HMF et en μg pour le 2-FA. G (%) : Concentration en glucose en g/100mL; Supp. : Fournisseur ; Vol. : Volume ; Cont. : Contenant. Les valeurs extrêmes pour un fournisseur sont indiquées en italique et en gras. * En dehors des gammes de validation.	66
Tableau 13 : Résumé des études décrites dans la littérature portant sur la formation des PDG pendant la phase de stérilisation.....	85
Tableau 14 : Influence de la stérilisation sur les concentrations initiales en 5-HMF (H_0) en nM et en 2-FA (FA_0) en nM. G_0 , concentration initiale en glucose, H concentration en 5-HMF et VH, la vitesse de formation du 5-HMF. FA, concentration en 2-FA et VFA, la vitesse de formation du 2-FA. Les concentrations sont exprimées en μM pour le glucose et en μM pour le 5-HMF et le 2-FA et les vitesses en nM/min. *inférieure à la LDQ, estimé à LDQ. $LDQ_{5\text{-HMF}} = 0,239 \mu\text{M}$ et $LDQ_{2\text{-FA}} = 57,00 \text{ nM}$. ** inférieure à la LDD, estimée à la LDD. $LDD_{5\text{-HMF}} = 0,052 \mu\text{M}$ et $LDD_{2\text{-FA}} = 17,10 \text{ nM}$	94

Tableau 15 : Concentration en 5-HMF et en 2-FA en nM (moyenne \pm écart-type) dans les solutions glucosées de G5, G10, G30 et G50 avant et après filtration stérilisante. ND : Non détectable (inférieure à la LDD). < 239 nM : détectable mais non quantifiable (inférieure à la LDQ), estimée à LDQ = 239 nM.	99
Tableau 16 : Impact de la stérilisation sur la formation du 5-HMF (μ M) et du 2-FA (nM) dans des solutions de G5, G10, G30 et G50 (moyenne \pm écart-type). ND : Non détectable (inférieure à la LDD _{2-FA} = 17,10 nM). < 239 nM : détectable mais non quantifiable (inférieure à la LDQ), estimée à LDQ = 239 nM.	100
Tableau 17 : Concentration en 5-HMF (μ M) et en 2-FA (nM) quantifiées dans les solutions de glucose après stérilisation par la chaleur humide par les cycles C ₂ et C ₅ (F ₀ =9) (moyenne \pm écart-type). Test de Mann et Whitney.	105
Tableau 18 : Concentration en 5-HMF (μ M) et en 2-FA (μ M) quantifiées dans les solutions de glucose après stérilisation par la chaleur humide par les cycles C ₃ et C ₆ (F ₀ = 20) (moyenne \pm écart-type). Test de Mann et Whitney.	105
Tableau 19 : Concentrations en 5-HMF (μ M) et en 2-FA (nM) mesurées après stérilisation par la chaleur humide par les cycles C ₉ et C ₁₀ (n = 12) réalisés respectivement par l'autoclave V et L . Les données sont présentées par moyenne \pm écart-type. Les comparaisons ont été effectuées entre les 2 stérilisateur par un test de Mann et Whitney.	108
Tableau 20 : Paramètres influençant la stérilisation. (t : valeur réelle de Student) pour le 5-HMF.	110
Tableau 21 : Paramètres influençant la stérilisation. (t : valeur réelle de Student) pour le 2-FA.	110

ABBREVIATIONS

2-FA : 2-furaldéhyde

3-DG : 3-déoxyglucosone

3,4-DGE : 3,4-didéoxyglucosone-3-ène

5-HMF : 5-hydroxyméthylfurfural

AGEs : Advanced Glycation End products

ATP : Adénosine Triphosphate

BPF : Bonnes Pratiques de Fabrication

BPPH : Bonnes Pratiques de Pharmacie Hospitalière

CAS : Chemical Abstract Service

CLHP : Chromatographie Liquide Haute Performance

CML : Carboxyméthyl-lysine

DMPD : 4,5-diméthyl-1,2-phénylènediamine

DP : Dialyse Péritonéale

F₀ : Effet stérilisant

F_{cal} : Valeur statistique calculée du test de Fisher

F_{théo} : Valeur statistique théorique du test de Fisher

GO : Glyoxal

ICH : *International Conference on Harmonization* – Conférence Internationale sur l'Harmonisation des exigences techniques pour l'enregistrement des médicaments à usage humain

IV : Intraveineuse

LC-MS : Chromatographie Liquide associée à une détection par Spectrométrie de Masse

LDD : Limite de Détection

LDQ : Limite de Quantification

MGO : Méthylglyoxal

MM : Masse Molaire

Na⁺ : Sodium

NaCl : Chlorure de Sodium

NAS : Niveau d'Assurance de Stérilité

NC : Non Communiqué

ND : Non Détectable

NS : Non stérile

PDG : Produit(s) de Dégradation du Glucose

PP : Polypropylène

PUI : Pharmacie à Usage Intérieur

PVC : Polychlorure de Vinyle

RAGE : Récepteur des AGEs

R_s : facteur de résolution

SF : Solution Fille

SI : Solution Intermédiaire

SEC : Secteur Extracellulaire

SIC : Secteur Intracellulaire

SFSTP : Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques

SGI : Solution(s) Glucosée(s) Injectable(s)

SM : Solution Mère

SSI : Solutions Salines Injectables

T_r : temps de rétention

UV : Ultraviolet

VEGF : *Vascular Endothelial Growth Factor* – Facteur de croissance vasculaire endothélial

PARTIE I. INTRODUCTION

I. Introduction générale

Les solutions glucosées injectables sont couramment utilisées à l'hôpital et sont considérées comme des solutions sûres, peu onéreuses et sans danger. Leur utilisation est multiple, notamment comme solution d'hydratation^[1], comme diluant pour les médicaments injectables^[2] ou comme agent osmotique dans les solutions de dialyse péritonéale (DP)^[3]. Elles entrent aussi dans la composition de la nutrition entérale et parentérale. Différentes concentrations, variant de 2,5 à 70 g/100mL, sont disponibles sur le marché français permettant de répondre aux différentes indications médicales.

Une grande majorité de ces solutions, quelle que soit l'indication, est destinée à être administrée par voie parentérale, ce qui impose une stérilité des solutions. La Pharmacopée Européenne recommande, comme méthode de stérilisation, la stérilisation par la chaleur humide en autoclave^[4]. Cette technique est basée sur la relation entre la température, la pression et le temps. Les hautes températures sont connues pour être promotrices de produits de dégradation du glucose (PDG)^[5-8]. D'autres facteurs ont été précédemment identifiés comme impactant la formation des PDG, tels que les conditions de stockage^[3,9], la concentration en glucose^[1,8] ou encore le pH de la solution^[10,11].

De nombreux PDG ont été identifiés dans les solutions de DP, tels que le 3-déoxyglucosone (3-DG), le 3,4-didéoxyglucosone-3-ène (3,4-DGE), le glyoxal (GO), le méthylglyoxal (MGO), 5-hydroxyméthylfurfural (5-HMF), 2-furaldéhyde (2-FA), formaldéhyde et l'acétaldéhyde^[3,10,12]. Il a été précédemment démontré que ces PDG avaient un impact notamment sur l'homéostasie cellulaire^[1,13,14], l'inflammation^[15], sur les systèmes cardiovasculaire^[1,16,17] et rénal^[12,18,19].

Peu de données sont aujourd'hui disponibles sur les quantités en PDG présentes dans les solutions glucosées administrées par voie parentérale. Compte tenu de

l'utilisation massive de ces solutions dans la prise en charge thérapeutique des patients, et compte tenu de l'augmentation des connaissances sur la toxicité potentielle des PDG, il apparaît nécessaire d'en déterminer leur quantité ainsi que les facteurs jouant un rôle dans leur formation.

II. Solutions glucosées en milieu hospitalier

Dans le milieu hospitalier, l'utilisation des solutions glucosées injectables (SGI) est très répandue, notamment pour leurs larges indications et leur faible coût. Ces SGI sont commercialisées à des concentrations variables, comme cité précédemment^[1]. Ces concentrations sont communément exprimées en pourcentage (% - g/100 mL). Ces solutions sont disponibles en divers volumes et flaconnages permettant une adaptation individuelle au besoin du patient.

Ces solutions sont destinées à être administrées par voie parentérale et répondent donc à la monographie correspondante de la Pharmacopée Européenne^[20] : « *Les préparations parentérales sont des préparations stériles destinées à être injectées, perfusées ou implantées dans le corps humain ou animal. Les préparations parentérales peuvent nécessiter l'emploi d'excipients, par exemple pour assurer l'isotonie au sang, ajuster le pH, augmenter la solubilité, permettre la conservation de la (ou des) substance(s) active(s), assurer une action antimicrobienne* »^[20].

Pour toute utilisation intraveineuse (IV), et ce, quelle que soit la substance injectée, les solutions doivent être stériles, exemptes de pyrogènes et de particules visibles.

La Pharmacopée Européenne définit plusieurs catégories de préparations parentérales, dont notamment^[20] :

- « *les préparations injectables,*
- *les préparations pour perfusion,*
- *les préparations à diluer pour injection ou pour perfusion,*
- *les poudres pour injection ou pour perfusion.* »

Lorsque l'administration s'effectue par voie IV, il est préférable pour des raisons de tolérance que la solution présente une osmolarité la plus proche du plasma afin d'éviter :

- une plasmolyse, définie comme une sortie d'eau des cellules sanguines lorsque la solution est hypertonique, entraînant une rétractation des cellules,
- une hémolyse, définie comme une entrée d'eau dans les cellules sanguines lorsque la solution est hypotonique, entraînant la lyse des cellules.

En effet, en revenant sur les définitions, la concentration osmolaire ou osmolarité d'une solution se définit par la somme des concentrations molaires de l'ensemble des substances osmotiquement actives qui la compose (mOsm/L)^[21]. L'osmolarité plasmatique se calcule en tenant compte du sodium, du glucose et de l'urée (principaux solutés) et est estimée à environ 295 mOsm/L ^[22]:

$$P_{cOsm} = (Na^+ \times 2) (\text{mmol} \cdot L^{-1}) + \text{glycémie} (\text{mmol} \cdot L^{-1}) + \text{urée} (\text{mmol} \cdot L^{-1}) \quad \text{éq. 1}$$

Où Na^+ est le sodium.

Cette équation montre l'équilibre à maintenir entre les solutés, rendant difficile l'utilisation unique des solutions salines injectables (SSI) comme soluté de perfusion mais nécessitant une diversité des solutés à administrer (SGI en alternative).

Les SGI ont la capacité de traverser les secteurs extra- et intracellulaire. En fonction de leur concentration, elles sont classées en trois catégories^[23] :

- solutions isotoniques : la SGI 5%, elle ne modifie pas l'hydratation cellulaire ;
- solutions hypertoniques : les SGI 10% et 30%, elles diminuent l'hydratation intracellulaire ;
- solutions hypotoniques : la SGI 2,5%, elles augmentent l'hydratation cellulaire.

En résumé, ces SGI sont utilisées comme soluté d'hydratation, véhicule d'administration de médicament injectable, comme agent osmotique ou encore comme source énergétique, en complément ou en remplacement d'autres solutions aqueuses, telles que les solutions salines injectables. Elles permettent, un apport calorique rapide (1g = 4 Kcal), soit 175 calories par litre perfusé^[23] car le glucose est un sucre rapidement métabolisé et permet la production de l'énergie qui se présente

sous la forme d'adénosine triphosphate (ATP). Le glucose est une source d'énergie indispensable au métabolisme cellulaire humain^[24].

Une surveillance des constantes biologiques pendant le traitement devra être mise en place, par le biais notamment d'un ionogramme plasmatique, de la mesure de la glycémie, de la glycosurie, de la kaliémie... Ces éléments de surveillance permettent de prédire un déséquilibre de l'osmolarité plasmatique et de détecter certains effets indésirables liés à l'administration IV.

1. Hydratation

C'est l'une des principales indications de ces SGI^[1].

Le corps humain est majoritairement composé d'eau (60% environ) avec une répartition schématisée en deux secteurs : secteur intracellulaire (SIC) et secteur extracellulaire (SEC). Les besoins quotidiens en eau sont de 1,5 à 2,5 litres par jour (30 mL/kg de poids corporel)^[23].

L'équilibre entre les milieux intra- et extracellulaire s'effectue par des échanges possibles par les membranes cellulaires séparant les secteurs. Les osmolarités entre les deux secteurs sont normalement égales. L'osmolarité extracellulaire est régulée par le métabolisme de l'eau (soif, réabsorption rénale). L'équilibre sodique est régulé par le rein, modulant l'excrétion du sodium, reflet du SIC.

On retrouve en pathologies, différents troubles de l'hydratation ^[24] :

La déshydratation extracellulaire ou déshydratation isotonique (rapport de perte en eau/Na⁺ égal à 1) : la perte de sodium est supérieure aux entrées. Elle est souvent accompagnée d'une perte d'eau, ce qui n'engendre pas de modification du SIC. Les étiologies sont diverses : la déshydratation aiguë est dans 90% des cas due à des pertes d'eau d'origine digestive (diarrhées, vomissements). C'est une perturbation métabolique, notamment très fréquente chez la personne âgée de par les modifications physiologiques liées à l'âge^[25]. Les autres étiologies retrouvées sont

des brûlures, une sudation extrême, un usage de diurétiques, une insuffisance surrénalienne, un diabète sucré, des néphropathies interstitielles... Le traitement s'effectue par l'administration de soluté salé isotonique (chlorure de sodium – NaCl 0,9%).

La déshydratation globale ou déshydratation hypertonique (rapport de perte en eau/Na⁺ supérieur à 1) : une perte en eau et en sodium avec une perte en eau supérieure à la perte en sodium, impactant le SIC. La déshydratation globale est diagnostiquée dans la population lors des grosses canicules. Le traitement consiste à une alternance de NaCl 0,9% et de SGI à 5% (G5%).

La déshydratation intracellulaire : elle provient d'une perte hydrique qui entraîne une hyperosmolarité extracellulaire. L'eau du SIC vient donc vers le SEC par un mouvement compensatoire. On retrouve en étiologie les diabètes insipides centraux et néphrogénique, la polypnée/hyperventilation prolongée... Après traitement étiologique, la prise en charge préconise une administration de G5%.

L'objectif de l'hydratation est de restaurer l'équilibre intra- et extracellulaire. Elle se fait de façon progressive tout en surveillant le rythme cardiaque, la diurèse et le poids (permettant le diagnostic d'œdème) qui sont les symptômes de l'hyperhydratation. Les SGI à 10 et 30% trouvent leur place dans la prise en charge de l'hyperhydratation intracellulaire par leur pouvoir osmotique permettant la sortie d'eau des cellules^[23].

Les SGI de basses concentrations, 2,5 et 5% trouvent leurs places dans la prise en charge de tous les types de déshydratations (intra- et extracellulaire, peu sévère à sévère et en cas de choc) en association avec d'autres solutés de remplissage (ex : NaCl 0,9%). La posologie recommandée chez l'adulte pour le traitement des déplétions en eau et en hydrate de carbone est comprise entre 500 mL et 3 L par 24 heures^[26]. Chez l'enfant et le nourrisson, elle s'adapte en fonction du poids. La posologie sera donc adaptée en fonction de l'indication, du patient, de son état clinique, de ses pathologies associées, de son poids et de son alimentation. Ces SGI s'administrent en perfusion continue par gravité avec un débit ne devant pas

dépasser une dose maximale de 5 mg/kg/min chez l'adulte afin d'éviter l'apparition d'une hyperglycémie.

Les SGI à 5% sont également utilisées dans la prévention des déshydratations. Elles possèdent de nombreux avantages, notamment d'être isotoniques au sang (278 mosm/L). Elles sont utilisées pour des patients nécessitant des restrictions sodiques (insuffisants rénaux, insuffisants cardiaques, hypoglycémie...).

2. Véhicule d'administration

De nombreux médicaments sont administrés par voie IV. En fonction de la concentration nécessaire pour l'administration de la bonne dose d'un médicament injectable, des dilutions pourront être réalisées. Pour cela, les SGI peuvent être utilisées comme solvant de reconstitution et/ou de dilution^[2]. Après vérification de la compatibilité et de la stabilité entre le principe actif et la SGI, la reconstitution et/ou la dilution pourront être réalisées. Les instructions d'utilisation de ces médicaments conditionnent les volumes appropriés pour chaque traitement. Nous retrouvons par exemple dans la catégorie des médicaments injectables^[2], des médicaments couramment utilisés en pratique clinique tels que des antihypertenseurs, des antalgiques mais également des anticancéreux cytotoxiques, des anti-infectieux ou encore des biothérapies (anticorps, biosimilaires)^[27,28]. Parfois, le recours à une SGI est obligatoire (ex : oxaliplatine^[29], amphotéricine^[30,31]).

Pour ces principes actifs, aucune alternative à la dilution et/ou à la reconstitution par des SGI n'est actuellement possible soit par l'absence de données de stabilité physico-chimique, soit par une instabilité ou une stabilité amoindrie avec un autre véhicule d'administration^[2].

3. Source énergétique

Le glucose est un sucre simple, de formule chimique $C_6H_{12}O_6$. Présent dans toutes les cellules vivantes, il est indispensable au fonctionnement cellulaire (nutriment le plus important du catabolisme cellulaire). Chez l'Homme adulte, la glycémie, qui reflète le taux de glucose dans le sang, est normalement comprise entre 0,80 et 1,20 g/L^[32].

Lorsque les apports alimentaires par voie orale ou entérale ne sont pas suffisants pour couvrir les besoins journaliers, la mise en place d'une nutrition parentérale peut s'avérer nécessaire. On retrouve, comme indication à la mise en place d'une nutrition parentérale, des pathologies intestinales avec malabsorption (ex : grêle court, maladie de Crohn), les contre-indications à la nutrition entérale (occlusion intestinale, abcès à point de départ digestif) ou encore une mauvaise tolérance à la nutrition entérale (pneumopathie d'inhalation, diarrhées sévères)^[33,34]. Elle consiste à perfuser des nutriments (glucose, acides aminés, lipides) sous forme de solution ou émulsion injectable adaptée aux besoins du patient. Elle permet de rétablir un bon état nutritionnel et de limiter les états de dénutrition. Outre ces macronutriments, la nutrition parentérale totale au long cours doit apporter des micronutriments (minéraux, oligo-éléments, vitamines).

Les mélanges de nutrition parentérale possèdent le statut de médicament. Ces solutions peuvent être industrielles et possèdent une autorisation de mise sur le marché ou être préparées au sein des pharmacies à usage intérieur (PUI) comme préparation magistrale.

De par leur composition, les mélanges de nutrition parentérale peuvent être classés en deux grands types de mélange ^[33,35] :

- Mélange binaire : solution composée d'un mélange de glucose et d'acides aminés,
- Mélange ternaire : émulsion composée d'un mélange de glucose, d'acides aminés et de lipides apportant des acides gras sous forme de triglycérides.

Les mélanges industriels de nutrition parentérale sont conditionnés dans une poche plastique compartimentée. Ils sont reconstitués de manière stérile juste avant

l'administration au patient. L'administration peut se dérouler en continue ou de manière cyclique (réalisée par paliers)^[34].

Présent dans l'ensemble des mélanges de nutrition parentérale (préparations industrielles ou préparations magistrales), le glucose provient de SGI concentrées (≥ 30 g/100 mL). De fait, des produits de dégradation du glucose sont également présents dans ces mélanges de nutrition parentérale.

4. Le glucose : agent osmotique – solution de dialyse péritonéale

La dialyse péritonéale (DP) est une technique extrarénale utilisée dans l'insuffisance rénale chronique au stade terminal. A ce stade de la pathologie, les reins n'assurent plus leur fonction d'épuration sanguine^[36,37]. Cette technique d'épuration extra-rénale ne concerne que 10% des patients atteints de maladie rénale chronique^[23].

Cette technique utilise le péritoine, membrane semi-perméable comme filtre. Ce dernier est composé de deux feuillets : le pariétal et le viscéral. Entre ces deux feuillets, une cavité est présente : la cavité péritonéale. Elle sera le lieu des échanges entre le liquide de dialyse péritonéale et le sang permettant l'ultra-filtration de liquide et l'épuration de molécules de petites et moyennes tailles, qui sont produites par le catabolisme de l'organisme telles que l'urée, la créatinine et des électrolytes^[38]. Elle permettra en plus de l'élimination de ces molécules, une régularisation de la volémie, de la pression artérielle et du pH sanguin^[37,39]. En revanche, la dialyse ne palie pas les fonctions endocrines rénales.

Pour la réalisation des échanges, une solution appelée dialysat (fluide de dialyse péritonéale) est introduite dans la cavité (environ 2 litres). Ces solutions de dialyse sont composées de solution tampon de lactate ou de bicarbonate, d'électrolytes (sodium, magnésium, calcium...) et d'agent osmotique tel que le glucose^[40]. Les électrolytes et l'agent osmotique interviennent dans les mécanismes d'échange de par leurs propriétés physico-chimiques :

- Les déchets du catabolisme et les électrolytes régulés en temps normal par le rein, vont être éliminés du plasma sanguin vers le dialysat par le principe de

diffusion. En effet, les concentrations dans le dialysat sont inférieures aux concentrations présentes dans le plasma.

- L'eau excédentaire va être attirée par l'agent osmotique permettant de régulariser la surcharge hydrique. Ce processus est le principe d'ultrafiltration. Le glucose en forte concentration entraîne un mouvement d'eau du plasma vers le dialysat. Plus la solution de dialyse est concentrée en glucose et plus le mouvement de l'eau sera important.

Les échanges entre le dialysat et le sang se réalisent pendant 6 heures : il s'agit de la période de stase. Puis la solution usagée, chargée d'eau et des éléments du catabolisme sera éliminée. Un nouveau cycle peut commencer avec 2 nouveaux litres de dialysat^[23]. Cette technique a l'avantage de pouvoir se réaliser à domicile mais une diminution d'efficacité allant jusqu'à la perte d'activité au cours du temps a été constatée^[23].

Différentes concentrations de glucose et différents volumes (de 1,5 à 5 litres) sont mis à disposition permettant de maîtriser l'élimination des liquides. Les concentrations en électrolytes ont été calculées afin de normaliser le taux d'électrolytes plasmatiques^[40]. Elles sont à pH physiologique soit directement si elles sont constituées d'un seul compartiment, soit après mélange si elles sont en bi- ou tri-compartiments^[40]. On classe les solutions de DP en trois catégories en fonction de leur osmolarité calculée d'après **l'équation 1** : solution isotonique au liquide péritonéal (1,26 à 1,5%), solution médiane (2,27 à 2,5%) et solution hypertonique (3,89 à 4,25%)^[9,40-42].

Le glucose joue un rôle essentiel dans la prise en charge de la dialyse péritonéale et permet en plus de réguler la volémie et secondairement la pression artérielle^[23,37].

En repartant des propriétés osmotiques et nutritives du glucose, ce dernier est utilisé en solution à différentes concentrations comme solution d'hydratation et comme véhicule d'administration, mais aussi en mélange comme source énergétique et solution d'épuration. En résumé, les solutions injectables à base de glucose apparaissent incontournables dans la prise en charge thérapeutique des patients, soit pour des raisons médicales soit pour des raisons thérapeutiques. Pour cela elles

sont utilisées quotidiennement dans les unités de soins hospitalières ou pour les soins à domicile. Leur utilisation expose à certains problèmes compte tenu de la présence de produits de dégradation du glucose.

III. Produits de dégradation du glucose

1. Les différents produits de dégradation du glucose

Les PDG proviennent de la dégradation du glucose sous l'influence de nombreux facteurs et sont présents naturellement dans l'organisme humain.

Le glucose est le principal hydrate de carbone de l'organisme humain et permet la production d'énergie par la cellule sous forme d'adénosine triphosphate (ATP). Cette formation d'ATP est associée à la formation d'ion superoxyde dérivant de l'oxygène. L'oxydation du glucose ou glycoxydation, réaction non-enzymatique, entraîne la formation de composés carbonyles instables tels que le 3-déoxyglucosone (3-DG), le 3,4-didéoxyglucosone-3-ène (3,4-DGE), le glyoxal (GO), le méthylglyoxal (MGO)^[24].

A ces quatre PDG s'ajoutent d'autres composés qui ont été également précédemment identifiés dans les fluides de DP^[3,10,12] et dans les SGI^[1,43] : le formaldéhyde, le 5-hydroxyméthylfurfural (5-HMF), le 2-furaldéhyde (2-FA) et l'acétaldéhyde. Les huit PDG cités sont ceux qu'il est possible de quantifier à l'heure actuelle dans les phénomènes de dégradation. Cependant le nombre théorique possible de PDG serait très important, comme le suppose Linden *et al.*^[3].

Parmi les PDG cités précédemment, deux ont attiré notre attention : le 5-HMF, considéré comme un bon marqueur de la dégradation et le 2-FA, produit final d'une seconde voie de dégradation du glucose^[3,43,44].

Ces deux PDG apparaissent dans des conditions de stockage à haute température^[3,45] et lors de la stérilisation selon Ulbricht *et al.*^[46]. La **figure 1** décrit un schéma de formation des PDG sous l'influence de la chaleur.

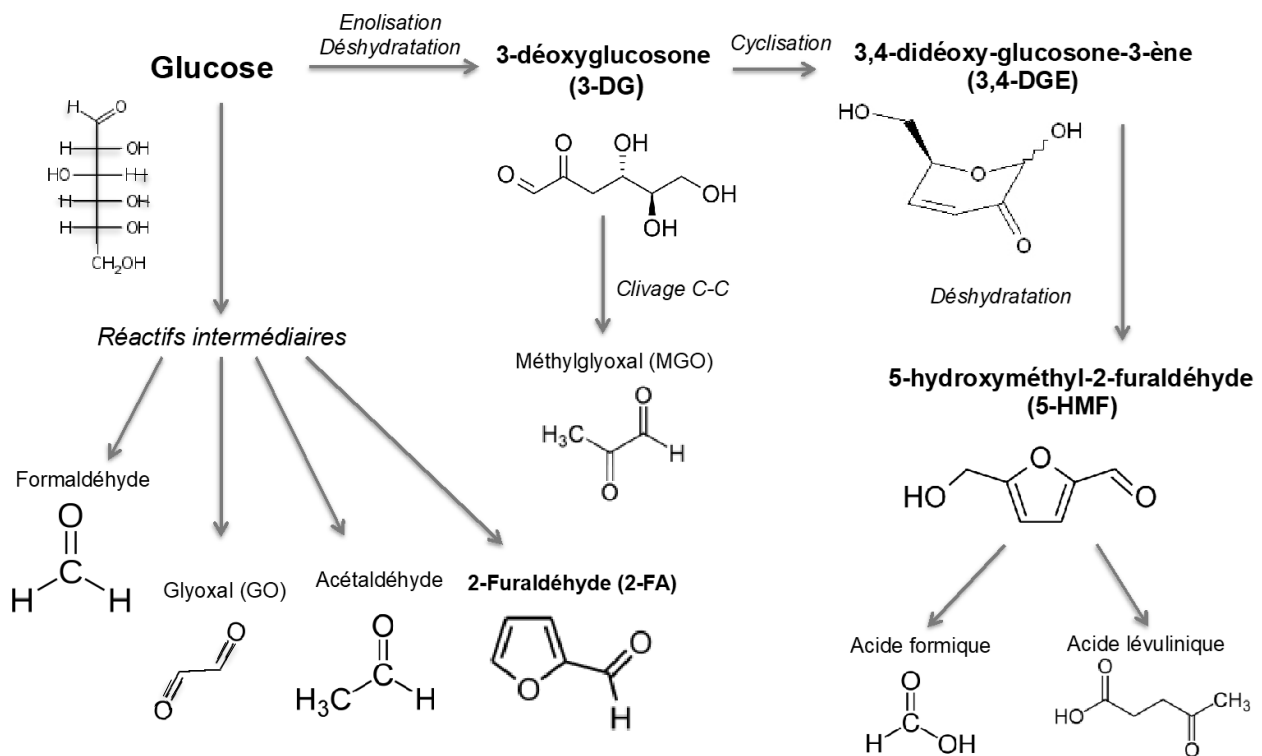


Figure 1 : Schéma de la dégradation du glucose dans des conditions de stockage à hautes températures^[3,45] ou de stérilisation^[46].

2. Voies de formation des PDG

Le glucose est connu pour être une substance promotrice de protéines glyquées. La glycation des protéines est le résultat de la formation d'une liaison covalente entre une fonction aldéhyde $-\text{CH}=\text{O}$ d'un sucre réducteur et une fonction amine libre $-\text{NH}_2$ d'acides aminés (lysine ou arginine)^[42]. C'est une réaction non-enzymatique qui porte le nom de celui qui l'a découverte : Louis Camille Maillard, en 1912^[47]. La réaction de glycation, sensible à l'oxygène, se produit de manière spontanée dans la nature, *in vitro* ou dans l'organisme (i.e. l'hémoglobine glyquée). Les produits issus de cette réaction de glycation, après un réarrangement moléculaire appelé réarrangement d'Amadori forment les produits de glycation avancée (*Advanced Glycation End products*), encore appelés AGEs^[24,48-50]. La **figure 2** décrit la réaction de Maillard à l'origine des AGEs^[48].

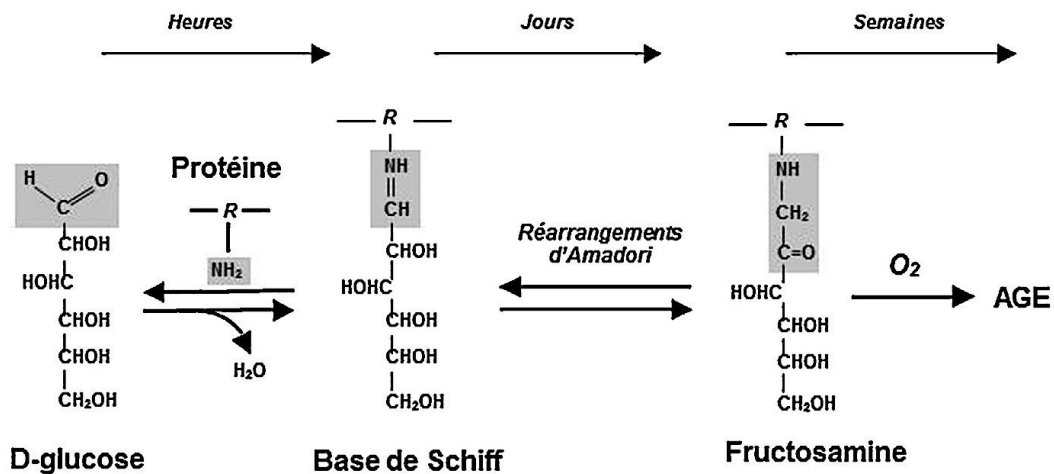


Figure 2 : Réaction de Maillard conduisant à la formation des AGEs (*Advanced Glycation End products*) après fixation d'un sucre, comme le glucose, sur une fonction amine libre -NH₂, d'après Wautier *et al.*^[48].

Ces derniers sont retrouvés dans le plasma et dans les tissus lors d'insuffisance rénale, de diabète et lors du vieillissement^[24]. Cette production d'AGEs se retrouve aussi dans l'alimentation, ce qui a pour conséquence, par exemple, la couleur brune de certains aliments tels que le pain^[51] après la cuisson^[52].

En parallèle de la réaction de Maillard, la réaction entre les PDG produits par l'oxydation du glucose (composés carbonyles instables) et les fonctions amines libres des protéines, est également source d'AGEs. Ainsi les PDG sont reconnus précurseurs d'AGEs^[53,54].

Ainsi, trois voies de dégradation du glucose conduisent à la formation des AGEs : la voie de la glycation (ou réaction de Maillard), la voie des polyols et la voie de la glycoxydation^[24] et dont décrites dans la **figure 3**.

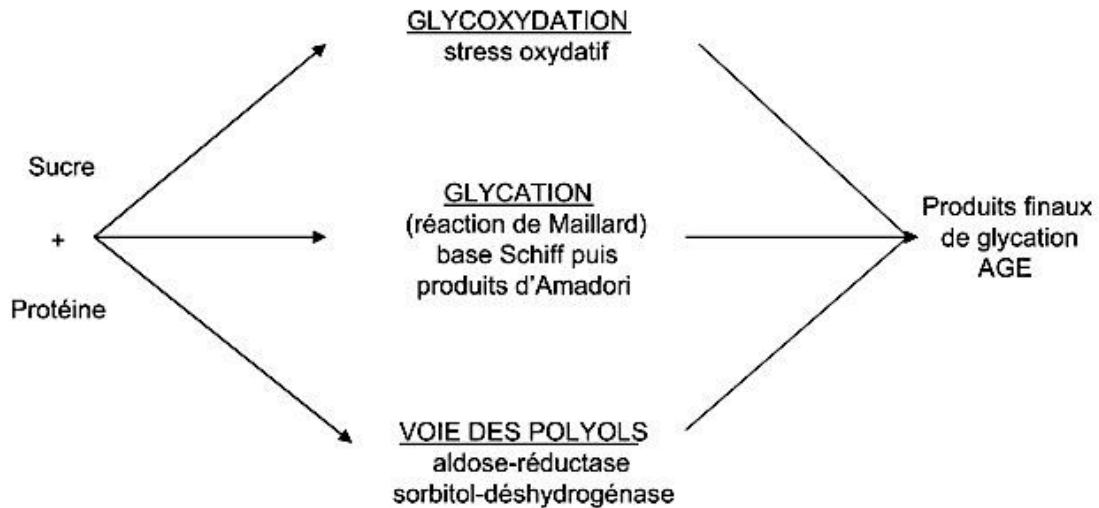


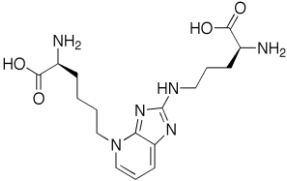
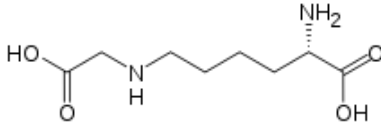
Figure 3 : Voies de formation des AGEs décrites par Boulanger *et al.*^[24]

La voie des polyols est une réaction enzymatique impliquant l'aldose réductase transformant le glucose en sorbitol, puis la sorbitol déshydrogénase intervient pour conduire à la formation d'AGEs.

La glycoxydation, quant à elle, est une réaction non enzymatique conduisant à la formation d'AGEs. Cette réaction est dépendante de la concentration en glucose, du temps et du stress oxydatif^[24].

Les deux AGEs les plus étudiés sont la pentosidine et la carboxyméthyl-lysine (CML)^[55]. Les structures chimiques sont décrites dans le **tableau 1**.

Tableau 1 : Descriptif des deux AGEs les plus étudiés.

Nom des AGEs	Formule chimique	Structure
Pentosidine	$C_{17}H_{26}N_6O_4$	
N(6)-Carboxyméthyl-lysine	$C_8H_{16}N_2O_4$	

Il existe sur de nombreuses cellules et revêtements des récepteurs aux AGEs : les RAGE. Ils font parties de la superfamille des immunoglobulines et sont au nombre de trois : le RAGE, le dominant négatif RAGE (DN-RAGE) et le RAGE sous sa forme soluble (s-RAGE). Seul le RAGE après liaison avec les AGEs active les mécanismes oxydatifs conduisant aux réponses cellulaires après transduction [24]. On retrouve ces trois récepteurs notamment sur les phagocytes, les neurones en développement ainsi que sur les cellules endothéliales et sur les muscles lisses^[56,57].

Les AGEs agissent soit librement, soit par l'intermédiaire de ces récepteurs RAGE.

3. Toxicité

Bien que l'on ne connaisse pas encore précisément les seuils de toxicité de ces produits, il a été montré que de hautes concentrations en PDG et en AGEs avaient un impact sur l'homéostasie cellulaire^[1,13,14].

Concernant le 5-HMF, il est considéré comme un produit irritant par exposition atmosphérique, notamment pour les yeux, le système respiratoire, la peau et les muqueuses^[58]. Le 3-DG, le 3,4-DGE, le GO et le MGO activent la production de

cytokines pro-inflammatoires (ex : IL-6), de facteurs de croissances (VEGF) et altèrent la viabilité cellulaire^[24,36,59].

L'identification de la toxicité des PDG et des AGEs n'est pas évidente *in vivo*. En effet, la réaction de Maillard se produisant spontanément dans l'organisme rend l'évaluation de la toxicité plus délicate par un modèle unique. De plus, les concentrations de ces produits de dégradation dans ces solutions glucosées varient entre 0,1 et 1000 µmol/L selon les PDG incriminés^[1,10,12,60]. Il a été démontré que le PDG le plus bio-réactif était le 3,4-DGE, limitant de ce fait la biocompatibilité^[1,3,13,53] des solutions de DP et des SGI.

Les PDG, précurseurs des AGEs, s'accumulent dans les organes et les tissus interagissant, notamment avec le RAGE, et entraînant de nombreuses réactions cellulaires de type pro-inflammatoire, pro-coagulante et pro-fibrosante qui sont néfastes pour les fonctions cellulaires et tissulaires^[15] et entraînant un vieillissement précoce.

Les AGEs :

- sont notamment impliqués dans le stress oxydatif ^[1,61],
- ont un impact sur le système cardiovasculaire ^[1,16] et sont associés à une augmentation de la morbidité cardiovasculaire ^[17],
- causent la dégradation de cellules mésothéliales et des caractéristiques de la membrane péritonéale ^[62,63],
- ont un impact sur la dégénérescence de la macula, sur la formation de cataracte et de rétinopathie diabétique^[61],
- entraînent une altération de la fonction rénale ^[19] et notamment par des lésions rénales ^[1,12,18],
- ralentissent la cicatrisation des plaies ^[1],
- induisent l'apoptose des leucocytes et des cellules épithéliales rénales ^[64].

Si l'impact des PDG et des AGEs sur les cellules est connu^[1,10,14,36,65], les risques liés à l'administration chronique de solutions thérapeutiques sont, quant à eux inconnus. De plus, leur degré d'interactions chimiques avec les nouveaux médicaments à structure protéique (anticorps, biosimilaires, etc.) est encore mal déterminé, si l'on considère le problème de la glycation avant administration^[27,28].

4. Facteurs influençant la formation des PDG dans les solutions glucosées commercialisées

Certains facteurs ont été précédemment identifiés comme étant des facteurs influençant la dégradation du glucose dans les solutions glucosées : le processus de stérilisation^[5-8] décrit dans le paragraphe précédent, le pH de la solution^[10,11] ainsi que la concentration initiale en glucose^[1,8].

L'Académie Nationale de Pharmacie a émis des recommandations en Janvier 2014 sur l'importance de limiter la formation des PDG et des AGEs^[66]. On retrouve dans le domaine thérapeutique des recommandations sur la stérilisation des SGI. En effet, la stérilisation par la chaleur humide est la technique de référence mais est connue pour être promotrice de PDG^[5,8].

a. Stérilisation et stérilité

i. Définition et recommandation

La Pharmacopée Européenne précise, dans sa définition des solutions destinées à l'administration parentérale, que celles-ci doivent être stériles^[20].

Les SGI sont donc préparées selon des méthodes devant assurer une limpidité, une stérilité et une apyrogénicité. Ces caractéristiques devront être maintenues sur l'ensemble de la période de conservation.

La Pharmacopée Européenne^[4] définit la stérilité comme « *l'absence de microorganismes viables* ». La stérilité est définie comme une probabilité d'absence de micro-organisme viable dans la préparation. Pour quantifier cette probabilité, la Pharmacopée Européenne^[67] a défini un seuil : le niveau d'assurance de la stérilité (NAS). « *Le NAS d'un procédé de stérilisation indique le degré d'assurance avec lequel une population d'articles est rendue stérile par le procédé considéré. Le NAS pour un procédé donné est exprimé comme la probabilité d'occurrence d'un article non stérile dans cette population. Un NAS de 10^{-6} , par exemple, correspond à une*

probabilité d'au plus 1 microorganisme viable pour 1 × 10⁶ unités stérilisées du produit final ». Le NAS attendu par ces procédés de stérilisation est d'au moins 10⁻⁶. Afin d'assurer cette stérilité, la Pharmacopée Européenne recommande une stérilisation terminale, chaque fois que cela est possible. La stérilisation terminale est définie comme une stérilisation du produit dans son conditionnement primaire. Toutefois, si la stérilisation terminale n'est pas utilisable, notamment pour des raisons de stabilité du principe actif, une stérilisation réalisée à l'aide d'un filtre antibactérien de porosité ≤ 0,22 µm ou la réalisation d'une préparation en milieu aseptique sont possibles.

