



<http://portaildoc.univ-lyon1.fr>

Creative commons : Paternité - Pas d'Utilisation Commerciale -
Pas de Modification 2.0 France (CC BY-NC-ND 2.0)



<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.0/fr>



UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON I
FACULTE DE PHARMACIE DE LYON
INSTITUT DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES

THESE n°37

THESE

pour le DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement le 29 mars 2022 par

M. LAMBERT Rémi

Né le 7 novembre 1997

à VILLEURBANNE (69)

**MISE AU POINT D'UNE PREPARATION MAGISTRALE DE GLUCOAMYLASE EN
RECOURS DANS LE TRAITEMENT DU DEFICIT CONGENITAL EN SACCHARASE-
ISOMALTASE**

JURY

Président : Monsieur Fabrice PIROT, Professeur des Universités – Praticien Hospitalier

Directeur : Monsieur Camille MERIENNE, Praticien Hospitalier

Membres : Monsieur Alain LACHAUX, Professeur des Universités – Praticien Hospitalier

Madame Chloé MARCHAND, Pharmacien Assistant Spécialiste

Madame Florence VILLARD-TRUC, Praticien Hospitalier

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

- Président Frédéric FLEURY
- Président du Conseil Académique Hamda BEN HADID
- Vice-Président du Conseil d'Administration Didier REVEL
- Vice-Président de la Commission Recherche Petru MIRONESCU
- Vice-Président de la Formation et de la Vie Universitaire Céline BROCHIER

Composantes de l'Université Claude Bernard Lyon 1

SANTE

UFR de Médecine Lyon Est	Directeur : Gilles RODE
UFR de Médecine Lyon Sud Charles Mérieux	Directrice : Carole BURILLON
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directeur : Claude DUSSART
UFR d'Odontologie	Directrice : Dominique SEUX
Institut des Sciences et Techniques de Réadaptation (ISTR)	Directeur : Xavier PERROT

SCIENCES ET TECHNOLOGIES

UFR Faculté des Sciences (Chimie, Mathématique, Physique)	Directeur : M. Bruno ANDRIOLETTI
UFR Biosciences (Biologie, Biochimie)	Directrice : Mme Kathrin GIESELER
Département composante Informatique	Directeur : M. Behzad SHARIAT
Département composante Génie Electrique et des procédés (GEP)	Directrice : Mme Rosaria FERRIGNO
Département composante Mécanique	Directeur : M. Marc BUFFAT
UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS)	Directeur : M. Yannick VANPOULLE
Polytech Lyon	Directeur : M. Emmanuel PERRIN
I.U.T. LYON 1	Directeur : M. Christophe VITON
Institut des Sciences Financières et d'Assurance (ISFA)	Directeur : M. Nicolas LEBOISNE
Observatoire de Lyon	Directrice : Mme Isabelle DANIEL

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ISPB - Faculté de Pharmacie Lyon

LISTE DES DEPARTEMENTS PEDAGOGIQUES

**DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DE SCIENCES PHYSICO-CHIMIQUES ET PHARMACIE
GALENIQUE**

- **CHIMIE GENERALE, PHYSIQUE ET MINERALE**
Monsieur Raphaël TERREUX (PR)
Madame Julie-Anne CHEMELLE (MCU)
- **CHIMIE ANALYTIQUE**
Madame Anne DENUZIERE (MCU)
Monsieur Lars-Petter JORDHEIM (MCU-HDR)
Madame Christelle MACHON (MCU-PH)
Monsieur Waël ZEINYEH (MCU)
- **PHARMACIE GALENIQUE-COSMETOLOGIE**
Madame Marie-Alexandrine BOLZINGER (PR)
Madame Stéphanie BRIANCON (PR)
Monsieur Fabrice PIROT (PU-PH)
Monsieur Eyad AL MOUAZEN (MCU)
Madame Sandrine BOURGEOIS (MCU)
Madame Danielle CAMPIOL ARRUDA (MCU)
Madame Ghania HAMDY-DEGOBERT (MCU-HDR)
Monsieur Plamen KIRILOV (MCU)
Madame Giovanna LOLLO (MCU)
Madame Jacqueline RESENDE DE AZEVEDO (MCU)
Monsieur Damien SALMON (MCU-PH)
Madame Eloïse THOMAS (MCU)
- **BIOPHYSIQUE**
Monsieur Cyril PAILLER-MATTEI (PR)
Madame Laurence HEINRICH (MCU)
Monsieur David KRYZA (MCU-PH-HDR)
Madame Sophie LANCELOT (MCU-PH)
Madame Elise LEVIGOUREUX (MCU-PH)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE PHARMACEUTIQUE DE SANTE PUBLIQUE

- **DROIT DE LA SANTE**
Madame Valérie SIRANYAN (PR)
Madame Maud CINTRAT (MCU)

- **ECONOMIE DE LA SANTE**
Madame Nora FERDJAOUI MOUMJID (MCU-HDR)
Monsieur Hans-Martin SPÄTH (MCU-HDR)
- **INFORMATION ET DOCUMENTATION**
Monsieur Pascal BADOR (MCU-HDR)
- **INGENIERIE APPLIQUEE A LA SANTE ET DISPOSITIFS MEDICAUX**
Monsieur Xavier ARMOIRY (PU-PH)
Madame Claire GAILLARD (MCU)
- **QUALITOLOGIE – MANAGEMENT DE LA QUALITE**
Madame Alexandra CLAYER-MONTEMBAULT (MCU)
Monsieur Vincent GROS (MCU-enseignant contractuel temps partiel)
Madame Audrey JANOLY-DUMENIL (MCU-PH)
Madame Pascale PREYNAT (MCU-enseignant contractuel temps partiel)
- **MATHEMATIQUES – STATISTIQUES**
Madame Claire BARDEL-DANJEAN (MCU-PH-HDR)
Madame Marie-Aimée DRONNE (MCU)
Madame Marie-Paule GUSTIN (MCU-HDR)
- **SANTE PUBLIQUE**
Monsieur Claude DUSSART (PU-PH)
Madame Chloë HERLEDAN (AHU)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE SCIENCES DU MEDICAMENT

- **CHIMIE ORGANIQUE**
Monsieur Pascal NEBOIS (PR)
Madame Amanda GARRIDO (MCU)
Madame Christelle MARMINON (MCU)
Madame Sylvie RADIX (MCU-HDR)
Monsieur Luc ROCHEBLAVE (MCU-HDR)
- **CHIMIE THERAPEUTIQUE**
Monsieur Marc LEBORGNE (PR)
Monsieur Thierry LOMBERGET (PR)
Monsieur Laurent ETTOUATI (MCU-HDR)
Monsieur François HALLE (MCU)
Madame Marie-Emmanuelle MILLION (MCU)
- **BOTANIQUE ET PHARMACOGNOSIE**
Madame Marie-Geneviève DIJOUX-FRANCA (PR)
Madame Anne-Emmanuelle HAY DE BETTIGNIES (MCU)
Madame Isabelle KERZAON (MCU)
Monsieur Serge MICHALET (MCU)

- **PHARMACIE CLINIQUE, PHARMACOCINETIQUE ET EVALUATION DU MEDICAMENT**

Madame Christelle CHAUDRAY-MOUCHOUX (PU-PH)
Madame Catherine RIOUFOL (PU-PH)
Madame Magali BOLON-LARGER (MCU-PH)
Monsieur Teddy NOVAIS (MCU-PH)
Madame Céline PRUNET-SPANO (MCU)
Madame Florence RANCHON (MCU-PH)
Madame Delphine HOEGY (AHU)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DE PHARMACOLOGIE, PHYSIOLOGIE ET TOXICOLOGIE

- **TOXICOLOGIE**

Monsieur Jérôme GUITTON (PU-PH)
Madame Léa PAYEN (PU-PH)
Monsieur Bruno FOUILLET (MCU)

- **PHYSIOLOGIE**

Monsieur Christian BARRES (PR)
Madame Kiao Ling LIU (MCU)
Monsieur Ming LO (MCU-HDR)

- **PHARMACOLOGIE**

Monsieur Sylvain GOUTELLE (PU-PH)
Monsieur Michel TOD (PU-PH)
Monsieur Luc ZIMMER (PU-PH)
Monsieur Roger BESANCON (MCU)
Monsieur Laurent BOURGUIGNON (MCU-PH)
Madame Evelyne CHANUT (MCU)
Monsieur Nicola KUCZEWSKI (MCU)
Madame Dominique MARCEL CHATELAIN (MCU-HDR)

- **COMMUNICATION**

Monsieur Ronald GUILLOUX (MCU)