Différentes méthodes de stérilisation terminale sont décrites dans la Pharmacopée Européenne :

- La chaleur humide,
- La chaleur sèche,
- L'irradiation ionisante,
- Les gaz.

Pour les solutions industrielles destinées au domaine hospitalier, la stérilisation terminale la plus couramment utilisée est la stérilisation par la chaleur humide. En revanche, lorsque les médicaments, sous forme de préparations magistrales ou hospitalières, sont préparés au sein des PUI, la préparation en milieu aseptique est la technique couramment choisie (notamment de par le matériel et les locaux disponibles).

Les trois autres méthodes de stérilisation terminale sont réservées à la stérilisation des dispositifs médicaux et sont peu appliquées aux médicaments. On retrouve la stérilisation par irradiation ionisante, par les gaz (ex : oxyde d'éthylène).

La stérilisation par la chaleur sèche, dite Poupinel, n'est plus autorisée. En effet, les Bonnes Pratiques de Pharmacie Hospitalière (BPPH) publiées par l'arrêté du 22 Juin 2001^[68] opposables aux PUI par le décret n°2000-1316 publié le 26 Décembre 2000^[69] indiquent «*Chaque fois que possible, la stérilisation à 134°C et pendant 18 minutes, est utilisée. L'utilisation de la chaleur sèche est proscrite.* »^[70]

ii. Méthode de stérilisation appliquée aux solutions glucosées injectables

La technique la plus couramment utilisée dans l'industrie pour la stérilisation des SGI est la stérilisation terminale par la chaleur humide sous pression, répondant aux recommandations de la Pharmacopée Européenne^[4]. Afin de minimiser la charge microbienne, il est important d'utiliser des matières premières avec un niveau faible de contamination microbienne, comme préconisé dans le référentiel en vigueur en France pour les laboratoires pharmaceutiques : les Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF)^[71].

La stérilisation par la chaleur humide s'appuie sur trois paramètres, qui sont à prendre en compte lors d'un cycle de stérilisation : la température du plateau (T), la durée du cycle (t) et la pression. Ces trois paramètres permettent la formation de la vapeur saturée qui jouera le rôle d'agent stérilisant.

L'effet stérilisant est jugé par le F_0 , exprimant la létalité d'un procédé de stérilisation (en unité de temps). « *La valeur F_0 associée à un procédé de stérilisation par la vapeur saturée exprime sa létalité, en termes de temps (en minutes) d'exposition à une température de 121°C qui serait nécessaire pour obtenir le même résultat qu'avec le procédé utilisé, appliqué au produit dans son récipient final, par rapport à des microorganismes possédant une valeur Z théorique de 10* »^[67]. La valeur Z est définie comme la résistance d'un microorganisme aux variations de température.

La valeur stérilisatrice F_0 est définie comme la somme des effets stérilisants par unité de temps sur toute la durée de la phase déclarée comme stérilisante dans un cycle de stérilisation^[5,67]. Elle permet de mesurer l'efficacité thermique du procédé de stérilisation. Pour un même F_0 , plusieurs combinaisons de température et de temps sont possibles.

Le principe de la stérilisation par la chaleur humide se base sur le fait que la plupart des microorganismes se reproduisent à l'état végétatif entre -5°C et +80°C^[70]. La vapeur saturée entraîne des modifications de la perméabilité des membranes et l'hydrolyse partielle des chaînes peptidiques des micro-organismes^[70].

La stérilisation par la chaleur est connue pour avoir un impact sur la dégradation du glucose^[1,5,7-9,72,73]. Effectivement, un grand nombre de produits de dégradation et/ou d'oxydation du glucose (PDG) est généré après exposition des solutions glucosées à la chaleur. Une étude ancienne portant sur l'impact de la température menée par Postaire *et al.* semble montrer que plus la température est importante et plus la génération des produits de dégradation est conséquente^[8]. En effet, la dégradation du glucose, exprimée en %, passe de 3,4 à 8,62% pour une température de 110°C à 134°C pour une solution de glucose à 50%. Mais la température n'est pas le seul facteur dans le cycle de stérilisation. La durée du cycle a également son importance. Les concentrations en 5-HMF varient de 2,46 à 40,01 mg/L pour des durées de cycles de 30 à 60 min, respectivement (température du cycle fixée à 120°C)^[8].

Cook *et al.*^[5] quant à eux, ont étudié différents couples temps/température : cinq températures différentes (115, 117, 119, 121 and 124°C) et cinq F_0 (8, 10, 12, 14 et 16), soit vingt-cinq combinaisons possibles. Les durées de cycle équivalentes sont comprises entre 4 minutes et 63 minutes. Ils démontrent qu'il serait préférable de travailler à une température plus élevée mais avec une durée de cycle le plus court possible dont la combinaison maintient la stérilité des solutions et permet de limiter la formation du 5-HMF. En effet, les concentrations en 5-HMF sont de 0,4 mg/L pour un cycle de 8 minutes à 124°C et de 2,2 mg/L pour un cycle de 64 minutes à 115°C.^[5] Ces deux cycles ont un effet stérilisant F_0 de 16.

b. Concentration en glucose

La concentration en glucose joue un rôle important dans la formation des PDG^[1,8]. Postaire *et al.* comparent trois solutions glucosées à 10, 30 et 50%. Les résultats montrent des concentrations en 5-HMF de 8,34 mg/L, de 23,79 mg/L et de 36,70 mg/L pour le glucose 10, 30 et 50% respectivement^[8]. Bryland *et al.* ont étudié les concentrations en 5-HMF dans les solutions de DP de concentration en glucose comprise entre de 2,5 et 30 g/100mL. Les concentrations en 5-HMF varient de 2 à 146 μ M, soit de 0,25 à 18,03 mg/L^[1]. Boulanger *et al.* ont résumé les concentrations en 5-HMF et en 2-FA dans les solutions de DP. Pour des concentrations en glucose

de 1,5 à 4,5 g/100mL, les concentrations en 5-HMF varient de 0,76 mg/L à 3,78 mg/L respectivement et les concentrations en 2-FA de 4,80 µg/L à 192,16 µg/L^[42].

Ces études démontrent le lien prévisible entre une concentration initiale en glucose plus élevée et l'apparition de PDG à des concentrations supérieures.

c. Conditions de stockage

Les études portant sur l'impact de la stérilisation démontrent l'importance de la température et du temps de stérilisation dans la formation des PDG, comme le démontrent les travaux de Cook *et al.*^[5] précédemment exposés. Mais qu'en est-il de la température et du temps de stockage de l'ensemble des SGI utilisées massivement à l'hôpital ? Les conditions de stockage sont variables d'une région à une autre, d'une saison à l'autre, d'un établissement de santé à un autre (structure, locaux climatisés...) et au sein d'une même PUI (organisation de l'espace de stockage...).

Dans la littérature quelques travaux mentionnent l'impact du stockage sur la formation des PDG^[3,9], et plus précisément l'impact de la température. Kjellstrand *et al.* ont étudié l'influence de la température (entre -20°C et 40°C) sur la formation de PDG sur une période de 2 ans et ont conclu par une recommandation de stockage de préférence inférieure à 20°C^[9].

Erixon *et al.*^[74,75] ont analysé des solutions de DP conservées à 25, 40°C et 60°C pendant 21 et 30 jours. Les concentrations en 5-HMF étaient stables durant 1 mois (14 µmol/L) lors d'un stockage à 25°C. Une augmentation des concentrations en 5-HMF jusqu'à 7 fois plus importante a été démontrée pour des températures supérieures. Pour montrer l'impact d'une haute température, ils ont travaillé sur des solutions conservées à température ambiante pendant deux mois et lors de l'analyse, en parallèle la solution analysée a été placée à 60°C pendant une journée^[76]. Une augmentation des concentrations a été observée lorsque le stockage subit une augmentation rapide de température sur une courte durée (1 jour).

Ces études semblent montrer que les conditions de stockage jouent un rôle dans la dégradation du glucose. Selon toute vraisemblance, plus le stockage est long et à haute température et plus la génération de PDG est conséquente.

Si plusieurs facteurs ont été préalablement identifiés comme influençant la dégradation du glucose, tels que la concentration en glucose^[1,8] le pH de la solution^[10,11], ou encore les conditions de stockage^[3,9], d'autres facteurs pourraient jouer un rôle comme le conditionnement primaire ou encore la perméabilité à l'oxygène puisque la formation des PDG est dépendante de l'oxygène^[42].

IV. Objectifs

Les données disponibles sur l'impact des PDG présents dans les SGI^[1,8,43,44], notamment sur la toxicité intrinsèque lors d'une administration chronique^[46] et sur leur impact sur les médicaments dilués par des SGI tels que les médicaments à structure protéique (oxydation et glycosylation du principe actif)^[27,28] sont moins nombreuses que celles disponibles sur les solutions de DP.

Les travaux retrouvés dans la littérature démontrent une hétérogénéité de l'exposition des patients aux PDG selon les SGI utilisées. Il semble nécessaire de limiter la formation de ces PDG à la vue de leur toxicité par la maîtrise des facteurs contribuant à leur formation.

La première partie de ce travail consiste, dans un premier temps, à identifier et quantifier deux PDG reconnus comme étant des marqueurs de dégradation du glucose [3,43,44] - le 5-HMF et le 2-FA - dans les SGI présentes sur marché français. Pour cela, une méthode de chromatographie liquide haute performance (CLHP) couplée à une détection dans l'ultraviolet (UV) a été validée. Puis dans un second temps, après analyse des facteurs influençant la formation des PDG, l'objectif a été de construire un modèle intégrant l'ensemble des paramètres définis.

La deuxième partie de ce travail porte sur l'influence des conditions de stérilisation, étape incontournable dans le processus de fabrication des SGI, sur la génération de PDG. L'analyse statistique des différents paramètres permet d'élaborer un modèle cinétique de la dégradation du glucose et de la formation des 5-HMF et 2-FA, tenant compte de l'ensemble des facteurs influents.

PARTIE II. IDENTIFICATION ET QUANTIFICATION DES PDG – ANALYSES DES FACTEURS INFLUENÇANT LA FORMATION DES PDG

I. Introduction

Comme annoncé précédemment, les SGI sont commercialisées sur le marché français avec des concentrations allant de 2,5% jusqu'à 70% dans divers conditionnements primaires : poches souples, flacons semi-rigides ainsi que des flacons en verre. Divers matériaux tels que du verre ou des polymères plastiques composent ces conditionnements.

Les recommandations de l'Académie Nationale de Pharmacie portant sur l'importance de limiter la formation des PDG tend à chercher l'ensemble des facteurs jouant un rôle dans la dégradation du glucose et à les optimiser^[66]. L'identification de ces facteurs impactant la dégradation du glucose commence par la détection et la quantification des PDG.

Le choix de la méthode de dosage et de la détection se réalise après analyse des caractéristiques physico-chimiques des molécules d'intérêt. De nombreuses méthodes analytiques permettant de doser les PDG par chromatographie liquide haute performance, couplée à une détection en ultraviolet (CLHP-UV) ont été décrites^[3,5,10,43,44].

Cependant, la détection de certains PDG en UV peut être complexe de par l'absence de groupement chromophore sur leur structure. Pour cela, une des techniques analytiques utilisables est la méthode de dérivation chimique qui consiste à greffer sur les molécules d'intérêt des groupements chromophores. Dans la littérature, l'utilisation du O-Phénylènediamine (O-Phe) comme agent dérivant est décrite^[12]. Cette méthode nécessite une quantité 4 fois importantes (ratio molaire) d'agent dérivant que de composé à doser. La détection se fait alors à 235 nm. Une autre méthode de dérivation a également été testée, portant notamment sur le 3-DG, le GO et le MGO. Elle utilise comme agent dérivant : le 2,3-diaminonaphtalène^[10,60].

Les méthodes de dosage par CLHP-UV sont diverses et variées. Tomo *et al.* ont travaillé avec une détection UV pour identifier et quantifier le 3-DG, le 5-HMF et le 2-FA. Leur travail porte également sur la quantification du MGO, du GO, du formaldéhyde et de l'acétaldéhyde. L'étude de ces quatre PDG a nécessité une étape de dérivation par le 2,4-DNPH. Les LDQ sont de 0,21 μM pour le 5-HMF, de 0,11 μM pour le MGO et le GO et de 0,5 μM pour l'acétaldéhyde. Pour le 2-FA, le 3-DG et le formaldéhyde, les LDQ n'ont pas été communiquées^[10].

L'équipe de Kjellstrand *et al.* a, quant à elle, travaillé sur le 3-DG, le 5-HMF, l'acétaldéhyde et le formaldéhyde^[11]. Une technique de dérivation a été nécessaire pour le 3-DG, l'acétaldéhyde et le formaldéhyde. L'agent dérivant utilisé est le 2,4-DNPH. Les LDQ et les LDD n'ont pas été communiquées^[11]. Le **tableau 2** décrit un ensemble de méthodes CLHP-UV retrouvées dans la littérature.

Tableau 2 : Méthodes CLHP-UV d'identification et quantification des PDG décrites dans la littérature. NC : non communiqué.
 2-FA : 2-furaldéhyde, 3-DG : 3-déoxyglucosone, 3,4-DGE : 3,4-didéoxyglucosone-3-ène, 5-HMF : 5-hydroxyméthylfurfural, AA : Acétaldéhyde, GO : Glyoxal, MGO : Méthylglyoxal, 2,4-DNPH : 2,4-Dinitrophénylhydrazine. CLHP-UV : chromatographie liquide haute performance - détection Ultra Violet. LDQ : Limite De Quantification, LDD : Limite De Détection. NC : Non Communiqué

Références	PDG étudiés	Méthode	Détection	Dérivation	LDQ	LDD	Gamme de validation
Cook et al. ^[5]	5-HMF 2-FA (étalon interne)	CLHP-UV	UV (283 nm)	Non	NC	NC	5-HMF : 1-5 µg/mL 2FA : 8745 µg/mL
Postaire et al. ^[8]	5-HMF Pyrazinamide (étalon interne)	CLHP-UV	UV (284 nm)	Non	NC	NC	5-HMF : 0,480-5,76 µg/mL Pyrazinamide : 1mg/mL
Tomo et al. ^[10]	3,4-DGE 5-HMF 2-FA	CLHP-UV	UV (284 nm) 5-HMF et 2-FA UV (360 nm) 3,4-DGE	Non	3,4-DGE : NC 5-HMF : 0,21 µM 2-FA : NC	NC	NC
Tomo et al. ^[10]	MGO GO 3-DG AA Formaldéhyde	CLHP-UV	UV (360 nm)	2,4-DNPH	MGO : 0,11 µM GO : 0,11 µM 3-DG : NC AA : 0,5 µM FO : NC	NC	NC
Bryland et al. ^[1]	3-DG 3,4-DGE 5-HMF Formaldéhyde MGO AA GO	CLHP-UV	NC	Non	NC	3-DG : NC 3,4-DGE : NC 5-HMF : NC FO : NC MGO : 1,0 µM AA : 1,1 µM GO : 3,4 µM	3-DG : 123 - 790 µM 3,4-DGE : 22 - 59 µM 5-HMF : 2 - 146 µM FO : 4 - 34 µM MGO : 7 - 17 µM AA : NC GO : NC
Kjellstrand et al. ^[11]	5-HMF	CLHP-UV	UV (284 nm)	Non	NC	NC	5-HMF : 7 - 309 mM
Kjellstrand et al. ^[11]	3-DG AA Formaldéhyde	CLHP-UV	UV (228 nm)	2,4-DNPH	NC	NC	3-DG : 5 - 163 mM AA : 1,1 - 5,7 mM FO : 1,3 - 13 mM
Linden et al. ^[41]	3,4-DGE	CLHP-UV	UV (228 nm)	Non	NC	3,4-DGE : 0,07 µM	3,4-DGE : 0,3 - 18,3 µM

La détection UV n'est pas universelle et elle se limite aux PDG porteurs de groupements chromophores, avec la possibilité d'extension par dérivation.

D'autres détecteurs ont été utilisés, notamment pour identifier et quantifier un nombre plus important de PDG. La chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse (i.e. LC-MS) en fait partie. Pour améliorer la spécificité et/ou augmenter l'ionisation permettant d'augmenter l'intensité du signal, la dérivation peut être réalisée, notamment pour les molécules d'intérêt de faible poids moléculaire.

Le **tableau 3** décrit les méthodes utilisant la LC-MS retrouvées dans la littérature^[12,77-80]. Frischmann *et al.* ont utilisé la dérivation par O-Phe pour la détection du 3-DG, du 3,4-DGE, du 5-HMF, du 2-FA, du MGO, du GO, du formaldéhyde et de l'acétaldéhyde. Les LDQ n'ont pas été communiquées. Les LDD sont de 2,4 µM, de 1,0 µM, de 3,3 µM, de 1,4 µM, de 2,3 µM et de 1,7 µM pour le 3,4-DGE, le 2-FA, le formaldéhyde, le MGO, l'acétaldéhyde et le GO respectivement. Pour le 3,-DG et le 5-HMF, les LDD n'ont pas été communiquées.

D'autres méthodes en chromatographie liquide sont décrites, utilisant une double détection UV et MS ^[79-81]. L'équipe de Mittelmaier *et al.* a travaillé sur des solutions de DP industrielles. Ils ont identifié et quantifié le 3-DG, le 3,4-DGE, le GO et le MGO. Une dérivation a été nécessaire. Les LDQ vont de 0,40 à 0,57 µM et les LDD de 0,13 µM à 0,19 µM.

Tableau 3 : Méthodes LC-MS d'identification et quantification des PDG décrites dans la littérature. 2-FA : 2-furaldéhyde, 3-DG : 3-déoxyglucosone, 3,4-DGE : 3,4-didéoxyglucosone-3-ène, 5-HMF : 5-hydroxyméthylfurfural, AA : Acétaldéhyde, GO : Glyoxal, MGO : Méthylglyoxal, DMPD : 4,5-diméthyl-1,2-phénylènediamine. LDQ : Limite De Quantification, LDD : Limite De Détection. NC : Non Communiqué

Références	PDG	Détection	Dérivation	LDQ	LDD	Gamme de validation	Milieu étudié
Min et al. [77]	3-DG MGO GO	TOF-MS - source d'ionisation : + 3000 V - Gaz pour évaporation des solvants : 300°C - Energie de collision : NC	DMPD : 4,5-diméthyl-1,2-phénylènediamine		3-DG = 0,75 nM MGO = 2,5 nM GO = 12,5 nM	3-DG : 0,25 – 2 µM MGO : 0,25 – 0,75 µM GO : 0,25 – 2 µM	Ongle
Mittelmaier et al. [79]	Glucosone 3-DG 3,4-DGE GO MGO	UV (316 nm) SM : - source d'ionisation : NC - Gaz pour évaporation des solvants : nitrogen / 700°C - Energie de collision : 30 eV	o-phénylènediamine	De 0,40 à 0,57 µM	De 0,13 à 0,19 µM	0,05 – 2 µM	Poche commerciale DP : 1,5%, 2,3% et 4,25%
Mittelmaier et al. [78]	Glucose Glucosone 3-DG 3,4-DGE MGO GO	UV () SM : - source d'ionisation : + 5500 V - Gaz pour évaporation des solvants : nitrogen / 500°C - Energie de collision : 30 eV	o-phenylenediamine	NC	NC	NC	Solution de peptide

Frischmann et al. ^[12]	3-DG 3,4-DGE 5-HMF 2-FA FO MGO AA GO	UV (316 nm) SM : - source d'ionisation : + 5000 V - Gaz pour évaporation des solvants : nitrogen / 400°C - Energie de collision : 20 eV	o-phenylenediamine	NC	3-DG : NC 3,4-DGE : 2,4 µM 5-HMF : NC 2-FA : 1,0 µM FO : 3,3 µM MGO : 1,4 µM AA : 2,3 µM GO : 1,7 µM	3-DG : 7,5 – 266,8 µM 3,4-DGE : 7,5 – 18,1 µM 5-HMF : 2,9 – 69,4 µM 2-FA : 1,1 – 3,1 µM FO : 3,4 – 8,5 µM MGO : 5,2 – 9,9 µM AA : 3,2 – 170,9 µM GO : 1,7 – 9,0 µM	Poches commerciales de solution de DP : de 1,36% à 50%
Mittelmanier et al. ^[80]	glucosone	UV (316 nm) SM : - source d'ionisation : + 1500 V - Gaz pour évaporation des solvants : nitrogen / 500°C - Energie de collision : 70 eV	o-phenylenediamine	Glucosone : 1,1 µM	Glucosone : 0,6 µM		Solution DP

Le 5-HMF ^[43,44] et le 2-FA ^[41,45,46] ont retenu notre attention d'une part, par leur position dans la synthèse des PDG (**figure 1**) qui permet de refléter la dégradation générale du glucose et d'autre part, par les données de la littérature sur leur présence dans les SGI et dans les fluides de DP, ces dernières données étant les plus abondantes^[10,41]. De plus, la présence de groupements chromophores sur ces deux PDG permet d'éviter les étapes de dérivation complexes.

Le premier objectif de cette étude est la validation d'une méthode de dosage par CLHP-UV permettant l'identification et la quantification du 5-HMF et du 2-FA dans les SGI présentes sur le marché français.

Le second objectif sera de construire un modèle cinétique intégrant les paramètres impactant la dégradation du glucose définis lors de l'analyse du marché français.

II. Matériels et Méthodes

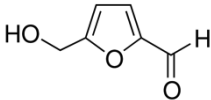
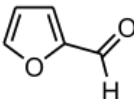
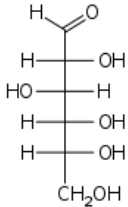
A. Caractérisation et quantification des PDG par CLHP-UV

1. Produits chimiques et consommables

a. Réactifs

Les deux PDG étudiés, le 5-HMF, de pureté à 97% et le 2-FA, de pureté à 98% ainsi que le dihydrogénophosphate de potassium proviennent tous trois de VWR International S.A.S (Fontenay-sous-Bois, France) et sont de qualité pour analyses. Le glucose utilisé pour la réalisation des solutions est un glucose anhydre obtenu chez Inresa (Bartenheim, France). Leurs caractéristiques sont résumées dans le **tableau 4**.

Tableau 4 : Caractéristiques du glucose et des PDG utilisés. CAS : *Chemical Abstract Service* ; MM : masse molaire.

Nom	Identifiants	Formules moléculaires	
5-HydroxyMethyl- 2-Furaldehyde (5-HMF)	CAS : 67-47-0	C ₆ H ₆ O ₃	
	Lot : 10189124		
	Réf : 12475.06		
	MM : 126,11 g/mol		
2-Furaldehyde (2-FA)	CAS : 98-01-1	C ₅ H ₄ O ₂	
	Lot : N17B034		
	Réf : 16167.30		
	MM : 96,09 g/mol		
Glucose	CAS : 50-99-7	C ₆ H ₁₂ O ₆	
	Lot : 15329001		
	Réf : 50997-1		
	MM : 180,16 g/mol		

a. Solvants

Le méthanol (HiPerSolv Chromanorm[®] gradient grade, VWR International S.A.S, Fontenay-sous-bois, France) utilisé pour les analyses chromatographiques est de qualité CLHP. L'acide acétique glacial 100% provient de VWR International S.A.S (Fontenay-sous-bois, France). De l'eau ultra-pure, utilisée pour la phase mobile et la réalisation des échantillons, a été obtenue par un système *UHQ pure water system* (Elga, Wasquehal, France).

b. Matériels

La verrerie utilisée se compose de fioles jaugées de 5 mL à 5 L, de béchers et de tubes à essais de 5 à 20 mL. Elle est de classe A (VWR International S.A.S, Fontenay-sous-Bois, France). Les pointes de micropipette (Eppendorf® lorention) et les microtubes de centrifugation proviennent d'Eppendorf® France S.A.S (Montesson, France). Les micropipettes utilisées sont de la gamme Biohit de chez Gilson® (Villiers le Bel, France). Les intervalles de volume utilisés sont de 10 – 100 µL, de 10 – 100 µL, de 20 – 200 µL, de 100 – 1 000 µL et de 1 000 – 5 000 µL.

2. Chaîne chromatographique

Les deux composés ont été dosés avec un système de CLHP-UV (Shimadzu®, Marne la Vallée, France) piloté par le logiciel Labsolution® de Shimadzu®. Le système de CLHP-UV se compose d'une double pompe à solvant (SIL-20AD XR), d'un passeur automatique d'échantillons (SIL-20AC XR) équipé d'une boucle d'injection de 100 µL, d'un four (CTO-20AC) et d'un détecteur à barrette de diodes DAD (SPD-M20A).

3. Conditions chromatographiques

La colonne utilisée pour la méthode de dosage est une colonne Alltech Apollo™ C18, 5µm, 150 × 4,6 mm I.D (Fisher Scientific, Illkirch, France). Celle-ci est thermostatée à 25°C.

La phase mobile est composée d'un mélange (10/90 v/v) de méthanol et d'un tampon phosphate 0,011 M, pH 2,95. Celui-ci est préparé à partir de dihydrogénophosphate de potassium (1,95 g pour 1 litre) et le pH est ajusté avec de l'acide acétique glacial. Le débit de la phase mobile est fixé à 2mL/min, en mode isocratique avec une durée d'analyse de 7 min. La longueur d'onde de détection et d'analyse des deux PDG a été fixée à 284 nm, conformément à la littérature^[60].

Afin de déterminer le temps de rétention (t_R) des deux PDG, des solutions témoins de 5-HMF et de 2-FA ont été injectées individuellement. La qualité de la séparation chromatographique de ces deux composés a été évaluée par la résolution (R_s), calculée après injection d'une solution contenant les deux composés en mélange (**équation 2**). Cette équation utilise la méthode des demi-hauteurs selon les standards de la Conférence Internationale d'Harmonisation des exigences techniques pour l'enregistrement des médicaments à usage humain (ICH)^[82] :

$$R_s = \frac{2 \times (t_{2-FA} - t_{5-HMF})}{1,7 \times (W_{0,5,5-HMF} + W_{0,5,2-FA})} \quad \text{éq. 2}$$

Où t_{5-HMF} et t_{2-FA} sont les t_R du 5-HMF et du 2-FA, respectivement et $W_{0,5, 5-HMF}$ et $W_{0,5, 2-FA}$ sont les largeurs maximales à mi-hauteur des pics respectifs.

Dans nos conditions chromatographiques, la résolution a été évaluée à 6,5 soit bien supérieure à 1,5, valeur limite généralement acceptée.

4. Préparation des solutions échantillons

En s'appuyant sur les données de la littérature et de tests préliminaires, les gammes d'étalonnage des PDG ont été définies^[1,10]. Ces gammes ont été réalisées à partir de solutions mères (SM) de concentration 1 000 mg/L, soit 8 mM et 10 000 mg/L, soit 104 mM pour le 5-HMF et 2-FA, respectivement. Le **tableau 5** décrit la préparation des solutions mères.

Tableau 5 : Préparation des solutions mères de 5-HMF. (8 mM, équivalent à 1 000 mg/L) et de 2-FA (104 mM, équivalent à 10 000 mg/L)

PDG	Pesée (mg)	Volume prélevé (µL)	Fiole de mélange (mL)	Concentrations (mg/L)	Concentrations (mM)
5-HMF (97%)	103,1	-	100	1 000	8
2-FA (98%)	-	88	10	10 000	104

Les solutions des gammes d'étalonnage ont été préparées par dilutions des solutions mères initialement préparées. Au final, les gammes s'étendaient de 25 à 2000 µg/L (soit de 198 à 15 859 nM) pour le 5-HMF et de 5 à 250 µg/L (soit de 52 à 2602 nM) pour le 2-FA (**tableau 6**).

Ces gammes ont été préparées six fois, à partir de trois SM différentes de chacun des PDG, sur trois jours selon les recommandations de la Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques (SFSTP)^[83,84] (**figure 4**). Chaque solution fille est analysée trois fois.

Tableau 6 : Concentrations des PDG dans les solutions filles utilisées lors de la validation de la méthode de dosage (en nM).

	SF1	SF2	SF3	SF4	SF5	SF6	SF7	SF8	SF9	SF10	SF11	SF12
5- HMF	198	396	793	1 189	1 586	3 965	4 956	5 947	6 938	7 930	9 912	15 859
2-FA	52	104	520	650	781	911	1 041	1 301	2081	2 602	X	X

	Jour 1						Jour 2						Jour 3					
SM 5-HMF	x						x						x					
SM 2-FA	x						x						x					
SF (12)	x			x			x			x			x			x		
Répétition	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x

Figure 4 : Protocole de validation de la gamme de dosage sur trois jours.

5. Validation de la méthode analytique

Différents paramètres de validation ont été déterminés : spécificité, linéarité, précision, limites de détection (LDD) et limites de quantification (LDQ). Pour valider statistiquement la méthode de dosage, une analyse de variance (ANOVA) à un facteur a été réalisée. Pour cela, la méthode statistique de validation débute par un test de Cochran permettant de vérifier l'homogénéité des variances entre les groupes. Puis la régression linéaire est déterminée si les conditions d'homogénéité de variances sont respectées. Si le modèle linéaire n'apparaît pas adapté par l'ANOVA alors que les données expérimentales semblent attester du contraire, un test d'ajustement du polynôme d'ordre 2 sera appliqué aux données expérimentales de type (**équation 3**) :

$$Y = \alpha + \beta_1 x + \beta_2 x^2$$

éq. 3

Les paramètres α , β_1 , β_2 sont calculés pour chaque série et pour chaque PDG. Le but étant de montrer que le paramètre β_2 est non significativement différent de 0 à l'aide d'un test de Student (5 ddl, $\alpha = 5\%$). Les paramètres de la régression seront ensuite calculés : β_1 , la pente et α , l'ordonnée à l'origine.

Dans un deuxième temps, afin de vérifier que cette méthode est bien adaptée à la mesure de nos concentrations, une droite sera réalisée pour démontrer la justesse

de la méthode d'étalonnage. Elle permet de vérifier la linéarité de la méthode dosage sur l'ensemble de la gamme.

Enfin, dans un troisième temps, l'exactitude de la méthode sera validée par le diagramme de recouvrement. Les biais relatifs ne devront pas être supérieurs à $\pm 10\%$ pour conclure à l'exactitude de la méthode.

La limite de détection (LDD) est la plus petite concentration que l'on peut détecter mais non quantifier. Pour la calculer, la méthode utilisée est basée sur l'écart-type de l'ordonnée à zéro (**équation 4**)^[82] :

$$Y_{LDD} = \alpha + 3\sigma_{\alpha} \quad \text{éq. 4}$$

où σ_{α} est l'écart-type de l'ordonnée à l'origine du modèle et Y_{LDD} le signal minimal détectable. On en déduit **l'équation 5**, d'après **l'équation 4** et à l'aide des paramètres de régression (β_1 , la pente et α , l'ordonnée à l'origine), qui nous permet de trouver X_{LDD} , concentration minimale détectable :

$$X_{LDD} = \frac{\alpha + 3\sigma_{\alpha}}{\beta_1} \quad \text{éq. 5}$$

La limite de quantification (LDQ) est la plus petite concentration que l'on peut quantifier. Pour la calculer, la méthode utilisée est également basée sur l'écart-type de l'ordonnée à zéro (**équation 6**) :

$$Y_{LDQ} = \alpha + 10\sigma_{\alpha} \quad \text{éq. 6}$$

où σ_α est l'écart-type de l'ordonnée à l'origine du modèle et Y_{LDQ} , le signal minimal quantifiable. On en déduit, comme précédemment, l'**équation 7** qui nous permet de trouver X_{LDQ} , concentration minimale quantifiable :

$$X_{LDD} = \frac{\alpha + 10\sigma_\alpha}{\beta_1} \quad \text{éq. 7}$$

La dernière étape consiste à démontrer que sur la plage de concentrations d'intérêt, la méthode est fidèle. La fidélité sera évaluée à partir des coefficients de variations des concentrations recalculées lors des essais de répétabilité (intra-jour) et de fidélité intermédiaire (inter-jour). Le nombre de niveaux de concentration est de 3.

B. Analyse des facteurs influençant la formation des PDG

1. Analyse des solutions glucosées sur le marché français

a. Descriptif des solutions glucosées sur le marché français

L'analyse du marché français porte sur 84 solutions provenant de 5 fabricants différents : Baxter, Lavoisier, MacoPharma, BBraun et Fresenius ; avec 8 concentrations (2,5, 5, 10, 15, 20, 30, 50 and 70 g/100 mL), 6 volumes (50, 100, 125, 250, 500 and 1000 mL) et dans 3 types de contenants : poches souples, flacons semi-rigides appelés Ecoflac et flacons verres. Six matériaux différents ont été répertoriés : polychlorure de vinyle (PVC), polyéthylène (PE), polypropylène (PP), multicouches PP-PE, et multicouches PP-polyamide (PA)-PE et du verre ont été utilisés comme matières premières dans la fabrication des contenants.

La conservation des SGI varie de 4 à 61 mois à température ambiante. Le stockage s'est réalisé dans des boîtes en carton industrielles, dans l'entrepôt de la pharmacie du Centre Hospitalier Universitaire de Lille, situé au sous-sol du bâtiment. Le détail de chaque solution testée est présenté dans le **tableau 7**.

Tableau 7 : Description des solutions glucosées du marché français étudiées.

Tous les fournisseurs ont confirmé utiliser la stérilisation par la chaleur humide mais tous n'ont pas communiqué leur processus. A: non communiqué, B: non communiqué, C: $F_0 \geq 11$, D: $F_0 \geq 15$ (estimé entre 42 et 45), D': $F_0 \geq 15$ (estimé à 20), E: $F_0 = 15$.

Conc (%)	N	Vol (mL)	Type de contenant	Type de matériaux du contenant	Temps écoulé depuis la fabrication (mois)	Fournisseur
2,5	5	500 - 1000	EcoFlac – Poche	PE – PE/PP – PE/PA/PP	4 – 10 – 15 – 16 – 32	A – B – E
5	44	50 – 100 – 125 – 250 – 500 – 1000	EcoFlac – Poche – Flacon	PE – PE/PP – PE/PA/PP – PP – PVC – Verre	6 – 7 – 8 – 9 – 10 – 11 – 13 – 14 – 15 – 16 – 17 – 18 – 20 – 23 – 25 – 26 – 28 – 31 – 32 – 33 – 34 – 36 – 37 – 43 – 44 – 51 – 56	A – B – C – D' – E
10	16	100 – 250 – 500 – 1000	EcoFlac – Poche – Flacon	PE – PE/PP – PE/PA/PP – PP – Verre	10 – 12 – 13 – 15 – 17 – 18 – 19 – 20 – 25 – 26 – 29 – 34 – 50 – 58	A – B – C – D – D' – E
15	6	500 – 1000	EcoFlac – Flacon	PE/PP – Verre	20 – 23 – 46 – 54 – 61	D' – E
20	1	500	Poche	PE/PP	18	E
30	9	250 – 500 – 1000	EcoFlac – Poche – Verre	PE – PE/PP – Verre	11 – 15 – 17 – 18 – 20 – 23 – 41	B – D' – E
50	2	500 – 1000	Poche – Flacon	PVC – Verre	5 – 17	B – E
70	1	500	Flacon	Verre	29	B

a. Analyse des solutions

L'ensemble des solutions glucosées a été analysé par la méthode de dosage par CLHP-UV décrite précédemment et après validation. Toutes les analyses ont été répétées trois fois. Selon leur concentration initiale en glucose, les SGI ont été analysés directement ou après dilution.

- Les SGI ayant une concentration en glucose $\leq 20\text{g}/100\text{mL}$:

Elles ont été injectées sans dilution préalable dans le système CLHP-UV à l'aide de la boucle d'injection de 100 μL . Si les concentrations calculées se situaient au-dessus des plages validées, la solution était alors diluée avec de l'eau ultra-pure afin d'atteindre une concentration en PDG comprises dans les gammes validées préalablement et analysée à nouveau. Des facteurs de dilution allant de 1/2 à 1/20 ont été utilisés.

- Les SGI ayant une concentration élevée en glucose ($\geq 30\text{g}/100\text{mL}$) :

Elles ont été systématiquement diluées au cinquième ou au dixième avec de l'eau ultra-pure, afin de protéger la phase stationnaire de la viscosité des solutions et d'éviter les précipitations dans le système d'analyse.

Après analyse et dilution des échantillons, l'ensemble des concentrations mesurées dans chaque contenant a été transformé en quantité par la multiplication de la concentration par le volume nominal du contenant. Le volume nominal a été utilisé puisque c'est le seul volume communiqué par tous les fournisseurs.

Pour l'interprétation des résultats, la vitesse de formation des PDG a été déterminée en divisant la quantité de PDG calculée par la durée de stockage. Pour l'analyse des SGI, tous les résultats ont été « anonymisés », c'est à dire que le nom du laboratoire est tenu secret. Ils sont exprimés en moyenne \pm erreur standard.

2. Modèle statistique et mise en évidence des facteurs influençant

Sept paramètres pouvant avoir une influence significative sur la formation des PDG ont été étudiés. Ceux-ci ont été déterminés à partir de la diversité des SGI du marché français.

- Le laboratoire (S) : Les SGI sont issues de 5 laboratoires différents. Le facteur laboratoire a été assimilé au facteur « stérilisation » et identifié par les lettres de A à E permettant de maintenir l'anonymat^[5]. Le laboratoire D a été considéré comme deux laboratoires D et D', puisque ce dernier utilise deux processus de stérilisation différents. Le détail des processus de stérilisation n'a pas toujours été communiqué et est décrit dans le **tableau 7**.
- La quantité initiale en glucose (G_0) : 2,5 – 5 – 6,5 – 10 – 12,5 – 25 – 50 – 75 – 100 – 150 – 250 – 300 – 350 et 500 g^[8]
- Le temps écoulé depuis la fabrication (t) : Ce paramètre a été défini comme le délai entre les dates d'analyse des échantillons et les dates de fabrication, dates préalablement estimées en soustrayant la date de péremption de la durée de conservation officielle^[26] communiquée par le laboratoire pour chaque lot.

La perméabilité à l'oxygène a été soupçonnée d'être un facteur de variation dans la formation des PDG puisque les PDG proviennent de l'oxydation du glucose. Les facteurs suivants ont été ajoutés au modèle :

- Le type de matériau (M) : PVC, PE, PP, multicouches PE-PP et PE-PA-PP et verre.
- Le coefficient moyen de perméabilité à l'oxygène (P). Ce paramètre a été estimé à partir de données publiées antérieurement^[85]. Le coefficient moyen de perméabilité à l'oxygène pour les flacons en PE a été estimé à 25×10^{-10} (cm³.mm)/(cm².s.cm de mercure)^[85]. Pour les poches en PA, PVC ou PP, il a été estimé respectivement à $0,2 \times 10^{-10}$, $0,6 \times 10^{-10}$ et 8×10^{-10} (cm³.mm)/(cm².s.cm de mercure)^[85]. Pour les flacons en verre, il a été fixé à 0 puisque, par nature, le verre

est étanche aux gaz. Ces coefficients de perméabilité à l'oxygène ont été rapportés à la surface des récipients et à la pression atmosphérique.

Pour déterminer la potentielle relation entre les sept paramètres d'influence et la vitesse de formation des PDG, un modèle d'analyse de covariance (ANCOVA) a été utilisé. Pour l'utilisation de ce modèle statistique, il est nécessaire d'avoir une relation entre les deux variables. Une transformation logarithmique a été réalisée, permettant ainsi la linéarisation.

Le modèle complet utilisé dans cette étude peut être résumé dans l'équation suivante :

$$\ln\left(\frac{dPDG}{dt}\right) = C + \alpha \ln(G_0) + \beta \ln(P) + \gamma \cdot M + \delta \cdot S + \varepsilon \cdot I - k \cdot t \quad \text{éq. 8}$$

où G_0 , P , M , S , t sont les paramètres précédemment cités et I , l'interaction entre les différents coefficients. α est le coefficient pour chaque quantité de glucose ; β , le coefficient pour chaque perméabilité à l'oxygène ; γ , le coefficient pour chaque matériau ; δ , le coefficient pour chaque fournisseur et ε le coefficient d'interaction. C est une constante correspondant au bruit de fond sur la vitesse. Lorsque tous les paramètres sont nuls, le $\ln(\text{vitesse})$ n'est pas égal à 0. Ce bruit de fond pourrait être expliqué par le fait que les facteurs influençant la vitesse ne sont pas encore tous répertoriés et que les concentrations très basses ne sont pas retrouvées.

Une erreur de type I $< 0,05$ a été considérée pour la signification statistique. Les analyses ont été réalisées à l'aide du logiciel XLSTAT® (v2014.5.02, Addinsoft, Paris, France).