- **ENSEIGNANTS CONTRACTUELS TEMPS PARTIEL**

Madame Aline INIGO PILLET (MCU-enseignant contractuel temps partiel)
Madame Pauline LOUBERT (MCU-enseignant contractuel temps partiel)
Madame Ievgeniia CHICHEROVA (ATER)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DES SCIENCES BIOMEDICALES A

- **IMMUNOLOGIE**

Monsieur Guillaume MONNERET (PU-PH)
Madame Morgane GOSSEZ (MCU-PH)
Monsieur Sébastien VIEL (MCU-PH)
Monsieur David GONCALVES (AHU)

- **HEMATOLOGIE ET CYTOLOGIE**
 - Madame Christine VINCIGUERRA (PU-PH)
 - Madame Sarah HUET (MCU-PH)
 - Monsieur Yohann JOURDY (MCU-PH)
 - Madame Amy DERICQUEBOURG (AHU)

- **MICROBIOLOGIE ET MYCOLOGIE FONDAMENTALE ET APPLIQUEE AUX BIOTECHNOLOGIES INDUSTRIELLES**
 - Monsieur Frédéric LAURENT (PU-PH)
 - Madame Florence MORFIN (PU-PH)
 - Madame Veronica RODRIGUEZ-NAVA (PR)
 - Monsieur Didier BLAHA (MCU-HDR)
 - Madame Ghislaine DESCOURS (MCU-PH)
 - Madame Anne DOLEANS JORDHEIM (MCU-PH-HDR)
 - Madame Emilie FROBERT (MCU-PH)
 - Monsieur Jérôme JOSSE (MCU)

- **PARASITOLOGIE, MYCOLOGIE MEDICALE**
 - Monsieur Philippe LAWTON (PR)
 - Madame Nathalie ALLIOLI (MCU)
 - Madame Samira AZZOUZ-MAACHE (MCU-HDR)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DES SCIENCES BIOMEDICALES B

- **BIOCHIMIE – BIOLOGIE MOLECULAIRE – BIOTECHNOLOGIE**
 - Madame Pascale COHEN (PR)
 - Madame Caroline MOYRET-LALLE (PR)
 - Madame Emilie BLOND (MCU-PH)
 - Monsieur Karim CHIKH (MCU-PH)
 - Madame Carole FERRARO-PEYRET (MCU-PH-HDR)
 - Monsieur Anthony FOURIER (MCU-PH)
 - Monsieur Boyan GRIGOROV (MCU)
 - Monsieur Alexandre JANIN (MCU-PH)
 - Monsieur Hubert LINCET (MCU-HDR)
 - Monsieur Olivier MEURETTE (MCU-HDR)
 - Madame Angélique MULARONI (MCU)
 - Madame Stéphanie SENTIS (MCU)
 - Monsieur Jordan TEOLI (AHU)

- **BIOLOGIE CELLULAIRE**
 - Madame Bénédicte COUPAT-GOUTALAND (MCU)
 - Monsieur Michel PELANDAKIS (MCU-HDR)

INSTITUT DE PHARMACIE INDUSTRIELLE DE LYON

Madame Marie-Alexandrine BOLZINGER (PR)

Monsieur Philippe LAWTON (PR)

Madame Sandrine BOURGEOIS (MCU)

Madame Marie-Emmanuelle MILLION (MCU)

Madame Alexandra MONTEBAULT (MCU)

Madame Angélique MULARONI (MCU)

Madame Marie-Françoise KLUCKER (MCU-enseignant contractuel temps partiel)

Madame Valérie VOIRON (MCU-enseignant contractuel temps partiel)

PR : Professeur des Universités

PU-PH : Professeur des Universités-Praticien Hospitalier

MCU : Maître de Conférences des Universités

MCU-PH : Maître de Conférences des Universités-Praticien Hospitalier

HDR : Habilitation à Diriger des Recherches

AHU : Assistant Hospitalier Universitaire

ATER : Attaché temporaire d'enseignement et de recherche



SERMENT DE GALIEN

En présence des Maitres de la Faculté, je fais le serment :

- D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle aux principes qui m'ont été enseignés et d'actualiser mes connaissances
- D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de Déontologie, de l'honneur, de la probité et du désintéressement
- De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers la personne humaine et sa dignité
- En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.
- De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession
- De faire preuve de loyauté et de solidarité envers mes collègues pharmaciens
- De coopérer avec les autres professionnels de santé.

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

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



REMERCIEMENTS

Aux membres du jury,

Professeur Fabrice PIROT, je vous remercie de présider cette thèse. Merci pour votre temps, votre aide et vos enseignements.

Je tiens à remercier mon directeur de thèse, le **Docteur Camille MERIENNE**. Merci de m'avoir confié ce projet, de m'avoir encadré et d'avoir répondu à l'ensemble de mes interrogations. Merci pour ta gentillesse et ta disponibilité permanente.

Professeur Alain LACHAUX, je vous remercie de siéger au sein de mon jury. Merci pour vos précieux conseils et pour l'intérêt que vous portez à mon travail. Je souhaite vous exprimer ma profonde gratitude.

Je remercie le **Docteur Chloé MARCHAND** de juger ce travail. Merci pour ton aide et ta bonne humeur quotidienne.

Docteur Florence VILLARD-TRUC, je vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail. Soyez assurée de toute ma reconnaissance.

Aux patients atteints de DCSI,

Au groupe KERRY®,

À mes collègues,

Je souhaite remercier l'ensemble de l'équipe FRIPHARM® qui m'a accompagné tout au long de ce projet. Un grand merci à **Karine, Éric, Brigitte** et **Christophe**, c'était un plaisir de travailler avec vous.

À **Meryl, Benjamine, Louisanne** et **Manuela** pour nos déjeuners sur la pelouse de l'hôpital et nos fous rires autour d'un verre après le travail.

À mes amis,

Merci à mes amis de pharma d'avoir rendu ces années inoubliables. À **Lucas, Nico, Arnaud, Thibault, Luc** et **Christophe** pour tous ces bons moments passés ensemble. J'ai vécu mes meilleures soirées à vos côtés.

Merci à mes amis de CPE d'avoir intégré un pharmacien dans leur promotion. À **Doriane** et **Elliott** pour m'avoir aidé à survivre à la chimie organique de 4A.

À **Pierre-Olivier** pour tous ces bons moments passés à refaire le monde une bière à la main.

À ma belle-famille,

Merci de m'accueillir toujours à bras ouverts. Vous êtes une seconde famille pour moi.

À ma famille,

Je chéris les moments que nous passons tous ensemble. Aucun mot n'est assez fort pour dire combien vous comptez pour moi. À **mes parents** pour votre soutien depuis toujours. Grâce à vous, j'ai pu m'épanouir dans les meilleures conditions. Je suis fier d'être votre fils. Spéciale dédicace à **ma sœur** adorée pour l'organisation de mon pot de thèse, tu es la meilleure.

À toi,

Déborah, merci de partager ma vie depuis bientôt cinq ans et d'en illuminer chaque jour avec ton sourire. Si certaines joies sont une source intarissable de force pour l'âme, les miennes résident dans notre vie à deux. Je t'aime.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES TABLEAUX.....	13
LISTE DES FIGURES.....	14
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	15
INTRODUCTION	17
CHAPITRE 1 : GÉNÉRALITÉS.....	18
I. LES MALADIES DIGESTIVES CHRONIQUES.....	18
1. Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin	18
2. Maladie cœliaque	19
3. Syndrome de l'intestin irritable	20
II. LE DÉFICIT CONGÉNITAL EN SACCHARASE-ISOMALTASE.....	21
1. Étiologie.....	21
2. Épidémiologie	21
3. Symptomatologie	22
4. Diagnostic	24
4.1. <i>Biopsie intestinale</i>	25
4.2. <i>Test de charge en saccharose</i>	25
4.3. <i>Breath test</i>	26
4.4. <i>Examen des selles</i>	26
4.5. <i>Autres examens</i>	27
5. Prise en charge	27
5.1. <i>Régime alimentaire</i>	27
5.2. <i>Enzymothérapie substitutive</i>	32
CHAPITRE 2 : MISE AU POINT D'UNE SOLUTION BUVABLE DE GLUCOAMYLASE.....	34
I. CONTEXTE	34
1. Mise au point et évaluation d'une préparation pharmaceutique d'invertase	34
2. Mise au point d'une préparation pharmaceutique de glucoamylase	36
II. QUALIFICATION PHARMACEUTIQUE DE LA MATIÈRE PREMIÈRE ENZYMATIQUE	38
1. Contrôle des certifications du fournisseur, du processus de production industriel et des spécifications techniques de la matière première	38
1.1. <i>Contrôle des certifications du fournisseur</i>	38
1.2. <i>Contrôle du processus de production industriel de l'enzyme</i>	40
1.3. <i>Contrôle des spécifications techniques de la matière première</i>	43
2. Essais menés pour la qualification pharmaceutique de la matière première	45