3. Modèle cinétique général

Au regard du schéma expliquant la formation des PDG (**figure 1**), on peut considérer la dégradation du glucose comme l'addition de différentes réactions chimiques avec une voie conduisant à la formation du 5-HMF, une autre à la formation du 2-FA et d'autres voies menant à la formation des autres PDG. Le mécanisme global de la

réaction peut être représenté comme la **figure 5**. Ainsi, dans ce modèle, la variation des quantités de glucose et des PDG peut s'expliquer par les équations **9** à **14** décrites dans le **tableau 8**.

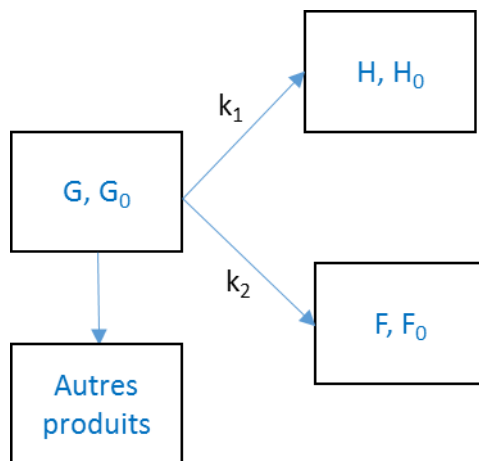


Figure 5 : Modèle de la dégradation du glucose. G, H et F sont les quantités en glucose, en 5-HMF et en 2-FA, respectivement. G_0 , H_0 et F_0 sont des quantités initiales en glucose, en 5-HMF et en 2-FA, respectivement. k est la constante de dégradation du glucose, k_1 la constante de formation du 5-HMF et k_2 celle du 2-FA.

Tableau 8 : Equations de la dégradation du glucose et de la formation des PDG. G, H et F sont les quantités de glucose, 5-HMF et 2-FA, respectivement. **G_0 , H_0 et F_0 sont les quantités initiales en glucose, 5-HMF and 2-FA, respectivement. k est la constante de vitesse de dégradation du glucose, k_1 et k_2 sont les constantes de vitesse de formation du 5-HMF et du 2-FA, respectivement.**

Produits	Equation de vitesse	Evolution de la quantité
Glucose (G)	$\frac{dG}{dt} = -kG$ (éq. 9)	$G = G_0 \cdot e^{-kt}$ (éq. 10)
5-HMF (H)	$\frac{d(H)}{dt} = k_1 G_0 \cdot e^{-kt}$ (éq. 11)	$H = H_0 + \frac{k_1}{k} G_0 \cdot (1 - e^{-kt})$ (éq. 12)
2-FA (F)	$\frac{d(F)}{dt} = k_2 G_0 \cdot e^{-kt}$ (éq. 13)	$F = F_0 + \frac{k_2}{k} G_0 \cdot (1 - e^{-kt})$ (éq. 14)

Plusieurs modèles ont été expérimentés ayant conduit à des optimisations dans l'organisation des variables étudiées. Un affinage du modèle cinétique a été réalisé au fur et à mesure de l'intégration des variables étudiés.

Dans notre étude, les volumes de réaction des milieux ne sont pas constants, selon le volume du contenant (50 à 1000 mL). Compte tenu de cette dernière hypothèse, les équations du modèle ont été établies en fonction des variations des quantités de PDG et non en concentrations comme il est de coutume de le faire.

III. Résultats

A. Caractérisation et quantification des PDG par CLHP-UV

1. Descriptif des résultats

Le chromatogramme obtenu dans les conditions analytiques décrites précédemment est représenté sur la **figure 6**. Les temps de rétention sont de 3,4 min et de 4,8 min pour le 5-HMF et le 2-FA, respectivement. La résolution R_s calculée est de 6,5, indiquant une très bonne séparation des produits. Le temps d'analyse, après optimisation de la méthode est de 7 min.

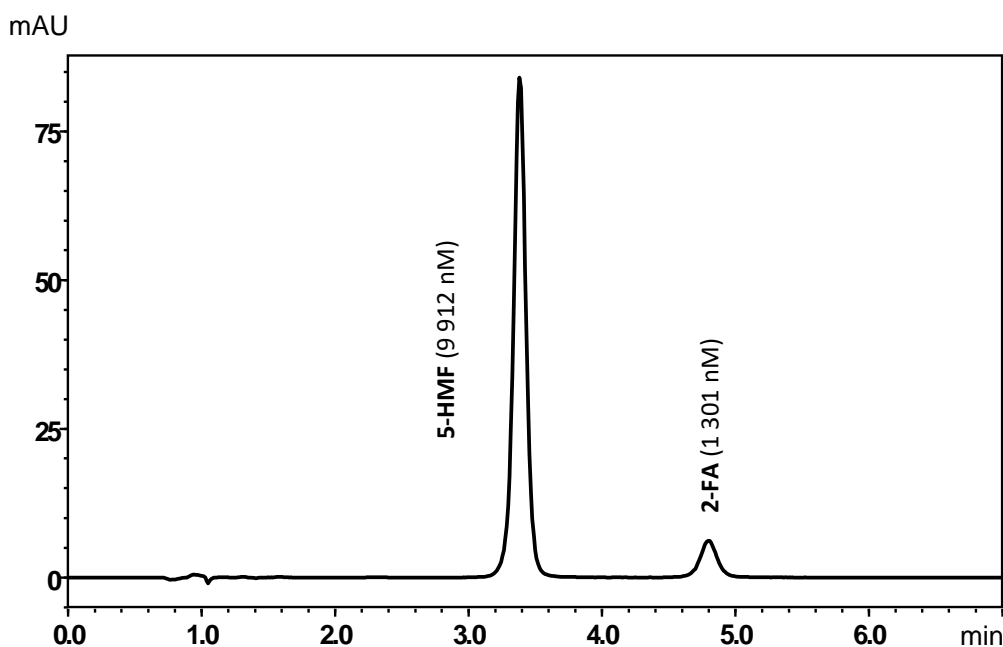


Figure 6 : Chromatogramme d'une solution d'un mélange de 5-HMF et 2-FA.

2. Paramètres de validation

L'homogénéité des variances est vérifiée par le test de Cochran avec une valeur de $C_{cal} = 0,1705$ et de $C_{théo} = 0,2195$ pour le 5-HMF et de $C_{cal} = 0,2400$ et de $C_{théo} = 0,3029$ pour le 2-FA. Comme les valeurs calculées ne sont pas supérieures aux valeurs théoriques, cela permet d'affirmer que les variances sont bien homogènes.

Le modèle linéaire n'apparaît pas adapté par l'ANOVA car les F_{cal} sont supérieurs aux $F_{\text{théo}}$. Ceci s'explique par le fait que la variance de répétabilité est très faible par rapport à celle de l'ajustement du modèle (non linéaire). Cela entraîne donc l'obtention d'un F_{cal} très élevé. Ce phénomène se produit lorsque la méthode d'ajustement est très fidèle.

Dans ce cas, l'alternative est le test d'ajustement du polynôme d'ordre 2, vérifié à l'aide d'un test de Student, qui permet de démontrer que le paramètre β_2 est non significativement différent de 0 pour les deux PDG (**tableau 9**).

Tableau 9 : Paramètre β_2 de chaque série pour le 5-HMF et le 2-FA. Les résultats sont présentés par moyenne \pm écart-type. Résultats du test de Student ($\alpha = 0,05$; 5 DDL). Différence : entre la moyenne des β_2 et 0.

		<i>β_2 du 5-HMF</i>	<i>β_2 du 2-FA</i>
Résultats	Série 1	$-8,429 \times 10^{-5} \pm 1,173 \times 10^{-4}$	$5,846 \times 10^{-5} \pm 0,001$
	Série 2	$-5,395 \times 10^{-5} \pm 1,246 \times 10^{-4}$	$-4,675 \times 10^{-5} \pm 0,001$
	Série 3	$-8,101 \times 10^{-5} \pm 1,111 \times 10^{-4}$	$5,085 \times 10^{-5} \pm 0,001$
	Série 4	$-8,134 \times 10^{-5} \pm 1,100 \times 10^{-4}$	$1,036 \times 10^{-5} \pm 0,001$
	Série 5	$-3,122 \times 10^{-3} \pm 6,456 \times 10^{-3}$	$-3,542 \times 10^{-5} \pm 0,001$
	Série 6	$-6,596 \times 10^{-5} \pm 1,107 \times 10^{-4}$	$1,669 \times 10^{-4} \pm 0,001$
	Moyenne	$-5,814 \times 10^{-4} \pm 1,153 \times 10^{-3}$	$4,962 \times 10^{-5} \pm 0,001$
Student	Différence ($\beta_2 - 0$)	$-5,814 \times 10^{-4}$	$4,962 \times 10^{-5}$
	t (Valeur observée)	1,144	1,490
	t (Valeur critique)	2,571	2,571
	p-value (bilatérale)	0,304	0,196

Ceci permet de simplifier l'équation $Y = \alpha + \beta_1 x + \beta_2 x^2$ en $Y = \alpha + \beta_1 x$. Les paramètres de régression sont résumés dans le **tableau 10**.

Tableau 10 : Paramètres de régression de la méthode pour le 5-HMF et le 2-FA. Les paramètres donnés sont : le coefficient de détermination (r^2), la pente de la droite (β_1), l'ordonnée à l'origine (α) les limites de détection (LDD) et de quantification (LDQ)

PDG	r^2	β_1	α	LDD (nM)	LDQ (nM)
5-HMF	0,999 ± 0,001	55,28 ± 0,22	-1552,1 ± 1476,1	52,02	238,92
2-FA	0,999 ± 0,001	41,75 ± 2,05	570,8 ± 237,9	17,10	57,00

La justesse de la méthode pour le dosage du 5-HMF (**A**) et du 2-FA (**B**) a été évaluée par l'étude de la linéarité entre les concentrations expérimentales et les concentrations recalculées grâce au modèle (**figure 7**). Elle permet de vérifier que la méthode appliquée au dosage des PDG est bien adaptée à la mesure des concentrations et présente une grande justesse sur l'ensemble des points de gammes testés.

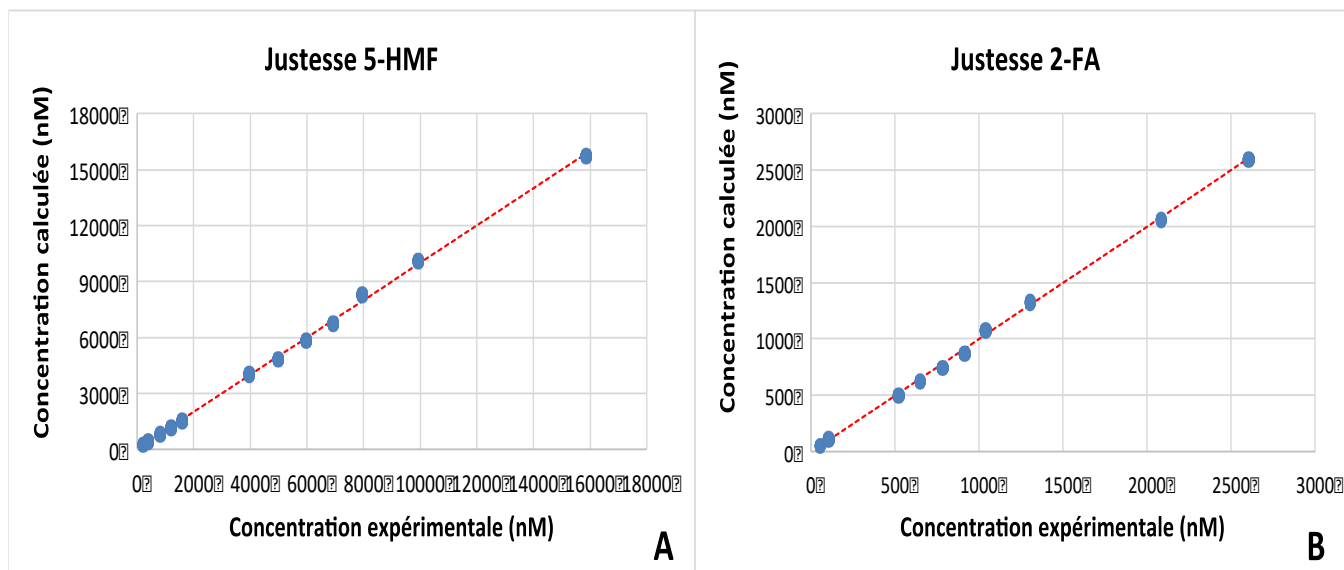


Figure 7 : Justesse de la méthode de validation pour le 5-HMF (A) et pour le 2-FA (B). **La courbe en pointillé rouge représente la droite de régression linéaire de référence.**

Les diagrammes de recouvrement, décrits par la **figure 8 (A)** pour le 5-HMF et **(B)** pour le 2-FA, confirment l'exactitude des méthodes de dosage. Pour le 5-HMF, la **figure 8 (A)** confirme l'exactitude de la méthode uniquement sur la plage de 396 à 15 859 nM ; la concentration 198 nM étant hors gamme de validation. Ce résultat est cohérent avec une LDQ calculée de 238,92 nM. Pour le 2-FA, l'exactitude est confirmée pour la plage entière allant de 52 à 2 602 nM (**figure 8 (B)**).

Les biais relatifs maximum sont de 4,40% pour le 5-HMF et de 5,33% pour le 2-FA, bien inférieurs à la limite fixée (10%).

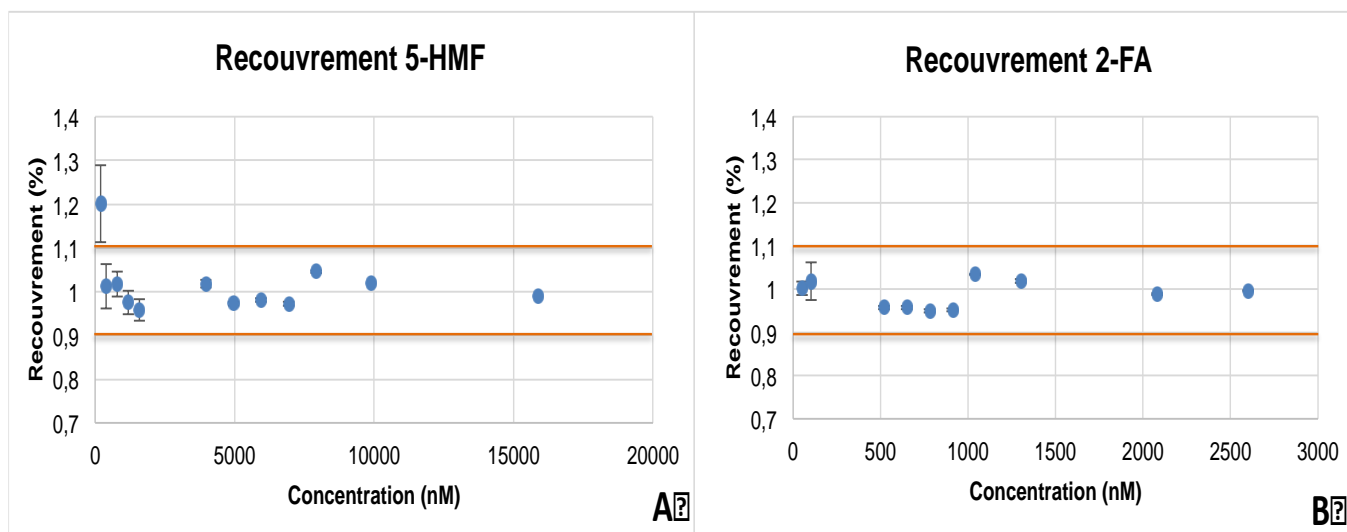


Figure 8 : Diagramme de recouvrement pour le 5-HMF (A) et pour le 2-FA (B). **Les limites des biais sont fixées à $\pm 10\%$ (droites en orange).**

Ce test d'ajustement permet de valider les dosages lorsque les concentrations sont comprises entre 396 et 15 859 nM pour le 5-HMF et entre 52 à 2 602 nM pour le 2-FA. Les résultats obtenus en dehors de ces gammes ne sont donc pas valides.

B. Analyse générale des facteurs influençant la formation des PDG

1. Résultat de l'analyse des solutions glucosées présentes sur le marché français

Au total, 84 SGI du marché français ont été analysées. Le 5-HMF et le 2-FA ont tous deux été identifiés et quantifiés dans chaque solution testée (**tableau 11 et 12**).

Tableau 11 : Quantités des PDG dans les solutions du marché français pour les concentrations en glucose de 2,5 et 5%. Chaque échantillon a été analysé en triplicate.

Les quantités de PDG sont données en moyenne \pm écart-type et exprimées en mg pour le 5-HMF et en μ g pour le 2-FA. G (%): Concentration en glucose en g/100mL; Supp.: Fournisseur ; Vol. : Volume ; Cont. : Contenant. Les valeurs extrêmes pour un fournisseur sont indiquées en italique et en gras. *En dehors des gammes de validation.

G (%)	Supp.	Vol. (mL)	Cont.	5-HMF (μ M)	2-FA (nM)	G (%)	Supp.	Vol. (mL)	Cont.	5-HMF (μ M)	2-FA (nM)
2.5	A	500	Bag	6,49 \pm 0.01	125 \pm 2*	5	B	500	Flask	15,2 \pm 0,1	506 \pm 5
	A	1000	Bag	28,3 \pm 0.2	2684 \pm 3		B	500	Flask	30,4 \pm 0,2	1 018 \pm 8
	A	1000	Bag	22,3 \pm 0.3	2 290 \pm 11		B	1000	Flask	44,4 \pm 0,1	1 563 \pm 2
	B	1000	Flask	9,81 \pm 0,16	320 \pm 5*		C	250	Bag	10,6 \pm 0,0	261 \pm 6
	E	1000	Bag	21,2 \pm 0,0	692 \pm 24		C	250	Bag	8,18 \pm 0,10	215 \pm 1
5	A	50	Bag	2,55 \pm 0,03	35,3 \pm 0,4		C	500	Bag	30,4 \pm 0,2	676 \pm 7
	A	50	Bag	2,58 \pm 0,02	33,5 \pm 0,2		C	500	Flask	38,9 \pm 0,1	981 \pm 42
	A	50	Bag	2,77 \pm 0,01	35,1 \pm 0,2		C	500	Bag	28,3 \pm 0,2	714 \pm 7
	A	50	Bag	4,18 \pm 0,01	46,5 \pm 0,3		C	500	Bag	26,3 \pm 0,5	566 \pm 1
	A	100	Bag	5,57 \pm 0,06	105 \pm 2		D'	125	Vial	3,80 \pm 0,03	124 \pm 1
	A	100	Bag	5,98 \pm 0,07	87,0 \pm 0,4		D'	125	Vial	8,04 \pm 0,12	213 \pm 3
	A	100	Bag	7,40 \pm 0,05	110 \pm 1		D'	250	Vial	17,7 \pm 0,2	405 \pm 1
	A	100	Bag	7,77 \pm 0,06	106 \pm 0		D'	250	Vial	19,3 \pm 0,1	480 \pm 4
	A	250	Bag	6,90 \pm 0,02	200 \pm 0		D'	500	Vial	28,1 \pm 0,3	647 \pm 1
	A	250	Bag	15,7 \pm 0,0	764 \pm 1		D'	500	Vial	29,1 \pm 0,1	606 \pm 4
	A	250	Bag	8,59 \pm 0,03	266 \pm 0		D'	1000	Vial	43,9 \pm 0,1	943 \pm 15
	A	500	Bag	14,9 \pm 0,1	353 \pm 3		D'	1000	Vial	71,6 \pm 0,2	1 591 \pm 12
	A	500	Bag	20,0 \pm 0,3	433 \pm 2		E	50	Bag	2,78 \pm 0,00	25,2 \pm 0,3*
	A	500	Bag	44,1 \pm 0,0	611 \pm 4		E	100	Bag	5,15 \pm 0,00	82,5 \pm 0,5
	B	50	Flask	1,58 \pm 0,01	37,4 \pm 0,6		E	100	Bag	9,22 \pm 0,00	80,8 \pm 0,4
	B	100	Flask	1,87 \pm 0,01	44,35 \pm 2,67*	E	100	Bag	9,98 \pm 0,01	83,0 \pm 0,4	
	B	100	Flask	211 \pm 0	4 428 \pm 34	E	100	Bag	10,4 \pm 0,0	76,8 \pm 1,4	
	B	250	Flask	7,01 \pm 0,02	223 \pm 1	E	500	Bag	29,0 \pm 0,2	405 \pm 3	
	B	250	Flask	7,87 \pm 0,04	306 \pm 4	E	500	Bag	54,0 \pm 0,3	491 \pm 13	
	B	250	Flask	7,83 \pm 0,08	305 \pm 2						

Tableau 12 : Quantités des PDG dans les solutions du marché français pour les concentrations en glucose de 10, 15, 20, 30, 50 et 70%. Chaque échantillon a été analysé en triplicate. **Les quantités de PDG sont données en moyenne ± écart-type et exprimées en mg pour le 5-HMF et en µg pour le 2-FA. G (%) : Concentration en glucose en g/100mL; Supp. : Fournisseur ; Vol. : Volume ; Cont. : Contenant. Les valeurs extrêmes pour un fournisseur sont indiquées en italique et en gras. * En dehors des gammes de validation.**

G (%)	Supp.	Vol. (mL)	Cont.	5-HMF (µM)	2-FA (nM)	G (%)	Supp.	Vol. (mL)	Cont.	5-HMF (µM)	2-FA (nM)	
10	A	500	Bag	30,3 ± 0,8	1086 ± 1	20	E	500	Bag	172 ± 1	2 667 ± 29	
	A	500	Bag	32,5 ± 0,5	568 ± 1		30	B	500	Flask	30,4 ± 0,2	2 684 ± 24
	A	1000	Bag	60,1 ± 1,0	1272 ± 2			D'	500	Vial	100 ± 2	2 546 ± 8
	B	250	Flask	19,5 ± 0,2	694 ± 1			D'	500	Vial	110 ± 1	2 740 ± 14
	B	250	Flask	1 996 ± 0,1	899 ± 18			D'	1000	Vial	277 ± 3	6 260 ± 28
	C	250	Flask	36,6 ± 0,1	850 ± 2			E	250	Bag	41,8 ± 0,4	959 ± 7
	C	500	Bag	46,8 ± 0,8	757 ± 1			E	500	Bag	90,7 ± 0,0	1 666 ± 1
	C	500	Bag	53,2 ± 0,2	997 ± 5			E	500	Bag	109 ± 1	2794 ± 19
	D	250	Bag	12,9 ± 0,2	297 ± 1			E	500	Bag	135 ± 1	2 880 ± 13
	D	250	Bag	14,1 ± 0,1	303 ± 0			E	500	Bag	161 ± 2	3 430 ± 17
	D	250	Bag	21,3 ± 0,4	383 ± 2			50	B	500	Vial	30,4 ± 0,2
	D'	500	Vial	79,8 ± 0,9	3 126 ± 18		E		1000	Bag	329 ± 1	1 901 ± 62
	D'	500	Vial	98,7 ± 1,9	3 518 ± 10		70	B	500	Flask	296 ± 2	3 394 ± 25
	E	100	Bag	5,59 ± 0,06	57,2 ± 0,8							
	E	100	Bag	9,96 ± 0,20	142 ± 1							
	E	100	Bag	11,3 ± 0,0	180 ± 2							
15	D'	500	Vial	127 ± 3	3 513 ± 20							
	D'	500	Vial	261 ± 5	6 784 ± 9							
	D'	1000	Vial	276 ± 6	6 090 ± 19							
	E	500	Bag	105 ± 1	1 820 ± 12							
	E	500	Bag	105 ± 2	1 513 ± 10							
	E	500	Bag	109 ± 2	1 531 ± 343							

Les quantités (moyenne \pm erreur standard) de 5-HMF varient de $1,58 \pm 0,01 \mu\text{mol}$ pour le G5%, 50 mL provenant du fournisseur B à $327 \pm 1 \mu\text{mol}$ pour G50%, 1000 mL provenant du fournisseur E. Pour le 2-FA, la variation est observée de $25,2 \pm 0,3 \text{ nmol}$ pour G5%, 50 mL, du fournisseur E à $6\,784 \pm 9 \text{ nmol}$ pour G15%, 1000 mL du fournisseur D'.

Une hétérogénéité des quantités en PDG peut également être observée pour une même concentration en glucose et pour le même fournisseur. Par exemple, pour la concentration en glucose de 2,5% pour le fournisseur A, les quantités vont de $6,49 \pm 0,01 \mu\text{mol}$ à $28,3 \pm 0,2 \mu\text{mol}$ pour 5-HMF, et de $125 \pm 2 \text{ nmol}$ à $2\,684 \pm 37 \mu\text{mol}$ pour le 2-FA. Ceci montre la grande variabilité des quantités de PDG dans nos échantillons.

Les quantités moyennes de PDG dans tous nos échantillons sont respectivement de $53,1 \pm 4,6 \mu\text{mol}$ et de $1,19 \pm 0,09 \mu\text{mol}$ pour 5-HMF et 2-FA. La conversion des quantités de GDP dans chaque récipient en concentrations, donne respectivement $110 \pm 6 \mu\text{M}$ et $2,31 \pm 0,13 \mu\text{M}$ pour le 5-HMF et le 2-FA.

2. Analyse des paramètres influençant la formation des PDG

Le modèle ANCOVA a montré une bonne relation linéaire entre le logarithme de la vitesse de formation des PDG et le temps écoulé depuis la fabrication pour les deux PDG. Les valeurs simulées et expérimentales sont très proches : $r^2 = 0,966$ ($p < 0,0001$) et $r^2 = 0,962$ ($p < 0,0001$) pour le 5-HMF et le 2-FA, respectivement (**figure 9**). Les valeurs simulées ont été générées par intégration des paramètres déterminés dans l'équation du modèle (**équation 8**) permettant ainsi de recalculer l'ensemble des concentrations en PDG avec chaque caractéristique (laboratoire, concentration en glucose...).

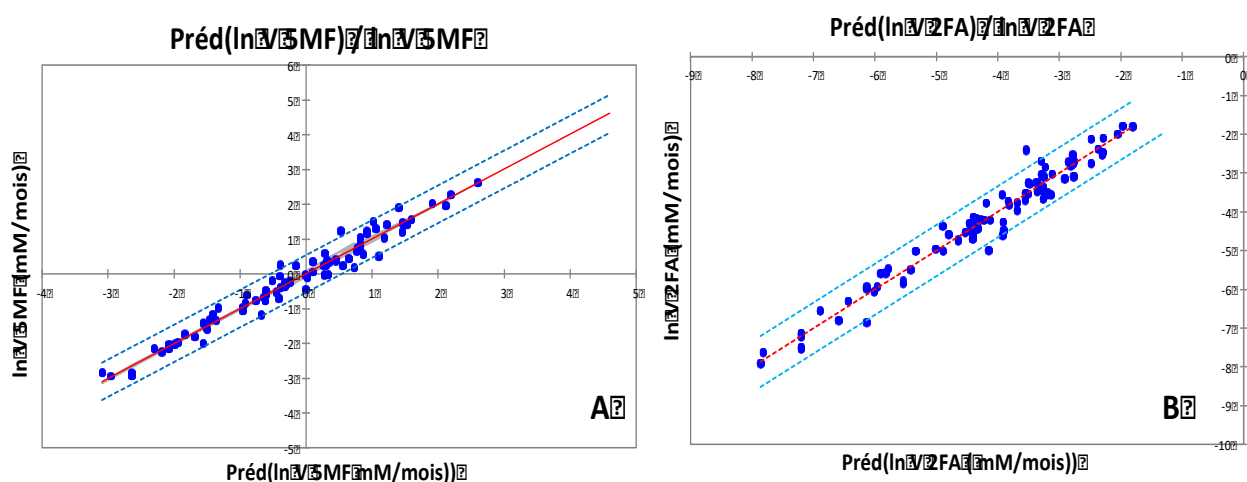


Figure 9 : Modèles de prédiction de la formation du 5-HMF (A) et de la formation du 2-FA (B). Relation linéaire entre \ln (vitesse de formation des PDG) et la prédiction de \ln (vitesse de formation des PDG). Les points bleus sont les valeurs mesurées et les lignes grises continues encadrant les valeurs représentent l'intervalle de confiance à 95%.

En repartant de l'équation 8, la constante C avait été définie comme le bruit de fond sur la vitesse. En repartant de la figure 9 A et B, cette constante C est statistiquement assimilable à 0.

L'ANCOVA permet de montrer l'influence significative des paramètres suivants sur les vitesses de formation des deux GDP : le temps de stockage (5-HMF : 0,293, $p = 0,012$ et 2-FA : 0,618, $p < 0,0001$), la quantité initiale de glucose dans le contenant (5-HMF : 2,456, $p = 0,005$ et 2-FA : 4,085, $p < 0,001$) et la perméabilité à l'oxygène (1,821 et 1,397, $p < 0,001$, pour le 5-HMF et le 2-FA, respectivement).

L'influence du contenant diffère selon le matériau. La **figure 10** révèle un profil similaire sur son impact sur la vitesse de formation du 5-HMF et du 2-FA.

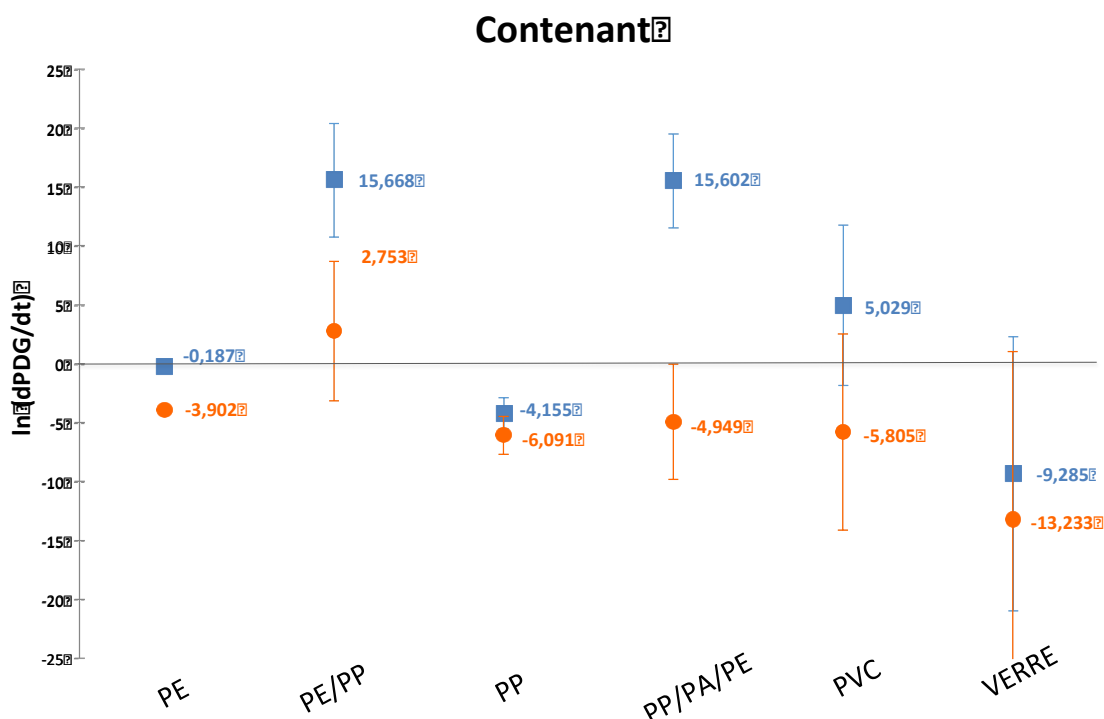


Figure 10 : Impact du type de matériau du contenant sur la vitesse de formation du 5-HMF (■) et 2-FA (●). La barre d'erreur indique les déviations standards.

A partir de ces données, il est possible de classer les matériaux en fonction de leur capacité à limiter la formation de GDP. En effet, la vitesse de formation de PDG est 1) plus lente avec le PP et le verre; 2) pas ou seulement légèrement influencée avec le PE, le multicouche PP/PA/PE et le PVC; et 3) plus rapide avec le PE/PP.

De même, l'effet fournisseur, associé à l'effet stérilisation a été analysé. Cependant, pour un fournisseur (fournisseur D), deux conditions de stérilisation différentes sont utilisées : une première pour les contenants en plastique (D) et une seconde pour les

contenants en verre (D'). Afin de ne pas limiter "l'effet fournisseur" à un "effet contenant", l'analyse ANCOVA a également vérifié l'absence de multi-colinéarité. Les résultats sont présentés à la **figure 11**. Les différences dans les techniques de stérilisation ont également été mises en évidence.

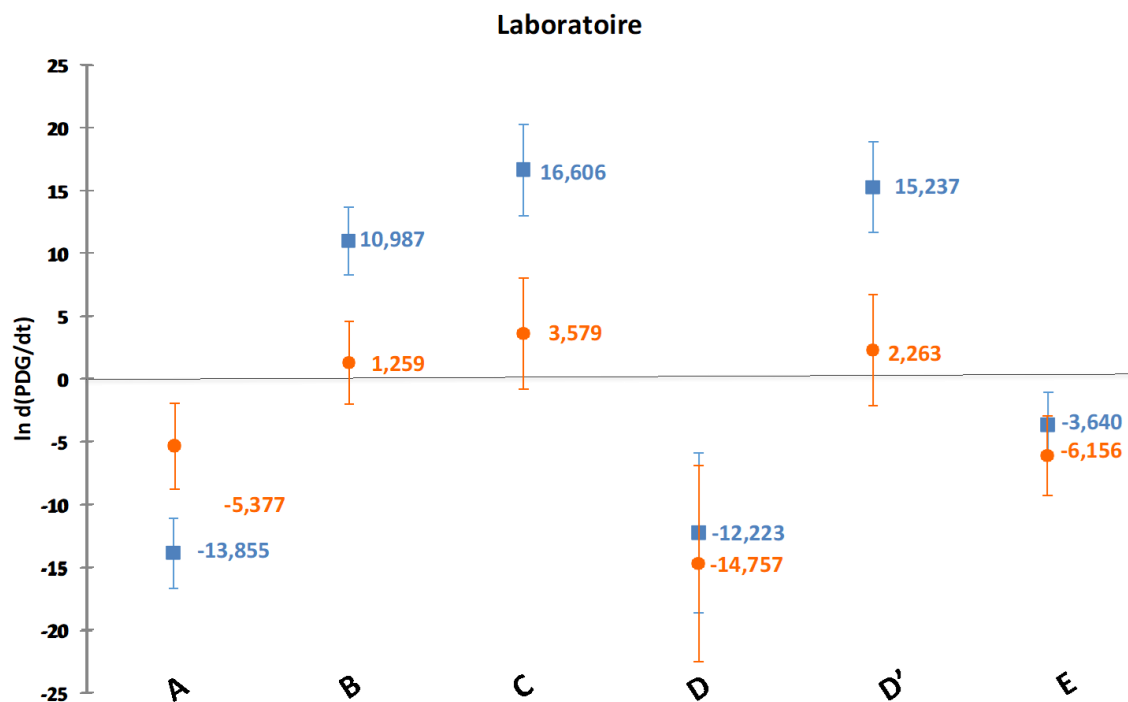


Figure 11 : Impact du fournisseur sur la vitesse de formation du 5-HMF (■) et 2-FA (●). La barre d'erreur indique les déviations standards.

A partir de ces données et de la **figure 11**, les fournisseurs peuvent également être classés en fonction de leur capacité à limiter la génération de PDG. Les fournisseurs A et D semblent moins contribuer à la formation des PDG, alors que les fournisseurs B et C semblent en générer davantage. Aucun impact significatif n'a été démontré pour les autres fournisseurs (D' et E).

3. Modèle cinétique

Le modèle cinétique a été choisi après avoir testé de nombreux modèles. Le modèle sélectionné est celui répondant au mieux à la dégradation du glucose en fonction des paramètres étudiés.

Le premier modèle cinétique s'est basé sur les équations chimiques permettant la transformation du glucose en 5-HMF d'une part et en 2-FA d'autre part. Les facteurs étudiés dans ce premier modèle étaient la concentration initiale en glucose, le temps écoulé depuis la fabrication et le packaging (verre – écoflac – poche). Après étude de ce premier modèle, le nombre de facteurs étudiés a augmenté, analysé par une ANCOVA (concentration initiale en glucose, laboratoire, type de matériau, surface des contenant, coefficient de perméabilité). Ce modèle est un modèle linéaire. La loi de Van't Hoff nous a permis cette linéarisation.

Les relations entre la vitesse de formation des PDG sont nettement mieux corrélées aux quantités qu'aux concentrations. Ce résultat trouve son explication dans le fait qu'une réaction du type : $\alpha A + \beta B \rightarrow \gamma C + \delta D$

A une vitesse de formation du type : $v = k[A]^m[B]^n$

Cette relation n'est vérifiée que si deux conditions sont respectées : l'homogénéité de notre milieu (solutions glucosées homogènes) et la constance du volume de réaction (variable de 50 à 1 000 mL). Cette dernière condition est respectée si le travail réalisé est en quantité. On obtient une vitesse en fonction des quantités $v = kA^mB^n$.

Le modèle a été ajusté après optimisation des paramètres étudiés : laboratoire D a été considéré comme deux laboratoires, la quantité initiale en glucose et le facteur « surface du contenant » a été incorporé au facteur « coefficient de perméabilité à l'air ».

Tous ces modèles ont permis d'affiner celui répondant au mieux à la dégradation du glucose.

Pour vérifier l'ajustement du modèle (**figure 4**), les valeurs de la constante de vitesse de dégradation du glucose (k) doivent être identiques dans les deux **équations 11** (pour 5-HMF) et **13** (pour 2-FA). En repartant du modèle décrit dans la **figure 5**, les valeurs de la constante de vitesse de dégradation du glucose (k) ont été déterminées

à partir de l'évolution des concentrations de 5HMF et 2FA en fonction du temps (**équation 12** et **14**) après intégration des équations de vitesse **11** et **13**. Elles ne sont pas significativement différentes (test de Student, $p=0,075$) pour les **équations 11** (5-HMF) et **12** (2-FA) :

$k = 0,29 \pm 0,12 \text{ mois}^{-1}$ pour l'**équation 11**

$k = 0,62 \pm 0,14 \text{ mois}^{-1}$ pour l'**équation 13**

Ainsi, l'hypothèse du modèle cinétique est validée et la valeur moyenne de la constante de dégradation du glucose est : $0,46 \pm 0,19 \text{ mois}^{-1}$.

Dans l'ANCOVA, les estimations des α sont $2,46 \pm 0,88$ et $4,09 \pm 1,07$. A l'aide de l'**équation 8**, les quantités moyennes en PDG dans les différentes solutions glucosées testées sont estimées à $53,1 \pm 4,6 \mu\text{mol}$ pour le 5-HMF et $1,19 \pm 0,09 \mu\text{mol}$ pour le 2-FA. Pour pouvoir comparer nos données avec la littérature, les quantités ont été converties en concentration dans chaque contenant, donnant ainsi $110 \pm 6 \mu\text{M}$ et $2,31 \pm 0,13 \mu\text{M}$ pour le 5-HMF et le 2-FA.

IV. Discussion

La caractérisation des PDG dans les solutions de glucose injectables est devenue essentielle en raison de la connaissance accrue des risques associés à leur utilisation. Leur présence a déjà été décrite, en particulier dans les fluides de dialyse péritonéale et notamment pour le 5-HMF.

Les deux PDG étudiés, 5-HMF et 2-FA ont été choisis car le 5-HMF est considéré comme un bon marqueur de la dégradation du glucose et le 2-FA comme produit final d'une des autres voies [43,44]. Par ailleurs, en raison de leurs propriétés chromophores, leur détection UV est possible. En repartant des **tableaux 1 et 2** résumant les conditions analytiques décrites dans la littérature, nous retrouvons principalement comme phase stationnaire, une colonne de phase inverse de nature octadécyl (C₁₈). Les phases mobiles sont principalement des mélanges eau/acétonitrile, eau/méthanol, (solution tampon/acétonitrile ou solution tampon/méthanol. Notre méthode utilise un mélange 10/90 (v/v) - méthanol / tampon phosphate 0,011 mM de pH 2,95 en mode isocratique, méthode similaire à celle décrite par Cool et *al.* [5,43]. En conformité avec la littérature, la méthode analytique de cette étude a été choisie car c'est une méthode simple, rapide (temps d'analyse de 7 minutes), reproductible et facilement transposable, mettant en évidence la dégradation générale du glucose par le choix des PDG.