3.	Contrôle de l'activité enzymatique de la glucoamylase	48
3.1.	<i>Rappels d'enzymologie</i>	48
3.2.	<i>Matériel et méthode</i>	51
3.3.	<i>Protocole de validation</i>	56
3.4.	<i>Résultats et interprétations</i>	59
3.5.	<i>Validation de la méthode</i>	61
4.	Validation de la qualité pharmaceutique de la matière première	62
III.	ETUDE DE FAISABILITE DU PROJET	65
1.	Statut de la préparation	65
1.1.	<i>Généralités</i>	65
1.2.	<i>Préparation magistrale de glucoamylase</i>	67
2.	Conformité réglementaire.....	67
2.1.	<i>Pertinence et intérêt pharmacothérapeutique de la préparation magistrale de glucoamylase</i>	67
2.2.	<i>Choix d'une posologie</i>	67
3.	Données bibliographiques.....	72
4.	Faisabilité technique.....	74
4.1.	<i>Matériel et locaux</i>	74
4.2.	<i>Personnel</i>	75
4.3.	<i>Formulation galénique</i>	75
4.4.	<i>Circuit de la matière première et des articles de conditionnement</i>	76
4.5.	<i>Circuit de préparation, de contrôle et de libération d'un lot</i>	76
5.	Contrôle de la stabilité de la préparation.....	81
6.	Analyse et gestion des risques	86
6.1.	<i>Généralités</i>	86
6.2.	<i>Analyse et gestion des risques de la préparation</i>	88
7.	Faisabilité économique.....	90
IV.	DISCUSSION GENERALE.....	91
	CONCLUSIONS	94
	REFERENCES	96
	ANNEXES	100

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Hétérogénéité de la prévalence du DCSI dans diverses populations autochtones d'Amérique du Nord

Tableau 2 : Aliments les moins bien tolérés par les enfants atteints de DCSI

Tableau 3 : Aliments les mieux tolérés par les enfants atteints de DCSI

Tableau 4 : Caractéristiques physicochimiques de l'AMYLO®

Tableau 5 : Préparation des standards de calibration

Tableau 6 : Préparation des standards de validation

Tableau 7 : Design des protocoles de validation selon Hubert et al.

Tableau 8 : Absorbance des standards de calibration de glucoamylase

Tableau 9 : Absorbance des standards de validation de glucoamylase

Tableau 10 : Résultats des paramètres de validation du dosage de l'AE de la glucoamylase

Tableau 11 : BAMP de la glucoamylase liquide

Tableau 12 : Taux de consommateurs (% et IC à 95 %) de CA au cours des 12 derniers mois, selon l'âge, dans les études INCA2 (2006-2007) et INCA3 (2014-2015)

Tableau 13 : Rôles, effets notoires et doses seuils des excipients de l'AMYLO®

Tableau 14 : BAPF de la PM de glucoamylase

Tableau 15 : BAES de la PM de glucoamylase

Tableau 16 : Tables de cotation AMDEC pour la fréquence, la sévérité et la détectabilité des risques

Tableau 17 : Niveau de risque global en fonction de la criticité moyenne

Tableau 18 : Analyse de risques de la PM de glucoamylase

Tableau 19 : Résultats de l'analyse de risque de la PM de glucoamylase

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Digestion des glucides complexes par le microbiote intestinal

Figure 2 : Algorithme décrivant la séquence des évaluations diététiques et des interventions nutritionnelles impliquées dans la prise en charge diététique des jeunes patients atteints de DCSI

Figure 3 : Digestion enzymatique du saccharose

Figure 4 : Certification FSSC 22000 de l'entreprise KERRY®

Figure 5 : Flowchart du processus de production enzymatique de KERRY®

Figure 6 : Liste des composants (m/V) de l'AMYLO®

Figure 7 : Dénombrement microbien de l'AMYLO®

Figure 8 : Modélisation de l'interaction Enzyme - Substrat par ajustement induit

Figure 9 : Mécanisme d'action du dosage de l'AE de la glucoamylase avec le réactif R-AMGR3 (MEGAZYME®)

Figure 10 : Principe de la spectrophotométrie UV – Visible

Figure 11 : Profil d'exactitude de la méthode de dosage de l'AE de la glucoamylase

Figure 12 : Alternative au Bi-Myconase® proposée par la pharmacie d'Akker (Apotheek de Akker)

Figure 13 : Étiquette bleu « EN CONTRÔLE » pour la mise en quarantaine du lot fabriqué

Figure 14 : Étiquette verte « ACCEPTE » pour la sortie de quarantaine du lot fabriqué

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AE : Activité(s) Enzymatique(s)

AMDEC : Analyse des Modes de Défaillance, de leurs Effets, et de leur Criticité

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

ANSES : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

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

AFDCSI : Association Française du Déficit Congénital en Saccharase-Isomaltase

ARS : Agence Régionale de Santé

ATU : Autorisation Temporaire d'Utilisation

BAES : Bulletin d'Analyse Etude de Stabilité

BAMP : Bulletin d'Analyse Matière Première

BAPF : Bulletin d'Analyse Produit Fini

BPF : Bonnes Pratiques de Fabrication

BPP : Bonnes Pratiques de Préparation

CA : Complément(s) Alimentaire(s)

CRS : Substance chimique de référence

CSP : Code de la Santé Publique

DCSI : Déficit Congénital en Saccharase-Isomaltase

DJA : Dose Journalière Acceptable

DLU : Date Limite d'Utilisation

DSP : Downstream Purification

EFSA : Autorité Européenne de Sécurité des Aliments

FDA : Food and Drug Administration

FSSC : Food Safety System Certification

HACCP : Hazard Analysis Critical Control Point

HCL : Hospices Civils de Lyon

HR : Humidité Relative

ICH : International Council of Harmonization

INCA : Etude Individuelle Nationale des Consommations Alimentaires

LCQ : Laboratoire de Contrôle Qualité

MICI : Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin
MC : Maladie de Crohn
MP : Matière(s) Première(s)
MPUP : Matière(s) Première(s) à Usage Pharmaceutique
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
PE : Pharmacopée Européenne
PM : Préparation(s) Magistrale(s)
PH : Préparation(s) Hospitalière(s)
PO : Préparation(s) Officinale(s)
PUI : Pharmacie(s) à Usage Intérieur
QP : Qualification Pharmaceutique
RCH : Rectocolite Hémorragique
RGO : Reflux Gastro-Œsophagiens
SFSTP : Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques
SI : Saccharase-Isomaltase
SII : Syndrome de l'Intestin Irritable
UI : Unité Internationale
ZPNS : Zone de Production Non Stérile
ZPS : Zone de Production Stérile

INTRODUCTION

Les maladies digestives concernent près d'un français sur cinq soit treize millions d'individus et connaissent actuellement une progression inexpliquée, notamment chez les enfants [79]. Parmi l'ensemble des pathologies de la digestion, il existe des maladies rares souvent méconnues du monde médical. Leur diagnostic est difficile et leur prise en charge constitue un défi majeur de santé publique pour les professionnels de santé. En effet, les maladies orphelines sont régulièrement victimes de l'absence de thérapies existantes. Pour pallier cette impasse, les Pharmacies à Usage Intérieur (PUI) peuvent être amenées à réaliser des préparations pharmaceutiques. Pour garantir la qualité des médicaments et la sécurité des patients, ces activités de préparation sont réalisées conformément aux bonnes pratiques et encadrées par des normes réglementaires. Avant la réalisation de toute nouvelle préparation, une étude de faisabilité incluant une évaluation des risques relatifs à cette préparation doit être effectuée.

Le déficit congénital en saccharase-isomaltase (DCSI) est une maladie digestive rare qui s'inscrit dans cette problématique. D'origine génétique, il se déclare classiquement chez l'enfant lors de la diversification alimentaire. Selon le degré de sévérité du déficit, il peut être nécessaire de traiter les patients avec une enzymothérapie substitutive. FRIPHARM®, la plateforme pharmaceutique de l'hôpital Édouard Herriot du groupement hospitalier centre des Hospices Civils de Lyon (HCL), propose déjà une solution buvable d'invertase pour améliorer la digestion du saccharose. Pour traiter le DCSI dans sa globalité, une demande a été émise par le biais d'une association de patients concernant la possibilité de mettre au point un médicament permettant de faciliter la digestion de l'amidon.

Notre travail s'intéresse à la mise au point d'une préparation pharmaceutique de glucoamylase au sein de FRIPHARM® pour faciliter la digestion de l'amidon dans la prise en charge thérapeutique du DCSI.

Dans une première partie, nous décriront les maladies digestives chroniques les plus fréquentes avant de focaliser notre propos sur le DCSI. Dans une seconde partie, nous détaillerons la Qualification Pharmaceutique (QP) de la Matière Première (MP) nécessaire à la réalisation de ce projet avant d'exposer les différentes étapes de l'étude de faisabilité de la préparation pharmaceutique de glucoamylase.

CHAPITRE 1 : GÉNÉRALITÉS

I. LES MALADIES DIGESTIVES CHRONIQUES

1. Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

Les Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI) regroupent la Maladie de Crohn (MC) et la Rectocolite Hémorragique (RCH). Ces pathologies sont caractérisées par une inflammation de la paroi du tractus gastro-intestinal accompagnées de manifestations inflammatoires extra-digestives. L'origine des MICI n'est pas encore clairement définie. Elle reposerait notamment sur l'interaction entre une prédisposition génétique, des facteurs environnementaux et le microbiote intestinal, entraînant une perturbation de l'immunité innée et de l'immunité adaptative [1].

Ces maladies évoluent par poussées inflammatoires dont la durée et la fréquence sont très difficiles à prédire du fait d'une grande variabilité interindividuelle. Dans la MC, tous les segments du tube digestif sont susceptibles d'être touchés par l'inflammation. Les crises sont généralement caractérisées par l'apparition de symptômes digestifs comprenant des diarrhées chroniques, des crampes d'estomac, des nausées et des vomissements [2]. La RCH touche principalement le rectum, mais peut également s'étendre de façon continue et rétrograde à la totalité du côlon, sans jamais atteindre ni l'intestin grêle ni l'anus. Les crises sont caractérisées par des symptômes digestifs comprenant des diarrhées glairo-sanglantes et des crampes d'estomac en association avec une altération de l'état général. Une complication majeure de la RCH est la colite aiguë grave, une poussée sévère qui se caractérise par un nombre d'émission de selles glairo-sanglantes supérieur à six par jour avec pronostic vital engagé [3]. Dans les deux maladies, des syndromes extra-intestinaux et des troubles immunitaires sont associés aux manifestations digestives. Les plus fréquents sont des rhumatismes articulaires, des atteintes oculaires et cutanées et des atteintes des voies biliaires [1].

En France, les MICI touchent chacune environ une personne sur 1 000 et sont généralement diagnostiquées entre 25 et 40 ans. Cependant, depuis 1988 nous observons une forte augmentation de l'incidence des formes à début pédiatrique dans notre pays (+ 126 % pour la MC et + 156 % la RCH) [4]. Le diagnostic ne repose pas sur un test spécifique, mais sur la

combinaison de données cliniques, biologiques, endoscopiques et histologiques. Il est généralement évoqué en cas de douleurs abdominales associées à des diarrhées chroniques et confirmé par endoscopie digestive avec mise en évidence de lésions macroscopiques caractéristiques.

La prise en charge thérapeutique des MICI n'est pas curative mais elle permet un contrôle durable de ces maladies. Dans la RCH, les 5-aminosalicylés sont le plus souvent utilisés en traitement d'attaque et en traitement de fond à des posologies différentes [5]. Les corticoïdes sont privilégiés pour traiter les poussées inflammatoires de la MC. Leur prise au long cours n'étant pas recommandée, une prise en charge à base d'immunosuppresseurs sera instaurée pour maintenir les périodes de rémission [6].

2. Maladie cœliaque

La maladie cœliaque, aussi appelée intolérance au gluten, est une entéropathie auto-immune qui provoque la destruction progressive des villosités de l'intestin grêle. Elle est caractérisée par une réaction immunitaire exagérée en réponse à l'ingestion de gluten, une protéine présente dans les farines de blé, d'orge et de seigle. Bien que son origine ne soit pas encore clairement définie, elle serait due à une association de facteurs génétiques et environnementaux. Les symptômes majoritairement observés sont des diarrhées chroniques et des douleurs intestinales accompagnées de nausées et de vomissements. De plus, la destruction des villosités intestinales est responsable d'une altération de la digestion entraînant la malabsorption des nutriments, des minéraux et des vitamines avec des complications potentiellement graves à long terme. On peut notamment observer une perte de poids, un retard de croissance, une anémie isolée par carence martiale ou en vitamine B12 ou encore une déminéralisation osseuse [7].

En France, la maladie cœliaque touche 0,5 à 2 % de la population générale et est généralement diagnostiquée entre 20 et 40 ans. Cependant, le diagnostic est difficile car le tableau clinique est très hétérogène allant de la forme asymptomatique à la malnutrition sévère [8]. Il repose sur la détection d'anticorps antitransglutaminase et d'anticorps anti-endomysium, et sur la mise en évidence d'une atrophie villositaire sur des biopsies de l'intestin grêle [9].

Le régime sans gluten permet une amélioration des symptômes cliniques deux à six mois après l'instauration de celui-ci avec disparition des anticorps anti-endomysium et antitransglutaminase. Une repousse villositaire avec normalisation des anomalies intestinales est visible après 12 à 24 mois de régime sans gluten [8].

3. Syndrome de l'intestin irritable

Le Syndrome de l'Intestin Irritable (SII) est un trouble chronique de la digestion qui associe des douleurs abdominales et des troubles du transit intestinal. Souvent considéré comme bénin par les médecins, il serait causé par des altérations organiques comme des troubles de la motilité, une hypersensibilité viscérale ou encore une perturbation du microbiote intestinal [10].

Le SII touche 5 à 10 % de la population française et débute généralement à l'adolescence. Il prédomine ensuite entre 20 et 40 ans avant de faiblir vers l'âge de 50 ans [11]. Les atteintes du transit intestinal sont très hétérogènes. En effet, 25 % des patients présentent une forme avec constipation prédominante, 35 % sont atteints d'une forme avec diarrhée prédominante et 40 % ont une forme mixte avec alternance de diarrhée et de constipation. De plus, la sévérité de la maladie est variable selon les patients [12].

Le diagnostic est uniquement clinique et ne peut être posé qu'en l'absence de signes d'alarme (rectorragies, méléna, anémie, perte de poids inexplicée, etc.) et d'un examen clinique normal [13]. Si des examens complémentaires sont réalisés, ils ont pour objectif d'éliminer les suspicions d'autres maladies qui pourraient donner les mêmes symptômes [12].

Les traitements médicamenteux de première intention comprennent les antispasmodiques, les laxatifs et les anti-diarrhéiques selon le type de trouble du transit. Un ensemble de mesures hygiéno-diététiques permettent également de limiter l'apparition des symptômes. En effet il apparait que 2/3 des patients constatent un lien entre leur alimentation et leurs symptômes. Cependant, ces mesures doivent être préférablement encadrées par un nutritionniste afin d'éviter les régimes d'exclusion exagérés et les carences [13].

II. LE DÉFICIT CONGÉNITAL EN SACCHARASE-ISOMALTASE

1. Étiologie

Décrit pour la première fois en 1960, le DCSI est une maladie génétique autosomique récessive du complexe Saccharase-Isomaltase (SI) situé au niveau de la membrane intestinale [14]. Une forme acquise de la maladie est également possible en association avec diverses pathologies digestives [15], [16]. Il s'agit de l'anomalie de la digestion des sucres la plus fréquente, affectant la capacité de l'organisme à dégrader le saccharose, le maltose, les dextrines et l'amidon en monosaccharides [17].

Au niveau génétique, plus de 40 mutations à l'origine d'une altération de la structure, de la fonction et/ou d'une perturbation de la production de la SI ont été identifiées. Il s'agit de mutations du gène 3q26.1 (gène 26.1 situé sur le bras long du chromosome 3) codant pour le complexe de la SI [18]. La diminution voire l'absence totale d'activité engendrée par ces mutations est responsable d'une grande variété de phénotypes qui se manifestent classiquement, après ingestion de saccharose ou d'amidon, par des crampes d'estomac, des ballonnements, des diarrhées et des vomissements [19].

2. Épidémiologie

Le DCSI est une maladie rare dont la prévalence est estimée à moins de 0,02 % en Europe [14], mais elle est plus élevée chez les populations autochtones du Groenland, de l'Alaska et du Canada (Tableau 1).