La méthode de dosage a été validée en suivant la méthodologie de la validation de la Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques (SFSTP)^[83,84] - profil d'exactitude - exigeant en plus des ICH (fidélité et exactitude) ^[82], la linéarité, la spécificité et les LDD et LDQ. Ce choix d'une méthodologie unique a été validé au sein du laboratoire de biopharmacie, pharmacie galénique et hospitalière afin de répondre au mieux aux travaux réalisés au sein du laboratoire : étude de produits pharmaceutiques (médicaments, DM), étude de stabilité, dégradation forcée... Dans notre étude, la méthode de dosage a été validée par un test d'ajustement du polynôme d'ordre 2. Les variances sont statistiquement homogènes, cependant lors d'une analyse par l'ANOVA, le modèle de validation n'apparaît pas adapté. Ce résultat, au premier abord mauvais, s'explique par une variance de répétabilité très faible par rapport à celle de l'ajustement du modèle (non linéarité). Cela entraîne

l'obtention d'un F calculé d'ajustement très élevé. Ce phénomène se produit lorsque la méthode analytique est très fidèle. Effectivement et plus simplement, les gammes de validation testées sont très étendues avec une répétabilité des points très bonne. Un petit écart de répétabilité sur un point entraîne une non-validation de la gamme par la méthode ANOVA malgré une linéarité visible celle-ci. Une alternative à ce test a été réalisée : le test d'ajustement du polynôme d'ordre 2. Ce test a permis de valider les gammes de la plage de 396 à 15 859 nM pour le 5-HMF de 52 à 2 602 nM pour le 2-FA. Les résultats de dosage des SGI montrent que nos choix de gamme correspondent aux concentrations retrouvées dans ces solutions. En effet, seules quatre concentrations de 2-FA sont en dessous de la gamme de validation mais elles sont au-dessus de la LDQ. La méthode utilisée est donc sensible, disposant de LDD et de LDQ très faibles mais ne permettant toutefois pas de détecter l'ensemble des concentrations des deux PDG malgré les nombreux avantages détaillés plus haut. Notre méthode trouve ses limites sur les faibles concentrations et sur la détection de seulement deux PDG. L'Académie Nationale de Pharmacie a émis des recommandations portant notamment sur le développement des techniques de dosage [66]. Afin de répondre à ses recommandations, un élargissement de notre méthode d'identification et de quantification à d'autres PDG serait nécessaire. Deux possibilités sont envisageables :

1) L'utilisation d'un agent dérivant permettant de greffer un groupement chromophore est décrit dans de nombreux travaux^[1,12,86]. Cependant, ces techniques de dérivation sont complexes et nécessitent des préparations longues en amont des dosages^[1,12,86], sans garantir une totale dérivation des PDG.

2) L'utilisation de la LC-MS seule ou couplée à une détection UV^[12,77-80] faciliterait la détection de l'ensemble des PDG. L'analyse du marché français par une méthode analytique permettant la détection de tous les PDG décrits à ce jour aurait permis d'en connaître les concentrations et de faire un parallèle avec les toxicités retrouvées dans la littérature, notamment pour le 3-DG, le 3,4-DGE, le GO et le MGO connus pour être les PDG les plus toxiques^[1,41,42,60]. Mais cette technique nécessite du matériel onéreux et, pour améliorer la spécificité des dosages, est souvent couplée à de la dérivation augmentant le poids moléculaire des PDG, tels que 3,4-DGE, le GO et le MGO^[79,80].

Dans notre étude, le 5-HMF et le 2-FA ont été identifiés et quantifiés dans presque toutes les solutions commercialisées testées. Dans des études déjà publiées, les concentrations de 5-HMF variaient de 1,98 à 146 μM dans les SGI pour des concentrations en glucose de 2,5 à 30%^[1], ou de 63,0 à 289 μM pour des concentrations en glucose de 10 à 50%^[8]. Aucune donnée n'est disponible pour le 2-FA dans les SGI, car les données publiées concernent uniquement les liquides de DP. Les concentrations de 2-FA variaient de 400 à 1 400 nM pour les concentrations en glucose variant de 1,36 à 3,86%^[9] et de 1 100 à 3 100 nM pour les concentrations en glucose variant de 1,5 à 7,5%^[3]. Ces valeurs retrouvées dans notre étude sont proches de celles obtenues précédemment : 9,52 et 596 μM et 244 et 8 117 nM, respectivement pour le 5-HMF et le 2-FA. Les concentrations les plus élevées retrouvées pour le 2-FA sont dues à des concentrations de glucose plus élevées. Si l'on ne tient compte que des concentrations de glucose de 2,5 et 5%, les concentrations sont similaires à celles publiées précédemment : elles varient de 245 à 3056 nM^[9,10].

Nos résultats démontrent que le 5-HMF et le 2-FA sont tous les deux présents en quantités variables dans toutes les SGI actuellement sur le marché français. Les différences d'un fournisseur à l'autre peuvent s'expliquer par l'hétérogénéité des différents processus de stérilisation (température, pression et temps du cycle de stérilisation)^[1,73,76,87]. Une homogénéisation des processus de stérilisation lors de la fabrication des SGI pourrait être un moyen de limiter la formation des PDG, après évaluation des conditions optimales des cycles de stérilisation permettant de garantir la stérilité des SGI tout en limitant la génération des PDG. Tous les fournisseurs ont confirmé utiliser le processus de la chaleur humide préconisé par la Pharmacopée Européenne, mais certains n'ont pas fourni leurs protocoles. En comparant les informations fournies, il apparaît qu'ils utilisent des températures différentes (111 ou 121°C) et des valeurs F_0 différentes (11 à 46). Le F_0 est une combinaison de temps et de température donnant une énergie et une létalité bactériennes égales^[46]. Cependant, la valeur seule de F_0 est insuffisante ; il est important de connaître les conditions thermodynamiques de la stérilisation^[8]. Dans leur étude, Postaire et al.^[8] ont démontré que plus la température est élevée, plus la formation de PDG est élevée. Il en est de même pour la durée du cycle : plus le temps de stérilisation est long, plus la formation de PDG est importante. Ceci est confirmé dans l'étude de Cook^[5]. Kjellstrand et al.^[87] ont évalué l'impact de

différentes valeurs de F_0 et ont démontré que la combinaison d'une température élevée avec un temps de stérilisation court limitait la formation de PDG.

Dans notre étude, une seule condition était proche de celles étudiées par Cook et *al.*^[5] : une solution à 5% de glucose conditionnée dans des flacons de 500 ml, stérilisée à 121°C avec une valeur F_0 de 20. Après application de notre équation dans ces conditions et pour un temps de stockage d'un mois, nous obtenons une concentration estimée de 5-HMF de 5,25 μM d'après **l'équation 8**. Cette valeur est très proche des résultats publiés précédemment^[5], permettant de confirmer la pertinence de notre modèle pour ces conditions.

En plus des conditions de stérilisation et de stockage, notre étude a tenu compte du type de contenant car il a été suspecté que ce dernier était un facteur contribuant à la formation des PDG. En effet, les contenants à fort coefficient de perméation génèrent plus de PDG que les autres. Ce résultat concorde avec des données publiées antérieurement montrant qu'une perméation élevée à l'oxygène peut entraîner une instabilité chimique du contenu, en particulier pour les composés facilement oxydables^[88,89]. Nos résultats indiquent que le choix d'un matériau à faible perméabilité à l'oxygène pourrait également être un moyen de limiter la formation de 5-HMF et de 2-FA.

Cette première partie de notre travail démontre l'hétérogénéité de l'exposition des patients aux PDG selon la solution de glucose utilisée. L'exposition dépend, en premier lieu, de la solution référencée, ce qui signifie qu'il est extrêmement difficile de déterminer l'exposition réelle des patients aux PDG. Pour l'estimer, si l'on considère que le volume maximum de fluide perfusé est de 2 litres/jour^[90] et que toutes les perfusions journalières sont uniquement des SGI, la quantité moyenne de 5-HMF perfusée la plus élevée serait alors de $203,55 \pm 11,74 \mu\text{mol/jour}$ (soit $25,67 \pm 1,48 \text{ mg/jour}$). Matzi et *al.* ont montré qu'un apport oral quotidien de 5 709 μmol (soit 720 mg) de 5-HMF sur 10 jours n'avait aucun effet toxicologique apparent^[91]. Cependant, la biodisponibilité absolue du 5-HMF est estimée à 72%^[92], de sorte qu'une consommation orale de 5 709 $\mu\text{mol/jour}$ équivaut à une dose IV approximative de 4 123 $\mu\text{mol/jour}$ (soit 520 mg/jour). Ces données semblent confirmer que les patients hospitalisés pour une courte période et recevant des perfusions de glucose à faible volume présentent un faible risque de toxicité, comme le suggère une étude publiée précédemment^[46]. Cependant, l'état clinique des

patients peut accentuer leur exposition aux PDG, par biosynthèse endogène ou leur sensibilité à l'action pharmacologique de ces composés. Par exemple, lors d'une insuffisance rénale, la concentration des AGEs augmente puisque leur clairance est directement dépendante de la fonction rénale^[89]. Chez le patient diabétique, la glycémie est plus élevée que chez le patient sain et secondairement, il en est de même pour la concentration en AGEs. Ces derniers inhibent les effets antiprolifératifs et relaxation vasculaire du monoxyde d'azote^[27,90].

On dispose actuellement de peu de données sur la toxicité associée à la perfusion chronique de ces produits, notamment chez les populations particulièrement fragiles (nouveau-nés, patients souffrant de troubles critiques ou patients recevant une thérapie intraveineuse à long terme). Il a déjà été démontré que les PDG et les AGEs perturbent l'homéostasie cellulaire^[1,10,12,14,36,60] ou entraînent des troubles cliniques^[1,16,18-20,91]. Par la suite, des études *ex vivo*, *in vivo* et cliniques seront nécessaires pour établir le profil de toxicité de ces solutions.

L'originalité de ce travail est qu'en utilisant un modèle statistique, des facteurs autres que la stérilisation, les conditions de stockage et la quantité de glucose initiale ont été identifiés comme facteurs pouvant influencer la formation de PDG pendant toute la durée du stockage. La vitesse de formation des PDG est bien corrélée à la durée de stockage comprise entre 4 et 61 mois. La perméabilité à l'oxygène a une influence significative sur la vitesse de formation des deux PDG. Le PP et le verre limitent la formation des PDG (**figure 10**). Les multicouches PP/PA/PE, PE/PP et le PVC ne limitent pas la génération de PDG. L'impact du PE n'est pas significativement différent de 0.

Pour conclure, ce travail montre que les facteurs suivants influencent la formation du PDG : la quantité initiale de glucose, le fournisseur (i.e. le procédé de stérilisation), le coefficient de perméabilité à l'oxygène, le type de matériau du contenant primaire et la durée de stockage depuis la fabrication. Jusqu'à ce que des études de toxicité soient menées sur des patients, certaines mesures pourraient être appliquées pour réduire le risque d'exposition : l'utilisation de solutions de glucose à faibles concentrations conditionnées dans des flacons en verre et stockées pendant une courte période. Les concentrations en 5-HMF et en 2-FA dans les SGI résultent donc

de nombreux facteurs. Certains facteurs sont très hétérogènes comme les conditions de stérilisation ou encore les conditions de stockage. Il semble nécessaire de déterminer plus précisément la relation entre les concentrations en PDG et les conditions de stérilisation, permettant ainsi une maîtrise de leur formation.

PARTIE III : ETUDE DE L'INFLUENCE DES CONDITIONS DE STERILISATION SUR LA GENERATION DES PRODUITS DE DEGRADATION DU GLUCOSE

I. Introduction

Comme écrit au début de ce document, les SGI sont destinées à la voie parentérale. De ce fait, conformément aux exigences de la Pharmacopée Européenne, elles doivent être stériles, exemptes de pyrogènes et de particules visibles.

1. Principe de la stérilisation par la chaleur

La stérilisation est définie par la norme NF EN ISO 17665-1 comme un « *procédé validé utilisé pour obtenir un produit exempt de micro-organismes viables* »^[96].

La stérilisation par la chaleur humide est actuellement la technique de choix pour la stérilisation des SGI^[4].

L'objectif de la stérilisation par la chaleur humide est d'obtenir la destruction des germes, de garantir l'innocuité de l'agent stérilisant et la rapidité de la mise à disposition de la solution traitée, ici les SGI. L'inactivation ou la destruction de la charge microbienne se réalise par une méthode physique. En effet, les micro-organismes ont besoin pour leur survie d'eau, de chaleur, de nutriments et d'air (pour les micro-organismes aérobies ou mixtes). En supprimant un de ces éléments essentiels à leur survie, les micro-organismes deviennent inactifs^[97].

La stérilisation par la chaleur humide agit par oxydation ou coagulation empêchant la multiplication des micro-organismes. La chaleur endommage les membranes cellulaires par dénaturation des protéines. La coagulation des protéines se produit à partir de 52°C, à la différence de l'oxydation qui se produit à des températures nettement plus élevées. L'humidité, quant à elle, permet d'augmenter le pouvoir létal

de la température en augmentant le transfert de chaleur, permettant ainsi d'obtenir une coagulation à température plus basse et à un temps d'exposition plus court. En fonction des espèces de micro-organisme, la résistance à la chaleur est variable.

Pour optimiser la stérilisation, l'identification des espèces susceptibles d'être présentes dans les SGI est importante. Pour limiter la contamination initiale, la préparation des SGI doit être réalisée dans des locaux adaptés avec du personnel qualifié, selon les bonnes pratiques de fabrication^[97].

Le concept de la stérilité absolue n'existe pas : la stérilisation permet de diminuer considérablement le nombre de germes. C'est pourquoi, un niveau d'assurance de stérilité (NAS) a été défini à 10^{-6} permettant de dire qu'un produit est stérile si et seulement si, sur 1 000 000 d'objets stérilisés, un seul objet est retrouvé contaminé.

Le principe de la stérilisation par la chaleur humide repose sur l'apport de calorie et l'hydrolyse. L'eau est transformée en vapeur par phénomène naturel : l'évaporation ou vaporisation grâce à la montée en température. Cette vapeur permet une diffusion dans toutes les directions, d'augmenter la chaleur libérée entraînant l'hydrolyse des protéines bactériennes. La vapeur est invisible à 100°C mais le principe de Watt précise que la vapeur d'eau au contact d'un objet est toujours à température supérieure à celui-ci permettant une condensation de la vapeur et créant la buée, restituant ainsi l'énergie par transfert de chaleur.

La vapeur saturée est de la vapeur pure obtenue par la sortie d'air permettant à la vapeur d'occuper tout l'espace dans un état d'équilibre entre condensation et évaporation^[96]. La condensation entraîne une diminution du volume (vapeur d'eau = 1600 litres versus condensation = 1 litre d'eau). Cette perte de volume entraîne un effet d'aspiration créant le vide, permettant de diminuer la température d'ébullition.

Pour que la vapeur soit efficace, elle doit être la plus chargée en eau (pour la destruction des micro-organismes), elle doit ensuite être condensée permettant d'apporter une nouvelle quantité de chaleur et avoir ainsi un pouvoir pénétrant. Elle se contrôle par la température et la pression.

La **figure 12** représente le diagramme d'état de l'eau récapitulant l'ensemble des états créés par la température et la pression.

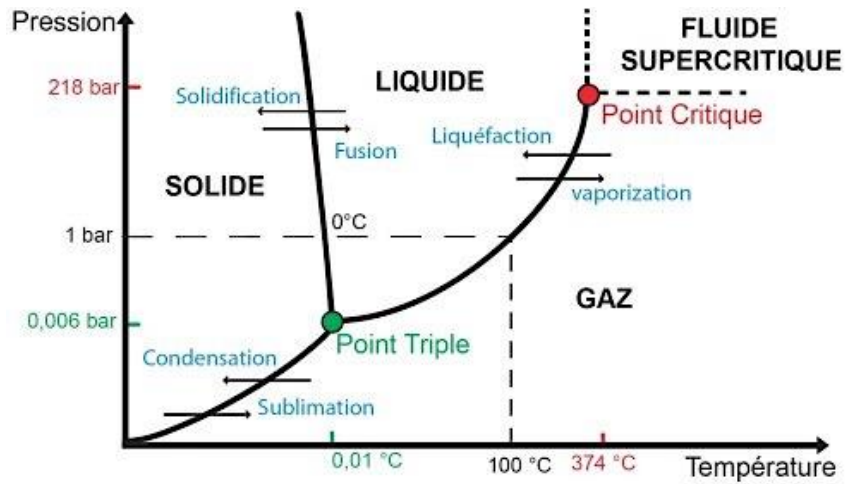


Figure 12 : Diagramme d'état de l'eau en fonction de la température et de la pression^[98].

La température et la pression sont étroitement liées. La table de Regnault permet de trouver la combinaison pression/température de la vapeur (**figure 13**).

Température °C	pression bars abs.
100	1,013
101	1,050
102	1,088
103	1,127
104	1,167
105	1,208
106	1,250
107	1,294
108	1,339
109	1,385
110	1,432
111	1,481
112	1,531
113	1,583
114	1,636
115	1,690
116	1,746
117	1,803
118	1,862
119	1,923
120	1,985

Température °C	pression bars abs.
121	2,049
122	2,114
123	2,182
124	2,251
125	2,321
126	2,394
127	2,468
128	2,545
129	2,623
130	2,703
131	2,785
132	2,869
133	2,956
134	3,044
135	3,135
136	3,228
137	3,323
138	3,420
139	3,520
140	3,621

Pression bars abs.	Pression bars relat.	Température °C
1	-0,013	99,09
2	0,987	119,62
3	1,987	132,88
4	2,987	142,92
5	3,987	151,11
6	4,987	158,08
7	5,987	164,17
8	6,987	169,61
9	7,987	174,53
10	8,987	179,040

selon formule approchée :

$$P = \frac{10}{0,783855 + \frac{2154,795153}{1058,835986 T + 273,15}} - (5,674582 - \frac{2154,795153}{1058,835986 T + 273,15})^2$$

Figure 13 : Table de Regnault : corrélation Pression/Température en vapeur saturée^[99].

La première partie de la norme NF EN ISO 17665-1 permet d'encadrer le développement, la validation et le contrôle d'un procédé de stérilisation^[96].

Les autoclaves doivent répondre à une qualification d'installation (équipement, installation et fonctionnement), opérationnelle et de performance. La norme stipule aussi des surveillances et des contrôles de routine permettant d'assurer le bon déroulement de la stérilisation.

La **figure 14** montre un exemple d'autoclave.



Figure 14 : Autoclave industriel permettant de réaliser des cycles de stérilisation par la chaleur humide^[100].

La **figure 15** décrit un cycle de stérilisation par la chaleur humide qui se déroule en 3 phases :

1) Prétraitement ou chauffage : alternance de dépressions et d'injections de vapeur pour chasser l'air résiduel. Il se termine par une phase de vide.

2) Plateau de stérilisation : injection de la vapeur pour obtenir la température et la pression désirée et maintien de la température et de la pression pendant la durée définie.

3) Séchage et vide avant un retour à la pression atmosphérique ou refroidissement : évacuation de la vapeur saturée et retour à la pression atmosphérique.

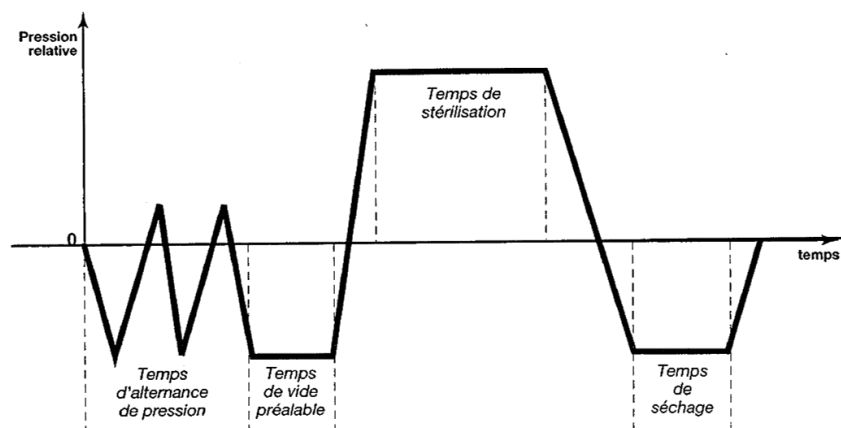


Figure 15 : Description des différentes phases se déroulant lors d'un cycle de stérilisation par la chaleur humide^[70].

La valeur stérilisatrice F_0 (en unité de temps) permet d'évaluer l'efficacité des cycles de stérilisation. Cet effet stérilisant représente la somme des effets stérilisants qui se cumulent pendant la durée du cycle. On peut le calculer comme suit :

$$F_0 = t * 10^{\frac{T-121}{10}}$$

Où t est la durée du cycle de stérilisation (en min) et T , la température de stérilisation (en °C).

Cette technique de stérilisation est une technique économique, rapide, simple, non polluante, non toxique, applicable à de nombreux produits et facile à contrôler.

2. Conséquences de la stérilisation par la chaleur humide sur les solutions de glucose stérilisées

La stérilisation par la chaleur est connue pour avoir un impact sur la dégradation du glucose^[1,5,7-9,72,73]. Effectivement, un grand nombre de produits de dégradation et/ou d'oxydation du glucose (PDG) est généré après exposition des solutions glucosées à la chaleur. L'étude menée au sein de notre laboratoire portant sur l'analyse du marché français a permis de démontrer l'impact de la stérilisation sur la formation de ces PDG.

Le **tableau 13** résume les données de la littérature sur les différentes études menées sur l'impact de la stérilisation par la chaleur humide sur la formation des PDG.

L'étude de Postaire *et al.* semble montrer que plus la température est importante et plus la génération des produits de dégradation est conséquente^[8] en travaillant en deux parties. Une première partie compare différents cycles de stérilisation (durées et températures différentes) mettant en évidence l'impact de la température par augmentation de la dégradation du glucose. Cette dégradation exprimée en %, passe de 3,4 à 8,62% pour une température de 110°C à 134°C pour une solution de glucose initialement dosée à 50%.

La seconde partie de l'étude met en évidence le rôle de la durée du cycle. Pour cela, Postaire *et al.* ont comparé trois cycles : la température a été fixée à 120°C et trois durées ont été testées (30, 40 et 60 minutes). Les concentrations en PDG varient de 2,46 à 40,01 mg/L pour des durées de cycles de 30 à 60 min, respectivement^[8]. L'équipe de Taylor arrive à cette même conclusion par comparaison de 7 durées de cycle, à une température de 120°C^[101].

Cook *et al.* quant à eux, ont étudié l'influence de cinq températures différentes (115, 117, 119, 121 and 124°C) et démontrent qu'il serait préférable de travailler à une

température plus élevée mais avec une durée de cycle la plus courte possible dont la combinaison permet le maintien de la stérilité des solutions et de limiter la formation du 5-HMF. Ces deux cycles ont un effet stérilisant F_0 de 16, exprimant la létalité d'un procédé de stérilisation (en unité de temps)^[5]. Lebedo *et al.*^[72] et Kjellstrand *et al.*^[87] retrouvent des conclusions similaires en travaillant à différentes températures et différents F_0 sur des solutions de DP. L'un exprime ses résultats par l'absorbance UV des PDG^[72] et l'autre par l'inhibition cellulaire^[87].

Tableau 13 : Résumé des études décrites dans la littérature portant sur la formation des PDG pendant la phase de stérilisation

Références	Solutions de Glucose	Caractéristiques étudiées	Interprétation des résultats
Postaire et al. ^[8]	G10% G30% G50%	<u>Cycles étudiés :</u> 110°C - 103 min 120°C - 20 min 134°C - 3 min	Plus la température est importante et plus la dégradation du glucose est conséquente (CLHP-UV)
Postaire et al. ^[8]	G10% G30% G50%	<u>Durées étudiées :</u> 120°C - 30 min 120°C - 40 min 120°C - 60 min	Plus la durée est importante et plus la dégradation du glucose est conséquente
Cook et al. ^[5]	G5%	<u>Cycles étudiés :</u> 115°C - F ₀ : 8,10,12,14 et 16 117°C - F ₀ : 8,10,12,14 et 16 119°C - F ₀ : 8,10,12,14 et 16 121°C - F ₀ : 8,10,12,14 et 16 124°C - F ₀ : 8,10,12,14 et 16	La durée du cycle semble avoir plus d'impact que la température sur la formation des PDG (CLHP-UV)
Taylor et al. ^[101]	G5%	<u>Durées étudiées :</u> 120°C - 5, 15, 20, 25, 30, 35 et 45 heures	Plus la durée est importante et plus la dégradation du glucose est conséquente
Kjellstrand et al. ^[87]	PDF 1,5%	115°C - F ₀ : 10, 20, 30, 40 et 50 120°C - F ₀ : 10, 20, 30, 40 et 50 125°C - F ₀ : 10, 20, 30, 40 et 50 130°C - F ₀ : 10, 20, 30, 40 et 50 140°C - F ₀ : 10, 20, 30, 40 et 50	La durée du cycle semble avoir plus d'impact que la température sur la formation des PDG (UV absorbance)
Ledebo et al. ^[72]	PDF 50%	Différents F ₀ : de 10 à 50 Différentes températures : de 115°C à 140°C	La durée du cycle semble avoir plus d'impact que la température sur la formation des PDG. (ICG)

L'équipe de Kjellstrand démontre l'impact du F_0 en comparant trois F_0 différents : $F_0 = 0$ (filtration stérilisante), $F_0 = 30$ et $F_0 = 80$ ^[87]. Plus le F_0 est grand et plus la formation des PDG est conséquente. Ces données sont aussi décrites dans les travaux de Lebedo et *al.*^[72].

L'objectif du travail de cette partie est dans un premier temps, d'identifier les principaux paramètres jouant un rôle dans la formation des PDG lors de la stérilisation en travaillant sur différentes méthodes de stérilisation et en faisant varier les conditions de stérilisation, en lien avec les données de la littérature, puis de définir leur impact par une méthode statistique permettant ainsi définir les conditions optimales de stérilisation afin de limiter la formation de PDG potentiellement toxiques au moment de la fabrication des SGI. Enfin, un modèle cinétique sera proposé tenant compte de l'ensemble des paramètres influents.

II. Matériels et Méthodes

1. Conditions de stérilisation

Comme annoncé précédemment, les conditions de stérilisation par la chaleur humide ne nous ont pas toujours été communiquées par les industriels. En nous basant sur les données de la littérature et sur les informations communiquées par les laboratoires, l'influence de dix conditions de stérilisation par chaleur humide a été évaluée. De plus, une méthode de stérilisation à froid, par filtration stérilisante, a été réalisée en tant que méthode de référence.

- Filtration stérilisante

La filtration stérilisante a été réalisée à l'aide d'une seringue de 50 ml Plastipak™ (Becton-Dickinson, Le Pont de Claix, France) et d'un filtre-seringue stérile de 0,22 µm de porosité et de 25 mm de diamètre en acétate de cellulose (VWR International S.A.S, Fontenay-sous-Bois, France).

- Chaleur humide

Les 10 cycles réalisés ont été :

- C₁ : 111°C, 30 min (F₀ = 3,0) – Autoclave VAPOUR-Line® (V)
- C₂ : 111°C, 90 min (F₀ = 9,0) – Autoclave Lequeux® (L)
- C₃ : 111°C, 200 min (F₀ = 20,0) – Autoclave Lequeux® (L)
- C₄ : 116°C, 30 min (F₀ = 9,5) – Autoclave VAPOUR-Line® (V)
- C₅ : 121°C, 9 min (F₀ = 9,0) – Autoclave VAPOUR-Line® (V)
- C₆ : 121°C, 20 min (F₀ = 20,0) – Autoclave VAPOUR-Line® (V)
- C₇ : 121°C, 30 min (F₀ = 30,0) – Autoclave VAPOUR-Line® (V)
- C₈ : 134°C, 3 min (F₀ = 60,0) – Autoclave VAPOUR-Line® (V)
- C₉ : 121°C, 15 min (F₀ = 15,0) – Autoclave VAPOUR-Line® (V)
- C₁₀ : 121°C, 15 min (F₀ = 15,0) – Autoclave Lequeux® (L)

Les cycles de stérilisation C_1 et de C_4 à C_9 ont été réalisés au sein du Laboratoire de Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière, de la Faculté de Pharmacie de Lille, à l'aide d'un autoclave de paillasse VAPOUR-Line® (VWR, Radnor, Pennsylvanie, Etats-Unis) décrit par la **figure 16**. Cet autoclave est limité à une durée maximale de cycle de 30 min. Les cycles C_2 , C_3 et C_{10} ayant une durée de stérilisation de 90, 200 et 15 min respectivement, ont été réalisés au Laboratoire de Bactériologie, à la Faculté de Pharmacie de Lille, par un autoclave Lequeux® (Getinge, Courtaboeuf – Les Ulis, France), **figure 17**. Les cycles C_9 et C_{10} ont été réalisés afin de vérifier l'influence potentielle de l'autoclave.



Figure 16 : Autoclave VAPOUR-Line® (VWR, Radnor, Pennsylvanie, Etats-Unis).



Figure 17 : Autoclave Lequeux® (Getinge, Courtaboeuf – Les Ulis, France)

Les cycles ont été choisis pour permettre une analyse des résultats pour une température fixe, un F_0 fixe et une durée de cycle identique, ayant pour but l'analyse des combinaisons temps/température influençant la dégradation du glucose.

Le protocole de l'étude de l'impact de la stérilisation sur la formation des PDG est résumé dans la **figure 18**.

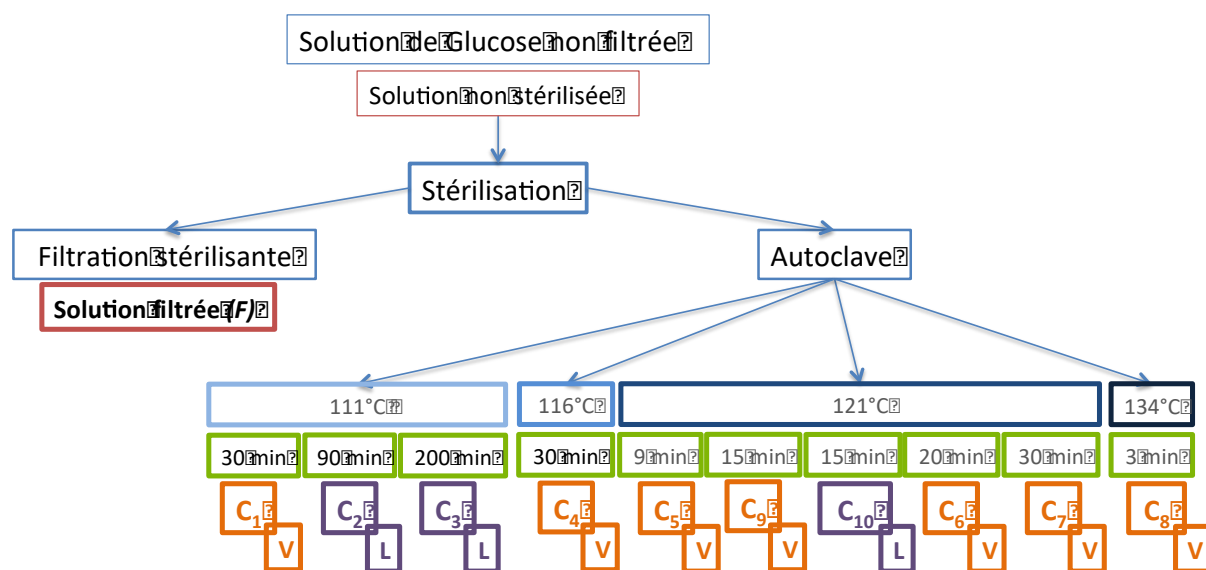


Figure 18 : Description des conditions opératoires de l'étude de stérilisation : les cycles C₁, C₄, C₅, C₆, C₇ et C₉ ont été réalisés à l'aide de l'autoclave VAPOUR-Line® (V) et les cycles C₂, C₃, C₁₀ ont été réalisés à l'aide de l'autoclave Lequeux® (L).

Pour chaque condition de stérilisation, une quantification des PDG est réalisée avant et après la stérilisation (filtration ou autoclave) à l'aide de la méthode analytique décrite au paragraphe A de la Partie II. Les échantillons étudiés avant une stérilisation sont identifiés comme non stériles (NS).

2. Préparation des échantillons de solutions glucosées à 5, 10, 30 et 50%

Le travail porte sur 4 concentrations de SGI, représentatives du marché français : 5%, 10%, 30% et 50%. En partant de glucose anhydre en poudre de qualité Pharmacopée Européenne et d'eau ultra-pure, les solutions de glucose ont été réalisées dans des fioles jaugées de 500 mL afin d'assurer une quantité suffisante pour l'ensemble des manipulations effectuées.

Ces solutions, une fois préparées ont été réparties de manière équitable dans les flacons en verre de 100 mL autoclavables (VWR International S.A.S, Fontenay-sous-

Bois, France) : 11 flacons par solution dont 1 pour la filtration stérilisante. Le choix du conditionnement final (volume fixé à 100mL et le flacon en verre) a été choisi en lien avec les travaux précédemment qui démontraient qu'un faible volume et qu'un conditionnement en verre limitaient la formation des PDG. Ces conditions expérimentales permettent donc d'observer l'impact de la stérilisation sur la dégradation du glucose en limitant l'influence des autres facteurs, mis en évidence dans l'étude précédente.

3. Méthode analytique

Les solutions glucosées préparées ont été analysées trois fois par la méthode analytique décrite précédemment. Lorsque cela était nécessaire, des dilutions ont été effectuées à l'aide d'eau ultra-pure afin que les concentrations finales en PDG soient comprises dans les gammes de dosage validées.

4. Analyse statistique

Les concentrations en glucose, en 5-HMF et en 2-FA sont exprimées en concentrations molaires.

A partir des concentrations calculées pour chaque solution testée, il est possible de définir la vitesse de formation des PDG selon la formule suivante (**équation 14**) :

$$\frac{d[\text{PDG}]}{dts} = \frac{[\text{PDG}] - [\text{PDG}_0]}{t_s} \quad \text{éq. 14}$$

où t_s est la durée du cycle de stérilisation, $[\text{PDG}_0]$ la concentration initiale en PDG et $[\text{PDG}]$ la concentration de PDG après la stérilisation.

S'il s'avérait que la vitesse de formation des PDG ne suive pas une loi normale, une transformation logarithmique de la variable étudiée serait nécessaire pour que la vitesse, une fois transformée $\ln\left(\frac{dPDG}{dt_s}\right)$ suive une loi normale.

Pour l'analyse des paramètres de la stérilisation influençant la formation des PDG, une analyse par régression multiple a été réalisée. Cette régression permet de modéliser l'influence des paramètres suivants : concentration initiale en glucose ($[G_0]$), la température du cycle (T) et l'effet stérilisant (F_0). L'équation théorique recherchée est décrite ci-dessous :

$$\ln\left(\frac{dPDG}{dt_s}\right) = a.T + b.F_0 + c.\ln[G_0] + i \quad \text{éq. 15}$$

où a, b et c sont les paramètres de la régression.

Le i est une constante correspondant au bruit de fond sur la vitesse.

Pour les comparaisons des conditions, lorsque les échantillons sont de petite taille ($n < 30$), sans possibilité de test de normalité, un test non paramétrique de type Wilcoxon sera utilisé afin de mettre en évidence ou non une différence entre les conditions de stérilisation. Dans les autres situations, un test de Student sera utilisé, notamment lors de la comparaison des paramètres de régression.

Pour l'ensemble des tests statistiques réalisés, un test bilatéral avec un $p < 0,05$ est considéré comme statistiquement significatif. Ces analyses ont été conduites avec le logiciel XLSTAT® (XLSTAT v2014.5.02, Addinsoft, Paris, France). Le test de Mann et Whitney a été utilisé pour mettre en évidence l'impact des différents cycles de stérilisation par la chaleur humide avec $p < 0,05$.

III. Résultats

1. Analyse descriptive

L'impact de la stérilisation s'étudie par comparaison avec les dosages avant la stérilisation (NS) et après chaque type de stérilisation, permettant de mettre en évidence la formation de PDG supplémentaires. Les **figures 19** et **20** ainsi que le **tableau 14** résument les résultats des dosages.

a. Solutions sans stérilisation

En ce qui concerne les solutions non stérilisées, le 5-HMF est présent dans l'ensemble de ces solutions à l'état de traces et non quantifiables pour les solutions de G5, G10 et G30. Seule la concentration en 5-HMF (447 ± 1 nM) pour la solution de G50 est supérieure à la LDQ (238,92 nM,). A l'inverse, le 2-FA n'est pas détecté par notre méthode de dosage, quelle que soit la concentration en glucose. L'ensemble de ces résultats est disponible dans le tableau 14.

Tableau 14 : Influence de la stérilisation sur les concentrations initiales en 5-HMF (H_0) en nM et en 2-FA (FA_0) en nM. G_0 , concentration initiale en glucose, H concentration en 5-HMF et VH, la vitesse de formation du 5-HMF. FA, concentration en 2-FA et VFA, la vitesse de formation du 2-FA. Les concentrations sont exprimées en μM pour le glucose et en μM pour le 5-HMF et le 2-FA et les vitesses en nM/min. *inférieure à la LDQ, estimé à LDQ. $LDQ_{5\text{-HMF}} = 0,239 \mu\text{M}$ et $LDQ_{2\text{-FA}} = 57,00 \text{ nM}$. ** inférieure à la LDD, estimée à la LDD. $LDD_{5\text{-HMF}} = 0,052 \mu\text{M}$ et $LDD_{2\text{-FA}} = 17,10 \text{ nM}$.