Tableau 1 : Hétérogénéité de la prévalence du DCSI dans diverses populations autochtones d'Amérique du Nord [19]

Lieu d'habitation	Prévalence du DCSI
Groenland	2 – 10 %
Alaska	3 %
Canada	3,6 – 7,1 %
Europe	< 0,1 %
États-Unis	≤ 0,2 %

Notons que 28,5 % de la population Inuite au Canada est porteuse d'un gène muté du complexe de la SI. Pour les Inuits, cette affection est un exemple de l'interaction gène –

environnement. Il est fort probable que la mutation du gène du SI se soit produite à l'origine chez leurs lointains ancêtres mais soit restée asymptomatique jusque dans les années 1960, époque où les aliments transformés et sucrés ont fait leur apparition dans leur diète traditionnellement faible en glucides [20].

Notons également que la proportion de patients présentant des symptômes de déficit en SI est bien plus large puisqu'elle regroupe :

- Les personnes porteuses d'une mutation homozygote du gène codant pour le complexe de la SI, on parle de DCSI ;
- Les personnes porteuses de certains variants génétiques à l'état hétérozygote, on parle alors plus globalement de déficit génétique en SI ;
- Les personnes atteintes de déficits en SI acquis ou secondaires à une autre pathologie.

3. Symptomatologie

Les premiers symptômes de la maladie se déclarent vers l'âge de 4 à 6 mois, au moment de la diversification alimentaire du nourrisson, avec l'introduction d'une alimentation contenant du saccharose et de l'amidon. Les symptômes de DCSI sont décrits principalement chez les enfants mais quelques cas ont également été observés chez l'adulte [15], [16]. Le déficit en SI empêchant l'hydrolyse du saccharose et des chaînes oligosaccharidiques de l'amidon, cela conduit à leur accumulation dans la lumière intestinale [21]. Les conséquences directes sont :

- Une augmentation du péristaltisme par un effet d'appel osmotique. La différence de pression osmotique est en faveur d'un afflux d'eau et d'électrolytes, dont le sodium, depuis le milieu extracellulaire vers la lumière intestinale selon le gradient de concentration. Un accroissement du volume intraluminal est rapidement observé.
- L'acidification des selles liée à la fermentation des polysaccharides par la flore colique. Pendant le processus biochimique de digestion anaérobie, les polysaccharides non digérés sont hydrolysés en chaînes plus courtes, puis en sucres simples, pour être fermentés en métabolites comme l'acide formique, l'acide succinique, l'acide lactique. Les produits finaux de cette chaîne trophique sont les acides volatils comme l'acide butyrique, l'acide acétique et l'acide propionique [22]. De l'hydrogène (H₂) et du gaz carbonique (CO₂) sont également libérés par ces voies de dégradation [21].

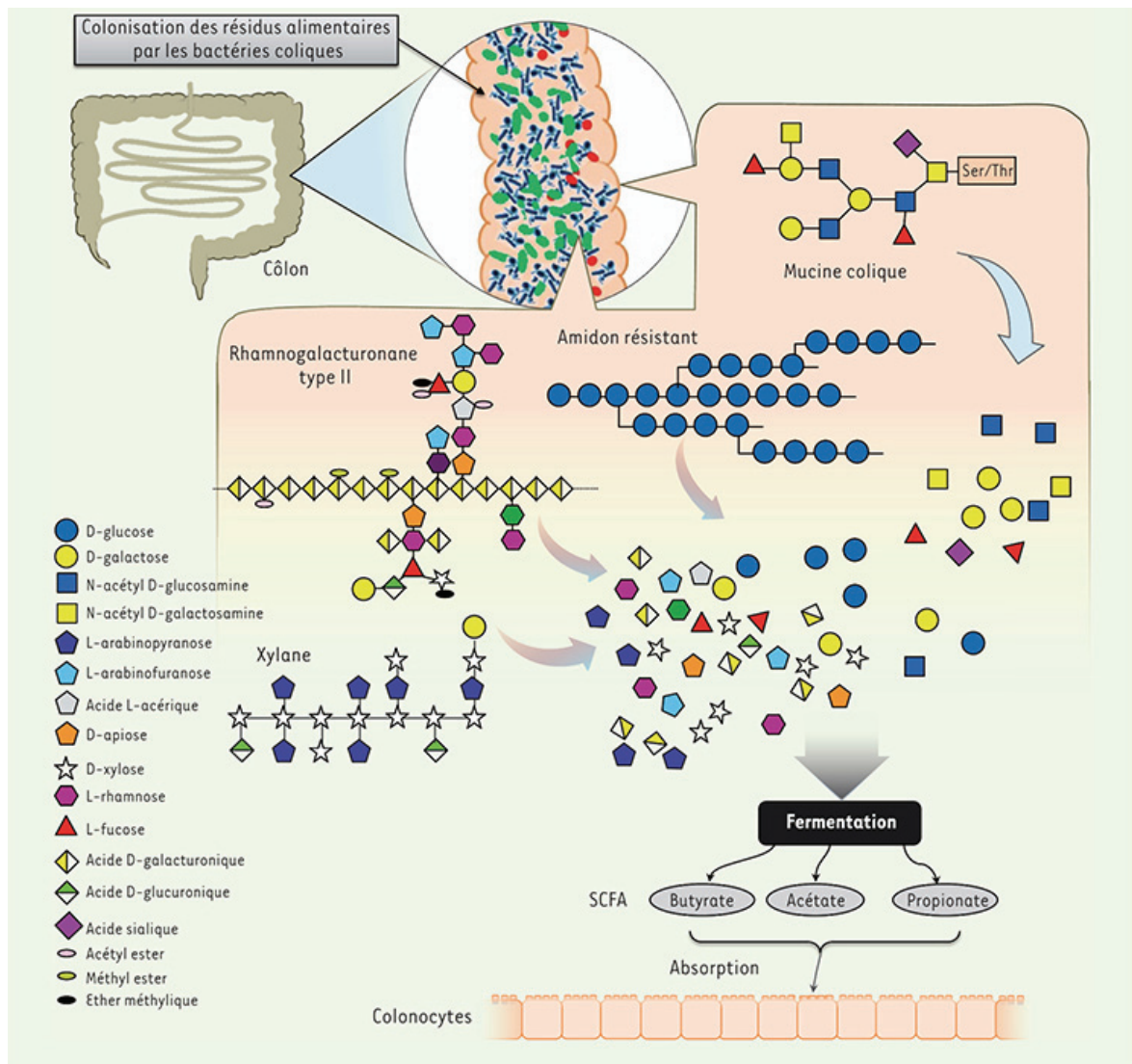


Figure 1 : Digestion des glucides complexes par le microbiote intestinal [22]

La sévérité des symptômes est généralement proportionnelle aux quantités de saccharose et d'amidon ingérées. Cliniquement, le DCSI se manifeste d'abord de manière digestive, par des diarrhées aqueuses souvent explosives et très abondantes, accompagnées de ballonnements (un gonflement très important du ventre peut être observé), de douleurs abdominales (pouvant altérer l'humeur des jeunes enfants), de flatulences, de reflux gastro-œsophagiens (RGO), de nausées et de vomissements. Un érythème fessier est parfois observé, ainsi qu'une soif très intense [23]. Les familles des patients ont relevé des différences notables entre les symptômes survenant après ingestion de saccharose et les symptômes survenant après ingestion d'amidon :

- Effets de l'absorption de saccharose : Selon les quantités de saccharose absorbées, les symptômes commencent à se manifester dans les 30 à 90 minutes qui suivent

l'ingestion. L'apogée des symptômes se situe usuellement 5 heures après le repas et perdurent généralement entre 1 et 3 jours ;

- Effets de l'absorption d'amidon : L'amidon provoque des symptômes digestifs à retardement. Dans un premier temps, des ballonnements, des maux de ventre et des RGO sont observés 5 heures après l'ingestion. Classiquement les diarrhées ne surviennent que 24 heures après l'ingestion et peuvent perdurer jusqu'à 4 jours suivant l'accumulation des quantités.

Avec le temps et lorsque le régime alimentaire n'est pas adapté, les symptômes peuvent empirer du fait de l'accumulation des polysaccharides dans l'intestin. Les déficits sévères peuvent même conduire à une fatigue importante, une déshydratation aiguë et une malnutrition avec hypoglycémies fréquentes pouvant engendrer un retard staturo-pondéral. Notons cependant que les symptômes et leur tolérance sont très variables d'un individu à l'autre et dépendent de plusieurs facteurs comme la sévérité du déficit enzymatique en SI, la nature de la flore intestinale et la longueur du tube digestif. Considérant cette variabilité interindividuelle, il est difficile de définir des seuils limites universels en saccharose et en amidon. Chez les enfants, le tube digestif est plus court que chez l'adulte. Par conséquent la capacité d'absorption de l'intestin grêle est plus faible et la flore colique est moins développée ce qui donne lieu à des symptômes digestifs plus bruyants.

4. Diagnostic

Le diagnostic du DCSI est souvent posé tardivement du fait de la méconnaissance de cette maladie, de sa faible prévalence en Europe et de la faible spécificité des symptômes. Il reposait initialement sur des réponses cliniques aux régimes pauvres en saccharose et en l'amidon. Les manifestations cliniques sont généralement attribuées, en premier lieu, à d'autres maladies digestives chroniques comme la MC, la RCH, le SII, la maladie cœliaque ou d'autres intolérances alimentaires [14].

Le diagnostic devrait être évoqué devant l'apparition des symptômes décrits précédemment lors de la diversification alimentaire et l'introduction du saccharose ou de l'amidon dans l'alimentation du nourrisson. Plusieurs méthodes, détaillées ci-dessous, existent pour diagnostiquer un DCSI.

4.1. Biopsie intestinale

Seule la biopsie intestinale avec étude enzymatique apporte la preuve formelle du déficit en SI. Elle constitue le gold standard et permet d'apprécier l'aspect morphologique de l'intestin et d'effectuer le dosage des Activités Enzymatiques (AE) des disaccharidases présentes à la surface de la bordure en brosse (saccharase, isomaltase, glucoamylase, maltase et lactase). L'étude des AE se fait au niveau de l'intestin grêle proximal (duodénum ou jéjunum proximal) [24]. En général, les critères d'orientation du diagnostic de DCSI comprennent une morphologie normale de l'intestin grêle en présence :

- D'une activité absente ou nettement réduite de la saccharase ;
- D'une activité très hétérogène de l'isomaltase ;
- D'une activité maltase réduite à normale ;
- D'une activité lactase normale (ou très peu réduite).

Bien que la morphologie intestinale soit intacte dans la majorité des cas, il est intéressant de noter l'atrophie partielle de l'intestin proximal rapportée chez quelques patients et associée à des troubles de l'absorption des graisses et des monosaccharides. Cette atrophie est attribuée à la malnutrition [21].

Il s'agit cependant d'une technique invasive et contraignante. Les biopsies doivent être transportées rapidement dans un bain de glace si le laboratoire est proche, ou congelées à -20°C ou -80°C pour la conservation. La muqueuse doit également être intacte car les AE sont diminuées en cas de lésions. De plus, une confusion persiste concernant le seuil d'activité normale de la saccharase [21].

Des méthodes d'orientation vers un DCSI, citées ci-dessous, sont non invasives et moins contraignantes.

4.2. Test de charge en saccharose

Le test de charge en saccharose, ou suivi de la cinétique de la réponse glycémique, consiste à administrer à jeun et *per os* une dose de 2 g de saccharose par kg de poids corporel, et à mesurer ensuite toutes les demi-heures la glycémie. En l'absence de déficit en saccharase, la courbe de suivi des glycémies montre un pic glycémique 2 heures après l'ingestion du saccharose avec une glycémie supérieure à 1,4 mg/mL. En cas de déficit de la saccharase,

aucun pic n'est observé et la variation de la glycémie reste inférieure à 0,2 mg/mL. A l'inverse, l'ingestion de glucose et de fructose donne un pic glycémique normal [21], [25].

Ce test, bien que simple et peu coûteux, reste contraignant puisque l'ingestion massive de saccharose provoque, chez les patients malades, les symptômes sévères précédemment décrits.

4.3. Breath test

Le principe du Breath test, également appelé test de l'hydrogène expiré, est de mesurer l'hydrogène produit par la flore colique lors de la fermentation des sucres non absorbés après ingestion de 2 g de saccharose par kg de poids corporel. Le taux d'hydrogène expiré est mesuré toutes les demi-heures pendant 3 heures. En l'absence de déficit enzymatique, le saccharose est digéré puis absorbé. Il n'y a donc pas de phénomène de fermentation. En cas de DCSI, le saccharose ingéré va subir le phénomène de fermentation par la flore colique, entraînant une libération importante d'hydrogène dans le sang. L'hydrogène est ensuite éliminé de l'organisme par expiration. La quantité d'hydrogène expirée est proportionnelle à la quantité d'hydrogène produite [21], [26].

Tout comme pour le test de charge en saccharose, le Breath test peut créer des symptômes chez le patient malade.

4.4. Examen des selles

L'examen des selles permet de mettre en évidence une intense fermentation des polysaccharides par la flore colique au moyen de la mesure du pH, de la détection d'acides fécaux et de la détermination de la flore fécale.

En cas d'intense fermentation des polysaccharides non digérés par les enzymes digestives de l'intestin, le pH est anormalement bas en dessous de 5 (normale entre 6,5 et 7,5) du fait de la production d'acides volatils (acétique, butyrique et propionique) et d'acides lactique lors de la fermentation des sucres par la flore colique [27].

La production d'acides volatils (acétique, butyrique et propionique) et d'acide lactique peut être mesurée. Chez un nourrisson sans DCSI, l'excrétion journalière des acides volatils n'excède normalement pas 10 à 13 mmol/j, et l'acide lactique est normalement présent

sous forme de traces. Chez un patient atteint de DCSI, l'excrétion journalière d'acide acétique peut être supérieure à 30-40 mmol/j, et l'acide lactique peut être augmenté à 30-50 mmol/j [21].

La flore fécale des patients présentant un DCSI est constituée quasiment exclusivement de bacilles Gram positif : *Lactobacillus acidophilus* et de *Bifidobacterium bifidum* [25].

4.5. Autres examens

Plus récemment, des tests respiratoires aux isotopes marqués ont été développés. Ils permettent de mettre en évidence les déficits enzymatiques de manière plus sélective en fonction du substrat utilisé. Le saccharose marqué au carbone 13 permet de caractériser la diminution de l'AE de la saccharase [28]. L'amidon marqué au carbone 13 permet de caractériser la diminution de l'AE de l'isomaltase, de la maltase et de la glucoamylase [29].

La recherche des mutations génétiques est également possible par génotypage, mais elle n'est pas faite en routine car elle est seulement informative. En effet, actuellement les mutations ne permettent pas de prédire l'importance du déficit [30], [24].

5. Prise en charge

5.1. Régime alimentaire

La prise en charge du DCSI consiste premièrement à instaurer un régime strict, très pauvre en saccharose, en polymère de glucose, en dextrines et en amidon. Une évaluation nutritionnelle permettra de déterminer l'étendue de la malnutrition et du retard de croissance et d'évaluer le degré d'atteinte du complexe de la SI. L'éducation diététique des familles ou de l'enfant, en fonction de son âge, est essentielle pour atteindre un état nutritionnel optimal et minimiser les symptômes du DCSI. Elle doit se faire en collaboration avec un médecin et un nutritionniste [31].

L'évaluation nutritionnelle comprend une évaluation de la croissance, une évaluation de la malnutrition et des besoins caloriques ainsi qu'une évaluation du niveau de tolérance de l'enfant au saccharose et à l'amidon :

- L'évaluation de la croissance comprend des mesures du poids, de la taille et de la circonférence occipitale jusqu'à l'âge de 2 ans. Les résultats sont rapportés sur les courbes de croissance de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS).
- L'évaluation de la malnutrition peut être réalisée de différente manière. La classification de Waterlow est, par exemple, couramment utilisée pour déceler et caractériser une éventuelle malnutrition aiguë ou chronique selon 3 degrés de malnutrition allant de normal à sévère. Les besoins caloriques et protéiques de l'enfant sont également calculés en suivant les recommandations de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES).
- Lorsque l'état nutritionnel de l'enfant est stable, les niveaux de tolérance au saccharose et à l'amidon peuvent être déterminés par l'introduction de quantités croissantes d'aliments contenant l'un et/ou l'autre dans son alimentation. Un relevé écrit sur 3 jours, détaillant précisément l'apport alimentaire et les symptômes associés, apporte également une aide précieuse pour l'élaboration d'un programme nutritionnel adapté aux besoins de l'enfant.

Le nutritionniste peut assister les familles dans l'établissement d'un régime adéquat, en tenant compte des antécédents alimentaires de l'enfant (types et quantités d'aliments, aliments et boissons problématiques), des éventuelles allergies alimentaires et des aversions. Il peut également s'appuyer sur un algorithme décrivant la séquence des évaluations diététiques et des interventions nutritionnelles impliquées dans la prise en charge diététique des jeunes patients atteints de DCSI (Figure 2).