	Température	F_0	Durée	$G_0\%$	G_0 (μM)	H_0 (nM)	H (μM)	VH ($\mu\text{M}/\text{min}$)	FA_0 (nM)	FA (nM)	VFA (nM/min)
Filtration	20	0	1	5	277 531	0,239*	0,239*	0,00	17,10**	0,00	-
Filtration	20	0	1	10	555 062	0,239*	0,239*	0,00	17,10**	0,00	-
Filtration	20	0	1	30	1 665 186	0,239*	0,239*	0,00	17,10**	0,00	-
Filtration	20	0	1	50	2 775 310	0,447	0,451	0,0516	17,10**	0,00	-
C₁	111	3	30	5	277 531	0,239*	0,617	0,0179	17,10**	57,0*	0,78
C₁	111	3	30	10	555 062	0,239*	1,42	0,0450	17,10**	57,5	1,92
C₁	111	3	30	30	1 665 186	0,239*	5,57	0,180	17,10**	266	8,87
C₁	111	3	30	50	2 775 310	0,447	6,25	0,195	17,10**	382	12,72
C₂	111	9	90	5	277 531	0,239*	23,48	0,260	17,10**	952	10,58
C₂	111	9	90	10	555 062	0,239*	43,30	0,480	17,10**	1 381	15,35
C₂	111	9	90	30	1 665 186	0,239*	141	1,566	17,10**	5 389	59,87
C₂	111	9	90	50	2 775 310	0,447	278	3,086	17,10**	9 269	102,99
C₃	111	20	200	5	277 531	0,239*	84,0	0,420	17,10**	3 255	16,27
C₃	111	20	200	10	555 062	0,239*	173	0,862	17,10**	5 187	25,93
C₃	111	20	200	30	1 665 186	0,239*	770	3,850	17,10**	11 612	58,06
C₃	111	20	200	50	2 775 310	0,447	1125	5,625	17,10**	17 984	89,92
C₄	116	30	9,5	5	277 531	0,239*	1,52	0,152	17,10**	80,9	8,52
C₄	116	30	9,5	10	555 062	0,239*	2,74	0,281	17,10**	128	13,45
C₄	116	30	9,5	30	1 665 186	0,239*	17,0	1,771	17,10**	631	66,47
C₄	116	30	9,5	50	2 775 310	0,447	30,0	3,110	17,10**	1 115	117,32

C₅	121	9	9	5	277 531	0,239*	2,12	0,227	17,10**	99,4	11,04
C₅	121	9	9	10	555 062	0,239*	3,28	0,357	17,10**	175	19,44
C₅	121	9	9	30	1 665 186	0,239*	18,1	1,993	17,10**	626	69,55
C₅	121	9	9	50	2 775 310	0,447	27,7	3,031	17,10**	1 306	145,06
C₆	121	20	20	5	277 531	0,239*	2,32	0,112	17,10**	197	9,86
C₆	121	20	20	10	555 062	0,239*	10,0	0,497	17,10**	376	18,78
C₆	121	20	20	30	1 665 186	0,239*	36,3	1,807	17,10**	1 216	60,78
C₆	121	20	20	50	2 775 310	0,447	43,0	2,129	17,10**	1 224	61,18
C₇	121	30	30	5	277 531	0,239*	8,78	0,290	17,10**	384	12,80
C₇	121	30	30	10	555 062	0,239*	21,9	0,728	17,10**	793	26,43
C₇	121	30	30	30	1 665 186	0,239*	65,9	2,191	17,10**	2 460	82,01
C₇	121	30	30	50	2 775 310	0,447	177	5,870	17,10**	5 006	166,86
C₈	134	60	3	5	277 531	0,239*	12,0	12,648	17,10**	929	309,61
C₈	134	60	3	10	555 062	0,239*	38,8	24,201	17,10**	1 623	540,99
C₈	134	60	3	30	1 665 186	0,239*	143	113,173	17,10**	6 622	2207,22
C₈	134	60	3	50	2 775 310	0,447	165	131,712	17,10**	6 488	2162,69
C₉	121	15	15	5	277 531	0,239*	6 410	422,08	17,10**	267	17,79
C₉	121	15	15	10	555 062	0,239*	12 727	843,82	17,10**	630	41,97
C₉	121	15	15	30	1 665 186	0,239*	29 578	1961,13	17,10**	1 155	76,99
C₉	121	15	15	50	2 775 310	0,447	43 396	2866,43	17,10**	1 263	84,20
C₁₀	121	15	15	5	277 531	0,239*	31 644	2104,34	17,10**	1 179	78,61
C₁₀	121	15	15	10	555 062	0,239*	56 694	3774,96	17,10**	2 279	151,89
C₁₀	121	15	15	30	1 665 186	0,239*	89 164	5933,52	17,10**	2 197	146,48
C₁₀	121	15	15	50	2 775 310	0,447	149 992	9972,85	17,10**	4 087	272,48

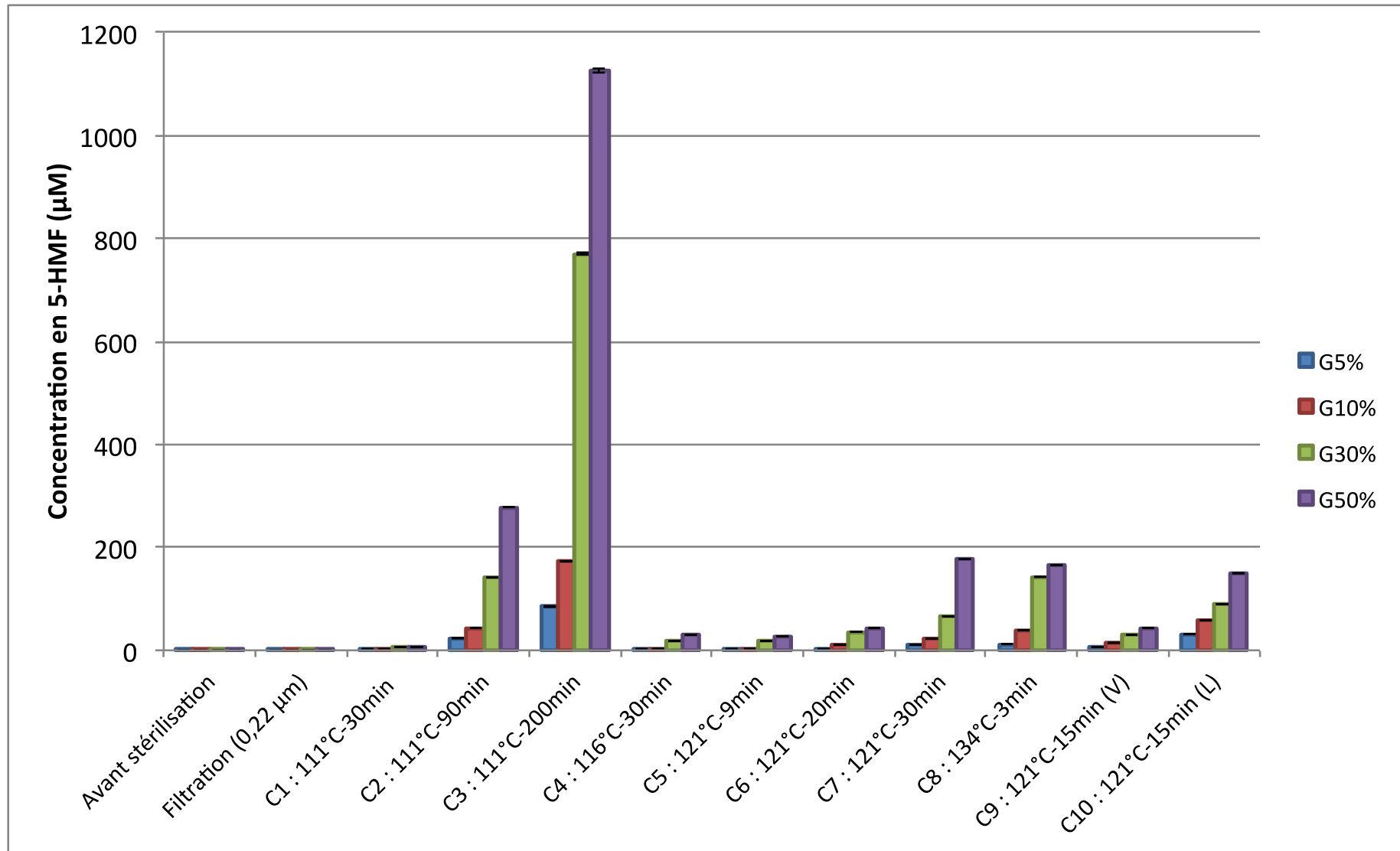


Figure 19 : Influence de la stérilisation sur les concentrations initiales en 5-HMF (H_0). Les concentrations sont exprimées en μM .

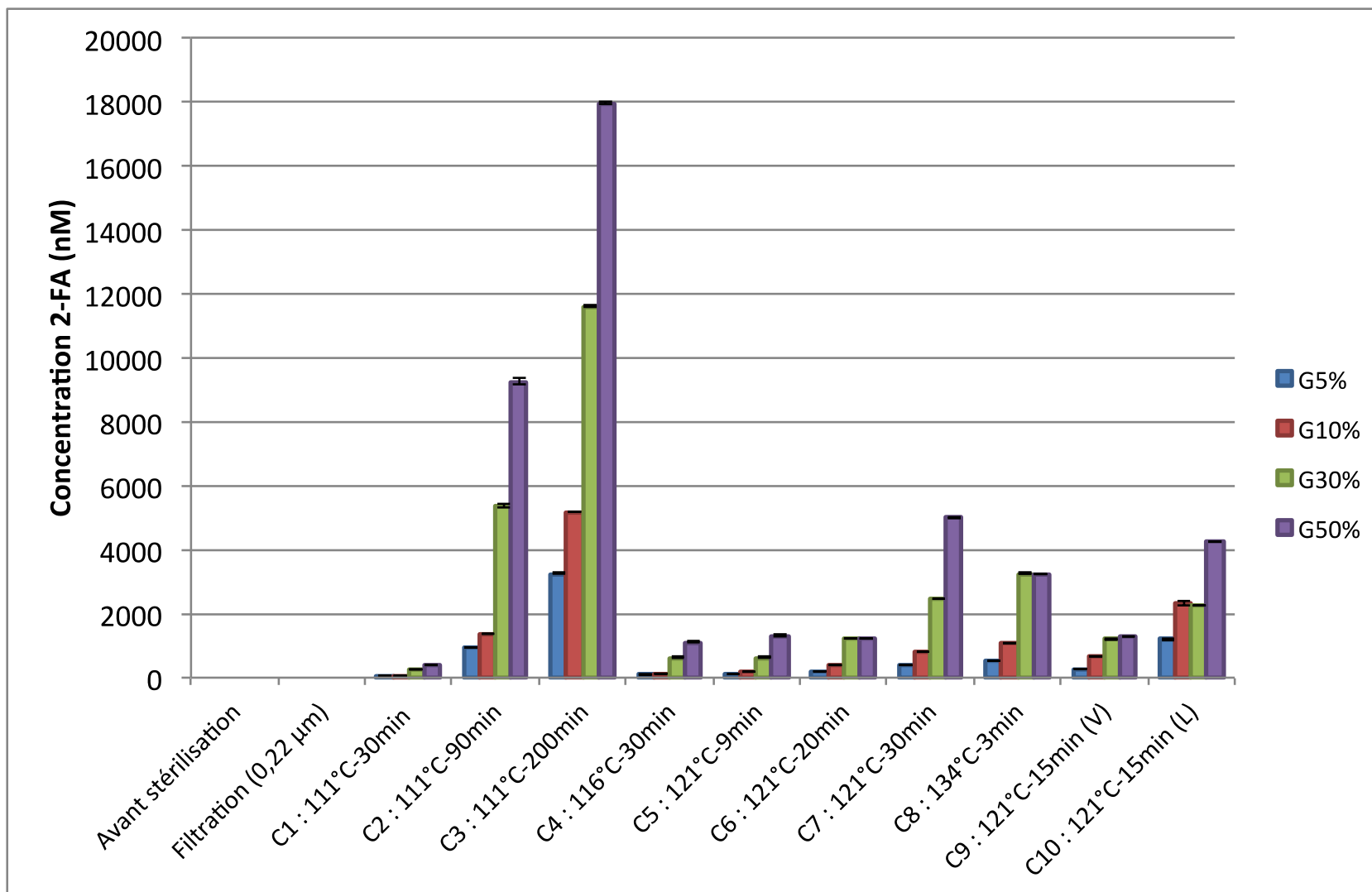


Figure 20 : Influence de la stérilisation sur les concentrations initiales en 2-FA (FA_0). Les concentrations sont exprimées en μM .

a. Solutions traitées par la filtration stérilisante

En ce qui concerne les solutions stérilisées par filtration, on constate que les concentrations en 5-HMF retrouvées sont très faibles et sont similaires à celles observées dans les solutions non stérilisées (**figure 21 et tableau 15**).

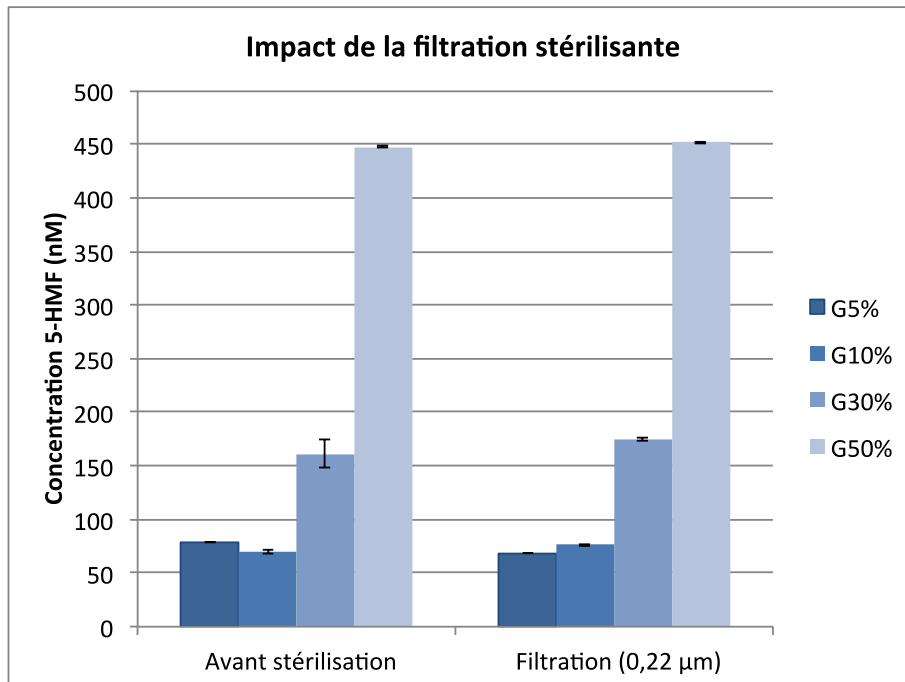


Figure 21 : Impact de la filtration stérilisante sur la formation du 5-HMF (nM)

Tableau 15 : Concentrations en 5-HMF et en 2-FA en nM (moyenne \pm écart-type) dans les solutions glucosées de G5, G10, G30 et G50 avant et après filtration stérilisante. ND : Non détectable (inférieure à la LDD). < 239 nM : détectable mais non quantifiable (inférieure à la LDQ), estimée à LDQ = 239 nM.

Concentration en glucose (g/100mL - %)	2-FA (nM)		5-HMF (nM)		
	Avant filtration stérilisante	Après filtration stérilisante	Avant filtration stérilisante	Après filtration stérilisante	p-value
5	ND	ND	<239 nM	<239 nM	-
10	ND	ND	<239 nM	<239 nM	-
30	ND	ND	<239 nM	<239 nM	-
50	ND	ND	447,29 \pm 1,22	451,35 \pm 0,78	0,25

Les concentrations en 5-HMF avant et après filtration stérilisante mesurées pour les solutions de G5, G10 et G30, sont inférieures à la LDQ. Pour essayer d'estimer l'impact de la filtration stérilisante, la même expérience a été réalisée du G50 pour lequel les résultats avant et après filtration sont respectivement les suivants 447 \pm 1 nM et de 451 \pm 1 nM. Sur ces données en G50, aucune différence significative n'est mise en évidence entre les concentrations avant et après filtration stérilisante ($p = 0,25$).

Le 2-FA n'est toujours pas détectable dans ces solutions, malgré une LDD très faible.

En conclusion, la stérilisation par filtration n'entraîne pas la formation significative de PDG.

b. Solutions stérilisées par la chaleur humide

Etant donné les résultats de la filtration stérilisante montrant un effet nul de cette dernière et le fait que la concentration en PDG est inférieure à la LDQ, sauf pour le G50, nous avons décidé, afin de se mettre dans les plus mauvaises conditions, de tester la différence entre la concentration en PDG après stérilisation par la chaleur et la LDQ (valeur maximale théorique pouvant être obtenue lors de la filtration stérilisante pour le G5, G10 et G30 sans pouvoir être quantifiée).

Les résultats sont décrits dans le **tableau 16**. La stérilisation par la chaleur humide, par l'étude de différentes conditions de stérilisation à chaud (C₁ à C₁₀), a une influence sur la formation des deux PDG. Le 2-FA est également détecté après stérilisation par la chaleur humide, quelles que soient les conditions. Ces résultats montrent que la stérilisation a un impact significatif sur la formation du 5-HMF et du 2-FA, et ce, quelle que soit la concentration en glucose ($p < 0,001$).

Les **figures 19 et 20** représente l'impact de la stérilisation sur les concentrations initiales en 5-HMF (**figure 19**) et en 2-FA (**figure 20**) en fonction des conditions de stérilisation. Les concentrations sont exprimées en nM.

Tableau 16 : Impact de la stérilisation sur la formation du 5-HMF (μM) et du 2-FA (nM) dans des solutions de G5, G10, G30 et G50 (moyenne \pm écart-type). ND : Non détectable (inférieure à la LDD_{2-FA} = 17,10 nM). < 239 nM : détectable mais non quantifiable (inférieure à la LDQ), estimée à LDQ = 239 nM.

Concentration en glucose (g/100mL - %)	5-HMF (μM)				2-FA (nM)			
	5	10	30	50	5	10	30	50
Stérilisation par Filtration	<239nM	<239nM	<239nM	0,45 \pm 0,00	ND	ND	ND	ND
Stérilisation par la chaleur	17,3 \pm 24,7	36,3 \pm 49,7	132 \pm 222	205 \pm 324	699 \pm 941	1213 \pm 505	2 886 \pm 3 310	4 508 \pm 5 247
p-value	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001

c. La concentration initiale

Les résultats montrent l'impact de la concentration initiale en glucose. En effet, plus la concentration initiale est importante et plus la formation des PDG est conséquente. Lors du cycle C₂ par exemple, la température est fixée à 111°C et la durée à 90 minutes. Les concentrations en 5-HMF retrouvées pour les solutions de G5, G10, G30 et G50 respectivement de $23,5 \pm 0,0 \mu\text{M}$, $43,3 \pm 0,1 \mu\text{M}$, $141 \pm 0 \mu\text{M}$ et $278 \pm 0 \mu\text{M}$. On retrouve la même augmentation pour les concentrations en 2-FA : $952 \pm 9 \text{ nM}$, $1381 \pm 10 \text{ nM}$, $5388 \pm 65 \text{ nM}$ et $9269 \pm 92 \text{ nM}$ pour le G5, G10, G30 et G50, respectivement.

Des augmentations de concentrations en PDG en fonction des concentrations initiales en glucoses sont présentes pour l'ensemble des cycles testés sauf pour le cycle C₆ et C₈ pour le 2-FA et pour le cycle C₈ pour le 5-HMF et ce pour le G30 et G50 uniquement.

d. La durée de la stérilisation

La comparaison des cycles C₁, C₂ et C₃ pour lesquels la durée du cycle varie de 30 à 200 minutes (T fixe à 111°C) montre une augmentation très importante des concentrations des 2 PDG (**figure 22**) avec l'augmentation de cette durée.

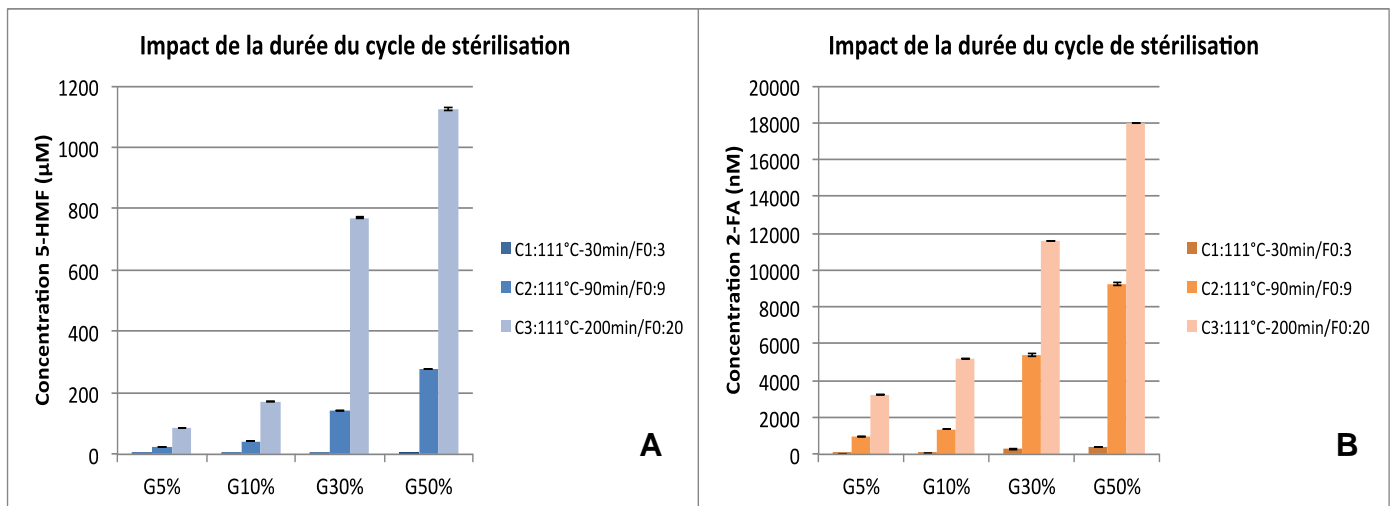


Figure 22 : Influence de la durée du cycle de stérilisation. Les conditions expérimentales sont : C₁ : 111°C/30 min (F₀=3), C₂ : 111°C/90 min (F₀=9) et C₃ : 111°C/200 min (F₀=20) en fonction des concentrations initiales en glucose sur la formation du 5-HMF en μM (A) et du 2-FA en nM (B).

On peut observer une variation des concentrations de 617 ± 2 nM à $83\,993 \pm 72$ nM pour le 5-HMF et de 23 ± 1 nM à $3\,254 \pm 6$ nM pour le 2-FA dans la solution de G5% pour une durée de cycle de 30 et 200 minutes respectivement. La **figure 22** montre également l'impact de la concentration initiale en glucose sur la formation des PDG. Plus la concentration en glucose est importante et plus la concentration en PDG est conséquente, quelles que soient les conditions de stérilisation.

e. La température de stérilisation

L'influence de la température est également observée (**figure 23**). En comparant les cycles C₁, C₄ et C₇, de durée fixée à 30 minutes et ayant une température de stérilisation de 111°C, 116°C et 121°C respectivement, on observe une augmentation des concentrations en PDG entre $1,42 \pm 0,01$ μM à $21,9 \pm 0,0$ μM pour le 5-HMF et de 58 ± 4 nM à 793 ± 5 nM pour le 2-FA dans la solution de G10%, passant de 111°C à 121°C respectivement.

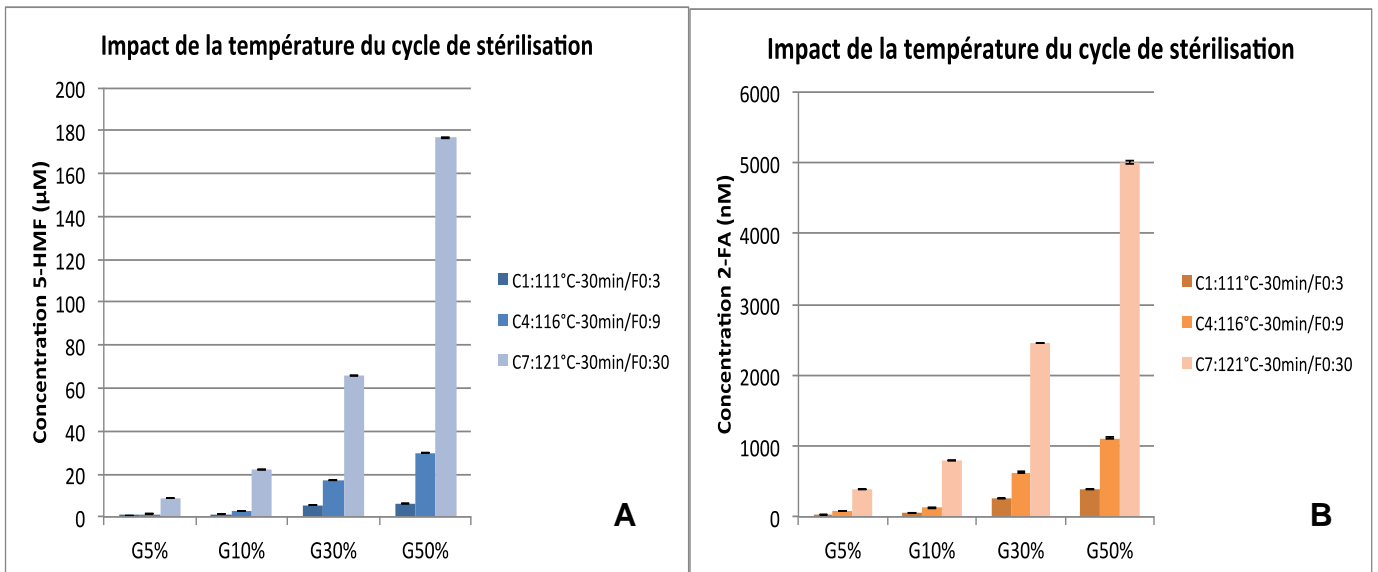


Figure 23 : Influence de la température du cycle de stérilisation. C₁ : 111°C – 30 min (F₀ = 3), C₄ : 116°C – 30 min (F₀ = 9,5) et C₇ : 121°C – 30 min (F₀ = 30) en fonction des concentrations initiales en glucose sur la formation du 5-HMF (A) et du 2-FA (B).

f. Valeur stérilisatrice F₀

La comparaison de la formation des PDG à valeur stérilisante équivalente F₀ = 9 et F₀ = 20 est décrite dans la **figure 24** et **25**, respectivement. Cette comparaison s'effectue entre le cycle C₂ et C₅ pour un F₀ = 9 et entre le cycle C₃ et C₆ pour un F₀ = 20. On observe que pour un même F₀, la durée du cycle a plus d'impact que la température du cycle. L'impact de la durée est d'environ 20 fois plus important que celui de la température.

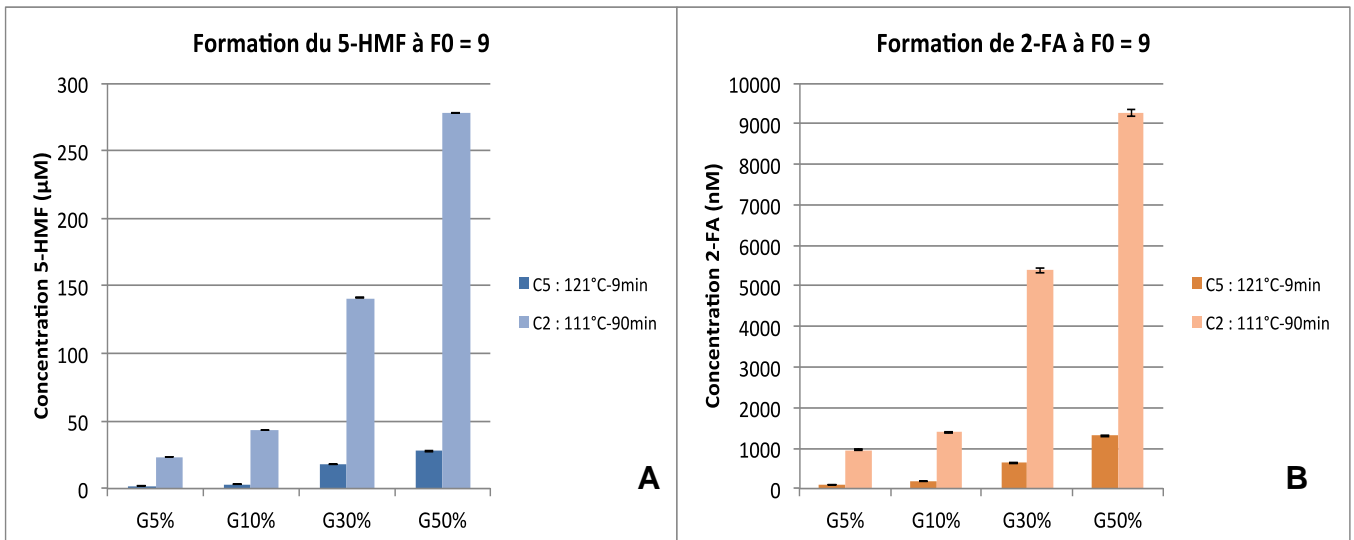


Figure 24 : Comparaison des conditions de stérilisation pour un F₀ de 9 (C₂ : 111°C – 90 min et C₅ : 121°C – 9 min) en fonction des concentrations initiales en glucose sur la formation du 5-HMF (µM) (A) et du 2-FA (nM) (B).

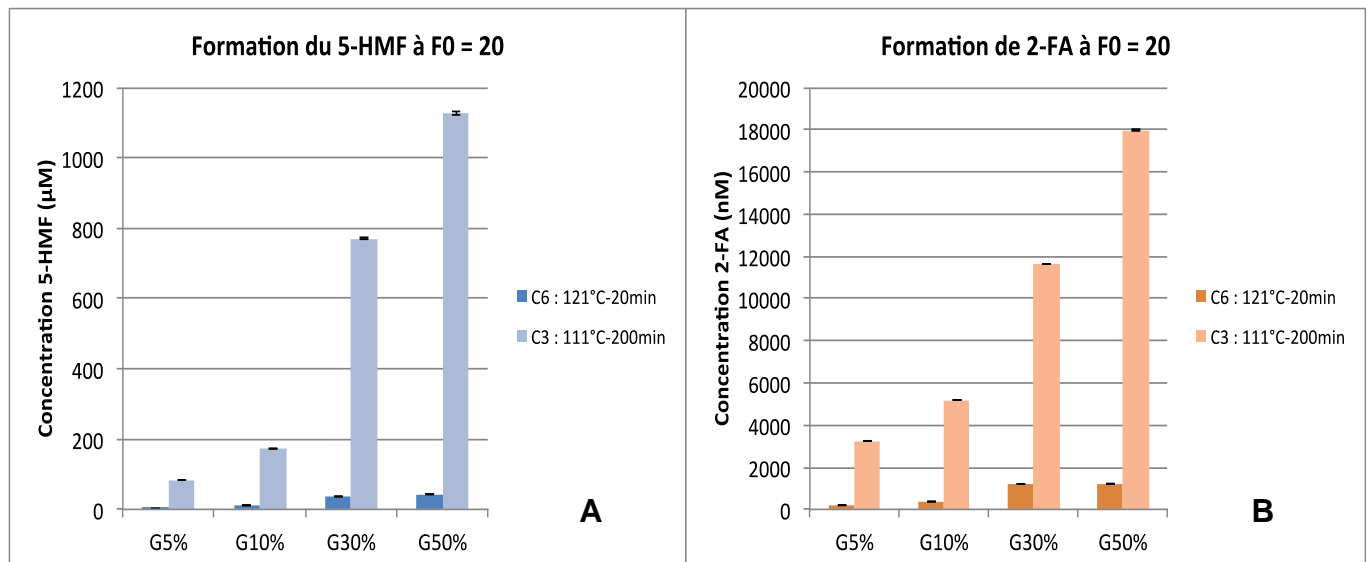


Figure 25 : Comparaison des conditions de stérilisation pour un F₀ de 20 (C₃ : 111°C – 200 min et C₆ : 121°C – 20 min) en fonction des concentrations initiales en glucose sur la formation du 5-HMF (µM) (A) et du 2-FA (nM) (B).

Les résultats des concentrations en 5-HMF et en 2-FA quantifiées dans les solutions de G5, G10, G30 et G50 après stérilisation par les cycles de $F_0 = 9$ (C_2 et C_5) et de $F_0 = 20$ (C_3 et C_6) sont décrits dans les **tableaux 17 et 18**, respectivement.

Tableau 17 : Concentration en 5-HMF (μM) et en 2-FA (nM) quantifiées dans les solutions de glucose après stérilisation par la chaleur humide par les cycles C_2 et C_5 ($F_0 = 9$) (moyenne \pm écart-type). Test de Mann et Whitney.

Concentration en glucose (g/100mL - %)	$F_0 = 9$			
	5-HMF (μM)		2-FA (nM)	
	$C_2 : 111^\circ\text{C}-90\text{min}$	$C_5 : 121^\circ\text{C}-9\text{min}$	$C_2 : 111^\circ\text{C}-90\text{min}$	$C_5 : 121^\circ\text{C}-9\text{min}$
5	23,5 \pm 0,0	2,12 \pm 0,01	953 \pm 9	99,4 \pm 2,4
10	43,3 \pm 0,1	3,28 \pm 0,01	1 381 \pm 10	174 \pm 4
30	141 \pm 0	18,1 \pm 0,2	5 389 \pm 66	626 \pm 8
50	278 \pm 0	27,7 \pm 0,4	9 270 \pm 93	1 3056 \pm 23
p-valeur	p < 0,001		p < 0,001	

L'analyse statistique des concentrations en 5-HMF et en 2-FA obtenues après stérilisation par les cycles C_2 et C_5 ($F_0 = 9$) montre une différence significative (p < 0,001).

Tableau 18 : Concentration en 5-HMF (μM) et en 2-FA (μM) quantifiées dans les solutions de glucose après stérilisation par la chaleur humide par les cycles C_3 et C_6 ($F_0 = 20$) (moyenne \pm écart-type). Test de Mann et Whitney.

Concentration en glucose (g/100mL - %)	$F_0 = 20$			
	5-HMF (nM)		2-FA (nM)	
	$C_3 : 111^\circ\text{C}-200\text{min}$	$C_6 : 121^\circ\text{C}-20\text{min}$	$C_3 : 111^\circ\text{C}-200\text{min}$	$C_6 : 121^\circ\text{C}-20\text{min}$
5	84,0 \pm 0,1	2,32 \pm 0,02	3 255 \pm 6	197 \pm 2
10	173 \pm 0,	10,0 \pm 0,0	5 188 \pm 1	376 \pm 3
30	771 \pm 2	36,3 \pm 0,0	11 613 \pm 16	1 216 \pm 14
50	1 125 \pm 5	43,0 \pm 0,0	17 986 \pm 38	1 224 \pm 6
p-valeur	p < 0,001		p < 0,001	

L'analyse statistique des concentrations en 5-HMF et en 2-FA obtenues après stérilisation par les cycles C₃ et C₆ (F₀ = 20) montre une différence significative ($p < 0,001$).

Selon nos résultats, pour un même F₀, il est préférable de travailler à une haute température, ce qui permet de réduire la durée du cycle et donc de limiter la formation du 5-HMF et du 2-FA.

La comparaison des cycles C₁, C₆ et C₈ montre une augmentation de la formation des PDG en fonction du F₀. Plus le F₀ est grand et plus la concentration en PDG est conséquente. Les concentrations en PDG varient de $0,62 \pm 0,01$ à $38,0 \pm 36,9$ μM pour le 5-HMF et de $23,4 \pm 0,9$ à 929 ± 607 nM pour le 2-FA dans la solution de G5%, pour les températures de 111°C et 134°C respectivement. La **figure 26** décrit l'influence du F₀ sur la formation des PDG. On s'aperçoit que le cycle C₈ montre de grandes variations de concentrations en 5-HMF par des écart-types très importants. Ceci s'explique par notre appareillage d'autoclavage qui n'a pas été conçu pour réaliser des cycles de stérilisation de très courte durée, de type flash. C'est pourquoi, nous n'avons pas réalisés les cycles de stérilisation de 1 min (131°C et 134°C).

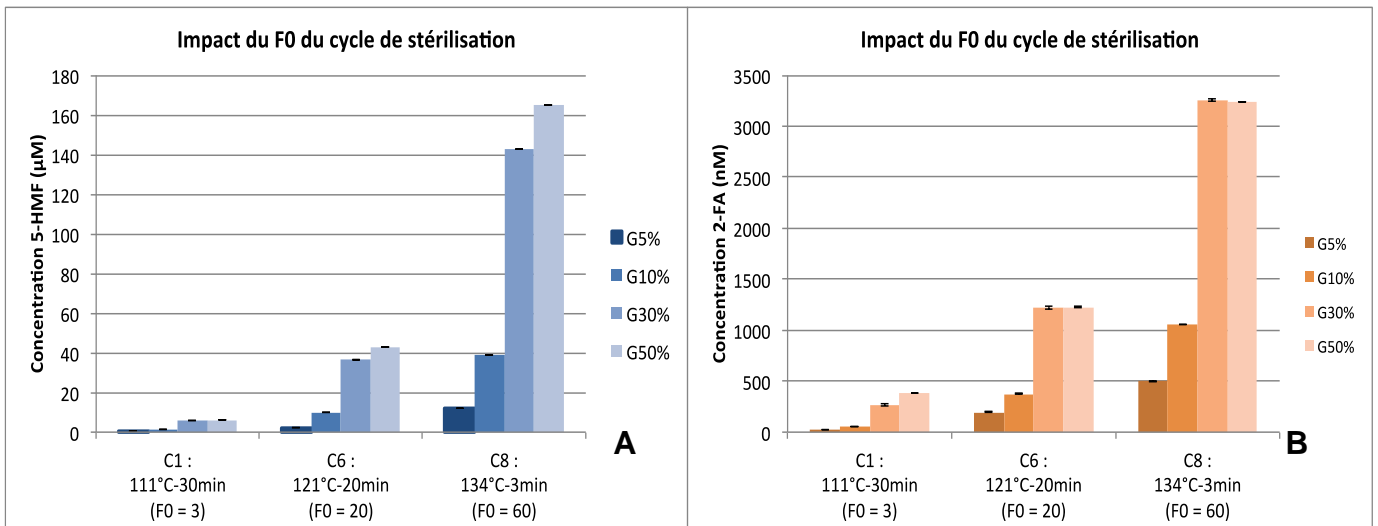


Figure 26 : Influence du F_0 par comparaison sur la quantité en 5-HMF et 2-FA. Les cycles présentés sont les cycles C₁ : 111°C – 30 min ($F_0 = 3$), C₆ : 121°C – 20 min ($F_0 = 20$) et C₈ : 134°C – 3 min ($F_0 = 60$) en fonction des concentrations initiales en glucose sur la formation du 5-HMF (A) et du 2-FA (B).

En règle générale, lors de toutes les comparaisons, on observe que plus la concentration initiale en glucose est importante, plus la formation en PDG est conséquente.

Effectivement, les concentrations en 5-HMF augmentent d'un facteur 10 à 20 en fonction du mode stérilisation entre les solutions à 5% et 50%. Il en est de même pour le 2-FA avec un facteur 5 à 10. La concentration en 5-HMF est en moyenne 100 fois plus importante que celle du 2-FA. Cependant, on constate que pour le 2-FA, les concentrations sont quasiment les mêmes dans le G30% et le G50% pour les cycles C₆ et C₈. Il en est de même pour le 5-HMF, même si ce résultat est moins marqué (**figure 26**).

g. Impact de l'autoclave

Pour la réalisation des cycles ayant des durées supérieures à 30 minutes, l'utilisation d'un second autoclave a été nécessaire. Nous avons réalisé deux cycles de stérilisation dans chacun des autoclaves : cycle 121°C pendant 15 minutes. L'autoclave disponible au laboratoire de galénique VAPOUR-Line® est intitulé **V** et celui disponible au laboratoire de bactériologie Autoclave Lequeux® intitulé **L**. Les résultats obtenus sont décrits dans le **tableau 19** :

- C₉ : 121°C, 15 min (F₀ = 15,0) – Autoclave VAPOUR-Line® (V)
- C₁₀ : 121°C, 15 min (F₀ = 15,0) – Autoclave Lequeux® (L)

Tableau 19 : Concentrations en 5-HMF (µM) et en 2-FA (nM) mesurées après stérilisation par la chaleur humide. **La stérilisation a été réalisée par les cycles C₉ et C₁₀ (n = 12) réalisés respectivement par l'autoclave V et L. Les données sont présentées par moyenne ± écart-type. Les comparaisons ont été effectuées entre les 2 stérilisateur par un test de Mann et Whitney.**

Concentration en glucose (g/100mL - %)	5-HMF (µM)			2-FA (nM)		
	C ₉ : 121°C, 15 min (V)	C ₁₀ : 121°C, 15 min (L)	p-value	C ₉ : 121°C, 15 min (V)	C ₁₀ : 121°C, 15 min (L)	p-value
5	6,41 ± 0,01	31,6 ± 0,0	<0,0001	267 ± 7	1 179 ± 15	<0,0001
10	12,7 ± 0,0	56,7 ± 0,1	<0,0001	630 ± 5	2 279 ± 54	<0,0001
30	29,6 ± 0,1	89,2 ± 0,2	<0,0001	1 155 ± 5	2 198 ± 43	<0,0001
50	43,4 ± 0,1	150 ± 0	<0,0001	1 263 ± 23	4 088 ± 125	<0,0001

L'analyse statistique des concentrations en 5-HMF et en 2-FA obtenues après stérilisation par les cycles C₉ et C₁₀ (comparaison de deux autoclaves) montre une différence significative (p < 0,001) entre pour chaque concentration en glucose.

2. Analyse statistique des paramètres influençant la formation des PDG au cours de la stérilisation

Pour rappel, à partir des données obtenues et décrites dans le **tableau 14**, la vitesse de formation a été calculée pour chaque PDG à partir de l'**équation 15**.

Pour analyser l'impact des différents paramètres sur la formation du 5-HMF et du 2-FA lors de la stérilisation, une analyse de variance est réalisée selon l'**équation 6**. Les données obtenues sont les suivantes : $r^2=0,955$ ($p<0,0001$) pour le 5-HMF et $r^2=0,940$ ($p<0,0001$) pour le 2-FA. La régression linéaire multiple montre que le modèle proposé est correct. Le modèle de prédiction pour la formation du 5-HMF et pour le 2-FA est décrit par la **figure 27**.