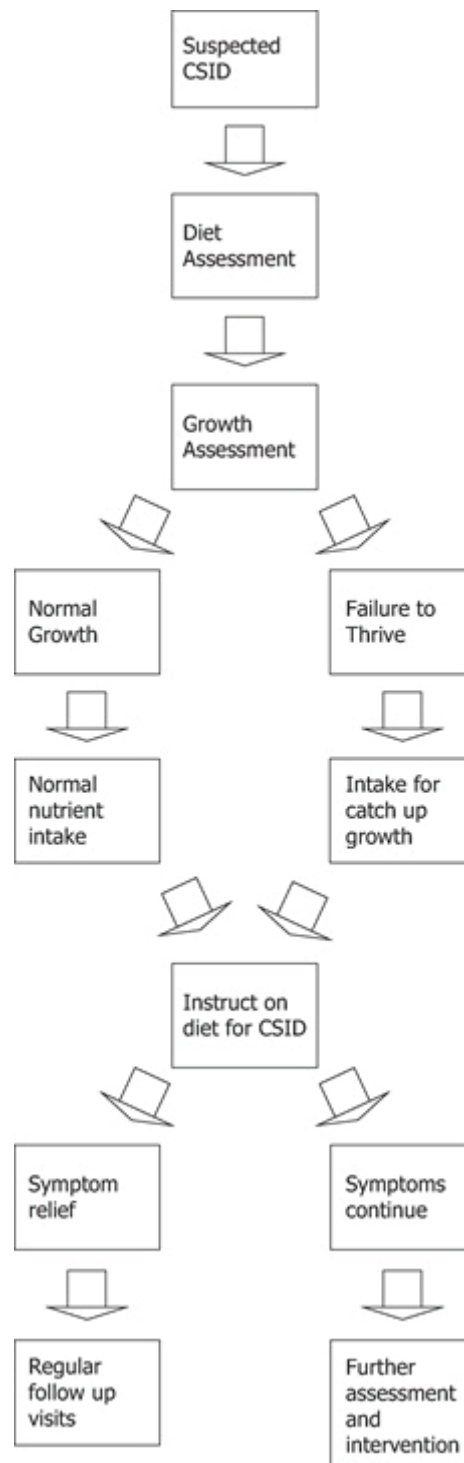


Figure 2 : Algorithme décrivant la séquence des évaluations diététiques et des interventions nutritionnelles impliquées dans la prise en charge diététique des jeunes patients atteints de DCSI [31]

Le degré de restriction est spécifique à chaque patient, en fonction du phénotype et de la tolérance. Les régimes peuvent donc varier considérablement d'un individu à l'autre. C'est pourquoi l'éducation diététique doit être individualisée. L'Association Française du Déficit

Congénital en Saccharase-Isomaltase (AFDCSI) a dressé la liste des aliments les mieux tolérés et des aliments à éviter afin de faciliter la mise en place d'un régime nutritionnel adapté, tout en limitant la survenue des symptômes du DCSI (Tableaux 2 et 3). Cette liste détaille les quantités de saccharose et d'amidon présents dans chaque aliment et fournit des informations utiles aux médecins, aux diététiciens et aux familles.

Tableau 2 : Aliments les moins bien tolérés par les enfants atteints de DCSI [32]

LEGUMES	Taux de saccharose pour 100 g	Taux d'amidon pour 100 g
Haricot bouilli	0,3	15,2
Carotte bouillie	1,14	
Oignon	1,9	
Salsifi	2	
Céleri branche	2,1	
Petits pois	3,1	
Carotte cru	3,6	1,4
Topinambour	4	
Soja	5,2	
Betterave	7,9	
FRUITS	Taux de saccharose pour 100 g	Taux d'amidon pour 100 g
Melon	1,2	
Poire	1,8	
Noix	2,4	0,1
Pomme	2,55	
Châtaigne	2,8	52,4
Goyave	3	0,2
Pamplemousse	3,5	
Amande	4	0,72
Orange	4,3	
Nectarine	4,9	
Ananas	5,6	
Pêche	5,7	
Abricot	5,9	
Melon	9,5	
Banane	10,3	
Pruneau	15,8	
FECULENTS	Taux de saccharose pour 100 g	Taux d'amidon pour 100 g
Boulgour		14
Pois chiche		15,2
Pomme de terre		15,9
Quinoa cuit		17,6
Riz sauvage cuit	0,3	18,8
Épeautre cuit		19,6
Couscous cuit		21,7
Riz blanc cuit		27,7
Pâtes		28,5
Fécule de maïs		90,4
Lentilles	0,5	9,7
Farines (toutes)		74 à 84

Tableau 3 : Aliments les mieux tolérés par les enfants atteints de DCSI [32]

LEGUMES	Taux de saccharose pour 100 g	Taux d'amidon pour 100 g
Concombre	0,05	
Tomate	0,08	
Courgette	0,1	
Courge	0,1	
Champignon	0,11	
Radis	0,14	
Épinard	0,19	
Choux fleur	0,2	0,5
Mâche	0,23	
Brocolis	0,48	
Poireau	0,49	
Navet	0,5	
Endive	0,6	0,3
Artichaut	0,7	
Potiron	1,07	
Asperge	1,31	
Avocat		0,1
Aubergine	0,8	
Olive		
FRUITS	Taux de saccharose pour 100 g	Taux d'amidon pour 100 g
Framboise	1	
Fraise	1	
Griotte	0,4	
Coing	0,64	
Myrtille	0,24	
Mûre		
Prune	0,6	
Citron	0,2	
Noix de coco	4,2	
Cerise	0,5	
Papaye		1,3
Cassis	0,7	
Raisin	0,4	
Grenade	1	
Litchi		
Kiwi	0,2	
Groseille	0,7	
Rhubarbe	0,33	
AUTRES		
Glucose		
Fructose		
Infusion sans sucre		
Poivre		
Sel		
Herbes aromatiques		
Viandes (toutes)		
Poissons (tous)		
Sirop d'agave		

Cependant, malgré le suivi d'un régime très restrictif, des études ont démontré que seuls 10 % des enfants deviennent asymptomatiques tandis que 60 à 75 % souffrent toujours de diarrhée, de gaz et/ou de douleurs abdominales. Le régime alimentaire doit donc être complété par des thérapies de substitution enzymatique [24].

5.2. Enzymothérapie substitutive

Afin de limiter les symptômes associés au DCSI et d'améliorer considérablement les possibilités de diversification de l'alimentation des patients, des thérapeutiques enzymatiques substitutives ont été développées. L'hydrolyse du saccharose libère une molécule de fructose et une molécule de glucose (Figure 3), communément appelé sucre inversi. Cette réaction est extrêmement lente en solution aqueuse, mais peut être catalysée par des enzymes de type glycoside hydrolases. Il s'agit d' α -glucosidases ou de β -fructosidases ayant plusieurs dénominations synonymes : invertase, sucrase, saccharase, sacrosidase, ou encore saccharose α -glucosidase.

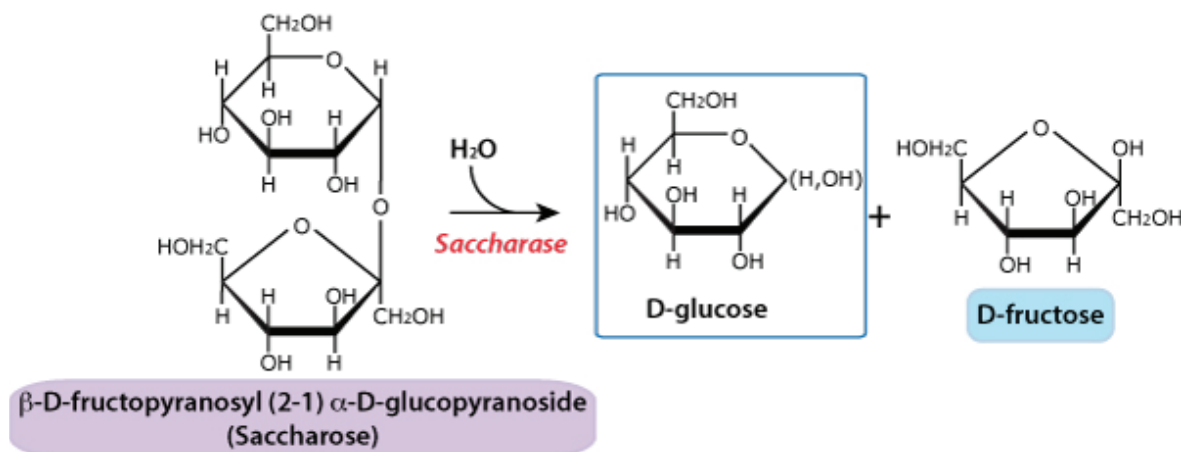


Figure 3 : Digestion enzymatique du saccharose [80]