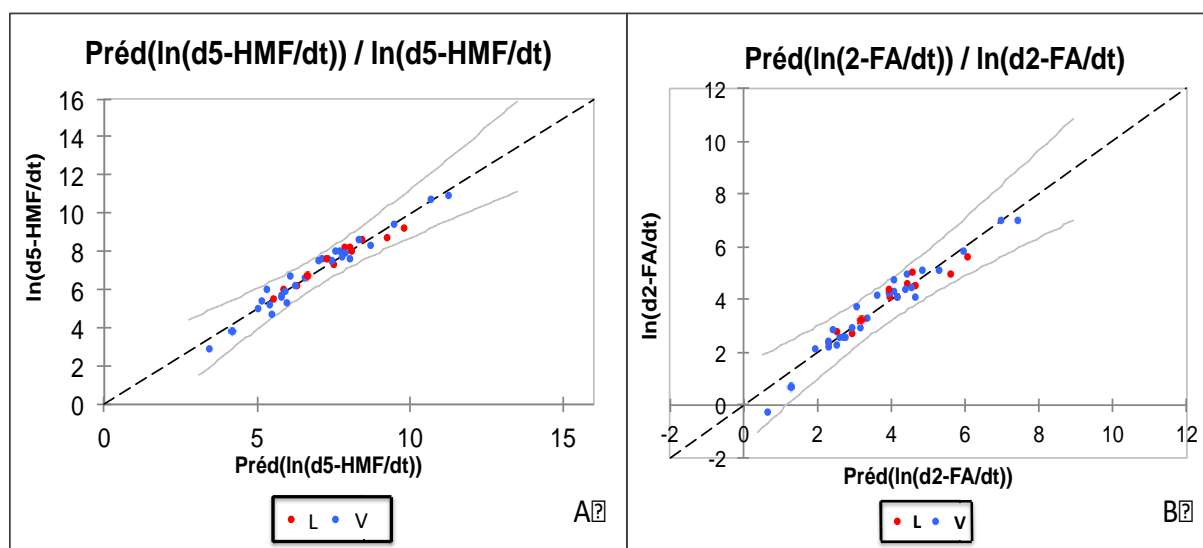


Figure 27 : Modèle de prédiction pour la formation du 5-HMF (A) et du 2-FA (B).

Le modèle montre une relation linéaire entre $\ln([dGDP/dt])$ et la prédiction du $\ln([dGDP/dt])$ pour les 2 PDG. Les courbes encadrant les valeurs individuelles sont les intervalles de confiance à 95%.

La **figure 27** montre que les droites prédites passent par 0 pour le 5-HMF et pour le 2-FA. Cela permet d'assimiler la constante i , bruit de fond sur la vitesse à 0.

Les **tableaux 20** et **21** décrivent les paramètres significatifs, influençant la formation des PDG lors de la stérilisation par l'analyse de la régression linéaire multiple pour le 5-HMF et le 2-FA.

Tableau 20 : Paramètres influençant la stérilisation. (t : valeur réelle de Student) pour le 5-HMF.

Source	Valeur	Erreur standard	Borne inférieure (95%)	Borne supérieure (95%)	Pr > t
Température	0,604	0,059	0,485	0,723	< 0,0001
F₀	0,277	0,055	0,166	0,388	< 0,0001
ln[G₀]	0,587	0,036	0,515	0,660	< 0,0001
Laboratoire-L/V	0,520	0,040	0,439	0,601	< 0,0001

Tableau 21 : Paramètres influençant la stérilisation. (t : valeur réelle de Student) pour le 2-FA.

Source	Valeur	Erreur standard	Borne inférieure (95%)	Borne supérieure (95%)	Pr > t
Température	0,152	0,015	0,122	0,183	< 0,0001
F₀	0,020	0,006	0,008	0,033	0,002
ln [G₀]	0,924	0,068	0,786	1,061	< 0,0001
Laboratoire-L/V	1,530	0,149	1,228	1,833	< 0,0001

Ces résultats montrent que la température du cycle, l'effet stérilisant F_0 et la concentration en glucose ont un impact significatif sur la formation des PDG avec des p-value $\leq 0,001$. Par ailleurs, l'identification de l'autoclave dans le modèle montre un effet différent de ce dernier sur la génération des PDG.

3. Modélisation mathématique

En repartant de l'équation de vitesse et des résultats de la régression linéaire multiple, nous obtenons l'**équation 16** :

$$\ln\left(\frac{d[\text{PDG}]}{dt}\right) = a.T + b.F_0 + c.\ln[G_0] + i \quad \text{éq. 16}$$

avec T la température, F_0 l'effet stérilisant et $[G_0]$ la concentration initiale en glucose.

Soit par transformation exponentielle, on obtient :

$$\frac{d[\text{PDG}]}{dt} = e^{(a.T + b.F_0 + c.\ln[G_0])} \quad \text{éq. 17}$$

Soit encore :

$$\frac{d[\text{PDG}]}{dt} = [G_0]^c e^{(a.T + b.F_0)} \quad \text{éq. 18}$$

Si on pose : $k = e^{(a.T + b.F_0)}$

On obtient l'équation suivante :

$$\frac{d[\text{PDG}]}{dt} = k.[G_0]^c \quad \text{éq. 19}$$

Dans le cas de cette analyse, c n'est pas significativement différent de 0,5 pour le 5-HMF au seuil de 5% puisque le test de Student réalisé à partir des données de la

régression donne un t expérimental de 0,587, soit nettement inférieur au t théorique à 5%.

L'équation 19 peut donc être assimilée pour le 5-HMF à :

$$\frac{d[5\text{-HMF}]}{dt} = k \cdot [G_0]^{0,5} \quad \text{éq. 20}$$

En ce qui concerne le 2FA, c n'est pas significativement différent de 1 au seuil de 5% puisque le test de Student réalisé à partir des données de la régression donne un t expérimental de 0,924, soit nettement inférieur au t théorique de comparaison à 5%.

L'équation 19 peut donc être assimilée pour le 2-FA à :

$$\frac{d[2\text{-FA}]}{dt} = k \cdot [G_0] \quad \text{éq. 21}$$

On peut ainsi remarquer que :

- Plus la durée du cycle est importante (à température identique) et plus la formation des PDG est conséquente ;
- Plus la température est élevée (à durée identique) et plus la formation des PDG est importante ;
- Pour un même F_0 , plus la température est forte (durée du cycle plus courte) et moins la formation des PDG est importante. Pour un F_0 de 9, on observe des constantes K_H et K_{FA} plus faibles pour le cycle C_5 (121°C – 9 min) que pour les cycles C_4 (116°C – 30 min) et C_2 (111°C – 90 min).
- Plus la concentration en glucose est importante, plus la vitesse de formation des PDG est importante.
- la formation des PDG dépend aussi de l'autoclave utilisé.

4. Détermination d'un modèle mathématique

En repartant du schéma général de la dégradation du glucose (**figure 1**), la dégradation du glucose en 5-HMF et 2-FA peut être considérée comme deux réactions parallèles (**figure 28**). Les autres voies n'ont pas encore été étudiées.

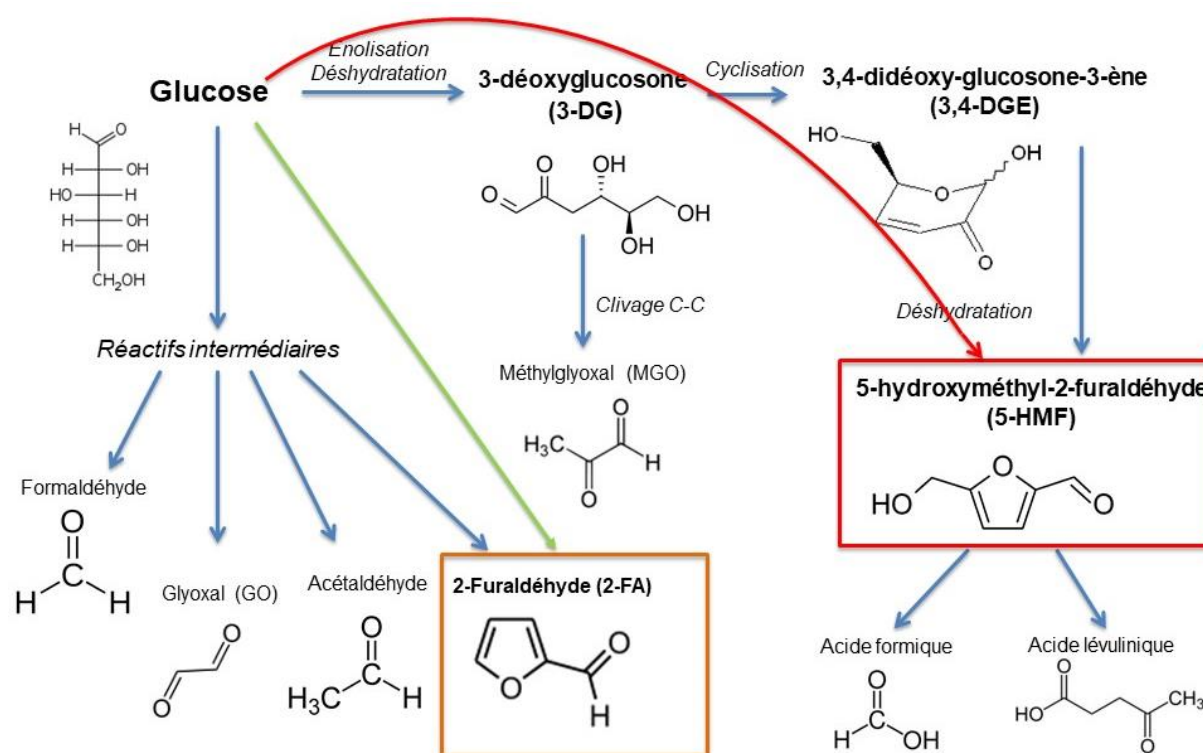


Figure 28 : Représentation schématique de la formation des PDG

En repartant de la **figure 28** et de l'**équation 18** qui est une équation différentielle, nous pouvons expliquer la cinétique de la dégradation du glucose (**figure 28**) par le schéma suivant (**figure 29**) :

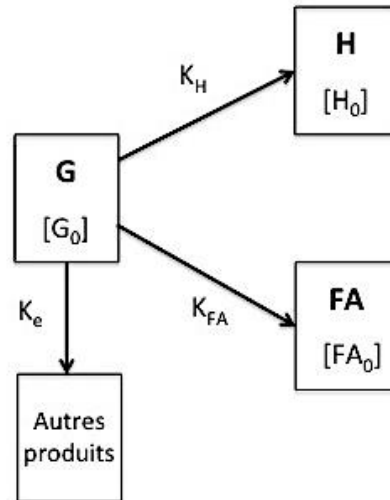


Figure 29 : Représentation schématique de la cinétique de dégradation du glucose. G, H et FA sont respectivement le glucose, le 5-HMF et le 2-FA. $[G_0]$, $[H_0]$ et $[FA_0]$ sont les concentrations initiales en glucose, 5-HMF et 2-FA. k_H et k_{FA} sont les constantes de vitesse de formation de 5-HMF et du 2-FA respectivement.

Pour la modélisation, l'étude se place dans les conditions où le volume de la solution de glucose est constant (100 mL) et tous les paramètres sont connus.

En tenant compte des résultats de l'analyse statistique précédente, les équations différentielles qui permettent de décrire les vitesses de transformation sont :

$$\left[\begin{array}{l} \frac{d[G]}{dt} = -(k_H[G] + k_{FA}[G] + k_e) = -k[G] \quad \text{où } k = k_H + k_{FA} + k_e \quad \text{éq. 21} \\ \frac{d[H]}{dt} = k_H[G]^{1/2} \quad \text{éq. 22} \\ \frac{d[FA]}{dt} = k_{FA}[G] \quad \text{éq. 23} \end{array} \right.$$

- Par intégration, on obtient pour l'équation 24 :

$$\int_0^G \frac{d[G]}{[G]} = -k \cdot \int_0^t dt \quad \text{éq. 24}$$

Soit encore

$$\ln([G]) - \ln([G_0]) = -k \cdot t \quad \text{éq. 25}$$

Qui par réarrangement de l'équation précédente donne

$$[G]=[G_0]e^{-k.t} \quad \text{éq. 26}$$

- En intégrant dans l'équation 22, l'équation 26, nous obtenons :

$$\frac{d[H]}{dt}=k_H([G_0]e^{-k.t})^{1/2}=k_H[G_0]^{1/2}e^{-\frac{k.t}{2}} \quad \text{éq. 27}$$

Soit par réarrangement et intégration

$$\int_0^H d[H]=k_H[G_0]^{1/2} \int_0^t e^{-\frac{k.t}{2}} \quad \text{éq. 28}$$

D'où

$$[H]=[H_0]+\frac{2k_H}{k}[G_0]^{1/2}\left(1-e^{-\frac{k.t}{2}}\right) \quad \text{éq. 29}$$

- En intégrant dans l'équation 23, l'équation 26, nous obtenons :

$$\frac{d[FA]}{dt}=k_{FA}[G_0]e^{-k.t} \quad \text{éq. 30}$$

Soit par réarrangement et intégration :

$$\int_0^{FA} d[FA]=k_{FA}[G_0] \int_0^t e^{-k.t} \quad \text{éq. 31}$$

D'où

$$[FA]=[FA_0]+\frac{k_{FA}}{k}[G_0](1-e^{-k.t}) \quad \text{éq. 32}$$

Le modèle de la dégradation du glucose au cours la stérilisation en 5-HMF et 2-FA est ainsi défini par les équations 23, 27, 30 soit :

$$\left\{ \begin{array}{l} [G]=[G_0] e^{-k.t} \\ [H]=[H_0]+\frac{2k_H}{k}[G_0]^{1/2}\left(1-e^{-\frac{k.t}{2}}\right) \\ [FA]=[FA_0]+\frac{k_{FA}}{k}[G_0](1-e^{-k.t}) \end{array} \right.$$

Ce modèle fait intervenir les concentrations initiales du glucose, du 5-HMF et du 2-FA ainsi que les constantes k_H et k_{FA} . On observe un ordre 0,5 pour la cinétique de formation du 5-HMF et un ordre 1 pour le 2-FA.

IV. Discussion

La stérilité imposée aux SGI de par leur administration en IV impose actuellement une stérilisation terminale, comme recommandée par les BPF et BPP^[71,102]. La technique la plus utilisée est la stérilisation par la chaleur humide. Toutefois, cette technique est connue pour être promotrice de PDG^[5,76,92]. L'étude réalisée ici porte sur la comparaison de différents cycles de stérilisation par la chaleur humide afin d'évaluer les facteurs qui impactent la vitesse de formation des PDG. Suite à l'étude précédente, la méthodologie adoptée a permis de limiter l'impact des autres facteurs pour ne s'intéresser qu'aux facteurs directement liés au processus de stérilisation.

Dans les solutions non stérilisées, le 5-HMF est retrouvé à l'état de trace, c'est-à-dire à des concentrations inférieures à la LDQ de notre méthode. Une hypothèse peut être émise concernant l'origine de la présence de 5-HMF : la matière première utilisée - la méthode d'obtention de la poudre (température, séchage, pression) - le conditionnement - le transport et le stockage (température et durée). En revanche, le 2-FA n'est pas détecté par notre méthode de dosage, et ce, dans aucune des solutions non stérilisées. Deux possibilités pourraient expliquer ce résultat : soit ce PDG se forme uniquement après une période de haute température (stérilisation), soit notre méthode n'est pas assez sensible pour détecter des faibles concentrations résiduelles de ce dernier. Cette absence de détection soulève la limite de notre méthode de dosage. La spectrométrie de masse permettrait de détecter des concentrations plus faibles bien que la LDD et la LDQ de notre méthode soient déjà très basses, 17,1 nM et 57,0 nM respectivement pour le 2-FA.

Actuellement, le travail portant sur les solutions de glucose préparées au laboratoire n'a été réalisé qu'à l'aide d'un type de glucose provenant d'un unique fournisseur. Il serait intéressant de comparer différentes sources de glucose (laboratoires, conditionnements, méthodes d'obtention) afin de comprendre la provenance du 5-HMF dans le glucose anhydre. Les mécanismes d'obtention du glucose anhydre pourraient être décrits permettant ainsi de définir les procédés favorisant la formation du 5-HMF lors de la déshydratation (lyophilisation, dessiccation, séchage) et d'optimiser ainsi la matière première. Une autre hypothèse concernant la provenance

de 5-HMF dans nos solutions non stérilisées pourrait être que la formation du 5-HMF débiterait dès la mise en solution et augmenterait jusqu'à l'analyse de l'échantillon.

Lorsque les solutions glucosées sont stérilisées par filtration (i.e. 0,22 μm), aucune augmentation des 2 PDG n'est retrouvée : les concentrations en 5-HMF sont similaires aux concentrations mesurées dans les solutions non stérilisées et le 2-FA n'est détecté dans aucune des solutions. Nos résultats sont en accord avec les résultats publiés par Kjellstrand *et al.*^[76] et par Bryland *et al.*^[1]. La filtration stérilisante pourrait être un moyen de maîtriser la formation des PDG. Cependant, la mise en œuvre de cette technique à l'échelle industrielle demanderait une réorganisation complète de l'ensemble du processus de stérilisation. Ceci entraînerait un coût lié au changement des autoclaves par le système de filtration, une requalification de l'ensemble de la chaîne de production. La conséquence de ces changements risque d'impacter fortement le prix des SGI. De plus, la filtration stérilisante est une technique de stérilisation à haut risque puisqu'il existe un risque de rupture du filtre, risque encore plus important lorsque la solution a une viscosité élevée^[70].

En revanche, dès l'utilisation d'une méthode de stérilisation par la chaleur humide, nos résultats montrent que la formation de PDG est systématique. L'analyse statistique utilisée (régression linéaire multiple) montre une influence significative de la température du cycle, de F_0 et de la concentration en glucose, résultats corroborés par de précédentes études^[5,8,72,87].

Il semble donc préférable de travailler à température la plus haute sur une durée courte, ce que laissaient présager les résultats de l'étude du marché français ainsi que les données de la littérature^[8].

a. Effet de la température

Ainsi, nos résultats démontrent l'impact de la température sur la formation de PDG par l'étude des cycles dont la durée a été fixée à 30 min (C_1 , C_4 et C_7) : plus la température est élevée et plus la génération de PDG l'est également. Pour une

augmentation des températures de cycles de 111°C à 121°C, on observe une augmentation des concentrations en PDG entre $1\,418 \pm 1$ nM à $21\,896 \pm 1$ nM pour le 5-HMF et de 58 ± 4 nM à 793 ± 5 nM pour le 2-FA dans la solution de G10%, respectivement. Ces deux derniers points, impact de la concentration initiale en glucose et de la température du cycle sont en accord avec les travaux menés par Postaire *et al.*^[9] et de Cook *et al.*^[5]. L'analyse des cycles C₁, C₆ et C₈ montre des résultats similaires aux travaux de Postaire *et al.* qui montrent une dégradation du glucose de 3,4% pour une température de cycle à 110°C jusqu'à 8,62% à 134°C^[8].

b. Effet de la durée du cycle

La comparaison des cycles C₁, C₂ et C₃, montre l'effet de la durée du cycle de stérilisation : plus la durée est importante et plus la dégradation du glucose est conséquente. On peut observer une variation des concentrations de 617 ± 2 nM à $83\,993 \pm 72$ nM pour le 5-HMF et de 23 ± 1 nM à $3\,254 \pm 6$ nM pour le 2-FA dans la solution de G5% pour une durée de cycle de 30 et 200 minutes respectivement. En parallèle, l'étude des concentrations de PDG à F₀ équivalent montre que l'impact de la durée du cycle de stérilisation est plus important que celui de la température. On observe une augmentation des concentrations de PDG pour une solution de glucose à 50% de $3\,491 \pm 55$ nM à $35\,079 \pm 6$ nM pour le 5-HMF et de 126 ± 9 nM à $891 \pm$ nM pour le 2-FA, pour les cycles C₅ et C₂ respectivement (F₀ = 9). Ceci est appuyé par notre modèle cinétique qui montre des constantes de vitesse de stérilisation plus importantes pour des F₀ plus grands à une température plus faible. Ces résultats sont en accord avec les travaux réalisés par Mannermaa *et al.*^[92] démontrant qu'il est préférable de travailler à plus forte température pour un même F₀ ainsi que les travaux de Kjellstrand *et al.*^[76], qui a étudié cinq F₀ différents. Ces derniers ont travaillé sur un modèle cellulaire afin de mettre en évidence l'inhibition de la croissance cellulaire lors de la stérilisation de solution de DP. L'inhibition cellulaire est moins importante pour une haute température à F₀ équivalent. Une solution glucosée ayant été stérilisée à haute température pour une F₀ faible serait donc une solution glucosée limitant l'administration de PDG. En comparant trois F₀, nous

retrouvons les mêmes conclusions : plus le F_0 est grand et plus la formation de PDG est conséquente.

c. Concentration de glucose

La régression linéaire multiple permet également de mettre en évidence l'impact de la concentration en glucose sur la formation des PDG lors de la stérilisation ($p < 0,0001$). Plus la solution glucosée est concentrée et plus la génération des PDG est conséquente, en accord les résultats précédemment publiés [1,8]. On note que pour les solutions glucosées à 30 et 50% après stérilisation, la formation en PDG semble similaire, indépendamment de la concentration. Ceci est observé lors du cycle C_8 (134°C ; 3 min) pour le 5-HMF par des concentrations de $142,56 \pm 0,03 \mu\text{M}$ et $165,13 \pm 0,31 \mu\text{M}$ pour le G30 et G50 respectivement et pour le 2-FA par des concentrations de $3\ 254,32 \pm 8,64 \text{ nM}$ et $3\ 243,29 \pm 2,20 \text{ nM}$ pour le G30 et G50. Il en est de même pour le cycle C_5 (121°C ; 9 min) mais que pour le 2-FA : $1\ 215,72 \pm 13,79 \text{ nM}$ et $1\ 223,65 \pm 5,94 \text{ nM}$ pour le G30 et G50. Ce phénomène est décrit dans la littérature comme la limite de saturation^[11,76]. Au vu de ces résultats, d'autres études devront être réalisées afin de limiter la formation des PDG. En effet, dans les solutions de DP, des études ont été réalisées sur des poches bi-compartmentées^[42]. Un des compartiments contient du glucose à haute concentration. La dilution s'effectue juste avant administration par mélange des deux compartiments. La formation des PDG pourrait être limitée lors de la stérilisation et ainsi lors de l'administration. Cette méthode pourrait être transposée aux SGI.

d. L'autoclave

L'impact de l'autoclave sur la formation des PDG est différent entre celui de l'autoclave V et de l'autoclave L. En effet, l'ANCOVA révèle une différence significative entre les 2 autoclaves avec un paramètre de 0,52 pour le 5-HMF et de 1,53 pour le 2-FA lorsque la stérilisation est réalisée au laboratoire B ($p > 0,0001$).

En repartant de l'étude menée sur le marché français, nous avons associé le laboratoire aux conditions de stérilisation^[104]. Nous avons obtenu des résultats montrant l'impact du laboratoire sur la dégradation du glucose et donc, des conditions de stérilisation. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus dans l'analyse de l'impact de la stérilisation. Un cycle de stérilisation se valide par une durée et une température donnée au plateau. Les écarts obtenus entre les deux autoclaves pourraient provenir de la différence de puissance de montée en température (temps plus court et montée en température plus rapide) ou encore le temps de refroidissement après le plateau (taille de l'autoclave, système de refroidissement...). Une autre hypothèse pouvant être évoquée est un décalage de température qui pourrait être lié à l'étalonnage de la pression. L'étude montre l'impact de la température sur la formation des PDG. Un décalage de quelques degrés seulement pourrait tendre à expliquer les différences de concentrations obtenues.

Dans l'attente de ces possibles nouvelles optimisations, une solution glucosée à faible concentration serait celle à administrer préférentiellement aux patients. Cependant, comme expliqué précédemment, les solutions glucosées sont aussi présentes dans la nutrition parentérale à de hautes concentrations ($\geq 30\%$). Les conséquences de la présence de ces solutions sont l'administration de PDG aux patients et le risque de glycation des acides aminés présents dans les solutions de nutrition parentérale^[93]. Ceci permet de faire un lien avec les récentes études montrant l'impact des PDG sur les nouvelles molécules à structures protéiques telles que les anticorps, les biosimilaires par glycation avant leur administration^[28]. D'autres travaux menés par Anderson *et al.* ont démontré l'interaction entre le 5-HMF et les héparines entraînant une modification de l'activité anticoagulante^[94]. L'activité anticoagulante est augmentée lorsque les solutions glucosées sont autoclavées. Dans cette étude, l'interaction entre les principes actifs et les PDG entraîne donc des effets différents selon les principes actifs. D'autres études plus approfondies sont nécessaires portant sur la possible modification d'activité pharmacologique des principes actifs de nature peptidique ou protéique pour confirmer l'utilisation potentielle des SGI comme solution de dilution. Des travaux en cours dans le

laboratoire (non encore publiés) montrent que la glycation des protéines thérapeutiques est un phénomène bien présent.

e. Modélisation

Le modèle cinétique proposé, obtenu à partir de la régression linéaire multiple et des équations différentielles, permet de confirmer une réaction d'ordre 0,5 pour le 5-HMF. Ce type d'ordre fractionné a déjà été décrit pour des réactions complexes avec plusieurs étapes, ce qui correspond a priori à notre situation^[97,98]. En repartant de la cinétique générale (partie II), l'ordre de la réaction du 5-HMF est différent lors de la stérilisation. En effet, l'ordre passe de 1 à 0,5. Cette différence peut s'expliquer par le fait que par un nombre supérieur de paramètres testés dans l'analyse du marché français en comparaison à un modèle ne travaillant que sur quatre paramètres. Nos travaux démontrent que la dégradation du 2-FA est, elle, d'ordre 1, ce qui confirme les travaux de Jing *et al.*^[95] D'autres travaux similaires portant sur la dégradation du glucose trouvent des réactions d'ordre 1 pour la réaction de dégradation, dont les études de Taylor *et al.* qui ont travaillé à 5 températures différentes pendant des durées variables allant jusqu'à 8 heures^[96].

Dans cette étude, la vitesse de formation des PDG est corrélée à la température du cycle, au F_0 de stérilisation et à la concentration initiale en glucose. Il reste à trouver la combinaison optimale temps/température permettant de limiter la dégradation du glucose tout en assurant la stérilité des solutions. Ce travail oriente déjà ce couple temps/température vers une température haute et un temps court. En parallèle, il serait intéressant de calculer pour un F_0 identique à celui des poches commerciales dosées, quelle est la proportion de PDG liée à la stérilisation seule par rapport aux quantités mesurées dans les poches du marché français permettant d'évaluer la place de la stérilisation sur la formation du glucose et de cibler les autres sources de dégradation du glucose à optimiser.

PARTIE IV. DISCUSSION GENERALE

1. Le contexte et la problématique

L'utilisation quotidienne des SGI au sein des établissements de santé, impose une sûreté de leur administration, que ce soit en tant que véhicule de dilution ou d'administration, comme solution de d'hydratation ou encore comme composant de la nutrition parentérale. Il semble important de maîtriser de la formation des PDG car bien que l'on ne connaisse pas encore les seuils de toxicité de ces produits, il a été montré que de hautes concentrations en PDG et AGEs ont un impact sur l'homéostasie cellulaire [1,13,14,61], notamment sur le système cardio-vasculaire^[1,16,17], le système rénal^[1,12,18,19] ou ophtalmique^[61] et ils induisent l'apoptose de diverses cellules^[62,63,65].

Pour limiter l'administration de PDG aux patients, il est important de déterminer les facteurs influençant leur formation et de tenter de les maîtriser.

2. Méthode de dosage et analyse du marché français

La première partie du travail de thèse a porté sur la mise au point d'une méthode de dosage permettant d'identifier et quantifier simultanément le 5-HMF et le 2-FA par une méthode par CLHP-UV dans les SGI du marché français. La méthode choisie est une méthode simple, rapide (temps d'analyse de 7 minutes), reproductible et facilement transposable d'une CLHP-UV à une autre, d'un laboratoire à un autre, mettant en évidence la dégradation générale du glucose par le choix des PDG^[43,44], puisque le 5-HMF et le 2-FA sont considérés comme de bons reflets de la dégradation générale du glucose de par leur position. L'utilisation de la spectrométrie de masse seule ou couplée à une détection UV^[12,77-80] permettrait la détection de plus nombreux PDG, notamment le 3-DG, le 3,4-DGE, le GO et le MGO connus pour être les PDG les plus toxiques^[1,41,42,60]. Les choix de la nouvelle méthode et des conditions opératoires devront tenir compte des gammes de dosage cibles, des PDG

choisis, de la présence ou non d'un agent dérivant et du coût engagé par cette méthode (matériel, consommables...) pour permettre de répondre aux recommandations de l'Académie Nationale de Pharmacie^[66]. Outre les facteurs déjà connus pour influencer positivement la génération des PDG lors d'une exposition de solutions de glucose à la chaleur humide, de nouveaux facteurs ont été identifiés, comme la nature du matériau constituant les parois du conditionnement primaire ou le coefficient de perméabilité à l'oxygène. Ainsi, différents moyens apparaissent possibles pour limiter encore plus la génération des composés d'oxydation du glucose, tels que l'emploi de certains matériaux pour les conditionnements primaires (ex : polypropylène). Il ne faut pas négliger l'influence que peuvent avoir ces matériaux sur la stabilité des médicaments injectables^[110-112]. Il pourrait donc être envisagé d'établir un cahier des charges particulier pour les récipients des solutions glucosées injectables pour qu'elles soient conditionnées dans des conditionnements primaires limitant fortement la génération des PDG ainsi que les risques d'interaction contenant-contenu au coût de fabrication le plus faible possible.

Devant ces résultats, la variabilité des quantités retrouvées soulève la question de l'hétérogénéité de l'exposition des patients aux PDG selon la solution de glucose utilisée. Outre les deux PDG dosés dans nos études, le dosage des autres PDG connus s'avère indispensable à l'avenir pour compléter nos données. De plus, l'étude des risques d'exposition avec un modèle clinique permettant de connaître réellement l'impact des PDG via la perfusion chronique serait intéressante bien que les conditions de réalisation semblent compliquées. D'une part, l'exposition dépend, en premier lieu, de la solution référencée puis de la durée et du volume de perfusion, de la biodisponibilité absolue des PDG. D'autre part, le choix de la population cible est compliqué (population fragile : nouveau-nés, patients souffrant de troubles critiques ou patients recevant une thérapie intraveineuse à long terme), car la différenciation de l'apport exogène et de l'apport endogène sur les quantités circulantes en PDG restera toujours la difficulté majeure de ce type d'étude. En effet, l'état clinique des patients peut accentuer leur exposition aux PDG, par biosynthèse endogène ou leur sensibilité à l'action pharmacologique de ces composés^[24,48]. En effet, plusieurs études ont montré une influence de l'état pathologique sur la concentration en AGEs. Il a été démontré que lors d'une insuffisance rénale, la

concentration des AGEs augmente, expliquée par une clairance directement dépendante de la fonction rénale^[89]. Chez le patient diabétique, la glycémie est plus élevée que le patient non diabétique et secondairement la concentration en AGEs^[27,90]. Le modèle clinique devra prendre en compte l'ensemble de ces éléments. L'identification et la quantification des PDG devront être optimisées en tenant compte du milieu d'analyse (sang, urine).

Nos résultats ont montré qu'une partie de la variation de l'exposition des patients aux PDG (5-HMF et 2-FA) pouvait être liée à la méthode de stérilisation employée par le fournisseur. Bien que la stérilisation par la chaleur humide soit la seule technique utilisée, les conditions de stérilisation sont variables, qu'il s'agisse de la température (111 ou 121°C) ou du F_0 (11 à 46). Pour rappel, le F_0 est une combinaison de temps et de température donnant une énergie et une létalité bactérienne égales^[46]. Cependant, si la valeur seule de F_0 permet de réduire le risque de développement bactérien dans le milieu stérilisé, elle est insuffisante pour prédire la quantité de PDG générée. Il est donc important de connaître les conditions thermodynamiques de la stérilisation^[8]. Au vu de ces résultats, il nous a semblé important de poursuivre les recherches sur l'impact de la stérilisation sur la dégradation du glucose et de tenter de proposer une homogénéisation des processus lors de la fabrication des SGI permettant de limiter la formation des PDG : évaluation des conditions optimales des cycles de stérilisation permettant de garantir la stérilité des SGI tout en limitant la génération des PDG. En attendant la poursuite des recherches, des premières recommandations peuvent être émises quand au choix des SGI pour réduire leur risque d'exposition : l'utilisation de solutions de glucose à faibles concentrations conditionnées dans des flacons en verre et stockées pendant une courte période. Pour des applications cliniques particulières telle que la nutrition parentérale, l'utilisation de solutions glucosées fortement concentrées est incontournable. Ainsi, s'il s'avérait à l'avenir que l'administration de PDG soit préjudiciable pour certains patients recevant de la nutrition parentérale, des solutions devraient être développées pour commercialiser des solutions glucosées injectables exemptes de PDG.

3. Etude de la stérilisation

La dégradation du glucose lors de la stérilisation a pu être modélisée dans la troisième partie de ce document, en repartant de l'étude de la partie II. La méthodologie adoptée a tenu compte des différents paramètres étudiés afin de limiter l'impact ces derniers pour ne s'intéresser qu'aux facteurs directement liés au processus de stérilisation : flacon en verre, échantillons analysés directement après la stérilisation, volume de 100 mL. L'analyse statistique n'a pas montré de différence significative entre les concentrations avant et après filtration stérilisante, conformément à des travaux antérieurs^[1,79]. La filtration stérilisante pourrait être un moyen de maîtriser la formation des PDG. Toutefois, malgré l'importante réorganisation que cette technique demanderait (changement des autoclaves par le système de filtration, requalification de l'ensemble de la chaîne de production, coût général) et le risque de rupture du filtre, risque encore plus important lorsque la solution a une viscosité élevée^[70]. La limitation du phénomène de glycoxydation lors de la stérilisation par la chaleur humide montre qu'il semble préférable de travailler à température plus la haute sur une durée courte, ce que laissait présager les résultats de l'étude du marché français ainsi que les données de la littérature^[8]. Cette analyse permet d'orienter le couple temps/température optimal permettant de limiter la formation des PDG : une température plus haute et une durée de cycle plus court. La recherche de ce couple temps/température au F_0 le plus petit permettant d'assurer la stérilité des solutions et limitant au maximum la formation des PDG représente la clé de voûte dans ce domaine. Actuellement, aucune limite de stérilité n'est annoncée pour le F_0 . Dans la pharmacopée européenne, on trouve seulement une recommandation pour un cycle de 121°C pendant 15 min, soit un F_0 de 15. Pour rechercher le F_0 optimal, l'étude de la stérilité devra être réalisée : tester des cycles de stérilisation à différent F_0 permettant d'assurer la stérilité puis une fois optimisé, le travail sur le couple temps/température devra être étudié.

Finalement, la présence de ces PDG dans les solutions glucosées injectables pose la question du risque d'instabilité physico-chimique des médicaments administrés, tel que le risque de glycation des acides aminés présents dans les solutions de nutrition parentérale^[93] ainsi que l'impact des PDG sur les nouvelles molécules à structures protéiques telles que les anticorps, les biosimilaires par glycation avant leur

administration^[28]. Des études de stabilité sont donc cruciales pour établir le risque d'instabilité de ces médicaments.

4. Axe d'optimisation

a. pH des solutions

Un facteur n'a pas été étudié dans la partie II sur l'étude du marché français : le pH de la solution de glucose^[10,11]. Il aurait été intéressant d'intégrer cette donnée dans l'analyse des facteurs. L'équipe de Kjellstrand démontre qu'un pH acide avoisinant 3,5 limiterait la formation de PDG. Dans l'étude de l'impact de la stérilisation, une première approche concernant le pH a été réalisée. Malheureusement, le volume d'étude de 5mL ne nous a pas permis de mesurer correctement le pH. En se basant sur l'étude de Kjellstrand et sur celle de l'équipe de Boulanger, il semble intéressant d'orienter une partie des prochains travaux sur l'étude de solutions glucosées très concentrées et très acides. Cela permettrait éventuellement de générer de nouvelles poches bi- compartimentées, à remettre en solution juste avant administration.

b. Stockage

L'analyse du marché français décrite dans ce travail montre que le temps écoulé depuis la fabrication est l'un des paramètres ayant un impact significatif sur la dégradation du glucose. En effet, l'ANCOVA réalisée a permis de montrer son influence sur les vitesses de formation des deux GDP : 5-HMF : 0,293, $p = 0,012$ et 2-FA : 0,618 $p < 0,0001$ ^[104]. Plus le temps écoulé est long et plus la formation est conséquente. Les données communiquées par les laboratoires et en s'appuyant des données disponibles sur les RCP des SGI, nous retrouvons des durées de péremptions des SGI variant de 24 à 60 mois. Ces données sont variables d'un fabricant à un autre et même au sein d'un même fabricant (d'un conditionnement à un autre).

Au sein des hôpitaux, le stockage des médicaments se fait principalement dans les PUI. Ces dernières réceptionnent les médicaments en conformité avec les données

disponibles sur les résumés des caractéristiques du produit (RCP) permettant ainsi de garantir la qualité des médicaments. Les SGI sont acheminées des PUI vers les services de soins quotidiennement. Pour que les PUI puissent répondre à leur besoin, il est nécessaire que ces unités possèdent des stocks suffisants et un lieu de stockage adéquat. Cependant, les conditions de stockage que subissent les SGI sont variables d'une région à une autre, d'une saison à l'autre, d'un établissement de santé à un autre (structure, locaux climatisés...) et au sein d'une même PUI (organisation de l'espace de stockage...). La variation des conditions climatiques (humidité et température) au sein du cycle de vie des SGI participe sans doute à la génération des PDG, mais dans une proportion encore non connue par rapport à la stérilisation.

En repartant des recommandations disponibles dans les RCP des SGI commercialisées, nous retrouvons différentes données sur la condition de conservation de ces solutions. Elles sont variables entre fournisseurs, entre concentrations et conditionnements d'un même fournisseur. Par exemple, nous retrouvons :

« ne nécessite pas de précautions particulières de conservation »

« à conserver à une température ne dépassant pas 25°C »

« à conserver à une température ne dépassant pas 25°C et dans son emballage d'origine, à l'abri de la lumière »^[26]

Les données ne sont donc pas uniformes quant aux conditions de stockage actuellement recommandées.

En reprenant les trajets des SGI depuis leur fabrication jusqu'à leur administration, il est facile de constater qu'il y a de nombreux points de stockage. La **figure 30** résume le trajet des SGI et les interrogations qui peuvent être émises concernant les températures de stockage.

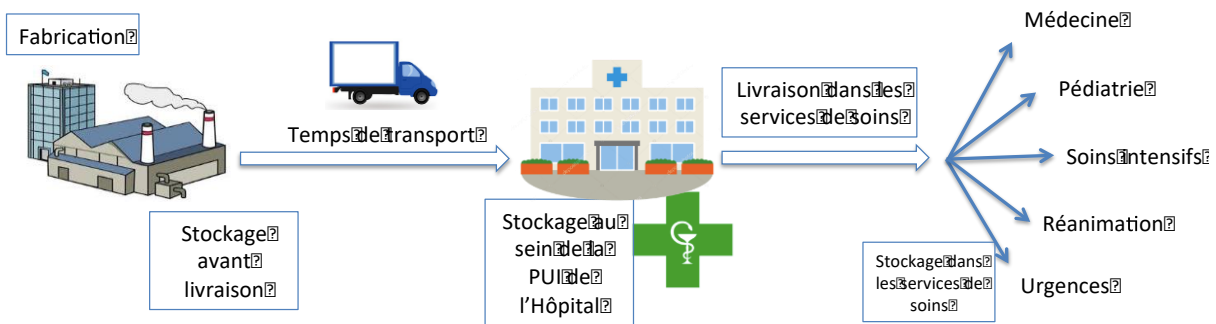


Figure 30 : Schéma récapitulatif des zones de stockage des SGI durant leur cycle de vie.

Après la fabrication, les solutions sont stockées en attendant la livraison dans les différentes PUI. Une fois dans la chaîne logistique du lieu de fabrication jusqu'aux PUI, les températures ne sont pas contrôlées et pour le moment, aucun relevé n'est réalisé. La zone de stockage dans les PUI n'est pas toujours équipée d'un relevé de température. Les températures dans ces lieux de stockage sont variables d'un établissement de santé à un autre (localisation de la PUI) et d'une région à une autre. Le transport de la PUI vers les services de soins est relativement court. En fonction du service de soins et des locaux, les températures sont variables. Il s'avère donc que le suivi des conditions de stockage des SGI est assez complexe.

En nous basant sur les données des RCP des SGI^[26], des analyses préliminaires ont été réalisées sur cinq conditions de stockage existant actuellement pour les médicaments :

- Deux méthodes simulant le stockage prévu dans les résumés des caractéristiques du produit (RCP) :

- Température ambiante non contrôlée, sur paillasse (TA)
- Enceinte climatique, température contrôlée : 25°C - 60% d'humidité relative (T25°C) reflétant le stockage dans les services de soins

- Réfrigérateur (T2-8°C)

- Deux méthodes sont étudiées au congélateur (-20°C) avec deux techniques de décongélation :

- Décongélation à température ambiante (CdTA)
- Décongélation au micro-ondes – 450W (CdμO)

L'étude s'est déroulée sur 3 mois et les dosages ont été réalisés aux temps suivants : J0, J1, J8, J15 et à 1, 2 et 3 mois sur 4 concentrations de SGI, représentatives du marché français : 5%, 10%, 30% et 50%. Cette première étude s'est déroulée juste après l'étude de stérilisation des cycles C₁, C₆ et C₈. La méthode de préparation des SGI reste la même que celle décrite dans la partie II. Une fois stérilisées, les solutions ont été réparties en aliquot de 1,5 ml dans des microtubes pour centrifugation type Eppendorf. A J0, ces solutions ont été dosées par la méthode CLHP-UV validée précédemment dans la partie I et les aliquots ont été répartis afin de tester les cinq conditions de stockage définies précédemment. L'analyse analytique est terminée mais les analyses statistique et cinétique sont en cours de réalisation. Les premiers résultats sont les suivants : les concentrations en 5-HMF augmentent sur 3 mois d'étude pour les stockages à température ambiante non contrôlée et à l'étuve (25°C – 65% HR). Cette augmentation est moins marquée pour le stockage entre 2 et 8°C et semble ne pas être présente pour le stockage au congélateur, et ce, quelle que soit la méthode de décongélation comme le montre la **figure 31**.

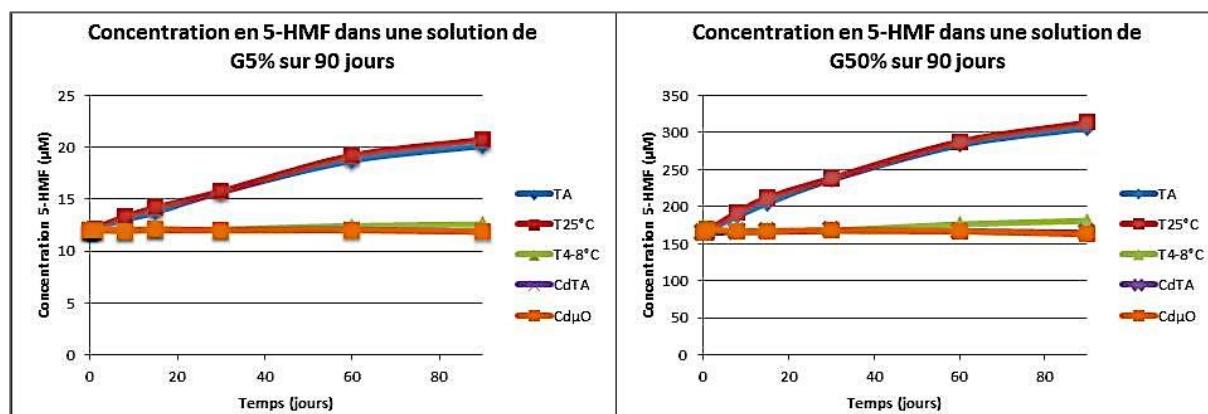


Figure 31 : Concentration en 5-HMF (μM) dans une solution de G5% et de G50% sur 90 jours après stérilisation par le cycle C₈ (134°C – 3 min).

Sur cette **figure 31**, on constate toujours la présence d'une concentration plus importante en 5-HMF en fonction de la concentration initiale en glucose (G5% et

G50%). Les résultats sont similaires pour les autres concentrations en glucose et pour les autres cycles de stérilisation (C₁ et C₆).

On constate une augmentation du 5-HMF maximale pour le stockage à l'étuve (T25°) et minimale pour le stockage au congélateur. La **figure 32** décrit les pourcentages d'augmentation.

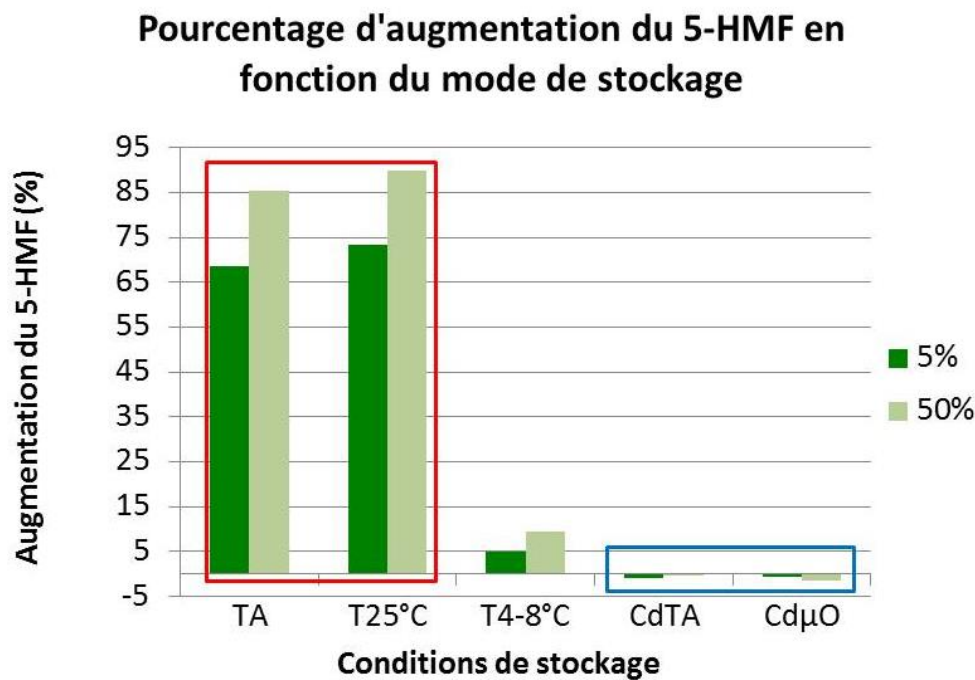


Figure 32 : Pourcentage d'augmentation du 5-HMF en fonction du mode de stockage pour des solutions de G5% et G50% après stérilisation par le cycle C₈ (134°C – 3 min). **L'encadré rouge indique les augmentations maximales retrouvées et l'encadré bleu, les augmentations minimales.**

Les résultats retrouvés montrent une augmentation maximale de 73,40% pour le G5% et de 89,73% pour le G50% lors du stockage T25°C. Les pourcentages minimaux étant retrouvés pour le stockage au congélateur sont de -0,80% et -0,63% pour le G5% et de -0,36% et de -1,52% pour le G50% lors des décongélations à température ambiante et par micro-ondes respectivement.

Nous retrouvons des résultats similaires pour le 2-FA.

Cette étude analytique émet l'hypothèse d'un classement des conditions de stockage de la manière suivante : le stockage à température non contrôlée et à l'étuve simulant les conditions de stockages actuels génèrent plus de PDG que le stockage au réfrigérateur. Le stockage au congélateur semble stopper la dégradation du glucose.

Ces premiers résultats sont en accord avec les travaux retrouvés dans la littérature mentionnant l'impact du stockage sur la formation des PDG^[3,9], et plus précisément la température. Kjellstrand *et al.* a travaillé sur le stockage de SGI à 25, 35 et 60% conservées à -20, 20, 25, 32 et 40°C pendant 2 ans. Ce travail conclut par une recommandation de stockage à une température basse, de préférence inférieure à 20°C^[9], température inférieure à celle mentionnée plus haut dans les RCP cités.

Cependant, le stockage au froid ne peut être réalisé à l'heure actuelle car les PUI et les services de soins ne disposent pas de réfrigérateur ou congélateur permettant l'entreposage de telle quantité de SGI. De plus, ce stockage nécessite une remise à température des SGI avant administration. Or, certaine utilisation se réalise dans l'urgence, ce qui pourrait entraîner un retard dans la prise en charge des patients.

Une analyse statistique permettant de mettre en évidence les facteurs impactant la formation des PDG pendant le stockage devra être réalisée afin de permettre l'optimisation de ce dernier et d'en déduire la cinétique de formation. De cela, pourrait en découler, un changement des dates limites d'utilisation en lien avec les résultats de l'étude du marché français, jusque-là très variable d'un fabricant à un autre et même au sein d'un même fabricant et d'optimiser le stockage en amont des PUI (congélation juste après la fabrication et décongélation avant distribution dans les PUI).

PARTIE V. CONCLUSION

Les données disponibles sur l'impact des PDG présents dans les SGI démontrent une hétérogénéité de l'exposition des patients aux PDG selon les SGI utilisées. Il semble nécessaire de limiter la formation de ces PDG par la maîtrise des facteurs contribuant à leur formation à la vue de leur toxicité intrinsèque lors d'une administration chronique et par le risque d'oxydation/glycoxydation des médicaments à structure protéique.

Afin de limiter le risque d'exposition des patients aux PDG, différentes mesures peuvent être appliquées afin de limiter l'administration des PDG : utiliser de faibles concentrations de glucose, dans des contenants en verre de faible volume, ayant été stérilisés par filtration stérilisante ou par un autoclave à haute température durant un cycle court.

Des travaux supplémentaires seront nécessaires afin d'une part d'étendre l'identification et la quantification à d'autres PDG et de leur appliquer le modèle cinétique et d'autre part de définir le F_0 idéal, c'est-à-dire le plus faible possible assurant la même stérilité des SGI que celle obtenue actuellement. A partir de ce F_0 défini, la température du cycle et secondairement la durée du cycle seront déterminées à l'aide du modèle cinétique. Le modèle cinétique déterminé dans cette étude est applicable aux conditions de stérilisation utilisées par les industriels.

Les premiers résultats sur les conditions de stockage sont prometteurs et devront être poursuivis afin d'optimiser en amont du stockage dans les PUI, la protection des SGI.

BIBLIOGRAPHIE

1. Bryland A, Broman M, Erixon M, Klarin B, Lindén T, Friberg H, et al. Infusion fluids contain harmful glucose degradation products. *Intensive Care Med* 2010;36(7):1213-20.
2. Trissel LA. *Handbook on Injectable Drugs*. 16th Edition. American Society of Health-System Pharmacists; 2011.
3. Linden T, Cohen A, Deppisch R, Kjellstrand P, Wieslander A. 3,4-Dideoxyglucosone-3-ene (3,4-DGE): a cytotoxic glucose degradation product in fluids for peritoneal dialysis. *Kidney Int* 2002;62(2):697-703.
4. Pharmacopée Européenne 9.2 Edition. 5.1.1. Méthodes de préparation des produits stériles. Strasbourg: 2017.
5. Cook AP, MacLeod TM, Appleton JD, Fell AF. HPLC studies on the degradation profiles of glucose 5% solutions subjected to heat sterilization in a microprocessor-controlled autoclave. *J Clin Pharm Ther* 1989;14(3):189-95.
6. Martinson E, Wieslander A, Kjellstrand P, Boberg U. Toxicity of heat sterilized peritoneal dialysis fluids is derived from degradation of glucose. *ASAIO J Am Soc Artif Intern Organs* 1992 1992;38(3):M370-372.
7. Kjellstrand P, Martinson E, Wieslander A, Holmquist B. Development of toxic degradation products during heat sterilization of glucose-containing fluids for peritoneal dialysis: influence of time and temperature. *Perit Dial Int J Int Soc Perit Dial* 1995;15(1):26-32.
8. Postaire E, Pradier F, Postaire M, Pradeau D, Matchoutsky L, Prognon P, et al. Various techniques for the routine evaluation of the degradation of glucose in parenteral solutions — a critical study. *J Pharm Biomed Anal* 1987;5(4):309-18.
9. Kjellstrand P, Erixon M, Wieslander A, Lindén T, Martinson E. Temperature: the single most important factor for degradation of glucose fluids during storage. *Perit Dial Int* 2004;24(4):385-91.
10. Tomo T, Okabe E, Yamamoto T, Namoto S, Iwashita T, Matsuyama K, et al.

Impact of 3,4-dideoxyglucosone-3-ene (3,4-DGE) on cytotoxicity of acidic heat-sterilized peritoneal dialysis fluid. *J Artif Organs* 2007;10(1):47-51.

11. Kjellstrand P, Martinson E, Wieslander A, Kjellstrand K, Jeppsson E, Svensson E, et al. Degradation in peritoneal dialysis fluids may be avoided by using low pH and high glucose concentration. *Perit Dial Int* 2001;21(4):338-44.

12. Frischmann M, Spitzer J, Fünfroeken M, Mittelmaier S, Deckert M, Fichert T, et al. Development and validation of an HPLC method to quantify 3,4-dideoxyglucosone-3-ene in peritoneal dialysis fluids. *Biomed Chromatogr* 2009;23(8):843-51.

13. Boulanger E, Wautier M-P, Gane P, Mariette C, Devuyst O, Wautier J-L. The triggering of human peritoneal mesothelial cell apoptosis and oncosis by glucose and glycoxydation products. *Nephrol Dial Transplant* 2004;19(9):2208-16.

14. Sanchez-Niño MD, Poveda J, Sanz AB, Carrasco S, Ruiz-Ortega M, Selgas R, et al. 3,4-DGE is cytotoxic and decreases HSP27/HSPB1 in podocytes. *Arch Toxicol* 2014;88(3):597-608.

15. Boulanger E, Puisieux F, Gaxatte C, Wautier J-L. Vieillessement : rôle et contrôle de la glycation. *Rev Médecine Interne* 2007;28(12):832-40.

16. Himmele R, Sawin D-A, Diaz-Buxo JA. GDPs and AGEs: impact on cardiovascular toxicity in dialysis patients. *Adv Perit Dial* 2011;27:22-6.

17. Cho Y, Johnson DW, Vesey DA, Hawley CM, Pascoe EM, Clarke M, et al. Baseline serum interleukin-6 predicts cardiovascular events in incident peritoneal dialysis patients. *Perit Dial Int J Int Soc Perit Dial* 2015;35(1):35-42.

18. Sarafidis PA, Whaley-Connell A, Sowers JR, Bakris GL. Cardiometabolic syndrome and chronic kidney disease: what is the link? *J Cardiometab Syndr* 2006;1(1):58-65.

19. Müller-Krebs S, Kihm LP, Zeier B, Gross ML, Deppisch R, Wieslander A, et al. Renal toxicity mediated by glucose degradation products in a rat model of advanced renal failure. *Eur J Clin Invest* 2008;38(5):296-305.

20. Pharmacopée Européenne 9.2 Edition. 7. Formes pharmaceutiques, préparations parentérales. Strasbourg: 2017.
21. Boillot A, Caps T, Blasco G, Grelier R. Hyperosmolarité. 1999;
22. Gennari FJ. Current concepts. Serum osmolality. Uses and limitations. *N Engl J Med* 1984;310(2):102-5.
23. Joly D. KB Néphrologie. Vernazobres-Gregg. Paris: VG; 2009.
24. Boulanger E, Wautier J-L, Dequiedt P, Schmidt A-M. [Glycation, glycoxidation and diabetes mellitus]. *Nephrol Ther* 2006;2 Suppl 1:S8-16.
25. Benelam B, Wyness L. Hydration and health: a review. *Nutr Bull* 2010;35(1):3-25.
26. Vidal Hoptimal. 2019;
27. Quan C, Alcalá E, Petkovska I, Matthews D, Canova-Davis E, Taticek R, et al. A study in glycation of a therapeutic recombinant humanized monoclonal antibody: where it is, how it got there, and how it affects charge-based behavior. *Anal Biochem* 2008;373(2):179-91.
28. Fischer S, Hoernschemeyer J, Mahler H-C. Glycation during storage and administration of monoclonal antibody formulations. *Eur J Pharm Biopharm Off J Arbeitsgemeinschaft Pharm Verfahrenstechnik EV* 2008;70(1):42-50.
29. Junker A, Roy S, Desroches M-C, Moussay C, Berhoune M, Bellanger A, et al. Stability of oxaliplatin solution. *Ann Pharmacother* 2009;43(2):390-1.
30. Kintzel PE, Kennedy PE. Stability of amphotericin B in 5% dextrose injection at concentrations used for administration through a central venous line. *Am J Hosp Pharm* 1991;48(2):283-5.
31. Mitrano FP, Outman WR, Baptista RJ, Palombo JD. Chemical and visual stability of amphotericin B in 5% dextrose injection stored at 4 degrees C for 35 days. *Am J Hosp Pharm* 1991;48(12):2635-7.
32. McMahon MM, Nystrom E, Braunschweig C, Miles J, Compher C, American

Society for Parenteral and Enteral Nutrition (A.S.P.E.N.) Board of Directors, et al. A.S.P.E.N. clinical guidelines: nutrition support of adult patients with hyperglycemia. JPEN J Parenter Enteral Nutr 2013;37(1):23-36.

33. Hopitaux Universitaires de Genève. Support nutritionnel parentéral - Guidelines Nutrition Artificielle. 2013;

34. Schneider S, Bertin E, Delarue J, Pigeyre M. Les référentiels des collèges - Nutrition. 2ème édition. Issy-les-Moulineaux: Elsevier Masson; 2015.

35. Cuntz D, Gottrand F, Michaud L, Dubar G, Pham N, Florent M, et al. Intérêt des mélanges ternaires pour la nutrition parentérale prolongée chez le nourrisson. Nutr Clin Métabolisme 1997;11(3):169-73.

36. Boulanger E, Wautier M-P, Gane P, Mariette C, Devuyst O, Wautier J-L. The triggering of human peritoneal mesothelial cell apoptosis and oncosis by glucose and glycoxydation products. Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc 2004;19(9):2208-16.

37. Dialyse rénale - Pierre Simon.

38. Paniagua R, Amato D, Vonesh E, Correa-Rotter R, Ramos A, Moran J, et al. Effects of Increased Peritoneal Clearances on Mortality Rates in Peritoneal Dialysis: ADEMEX, a Prospective, Randomized, Controlled Trial. J Am Soc Nephrol 2002;13(5):1307-20.

39. Durand P-Y, Kessler M. La dialyse péritonéale automatisée. Masson; 1998.

40. BALLAND M. Les solutions de dialyse péritonéale : médicaments et stratégies en évolution. 2014;

41. Linden T, Cohen A, Deppisch R, Kjellstrand P, Wieslander A. 3,4-Dideoxyglucosone-3-ene (3,4-DGE): A cytotoxic glucose degradation product in fluids for peritoneal dialysis. Kidney Int 2002;62(2):697-703.

42. Boulanger E, Moranne O, Wautier M-P, Rougier J-P, Ronco P, Pagniez D, et al. [Biocompatibility of peritoneal dialysis fluids]. Nephrol Ther 2005;1(1):14-22.

43. Cook AP, Macleod TM, Appleton JD, Fell AF. Reversed-phase high-

performance liquid chromatographic method for the quantification of 5-hydroxymethylfurfural as the major degradation product of glucose in infusion fluids. *J Chromatogr A* 1989;467:395-401.

44. Hung CT, Selkirk AB, Taylor RB. A chromatographic quality control procedure based on HPLC for 5-hydroxymethylfurfural in autoclaved D-glucose infusion fluids. *J Clin Hosp Pharm* 1982;7(1):17-23.

45. Thornalley PJ, Langborg A, Minhas HS. Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose. *Biochem J* 1999;344 Pt 1:109-16.

46. Ulbricht RJ, Northup SJ, Thomas JA. A review of 5-hydroxymethylfurfural (HMF) in parenteral solutions. *Fundam Appl Toxicol* 1984;4(5):843-53.

47. Maillard LC. Action des acides aminés sur les sucres; formation des mélanoidines par voie méthodique. 1912;

48. Wautier M-P, Tessier FJ, Wautier J-L. Les produits de glycation avancée : un risque pour la santé humaine. *Ann Pharm Fr* 2014;72(6):400-8.

49. Nagai R, Shirakawa J-I, Fujiwara Y, Ohno R-I, Moroishi N, Sakata N, et al. Detection of AGEs as markers for carbohydrate metabolism and protein denaturation. *J Clin Biochem Nutr* 2014;55(1):1-6.

50. Miki Hayashi C, Nagai R, Miyazaki K, Hayase F, Araki T, Ono T, et al. Conversion of Amadori products of the Maillard reaction to N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine by short-term heating: possible detection of artifacts by immunohistochemistry. *Lab Investig J Tech Methods Pathol* 2002;82(6):795-808.

51. Purlis E. Browning development in bakery products – A review. *J Food Eng* 2010;99(3):239-49.

52. Wautier JL. [Advanced glycosylation end products or glycotoxins: under-evaluated components of diet?]. *Rev Prat* 2001;51(13):1397-9.

53. Grossin N, Wautier M-P, Wautier J-L, Gane P, Taamma R, Boulanger E. Improved in vitro biocompatibility of bicarbonate-buffered peritoneal dialysis fluid.

Perit Dial Int J Int Soc Perit Dial 2006;26(6):664-70.

54. Welten AGA, Schalkwijk CG, ter Wee PM, Meijer S, van den Born J, Beelen RJH. Single exposure of mesothelial cells to glucose degradation products (GDPs) yields early advanced glycation end-products (AGEs) and a proinflammatory response. *Perit Dial Int J Int Soc Perit Dial* 2003;23(3):213-21.

55. Ahmed MU, Thorpe SR, Baynes JW. Identification of N epsilon-carboxymethyllysine as a degradation product of fructoselysine in glycated protein. *J Biol Chem* 1986;261(11):4889-94.

56. Boulanger E, Wautier M-P, Wautier J-L, Boval B, Panis Y, Wernert N, et al. AGEs bind to mesothelial cells via RAGE and stimulate VCAM-1 expression. *Kidney Int* 2002;61(1):148-56.

57. Tanji N, Markowitz GS, Fu C, Kislinger T, Taguchi A, Pischetsrieder M, et al. Expression of advanced glycation end products and their cellular receptor RAGE in diabetic nephropathy and nondiabetic renal disease. *J Am Soc Nephrol JASN* 2000;11(9):1656-66.

58. Faranak G, Mohammad Reza SS, Molood H zadeh. Effect of pH and Storage Temperature on 5-(Hydroxymethyl) Furfural (5HMF) Formation in USP Syrup Preparation. *21(1):1-5.*

59. Morgan LW, Wieslander A, Davies M, Horiuchi T, Ohta Y, Beavis MJ, et al. Glucose degradation products (GDP) retard remesothelialization independently of D-glucose concentration. *Kidney Int* 2003;64(5):1854-66.

60. Linden T, Musi B, Jarkelid L, Forsback G, Kjellstrand P, Deppisch R, et al. Glucose degradation products in peritoneal dialysis fluids may have both local and systemic effects: a study of residual fluid and mesothelial cells. *Perit Dial Int* 2001;21(6):607-10.

61. Kandarakis SA, Piperi C, Topouzis F, Papavassiliou AG. Emerging role of advanced glycation-end products (AGEs) in the pathobiology of eye diseases. *Prog Retin Eye Res* 2014;42C:85-102.

62. Cho K-H, Do J-Y, Park J-W, Yoon K-W, Kim Y-L. The Effect of Low-GDP

Solution on Ultrafiltration and Solute Transport in Continuous Ambulatory Peritoneal Dialysis Patients. *Perit Dial Int* 2013;33(4):382-90.

63. Park JW, Kang SH, Do JY. Effects of low-glucose degradation product solution on peritoneal membrane characteristics in peritoneal dialysis patients: a 3-year follow-up study. *Iran J Kidney Dis* 2014;8(1):58-64.

64. Catalan MP, Santamaría B, Reyero A, Ortiz A, Egido J, Ortiz A. 3,4-di-deoxyglucosone-3-ene promotes leukocyte apoptosis. *Kidney Int* 2005;68(3):1303-11.

65. Penélope Catalan M, Santamaría B, Reyero A, Ortiz A, Egido J, Ortiz A. 3,4-di-deoxyglucosone-3-ene promotes leukocyte apoptosis. *Kidney Int* 2005;68(3):1303-11.

66. Académie Nationale de Pharmacie. Recommandations « Glycation des protéines - la réaction de Maillard » Les dérivés toxiques du glucose : une menace pour la santé ? 2014;

67. Pharmacopée Européenne 9.2 Edition. 5.1.5. Application du concept F0 à la stérilisation par la vapeur des préparations aqueuses. Strasbourg: 2017.

68. Legifrance. Arrêté du 22 Juin 2001 relatif aux bonnes pratiques de pharmacie hospitalières. 2001;

69. Legifrance. Décret n°2000-1316 du 26 décembre 2000 relatif aux pharmacies à usage intérieur et modifiant le code de la santé publique (deuxième partie : Décrets en Conseil d'Etat). 2000;

70. Chapirot C. Les procédés de stérilisation à l'hôpital. 2012;

71. ANSM. Guide des bonnes pratiques de fabrication. 2016;

72. Ledebø I, Wieslander A, Kjellstrand P. Can we prevent the degradation of glucose in peritoneal dialysis solutions? *Perit Dial Int* 2000;20(Suppl 2):S48-51.

73. Linden T, Forsbäck G, Deppisch R, Henle T, Wieslander A. 3-Deoxyglucosone, a promoter of advanced glycation end products in fluids for peritoneal dialysis. *Perit Dial Int* 1998;18(3):290-3.

74. Erixon M, Linden T, Kjellstrand P, Carlsson O, Ernebrant M, Forsback G, et al. PD fluids contain high concentrations of cytotoxic GDPs directly after sterilization. *Perit Dial Int* 2004;24(4):3928.
75. Erixon M, Wieslander A, Linden T, Carlsson O, Forsback G, Svensson E, et al. Take care in how you store your PD fluids: actual temperature determines the balance between reactive and non-reactive GDPs. *Perit Dial Int* 2005;25(6):583-90.
76. Erixon M, Wieslander A, Lindén T, Carlsson O, Forsbäck G, Svensson E, et al. How to Avoid Glucose Degradation Products in Peritoneal Dialysis Fluids. *Perit Dial Int* 2006;26(4):4907.
77. Min JZ, Yamamoto M, Yu H, Higashi T, Toyo'oka T. Rapid and sensitive determination of the intermediates of advanced glycation end products in the human nail by ultra-performance liquid chromatography with electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal Biochem* 2012;424(2):18794.
78. Mittelmaier S, Pischetsrieder M. Multistep Ultrahigh Performance Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry Analysis for Untargeted Quantification of Glycating Activity and Identification of Most Relevant Glycation Products. *Anal Chem* 2011;83(24):9660-8.
79. Mittelmaier S, Fünfroeken M, Fenn D, Berlich R, Pischetsrieder M. Quantification of the six major α -dicarbonyl contaminants in peritoneal dialysis fluids by UHPLC/DAD/MSMS. *Anal Bioanal Chem* 2011;401(4):1183-93.
80. Mittelmaier S, Fünfroeken M, Fenn D, Fichert T, Pischetsrieder M. Identification and quantification of the glucose degradation product glucosone in peritoneal dialysis fluids by HPLC/DAD/MSMS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2010;878(11-12):877-82.
81. Mittelmaier S, Fünfroeken M, Fenn D, Pischetsrieder M. 3-Deoxygalactosone, a new glucose degradation product in peritoneal dialysis fluids: identification, quantification by HPLC/DAD/MSMS and its pathway of formation. *Anal Bioanal Chem* 2011;399(4):1689-97.
82. ICH Expert working group. Validation of analytical procedures: Text and

Methodology Q2(R1).

83. Hubert P, Nguyen-Huu J-J, Boulanger B, Chapuzet E, Chiap P, Cohen N, et al. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures. A SFSTP proposal--Part I. *J Pharm Biomed Anal* 2004;36(3):579-86.
84. Hubert P, Nguyen-Huu J-J, Boulanger B, Chapuzet E, Cohen N, Compagnon P-A, et al. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures. A SFSTP proposal--part III. *J Pharm Biomed Anal* 2007;45(1):82-96.
85. Reyne M. *Les plastiques : polymères, transformations et applications*. Hermes. Paris: Hermes; 1991.
86. Erixon M, Wieslander A, Lindén T, Carlsson O, Jönsson JA, Simonsen O, et al. 3,4-dideoxyglucosone-3-ene in peritoneal dialysis fluids infused into the peritoneal cavity cannot be found in plasma. *Perit Dial Int* 2009;29 Suppl 2:S28-31.
87. Kjellstrand P, Martinson E, Wieslander A, Holmquist B. Development of toxic degradation products during heat sterilization of glucose-containing fluids for peritoneal dialysis: influence of time and temperature. *Perit Dial Int* 1995;15(1):26-32.
88. Pohloudek-Fabini R, Martin E. [The effect of the gas permeability of plastics on the stability of thiomersal. Part 49: Contributions to problems concerning the use of plastic receptacles for liquid pharmaceuticals (author's transl)]. *Pharm* 1981;36(10):6835.
89. Allwood MC, Kearney MC. Compatibility and stability of additives in parenteral nutrition admixtures. *Nutr Burbank Los Angel Cty Calif* 1998;14(9):697-706.
90. Bernard L, Cueff R, Chagnon M, Abdoulouhab F, Décaudin B, Breyse C, et al. Migration of plasticizers from PVC medical devices: Development of an infusion model. *Int J Pharm* 2015;494(1):13645.
91. Matzi V, Lindenmann J, Muench A, Greilberger J, Juan H, Wintersteiger R, et al. The impact of preoperative micronutrient supplementation in lung surgery. A prospective randomized trial of oral supplementation of combined alpha-ketoglutaric acid and 5-hydroxymethylfurfural. *Eur J Cardio-Thorac Surg Off J Eur Assoc Cardio-Thorac Surg* 2007;32(5):77682.

92. Obied T. In-vitro metabolism and protein binding of 5-HMF, a potential antisickling agent. Theses Diss 2010;
93. Makita Z, Radoff S, Rayfield EJ, Yang Z, Skolnik E, Delaney V, et al. Advanced glycosylation end products in patients with diabetic nephropathy. *N Engl J Med* 1991;325(12):83642.
94. Devuyst O, van Ypersele de Strihou C. Nitric oxide, advanced glycation end products, and uremia. *Kidney Int* 2000;58(4):18145.
95. García-López E, Carrero JJ, Suliman ME, Lindholm B, Stenvinkel P. Risk factors for cardiovascular disease in patients undergoing peritoneal dialysis. *Perit Dial Int J Int Soc Perit Dial* 2007;27 Suppl 2:S205-209.
96. Norme Européenne NF EN ISO 17665-1 Stérilisation des produits de santé - Chaleur Humide - Novembre 2006.
97. Faoro B. Stérilisation à la vapeur d'eau - Les principes. 2014;
98. Université Paris Didero. Propriétés de l'eau.
99. Sterigene. Table de Regnault.
100. Sterigene. Equipements Process - Autoclave pharmaceutique mélange air/vapeur.
101. Taylor RB, Jappy BM, Neil JM. Kinetics of dextrose degradation under autoclaving conditions. *J Pharm Pharmacol* 1972;24(2):1219.
102. ANSM. Bonnes pratiques de préparation. 2007;
103. Mannermaa JP, Muttonen E, Yliruusi J, Määttänen L. The use of different time/temperature combinations in the optimization of sterilization of Ringers/glucose infusion solution. *J Parenter Sci Technol Publ Parenter Drug Assoc* 1992;46(6):18491.
104. Haybrard J, Simon N, Danel C, Pinçon C, Barthélémy C, Tessier FJ, et al. Factors Generating Glucose Degradation Products In Sterile Glucose Solutions For Infusion: Statistical Relevance Determination Of Their Impacts. *Sci Rep* 2017;7(1):11932.

105. Tovsen ML, Smistad G, Bjerke TM, Tønnesen HH, Kristensen S. Physicochemical Stability of Emulsions and Admixtures for Parenteral Nutrition during Irradiation by Glass-Filtered Daylight at Standardized Conditions. *PDA J Pharm Sci Technol* 2015;69(3):346-54.
106. Anderson W, Harthill JE. The anticoagulant activity of heparins in dextrose solutions. *J Pharm Pharmacol* 1982;34(2):90-6.
107. Jing Q, Lû X. Kinetics of Non-catalyzed Decomposition of Glucose in High-temperature Liquid Water. *Chin J Chem Eng* 2008;16(6):890-4.
108. Laidler KJ. *Chemical Kinetics*. 3rd éd. Harper & Row; 1987.
109. Atkins P, de Paula J. *Physical Chemistry*. 8th éd. W.H. Freeman; 2006.
110. Masse M, Maton M, Genay S, Blanchemain N, Barthélémy C, Décaudin B, et al. In vitro assessment of the influence of intravenous extension set materials on insulin aspart drug delivery. *PloS One* 2018;13(8):e0201623.
111. Maiguy-Foinard A, Blanchemain N, Barthélémy C, Décaudin B, Odou P. Influence of a Double-Lumen Extension Tube on Drug Delivery: Examples of Isosorbide Dinitrate and Diazepam. *PloS One* 2016;11(5):e0154917.
112. Treleano A, Wolz G, Brandsch R, Welle F. Investigation into the sorption of nitroglycerin and diazepam into PVC tubes and alternative tube materials during application. *Int J Pharm* 2009;369(12):307.

PUBLICATION SCIENTIFIQUE

FACTORS GENERATING GLUCOSE DEGRADATION PRODUCTS IN STERILE GLUCOSE SOLUTIONS FOR INFUSION: STATISTICAL RELEVANCE DETERMINATION OF THEIR IMPACTS

J. Haybrard^{a,b}, N. Simon^{a,b*}, C. Danel^b, C. Pinçon^c, C. Barthélémy^b, F. J Tessier^d, B. Décaudin^{a,b}, E. Boulanger^d, P. Odou^{a,b}

Affiliations

^a CHU Lille, Institut de Pharmacie, F-59000 Lille, France

^b Univ. Lille, EA 7365 – GRITA – Groupe de Recherche sur les formes Injectables et les Technologies Associées, F-59000 Lille, France

^c Univ. Lille, EA 2694, 59000 Lille Cedex, France

^d Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, U995 - LIRIC - Lille Inflammation Research International Center, F-59000 Lille, France

***Corresponding author:**

Dr Nicolas SIMON

Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

EA 7365 GRITA – Laboratoire de Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière

3, rue du Professeur Laguesse – B.P. 83

59006 LILLE Cedex

Tel: +33 (3) 20 96 40 29

Email: nicolas.simon@univ-lille2.fr

Keywords : Glucose; glucose degradation products, advanced glycation end products; infusion fluids; influencing factors, modelization

ABSTRACT

Sterilising glucose solutions by heat promotes the generation of a large number of glucose degradation products (GDPs). It has been shown that high levels of GDPs may result in Advanced Glycation End products that have an impact on cellular homeostasis and health in general. If data is available for peritoneal dialysis solutions, little has been published for glucose infusion fluids. It is essential to identify the parameters causing the formation of GDPs and so limit the risk of exposing patients to them.

After quantifying both 5-hydroxymethyl-2-furfural, considered as an important indicator of degradation, and 2-furaldehyde, an ultimate GDP of one degradation pathway, in marketed solutions, the aim of this work is to build a model integrating all the parameters involved in the formation rates of these two GDPs: supplier, glucose amount, container material, oxygen permeability coefficient and time-lapse since manufacture.

Our results show a good logarithmic relationship between GDP formation rates and time-lapse since manufacture for both GDPs. The amount of GDPs in the glucose solutions for infusion depends on the initial glucose amount, the polymer of the container, the time elapsed since manufacturing and the supplier.

INTRODUCTION

Sterile glucose solutions are commonly used in hospital settings as hydration solutions¹ or diluents for injectable drugs² as well as for peritoneal dialysis³. Considered as inexpensive, safe sources of energy and harmless substances, they are marketed in concentrations ranging from 2.5 to 70 g/100mL, packed in various containers such as bags, flasks and vials. Primary packaging can be made of materials such as plastic polymers (polyvinyl chloride, polyolefins, multilayers...) or glass. As they are used for intravenous (IV) administration, these solutions are sterile. According to the European Pharmacopoeia⁴, the main sterilisation technique used at the end of their production process is moist heat through a combination of temperature, pressure and time to obtain an adequate microbial lethality rate. F_0 can be described most simply as the equivalent time required in minutes at 121°C to produce the same microbiological killing effect as the process used⁵.

Heating glucose solutions is known to promote the generation of a large number of glucose degradation products (GDPs)^{1,6,7}. Several of these GDPs, such as 3-deoxyglucosone (3-DG), 3,4-dideoxyglucosone-3-ene (3,4-DGE), glyoxal, methylglyoxal, 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF), 2-furaldehyde (2-FA), formaldehyde and acetaldehyde, have previously been identified in peritoneal dialysis and infusion fluids^{3,8,9}. It has already been demonstrated that GDPs are highly reactive precursors of Advanced Glycation End products (AGEs)^{6,10,11} in proteins. AGEs result from a chemical reaction when reduced carbohydrates (such as glucose) react with amino acids or nucleotides. In 1912, Louis Maillard was the first to describe this non-enzymatic reaction known as the “Maillard reaction”¹² which is at the origin of a class of products formed spontaneously in nature or in living organisms (e.g. glycosylated haemoglobin)¹³. Among the GDPs cited above, 5-HMF and 2-FA are considered as important indicators of degradation^{14,15} and, according to Linden *et al.*³ and Thornalley *et al.*¹⁰, they may appear in the glucose degradation process under high temperature storage conditions and according to Ulbright *et al.*¹⁶ under sterilising conditions (Fig. 1).

Although precise thresholds of toxicity are not yet known for GDPs and AGEs administered to chronically-ill patients, it has been shown that high levels of GDPs and AGEs have an impact on cell homeostasis^{1,9,17-19}, are involved in oxidative stress^{20,21}, are associated with cellular inhibition²², induce apoptosis in human leukocytes and renal epithelial cells^{1,18,23}, cause degradation of mesothelial cells and peritoneal membrane characteristics^{6,23-}

²⁵, have an impact on the cardiovascular system^{21,26,27}, are associated with an increase in cardiovascular morbidity²⁸ and a decline in renal function²⁹ or cause kidney damage^{1,8,30}. Other studies have shown that the accumulation of AGEs in patients suffering from diabetes mellitus can lead to microvascular complications⁶ such as diabetic retinopathy²⁰ or diabetic vascular complications³¹. Very high levels of 5-HMF may lead to acute toxicity¹⁶.

Little data is at present available on the quantification of GDPs in glucose solutions for intravenous administration^{1,14,15,32}. Many questions remain unanswered, particularly regarding the risks involved in the chronic administration of sterile glucose solutions or those associated with chemical interactions with new protein-structured drugs (e.g. antibodies, biosimilars...), which raise the issue of drug glycation before administration^{33,34}. Many factors have previously been identified as factors contributing to the formation of GDPs in infusion bags: sterilisation process⁵, storage conditions⁷ or amount of glucose³². However, some others have never been tested (e.g. the container) and their impact should be assessed in order to understand how to limit of the formation of GDPs.

Thus, the first objective of this work is to quantify actual amounts of both 5-HMF and 2-FA in marketed glucose IV solutions from different suppliers on the French market and to compare with known toxicological data. The second objective is to build a model integrating all parameters influencing the formation rates of these two GDPs.

RESULTS

Measurement of two GDPs in marketed solutions

Both 5-HMF and 2-FA were identified and quantified in each tested solution (tables 1 and 2). The amounts of 5-HMF vary from 0.20 ± 0.00 mg for the G5% 50 mL of supplier B to 41.21 ± 0.08 mg for G50% 1000 mL of the supplier E. For 2-FA, the variation is observed from 2.42 ± 0.02 μ g for G5% 50 mL of supplier E to 654.28 ± 1.04 μ g for G15% 1000 mL for supplier D'. An heterogeneity in GDP amounts could be also observed for the same glucose concentration for the same supplier. For example, for the concentration in glucose of 2.5% for supplier A, the amounts range from 0.82 ± 0.00 mg to 3.57 ± 0.03 mg for 5HMF, and from 12.01 ± 0.23 μ g to 257.85 ± 3.58 μ g for 2-FA. This shows the variability of GDP amounts in our samples.

The mean GDP amounts in all our samples were 6.70 ± 0.58 mg and 114.32 ± 9.00 μ g for 5HMF and 2FA, respectively. To compare our data with that in the literature, all amounts were converted into GDP concentrations in each container, giving 13.82 ± 0.79 and 0.23 ± 0.01 μ g/mL for 5-HMF and 2-FA, respectively.

Analysis of the influencing parameters

The ANCOVA model showed a good linear relationship between the logarithm of GDP formation rate and time-lapse since manufacture for both GDPs. The simulated and experimental values are very close: $r^2=0.966$ ($p<0.0001$) and $r^2=0.962$ ($p<0.0001$) for 5-HMF and 2-FA, respectively (Fig. 2).

The ANCOVA analysis shows the significant influence of the following parameters on the formation rates of both GDPs: storage time (5HMF: 0.293, $p=0.012$ and 2FA: 0.618 $p<0.0001$), initial glucose amount in container (5HMF: 2.456, $p=0.005$ and 2FA: 4.085, $p<0.001$), and permeability to oxygen (1.821 and 1.397, $p<0.001$, for 5HMF and 2FA, respectively).

The influence of container material differs from one material to another. Figure 3 reveals a similar profile on its impact on the formation rate of both 5-HMF and 2-FA. From this data, it

is possible to classify container materials according to their ability to limit GDP generation. When considering the influence of container material, GDP formation rate is 1) lower with both PP and glass; 2) not or only slightly influenced with PE, PE/PP and PVC; and 3) higher with multilayer PP/PA/PE.

Similarly, the supplier effect was analysed. However, for one supplier (supplier D), two different sterilising conditions were used: one for the plastic container (D) and another for the glass container (D'). For the statistical analysis, we therefore decided to consider this supplier as two different ones (D and D'). So as not to limit the “supplier effect” to only a “container effect”, the ANCOVA analysis also checked the absence of multicollinearity. Results are presented in figure 4. Differences in sterilisation techniques have also been highlighted. From this data, suppliers can also be classified according to their ability to limit GDP generation. Suppliers A and D seemed to contribute less to GDP formation (Fig. 4) whereas suppliers C and B seemed to generate more. No significant impact was shown for the other suppliers.

DISCUSSION

Characterisation of GDPs in injectable glucose solutions has become essential due to increased knowledge about the risks associated with their use. Their presence has already been described, particularly in PD fluids and particularly for 5-HMF. Indeed in this study, both 5-HMF and 2-FA were identified and quantified in all marketed solutions tested. In previously published studies, 5-HMF concentrations ranged from 0.25 to 18.4 mg/L in infusion fluids for glucose concentrations from 2.5 to 30%¹, or from 7.94 to 36.46 mg/L for glucose concentrations from 10 to 50%³². No data is available for 2-FA in infusion fluids, only in peritoneal dialysis fluids. 2-FA concentrations ranged from 38.43 to 134.52 µg/L for glucose concentrations varying from 1.36 to 3.86%⁷ and from 105.69 to 297.86 µg/L for glucose concentrations varying from 1.5 to 7.5%³. These values are close to ours: 1.2 and 75.1 mg/L and 23.4 and 779.9 µg/L, for 5-HMF and 2-FA, respectively. The highest values measured in this study for 2-FA, are due to higher glucose concentrations. If only 2.5 and 5% glucose concentrations are taken into account, values are similar to those previously published, with 2-FA concentrations varying from 23.5 to 293.6 µg/L.

Our results demonstrate that both 5-HMF and 2-FA are present in varying quantities in all injectable glucose solutions currently on the French market. Differences from one supplier to

another may be explained by different sterilising processes (temperature, pressure and time of sterilization cycle)^{1,6,35,36}. All suppliers confirmed the use of the moist heat method according to the European Pharmacopeia, but some did not provide their protocols. After questioning, it appears that they use different temperatures (111 or 121°C) and F_0 values (11 to 46). F_0 is a combination of time and temperature giving equal energy/bacterial lethality¹⁶. However, the value alone of F_0 is insufficient; it is important to know the thermodynamic conditions of sterilisation³². In their study, Postaire *et al.* demonstrated that the higher the temperature, the higher the GPD formation rate, and independently, the longer the sterilisation time, again the higher the GPD formation rate³², which is confirmed in Cook's study⁵. Kjellstrand *et al.* studied five different F_0 values and demonstrated that combining a high temperature with a short sterilisation time limited the formation of GDPs³⁶. In our study, only one condition was close to those studied by Cook *et al.*⁵: 5% glucose conditioned in 500mL glass vials, sterilised at 121°C at an F_0 value of 20⁵. Applying our equation for a storage time of one month yields an estimated concentration for 5-HMF of 0.662 µg/mL, a value close to previously published results⁵. This confirms the suitability of our model for these conditions.

Apart from sterilisation and storage conditions, we suspected the type of container to be another contributing factor to the formation of GDPs. Indeed, containers with a high coefficient of permeation generate more GDPs than others. This result concurs with previously published data showing that high permeation to oxygen can lead to chemical instability of bag contents, especially for easily oxidisable compounds^{37,38}. Our results indicate that choosing materials with low permeation to oxygen could be a means of limiting the formation of both 5-HMF and 2-FA.

Finally, this study demonstrates the heterogeneity of patients' exposure to GDPs according to the glucose solution used. Exposure firstly depends on the solution purchased, which means that it is extremely difficult to determine real exposure to GDPs. To estimate it, we consider that the maximum fluid volume perfused is 2 litres/day³⁹. If all infusions are based on glucose, the highest average perfused amount of 5-HMF would be 25.67 ± 1.48 mg/day. Matzi *et al.* showed that an oral daily intake of 720 mg of 5HMF over 10 days had no apparent toxicological effect⁴⁰. The absolute bioavailability of 5-HMF is estimated at 72%⁴¹, so 720 mg / day oral intake is equivalent to an approximate IV dose of 520 mg / day. This data confirms that patients hospitalised for a short period and receiving dextrose infusions at low volumes are at a low risk of toxicity, as suggested by a previously published study¹⁶. Little data is currently available on toxicity associated with the chronic infusion of these

products, especially in particularly fragile populations (e.g. neonates, patients suffering from critical conditions or patients receiving long-term IV therapy with glucose solutions). It has previously been shown that GDPs and AGEs may disrupt cellular homeostasis^{1,8,9,11,17,42} or lead to clinical disturbances^{1,8,21,26,27,30}, and so further *ex vivo*, *in vivo* and clinical studies are required to establish the toxicity profile of such solutions.

The originality of this work is to indicate that, by using a statistical model, factors other than sterilisation, storage conditions and initial glucose amount may influence the formation of GDPs during storage:

- 1) GDP formation rate is well correlated with storage duration (between 4 and 61 months).
- 2) Oxygen permeability has a significant influence on the formation rate of both GDPs. PP and glass limit the formation of GDPs (Fig. 4). The multilayers PP/PA/PE, PE/PP and PVC are unable to limit or prevent the generation of GDPs. The impact of PE is not significantly different from 0.

To conclude, this work shows that the following factors influence GDP formation: initial amount of glucose, supplier, mean oxygen permeability coefficient, type of container materials and storage duration since manufacture. Until toxicity studies have been carried out on patients, some measures could be applied to reduce their risk of exposure: the use of glucose solutions with low concentrations conditioned in glass vials and stored for only a short period of time.

METHODS

Chemicals and reagents. Methanol (HPLC – grade), 100% glacial acetic acid, anhydrous potassium dihydrogenophosphate, 5-HMF and 2-FA were purchased from VWR International S.A.S (Fontenay-sous-Bois, France). Pure water was produced with an ultrapure water system (Ultrapure water, Purelab UHQ, ELGA). Anhydrous glucose was obtained from Inresa (Bartenheim, France).

Analytical method. The analyses were carried out by an HPLC system (Shimadzu, Noisiel, France) equipped with an autosampler (SIL-20AC XR) with a 100 μ L injection loop, a diode array detector (SPD-M20A) and a system of double flow-rate pump solvent module (LC-20AD XR). A column oven (CTO-20AC) was used to maintain the column (Alltech ApolloTM C₁₈ column, 5 μ m, 150 x 4.6 mm I.D. (Fisher Scientific, Illkirch, France) at 25°C. All data was analysed with LabSolution software (Shimadzu, France).

The mobile phase consisted of a mixture (10%/90% - v/v) of methanol and phosphate solution (1.5 g, 0.011 mmol for 1 litre) adjusted to pH 2.95 with acetic acid. Flow-rate was set at 2 mL/min. Detection wavelength for both GDPs was fixed at 284 nm following literature guidelines¹¹. A chromatogram is depicted in figure 5.

Concentrations were chosen for calibration points based on previously published data¹ and results of pre-validation steps in our laboratory. Calibration ranges were 500 – 2000 μ g/L and 50 – 200 μ g/L for 5-HMF and 2-FA, respectively. The method was validated by an analysis of variance (ANOVA). Range for validation assay, regression parameters, limits of detection (LOD) and of quantification (LOQ) were 36 and 12 μ g/L, and 72 and 24 μ g/L for 5-HMF and 2-FA, respectively. Validation data are summarized in table 3.

A volume of 100 μ L glucose solution was injected into the HPLC-UV system without pre-treatment with a 100- μ L injection loop. If after dosing, the back-calculated concentration was outside the validated ranges, the solution was diluted with pure water to reach a concentration within the validated ranges and re-analysed. High glucose concentrations (\geq 30g/100ml) were systematically diluted with pure water to avoid injecting too viscous a solution. Each glucose solution was measured in triplicate.

Each concentration measured in each container was transformed into amounts by multiplying the concentration by the container's nominal volume. The nominal volume was used because it is the only volume communicated by all the suppliers. Finally, the GDP rate was determined by dividing the amount by storage duration. For the analysis of glucose infusion fluids, all results were anonymised and are given as mean \pm standard error.

Analysis of marketed solutions. The analysis involved 84 glucose solutions coming from 5 suppliers (Baxter, Lavoisier, MacoPharma, BBraun and Fresenius) at 8 concentrations (2.5, 5, 10, 15, 20, 30, 50 and 70 g/100 mL), 6 volumes (50, 100, 125, 250, 500 and 1000 mL) and in 3 types of containers: bags, flasks and vials. Six different materials: plastic polymers (polyvinyl chloride (PVC), polyethylene (PE), polypropylene (PP), multilayer PP-PE and multilayer PP-polyamide (PA)-PE and glass were used as raw materials for the containers. All solutions were stored from 4 to 61 months at room temperature, in industrial cardboard boxes, in the warehouse of hospital pharmacy, located in the basement of the building. The detail of each solution tested is presented in table 4.

Statistical model. Two factors have been added to those already described in the literature.

- 1) *Suppliers (S)*: A to E (*i.e. sterilisation process*⁵);
- 2) *Initial glucose amounts (G₀)*: 2.5, 5, 6.5, 10, 12.5, 25, 50, 75, 100, 150, 250, 300, 350 and 500g³²;
- 3) *Time-lapse since manufacture (t)*. This parameter was defined as the delay between measurement and manufacturing dates, estimated by subtracting the expiry date from official shelf life⁴³. The shelf lives used in this study were validated by each pharmaceutical supplier for each batch.

Since permeability to oxygen was suspected to be a prominent factor in the formation of GDPs, we added the following factors to the model:

- 4) *Materials (M)*: PVC, PE, PP, multilayers (PE-PP and PE-PA-PP) and glass;
- 5) *Mean oxygen permeability coefficient (P)*. This parameter was estimated from previously published data⁴⁴. The mean oxygen permeability coefficient for plastic flasks

made of PE was estimated at 25×10^{-10} ($\text{cm}^3 \cdot \text{mm} / (\text{cm}^2 \cdot \text{s} \cdot \text{cm of mercury})$)⁴⁴. For bags made of either PA, PVC or PP, it was estimated at 0.2×10^{-10} , 0.6×10^{-10} and 8×10^{-10} ($\text{cm}^3 \cdot \text{mm} / (\text{cm}^2 \cdot \text{s} \cdot \text{cm of mercury})$), respectively⁴⁴. For glass vials, it was fixed at 0 because glass is gasproof. These oxygen permeability coefficients have been referred to the surface of containers and to atmospheric pressure.

To determine a potential relationship between influencing parameters and GDP formation rate, an analysis of covariance (ANCOVA) model was used. However, the relationship between the two variables must be linear to use the ANCOVA model and this was obtained by logarithmic transformation. The complete model used in this study can be summarised in the following equation:

$$\ln(dGDP/dt) = C + \alpha \times \ln(G_0) + \beta \times \ln(P) + \gamma \times M + \delta \times S + \varepsilon \times I - k \times t \quad \text{eq 1}$$

where G_0 , P , M , S , t are the previously cited parameters and I , the interaction between the different coefficients. α is the coefficient for each amount of glucose; β , the coefficient for each case of oxygen permeability; γ , the coefficient for each material; δ , the coefficient for each supplier and ε the coefficient for interaction.

A two-tailed type I error < 0.05 was considered for statistical significance. Analyses were conducted using XLSTAT[®] software (v2014.5.02, Addinsoft, Paris, France).

References

1. Bryland, A. *et al.* Infusion fluids contain harmful glucose degradation products. *Intensive Care Med.* **36**, 1213–1220 (2010).
2. Trissel, L. A. *Handbook on Injectable Drugs*. American Society of Health-System Pharmacists, Bethesda, (2011).
3. Linden, T., Cohen, A., Deppisch, R., Kjellstrand, P. & Wieslander, A. 3,4-Dideoxyglucosone-3-ene (3,4-DGE): a cytotoxic glucose degradation product in fluids for peritoneal dialysis. *Kidney Int.* **62**, 697–703 (2002).
4. European Pharmacopoeia, 9.0 Edition. Monograph 5.1.1. Methods of preparation of sterile products. Available at: <http://online.edqm.eu/entry.htm> (2017).
5. Cook, A. P., MacLeod, T. M., Appleton, J. D. & Fell, A. F. HPLC studies on the degradation profiles of glucose 5% solutions subjected to heat sterilization in a microprocessor-controlled autoclave. *J. Clin. Pharm. Ther.* **14**, 189–195 (1989).
6. Linden, T., Forsbäck, G., Deppisch, R., Henle, T. & Wieslander, A. 3-Deoxyglucosone, a promoter of advanced glycation end products in fluids for peritoneal dialysis. *Perit. Dial. Int.* **18**, 290–293 (1998).
7. Kjellstrand, P., Erixon, M., Wieslander, A., Lindén, T. & Martinson, E. Temperature: the single most important factor for degradation of glucose fluids during storage. *Perit. Dial. Int.* **24**, 385–391 (2004).
8. Frischmann, M. *et al.* Development and validation of an HPLC method to quantify 3,4-dideoxyglucosone-3-ene in peritoneal dialysis fluids. *Biomed. Chromatogr.* **23**, 843–851 (2009).
9. Tomo, T. *et al.* Impact of 3,4-dideoxyglucosone-3-ene (3,4-DGE) on cytotoxicity of acidic heat-sterilized peritoneal dialysis fluid. *J. Artif. Organs* **10**, 47–51 (2007).
10. Thornalley, P. J., Langborg, A. & Minhas, H. S. Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose. *Biochem. J.* **344 Pt 1**, 109–116 (1999).
11. Linden, T. *et al.* Glucose degradation products in peritoneal dialysis fluids may have

both local and systemic effects: a study of residual fluid and mesothelial cells. *Perit. Dial. Int.* **21**, 607–610 (2001).

12. Hellwig, M. & Henle, T. Baking, ageing, diabetes: a short history of the Maillard reaction. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **53**, 10316–10329 (2014).

13. Chen, G. & Smith, J. S. Determination of advanced glycation endproducts in cooked meat products. *Food Chem.* **168**, 190–195 (2015).

14. Hung, C. T., Selkirk, A. B. & Taylor, R. B. A chromatographic quality control procedure based on HPLC for 5-hydroxymethylfurfural in autoclaved D-glucose infusion fluids. *J. Clin. Hosp. Pharm.* **7**, 17–23 (1982).

15. Cook, A. P., Macleod, T. M., Appleton, J. D. & Fell, A. F. Reversed-phase high-performance liquid chromatographic method for the quantification of 5-hydroxymethylfurfural as the major degradation product of glucose in infusion fluids. *J. Chromatogr. A* **467**, 395–401 (1989).

16. Ulbricht, R. J., Northup, S. J. & Thomas, J. A. A review of 5-hydroxymethylfurfural (HMF) in parenteral solutions. *Fundam. Appl. Toxicol.* **4**, 843–853 (1984).

17. Sanchez-Niño, M. D. *et al.* 3,4-DGE is cytotoxic and decreases HSP27/HSPB1 in podocytes. *Arch. Toxicol.* **88**, 597–608 (2014).

18. Penélope Catalan, M. *et al.* 3,4-di-deoxyglucosone-3-ene promotes leukocyte apoptosis. *Kidney Int.* **68**, 1303–1311 (2005).

19. Boulanger, E. *et al.* The triggering of human peritoneal mesothelial cell apoptosis and oncosis by glucose and glycoxydation products. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* **19**, 2208–2216 (2004).

20. Kandarakis, S. A., Piperi, C., Topouzis, F. & Papavassiliou, A. G. Emerging role of advanced glycation-end products (AGEs) in the pathobiology of eye diseases. *Prog. Retin. Eye Res.* **42C**, 85–102 (2014).

21. García-López, E., Carrero, J. J., Suliman, M. E., Lindholm, B. & Stenvinkel, P. Risk factors for cardiovascular disease in patients undergoing peritoneal dialysis. *Perit. Dial. Int. J. Int. Soc. Perit. Dial.* **27 Suppl 2**, S205-209 (2007).

22. Linden, T. *et al.* Glucose degradation products in peritoneal dialysis fluids may have both local and systemic effects: a study of residual fluid and mesothelial cells. *Perit. Dial. Int. J. Int. Soc. Perit. Dial.* **21**, 607–610 (2001).
23. Thornalley, P. J. Measurement of protein glycation, glycated peptides, and glycation free adducts. *Perit. Dial. Int. J. Int. Soc. Perit. Dial.* **25**, 522–533 (2005).
24. Cho, K.-H., Do, J.-Y., Park, J.-W., Yoon, K.-W. & Kim, Y.-L. The Effect of Low-GDP Solution on Ultrafiltration and Solute Transport in Continuous Ambulatory Peritoneal Dialysis Patients. *Perit. Dial. Int.* **33**, 382–390 (2013).
25. Park, J. W., Kang, S. H. & Do, J. Y. Effects of low-glucose degradation product solution on peritoneal membrane characteristics in peritoneal dialysis patients: a 3-year follow-up study. *Iran. J. Kidney Dis.* **8**, 58–64 (2014).
26. Himmele, R., Sawin, D.-A. & Diaz-Buxo, J. A. GDPs and AGEs: impact on cardiovascular toxicity in dialysis patients. *Adv. Perit. Dial.* **27**, 22–26 (2011).
27. Müller-Krebs, S. *et al.* Glucose degradation products result in cardiovascular toxicity in a rat model of renal failure. *Perit. Dial. Int. J. Int. Soc. Perit. Dial.* **30**, 35–40 (2010).
28. Cho, Y. *et al.* Baseline serum interleukin-6 predicts cardiovascular events in incident peritoneal dialysis patients. *Perit. Dial. Int. J. Int. Soc. Perit. Dial.* **35**, 35–42 (2015).
29. Müller-Krebs, S. *et al.* Renal toxicity mediated by glucose degradation products in a rat model of advanced renal failure. *Eur. J. Clin. Invest.* **38**, 296–305 (2008).
30. Sarafidis, P. A., Whaley-Connell, A., Sowers, J. R. & Bakris, G. L. Cardiometabolic syndrome and chronic kidney disease: what is the link? *J. Cardiometab. Syndr.* **1**, 58–65 (2006).
31. Chawla, D. *et al.* Role of advanced glycation end product (AGE)-induced receptor (RAGE) expression in diabetic vascular complications. *Microvasc. Res.* **95C**, 1–6 (2014).
32. Postaire, E. *et al.* Various techniques for the routine evaluation of the degradation of glucose in parenteral solutions — a critical study. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **5**, 309–318 (1987).
33. Fischer, S., Hoernschemeyer, J. & Mahler, H.-C. Glycation during storage and

administration of monoclonal antibody formulations. *Eur. J. Pharm. Biopharm. Off. J. Arbeitsgemeinschaft Pharm. Verfahrenstechnik EV* **70**, 42–50 (2008).

34. Quan, C. *et al.* A study in glycation of a therapeutic recombinant humanized monoclonal antibody: where it is, how it got there, and how it affects charge-based behavior. *Anal. Biochem.* **373**, 179–191 (2008).

35. Erixon, M. *et al.* How to Avoid Glucose Degradation Products in Peritoneal Dialysis Fluids. *Perit. Dial. Int.* **26**, 490–497 (2006).

36. Kjellstrand, P., Martinson, E., Wieslander, A. & Holmquist, B. Development of toxic degradation products during heat sterilization of glucose-containing fluids for peritoneal dialysis: influence of time and temperature. *Perit. Dial. Int.* **15**, 26–32 (1995).

37. Pohloudek-Fabini, R. & Martin, E. [The effect of the gas permeability of plastics on the stability of thiomersal. Part 49: Contributions to problems concerning the use of plastic receptacles for liquid pharmaceuticals (author's transl)]. *Pharm.* **36**, 683–685 (1981).

38. Allwood, M. C. & Kearney, M. C. Compatibility and stability of additives in parenteral nutrition admixtures. *Nutr. Burbank Los Angel. Cty. Calif* **14**, 697–706 (1998).

39. Bernard, L. *et al.* Migration of plasticizers from PVC medical devices: Development of an infusion model. *Int. J. Pharm.* **494**, 136–145 (2015).

40. Matzi, V. *et al.* The impact of preoperative micronutrient supplementation in lung surgery. A prospective randomized trial of oral supplementation of combined alpha-ketoglutaric acid and 5-hydroxymethylfurfural. *Eur. J. Cardio-Thorac. Surg. Off. J. Eur. Assoc. Cardio-Thorac. Surg.* **32**, 776–782 (2007).

41. Obied, T. In-vitro metabolism and protein binding of 5-HMF, a potential antisickling agent. *Theses Diss.* (2010).

42. Boulanger, E. *et al.* The triggering of human peritoneal mesothelial cell apoptosis and oncosis by glucose and glycoxydation products. *Nephrol. Dial. Transplant.* **19**, 2208–2216 (2004).

43. Murty, B. S., Kapoor, J. N. & Smith, F. X. Levels of 5-hydroxymethylfurfural in dextrose injection. *Am. J. Hosp. Pharm.* **34**, 205–206 (1977).

44. Reyne, M. *Les Plastiques : Polymères, Transformations et Applications*. Hermes, Paris, 48 (1991).

Acknowledgements

We thank the Pharmacy supply service at Lille University hospital for their help, in particular Dr. S. Neuville, Dr. I. Walbecq, Dr. C. Cuaz-Perolin.

Author contributions

Work conception and design: J.H, N.S and P.O

Data collection: J.H

Data analysis: J.H, N.S, C.P, P.O

Manuscript writing: J.H, N.S and P.O

Manuscript reviewing: . J.H, N.S, C.D, C.B, F.J.T, E.B, B.D and P.O

All authors have contributed to the work and approved the final version of the manuscript, as submitted.

Competitive interest statement

The authors declare no competing financial interests related to this work.

Figure and table legends

Figure 1: Main glucose degradation pathways. This figure synthesises the main degradation pathways of glucose under high temperature storage conditions^{3,10} or sterilisation¹⁶

Figure 2: Prediction models for 5-HMF generation (a) and 2-FA generation (b) . Linear relationship between $\ln(\text{formation rate of GDP})$ and the prediction of $\ln(\text{formation rate of GDP})$. Dots are measured values and continuous grey lines the confidence interval at 95%.

Figure 3: Impact of container material on the formation rate of both 5-HMF (■) and 2-FA (●). Error bars indicate standard deviations.

Figure 4: Impact of suppliers on the formation rate of both 5-HMF (■) and 2-FA (●). Error bars indicate standard deviations.

Figure 5: Chromatogram of a solution containing 5-HMF and 2-FA. The concentrations of 5-HMF and 2-FA are 1250 $\mu\text{g/l}$ and 125 $\mu\text{g/l}$, respectively ($R_s = 6.5$).

Table 1: Amounts of GDPs in the marketed solutions concerning glucose concentrations of 2.5 and 5%. Each sample was analysed three times. Amounts in glucose degradation products are given as mean \pm standard error, expressed in mg for 5-HMF and in μg for 2-FA. G (%): glucose concentration in g/100 ml; Supp.: supplier; Vol.: volume; Cont.: container. Extreme values for one supplier are in italic/bold. *Out of accuracy profile

Table 2: Amounts of GDPs in the marketed solutions, concerning glucose concentrations of 10, 15, 20, 30, 50 and 70%. Each sample was analysed three times. Amounts in glucose degradation products are given as mean \pm standard error, expressed in mg for 5-HMF and in

μg for 2-FA. G (%): glucose concentration in g/100 ml; Supp.: supplier; Vol.: volume; Cont.: container. Extreme values for one supplier are in italic/bold. *Out of accuracy profile

Table 3: Regression parameters, LOD and LOQ for each GDP

Table 4: Description of tested solutions. All suppliers confirmed the use of the moist heat method but some did not provide their protocol: A: Not communicated, B: Not communicated, C: $F_0 \geq 11$, D: $F_0 \geq 15$ (estimated between at 42 and 45), D': $F_0 \geq 15$ (estimated at 20), E: $F_0 = 15$.

Table 1: Amounts of GDPs in the marketed solutions concerning glucose concentrations of 2.5 and 5%. Each sample was analysed three times. Amounts in glucose degradation products are given as mean \pm standard error, expressed in mg for 5-HMF and in μg for 2-FA. G (%): glucose concentration in g/100 ml; Supp.: supplier; Vol.: volume; Cont.: container. Extreme values for one supplier are in italic/bold. *Out of accuracy profile

G (%)	Supp.	Vol. (mL)	Cont.	5-HMF (mg)	2-FA (μg)	G (%)	Supp.	Vol. (mL)	Cont.	5-HMF (mg)	2-FA (μg)
2.5	A	500	Bag	<i>0.82 \pm 0.00</i>	<i>12.01 \pm 0.13*</i>	5	B	500	Flask	1.92 \pm 0.01	48.64 \pm 0.27
	A	1000	Bag	<i>3.57 \pm 0.02</i>	257.85 \pm 2.07		B	500	Flask	3.84 \pm 0.01	97.76 \pm 0.46
	A	1000	Bag	2.81 \pm 0.02	<i>220.07 \pm 0.62</i>		B	1000	Flask	5.60 \pm 0.01	150.14 \pm 0.12
	B	1000	Flask	1.24 \pm 0.01	30.73 \pm 0.29*		C	250	Bag	1.33 \pm 0.00	25.11 \pm 0.34
	E	1000	Bag	2.67 \pm 0.00	66.44 \pm 1.30		C	250	Bag	<i>1.03 \pm 0.01</i>	<i>20.69 \pm 0.06</i>
5	A	50	Bag	<i>0.32 \pm 0.00</i>	3.40 \pm 0.02		C	500	Bag	3.84 \pm 0.01	64.98 \pm 0.39
	A	50	Bag	0.33 \pm 0.00	<i>3.22 \pm 0.01</i>		C	500	Flask	<i>4.91 \pm 0.01</i>	<i>94.23 \pm 2.32</i>
	A	50	Bag	0.35 \pm 0.00	3.37 \pm 0.01		C	500	Bag	3.57 \pm 0.02	68.58 \pm 0.38
	A	50	Bag	0.53 \pm 0.00	4.46 \pm 0.02		C	500	Bag	3.31 \pm 0.04	54.35 \pm 0.08
	A	100	Bag	0.70 \pm 0.01	10.12 \pm 0.09		D'	125	Vial	<i>0.48 \pm 0.00</i>	<i>11.90 \pm 0.02</i>
	A	100	Bag	0.75 \pm 0.01	8.36 \pm 0.02		D'	125	Vial	1.01 \pm 0.01	20.47 \pm 0.17
	A	100	Bag	0.93 \pm 0.01	10.53 \pm 0.05		D'	250	Vial	2.24 \pm 0.01	38.86 \pm 0.03
	A	100	Bag	0.98 \pm 0.01	10.13 \pm 0.01		D'	250	Vial	2.44 \pm 0.01	46.09 \pm 0.13
	A	250	Bag	0.87 \pm 0.00	19.25 \pm 0.02		D'	500	Vial	3.54 \pm 0.02	62.20 \pm 0.02
	A	250	Bag	1.98 \pm 0.00	73.36 \pm 0.03		D'	500	Vial	3.67 \pm 0.01	58.25 \pm 0.21
	A	250	Bag	1.08 \pm 0.00	25.58 \pm 0.02	D'	1000	Vial	5.54 \pm 0.01	90.57 \pm 0.81	
	A	500	Bag	1.87 \pm 0.01	33.88 \pm 0.14	D'	1000	Vial	<i>9.03 \pm 0.02</i>	<i>152.87 \pm 0.68</i>	
	A	500	Bag	2.52 \pm 0.02	41.55 \pm 0.10	E	50	Bag	<i>0.35 \pm 0.00</i>	<i>2.42 \pm 0.02*</i>	
	A	500	Bag	<i>5.56 \pm 0.00</i>	<i>58.66 \pm 0.20</i>	E	100	Bag	0.65 \pm 0.00	7.92 \pm 0.03	
	B	50	Flask	<i>0.20 \pm 0.00</i>	<i>3.59 \pm 0.06</i>	E	100	Bag	1.16 \pm 0.00	7.77 \pm 0.02	
	B	100	Flask	0.24 \pm 0.00	4.26 \pm 0.15*	E	100	Bag	1.26 \pm 0.00	7.97 \pm 0.02	
	B	100	Flask	<i>26.57 \pm 0.02</i>	<i>425.43 \pm 1.86</i>	E	100	Bag	1.30 \pm 0.00	7.38 \pm 0.08	
	B	250	Flask	0.88 \pm 0.00	21.39 \pm 0.06	E	500	Bag	3.66 \pm 0.02	38.90 \pm 0.17	
	B	250	Flask	0.99 \pm 0.00	29.43 \pm 0.23	E	500	Bag	<i>6.81 \pm 0.02</i>	<i>47.20 \pm 0.70</i>	
	B	250	Flask	0.99 \pm 0.01	29.27 \pm 0.11						

Table 2: Amounts of GDPs in the marketed solutions, concerning glucose concentrations of 10, 15, 20, 30, 50 and 70%. Each sample was analysed three times. Amounts in glucose degradation products are given as mean \pm standard error, expressed in mg for 5-HMF and in μ g for 2-FA. G (%): glucose concentration in g/100 ml; Supp.: supplier; Vol.: volume; Cont.: container. Extreme values for one supplier are in italic/bold. *Out of accuracy profile

G (%)	Supp.	Vol. (mL)	Cont.	5-HMF (mg)	2-FA (μ g)	G (%)	Supp.	Vol. (mL)	Cont.	5-HMF (mg)	2-FA (μ g)	
10	A	500	Bag	<i>3.82 \pm 0.06</i>	104.34 \pm 0.05	20	E	500	Bag	21.77 \pm 0.02	256.26 \pm 1.62	
	A	500	Bag	4.09 \pm 0.03	<i>54.53 \pm 0.08</i>		30	B	500	Flask	3.84 \pm 0.01	257.92 \pm 1.32
	A	1000	Bag	<i>7.57 \pm 0.07</i>	<i>122.25 \pm 0.12</i>			D'	500	Vial	<i>12.67 \pm 0.10</i>	<i>244.63 \pm 0.44</i>
	B	250	Flask	<i>2.46 \pm 0.01</i>	<i>66.64 \pm 0.07</i>			D'	500	Vial	13.81 \pm 0.10	263.25 \pm 0.76
	B	250	Flask	<i>2.50 \pm 0.01</i>	<i>86.35 \pm 1.01</i>			D'	1000	Vial	<i>34.95 \pm 0.22</i>	<i>601.42 \pm 1.53</i>
	C	250	Flask	<i>4.61 \pm 0.01</i>	81.67 \pm 0.10			E	250	Bag	<i>5.27 \pm 0.03</i>	<i>92.14 \pm 0.38</i>
	C	500	Bag	5.90 \pm 0.16	<i>72.75 \pm 0.07</i>			E	500	Bag	11.44 \pm 0.00	160.09 \pm 0.05
	C	500	Bag	<i>6.71 \pm 0.02</i>	<i>95.80 \pm 0.28</i>			E	500	Bag	13.78 \pm 0.06	268.44 \pm 1.06
	D	250	Bag	<i>1.62 \pm 0.01</i>	<i>28.49 \pm 0.08</i>			E	500	Bag	17.04 \pm 0.06	276.70 \pm 0.70
	D	250	Bag	1.77 \pm 0.01	29.13 \pm 0.01			E	500	Bag	<i>20.28 \pm 0.12</i>	<i>329.51 \pm 0.92</i>
	D	250	Bag	<i>2.68 \pm 0.03</i>	<i>36.81 \pm 0.09</i>			50	B	500	Vial	3.84 \pm 0.01
	D'	500	Vial	<i>10.06 \pm 0.06</i>	<i>300.32 \pm 1.01</i>		E		1000	Bag	41.21 \pm 0.08	182.68 \pm 3.45
	D'	500	Vial	<i>12.44 \pm 0.14</i>	<i>338.04 \pm 0.58</i>		70		B	500	Flask	37.27 \pm 0.23
	E	100	Bag	<i>0.70 \pm 0.01</i>	<i>5.50 \pm 0.05</i>							
	E	100	Bag	1.26 \pm 0.02	13.62 \pm 0.03							
	E	100	Bag	<i>1.42 \pm 0.00</i>	<i>17.30 \pm 0.08</i>							
15	D'	500	Vial	<i>15.95 \pm 0.37</i>	<i>337.52 \pm 1.10</i>							
	D'	500	Vial	32.93 \pm 0.63	651.83 \pm 0.47							
	D'	1000	Vial	<i>34.81 \pm 0.72</i>	<i>654.28 \pm 1.04</i>							
	E	500	Bag	<i>13.21 \pm 0.07</i>	<i>174.82 \pm 0.70</i>							
	E	500	Bag	13.22 \pm 0.21	<i>145.41 \pm 0.58</i>							
	E	500	Bag	<i>13.71 \pm 0.27</i>	147.12 \pm 19.05							

Table 3: Regression parameters, LOD and LOQ for each GDP

GDP	Range ($\mu\text{g/L}$)	r^2	Slope	y-Intercept	LOD ($\mu\text{g/L}$)	LOQ ($\mu\text{g/L}$)
5-HMF	500-2000	0.999	92686.87	-1349.29	36	72
2-FA	50-200	0.988	12.95	7.83	12	24

Table 4: Description of tested solutions. All suppliers confirmed the use of the moist heat method but some did not provide their protocol: A: Not communicated, B: Not communicated, C: $F_0 \geq 11$, D: $F_0 \geq 15$ (estimated between at 42 and 45), D': $F_0 \geq 15$ (estimated at 20), E: $F_0 = 15$.

Supplier	N	Conc (%)	Volume (ml)	Type of Container	Type of container material	Time-lapse since manufacture (months)
A	20	2.5 – 5 – 10	50 – 100 – 250 – 500 – 1000	Bag	PE/PA/PP	7 – 9 – 10 – 12 – 14 – 15 – 16 – 17 – 20 – 31 – 32 – 33 – 34 – 51
B	15	2.5 – 5 – 10 – 30 – 50 – 70	50 – 100 – 250 – 500 – 1000	Flask – Vial	PE - Glass	4 – 5 – 6 – 7 – 8 – 11 – 17 – 18 – 25 – 29 – 36
C	9	5 – 10	250 – 500	Flask – Bag	PE – PP	15 – 16 – 18 – 20 – 34 – 43 – 44
D	3	10	250	Bag	PP	13 – 19
D'	16	5 – 10 – 15 – 30	125 – 250 – 500 – 1000	Vial	Glass	10 – 13 – 15 – 18 – 20 – 23 – 25 – 28 – 31 – 33 – 46 – 50 – 54 – 58 – 61
E	21	2.5 – 5 – 10 – 15 – 20 – 30 – 50	50 – 100 – 250 – 500 – 1000	Bag	PE/PP - PVC	11 – 15 – 16 – 17 – 18 – 20 – 23 – 26 – 29 – 31 – 37 – 41 – 56

Produits de dégradation du glucose dans les solutions glucosées injectables – Caractérisation et modélisation des facteurs influençant leur génération

L'utilisation quotidienne des solutions glucosées injectables (SGI) au sein des établissements de santé, impose une sûreté de leur administration, que ce soit en tant que véhicule d'administration, solution d'hydratation, ou composant des solutions parentérales ou de nutrition parentérale. L'administration par voie parentérale impose une stérilité des solutions. La Pharmacopée Européenne recommande la stérilisation par la chaleur humide, méthode connue pour favoriser la formation de produits de dégradation du glucose (PDG), précurseur des AGEs (Advanced Glycation End products). Il a été montré que de hautes concentrations en PDG et AGEs ont un impact sur l'homéostasie cellulaire et la mise en place de pathologies, notamment au sein du système cardio-vasculaire et rénal. Afin de limiter l'administration de PDG aux patients, il est important de déterminer les facteurs influençant leur formation et de tenter de les maîtriser, ce qui est l'objectif de ce travail.

La première partie a été de développer et de valider une méthode de dosage de deux PDG, le 5-hydroxyméthyl-2-furaldéhyde (5-HMF) et le 2-furaldéhyde (2-FA). Après validation de la méthode de dosage par CLHP-UV, 84 SGI ont été étudiées, provenant de 5 fabricants, avec 8 concentrations en glucose, 6 volumes, 3 types de contenants et 6 matériaux différents. Cette analyse du marché français montre une influence du temps de stockage, de la quantité initiale en glucose, de la perméabilité à l'oxygène du contenant sur la vitesse de formation de ces deux PDG. Les matériaux des contenants et les fournisseurs ont été classés en fonction de leur impact. Le verre et le polypropylène semblent limiter la formation des PDG contrairement au bicouche polyéthylène/polypropylène.

La dernière partie consiste en l'étude de la stérilisation des SGI à 5%, 10%, 30% et 50%, stérilisées par filtration et par la chaleur humide (10 cycles de stérilisation). Quatre paramètres de stérilisation ont été étudiés : la température (111, 11, 121 et 134°C), la durée (3, 9, 15, 20, 30, 90 et 200 min), l'effet stérilisant F_0 (3, 9, 9,5, 15, 20, 30 et 60 min) et l'autoclave (L et B). La filtration ne génère pas plus de PDG que l'absence de stérilisation, alors que la stérilisation à chaud montre une augmentation de leur production quel que soit le cycle choisi. La vitesse de formation des PDG est corrélée à la température du cycle, à l'effet stérilisant F_0 et à la concentration en glucose. L'ensemble de ces résultats a permis de définir les premières conditions optimales de stérilisation par la chaleur, recommandant de se placer à la température la plus élevée pour un F_0 donné, afin d'avoir la durée de stérilisation la plus courte possible.

En conclusion, afin de limiter le risque d'exposition des patients aux PDG, différentes mesures peuvent être appliquées : utiliser de faibles concentrations de glucose, dans des contenants en verre de faible volume, ayant été stérilisés par filtration stérilisante ou par un autoclave à haute température durant un cycle court.

Mots clés : Glucose, Produits de dégradation du glucose, 5-hydroxyméthyl-2-furaldéhyde, 2-furaldéhyde, CLHP-UV, Modélisation, Stérilisation

Glucose degradation products in sterile glucose solutions for infusion - Characterisation and modelling factors influencing their generation

The daily use of sterile glucose solutions for infusion (GSI) in hospital imposes a safety of their administration. They are used as diluents for injectable drugs, as hydration solutions or as well as for parenteral solutions and parenteral nutrition. The intravenous administration requires sterilization. However, the moist heat sterilization process, recommended by European Pharmacopoeia, generates glucose degradation products (GDP). GDPs are highly reactive precursors of Advanced Glycation End products (AGEs) which high levels could have an impact on cell homeostasis and pathogenesis, especially on cardiovascular and renal systems. In order to limit the administration of PDG to patients, it is important to determine the factors influencing their formation and try to control them, which was the objective of work.

The first part was to develop and validate an analytical method tow GDP, 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde (5-HMF) and 2-furaldehyde (2-FA). After validation of analytical method by HPLC-UV, 84 GSI were studied, coming from 5 suppliers at 8 concentrations, 6 volumes, 3 types of containers and 6 different materials.

This analysis of the French market determinate a significant influence of storage time, initial glucose amount, and permeability to oxygen of containers on the GDPs formation rates.

The influence of container material and suppliers could be classified according to their ability to limit GDP generation. For instance, the GDP formation rate is lower with both polypropylen and glass.

The second part consists in the study of sterilization process on GSI at 5%, 10%, 30% and 50% and sterilized by filtration or moist heat (10 cycles). Four sterilization parameters were analysed: temperature (111, 11, 121 or 134°C), time (3, 9, 15, 20, 30, 90 or 200 m), sterilization effect F_0 (3, 9, 9, 5, 15, 20, 30 or 60 min) and autoclave (L or B). The filtration process did not generate more GDP than without sterilization, whereas moist heat sterilization improves their production in all conditions. The GDP formation rate was correlated with cycle temperature, sterilization effect F_0 and glucose concentration. These data have enabled to define optimal heat moist sterilization conditions, which recommended the highest temperature for an F_0 in order to have the smallest sterilization length.

To conclude, in aim to limit GDP exposition risk for patients, numerous measures could be applied: use low glucose concentration in glass small volume container, sterilized with high temperature autoclave short cycles.

Keys words: Glucose, Glucose degradation product, 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde, 2-furaldehyde, HPLC-UV, modelling, sterilization.