Dans l'organisme, l'hydrolyse enzymatique du saccharose est permise, de manière quasi exclusive, par la saccharase du complexe SI. Or tous les phénotypes du DCSI sont caractérisés par un déficit total de cette enzyme digestive. Plusieurs traitements à base d'enzymes capables d'hydrolyser le saccharose ont été développés. Dès 1987, les premières études visant à chercher un traitement pour le DCSI ont montré que l'administration de levures de boulanger (*Saccharomyces cerevisiae*), juste avant la réalisation d'un breath test, diminuait considérablement l'hydrogène expiré. De plus, aucun symptôme clinique n'a été observé, malgré la dose de charge. Cela s'explique par le

fait que *Saccharomyces cerevisiae* contient une β -fructosidase capable d'hydrolyser sélectivement le saccharose. Dès lors, une forme lyophilisée de *Saccharomyces cerevisiae* fut proposée en traitement du DCSI mais l'acceptabilité par les enfants était relativement faible en raison de son goût [30], [33]. La β -fructosidase isolée de *Saccharomyces cerevisiae* était déjà utilisée depuis longtemps dans l'industrie alimentaire sous le nom d'invertase. Son application majeure étant la production de sucre inverti en confiserie. Elle fut ensuite proposée sous forme de traitement du DCSI par plusieurs firmes pharmaceutiques.

Sucraid® est actuellement le seul médicament indiqué dans le traitement du DCSI disponible sur le marché. Il s'agit d'une enzymothérapie substitutive approuvée par la Food and Drug Administration (FDA) en 1998. Initialement fabriqué par ORPHAN MEDICAL® puis par QOL MEDICAL® à partir de 2003, il possède une Autorisation Temporaire d'Utilisation (ATU) nominative en France depuis plus de 10 ans. Il s'agit d'une solution buvable de sacrosidase (issue de *Saccharomyces cerevisiae*) dosée à 8500 UI/mL dans un mélange équivolumique de glycérol et d'eau. Conditionné en flacon de 118 mL, il doit être conservé à l'abri de la lumière, entre +2 et +8°C, au maximum 28 jours après ouverture. La posologie recommandée est la suivante :

- Enfant de moins de 15 kg : 1 ml (soit l'équivalent de 8 500 UI de sacrosidase) par repas ou collation ;
- Enfant de plus de 15 kg : 2 ml (soit l'équivalent de 17 000 UI de sacrosidase) par repas ou collation.

Chaque dose de Sucraid® doit être diluée dans un peu d'eau, de lait ou de préparation pour nourrissons. Pour ne pas diminuer son activité ou désactiver l'enzyme, le médicament ne doit ni être chauffé, ni être administré avec une boisson chaude ou un jus de fruit [34].

Cependant, bien que son efficacité sur la digestion du saccharose ait permis d'améliorer nettement la qualité de vie des patients [35], l'enzymothérapie substitutive à la sacrosidase ne corrige pas la mauvaise digestion de l'amidon [36]. En effet, souvent les symptômes persistent chez les patients traités à la sacrosidase et leur régime doit rester pauvre en amidon.

CHAPITRE 2 : MISE AU POINT D'UNE SOLUTION BUvable

DE GLUCOAMYLASE

I. CONTEXTE

1. Mise au point et évaluation d'une préparation pharmaceutique d'invertase

Depuis 2017, la PUI de l'hôpital Edouard Herriot prépare et dispense une solution buvable d'invertase en recours dans le traitement des patients atteints de DCSI. Cette préparation magistrale (PM) est une alternative au Sucraid® et n'est disponible que sur prescription nominative. La nécessité de disposer d'une alternative thérapeutique au Sucraid® s'est expliquée par :

- L'augmentation des signalements d'effets indésirables, d'intolérance et de perte d'efficacité associés au Sucraid® auprès des Centres Régionaux de Pharmacovigilance : D'après la FDA, le processus d'extraction de la sacrosidase par digestion enzymatique pour la fabrication du Sucraid® fait appel à la papaïne qui peut être à l'origine de réactions allergiques [30], [37].
- Les difficultés d'approvisionnement du Sucraid® : En 2015, les difficultés d'approvisionnement ont conduit à la pénurie de ce médicament sur le territoire français, laissant des enfants atteints de DCSI dans l'impasse thérapeutique.
- L'existence d'alternatives au Sucraid® dans d'autres pays : Depuis de nombreuses années, la PUI de l'hôpital Newcastle fabrique et dispense, avec l'autorisation de l'instance de santé anglaise, une préparation d'invertase en alternative au Sucraid® pour le Royaume-Uni. La MP enzymatique utilisée pour la fabrication de cette préparation d'invertase porte le nom de BIOINVERT® et provient du laboratoire agroalimentaire irlandais KERRY®. Son procédé d'extraction ne requiert pas l'utilisation de la papaïne [30].

C'est dans ce contexte qu'en 2016, la plateforme FRIPHARM® de l'hôpital Édouard Herriot a été sollicitée par l'AFDCSI, soutenue par le médecin lyonnais référent du DCSI, pour réaliser une préparation pharmaceutique d'invertase en alternative au Sucraid®.

FRIPHARM® est une plateforme hospitalo-universitaire de fabrication, de recherche et d'innovation pharmaceutique, qui assure [38] :

- La production et le conditionnement de médicaments hospitaliers non disponibles sur le marché, pour le traitement de maladies orphelines et les protocoles de recherche clinique ;
- La recherche et le développement de nouvelles préparations adaptées à des besoins cliniques spécifiques ;
- Le contrôle de la qualité des Matières Premières à Usage Pharmaceutique (MPUP) et des préparations pharmaceutiques ;
- La mise en œuvre d'études de stabilité prospectives selon la méthodologie ICH et des méthodes de prédiction de stabilité de médicaments.

Dans une situation d'urgence et pour faciliter les démarches nécessaires à la réalisation de ce projet, l'équipe FRIPHARM® a pris la décision de conserver le même fournisseur de MP enzymatique que la PUI de l'hôpital Newcastle. Du fait de son origine, une QP de la MP a été réalisée. En l'absence de monographie spécifique, les contrôles effectués sur la MP ont été réalisés conformément à la monographie 2034 de la Pharmacopée Européenne (PE) en vigueur relative aux substances pour usage pharmaceutique. L'ensemble des étapes inhérentes à la réalisation des projets au sein de l'unité a été suivi et un circuit de dispensation adéquat a été mis en place. La première rétrocession d'invertase à la PUI de l'hôpital Édouard Herriot a eu lieu en avril 2017 [30].

Un suivi des patients traités avec la solution buvable d'invertase a été mené afin d'étudier son efficacité et d'en assurer la pharmacovigilance. Les résultats ont été en faveur de l'amélioration générale de la qualité de vie des patients. Nous pouvons souligner l'amélioration de la tolérance et de la diversité des fruits, des légumes, et des aliments sucrés acceptés. De même, les patients traités ont présenté une amélioration de l'appétit associée à une diminution des cas de dénutrition et de retards de croissance. Compte tenu de son efficacité, le nombre de patients traités par la préparation pharmaceutique n'a cessé de croître. L'Agence Régionale de Santé (ARS) de la région Auvergne-Rhône-Alpes a donné son accord pour la sous-traitance de la PM d'invertase en juin 2017 [30]. Actuellement, la PUI de l'hôpital Édouard Herriot fabrique et dispense cette solution buvable d'invertase à 25 patients.

2. Mise au point d'une préparation pharmaceutique de glucoamylase

Comme décrit précédemment, la solution buvable d'invertase est une alternative au Sucraid® et l'enzyme en question agit spécifiquement sur le saccharose. Cependant, son action sur la digestion de l'amidon est minime voire inexistante. Malgré le traitement par invertase, les familles des patients atteints de DCSI ont relevé la persistance de symptômes invalidants et la nécessité de continuer un régime restrictif qui exclut l'amidon [36], [39].

En 2019, FRIPHARM® a de nouveau été sollicitée par l'AFDCSI et le médecin lyonnais référent du DCSI, pour réaliser une préparation pharmaceutique de glucoamylase permettant de faciliter la digestion de l'amidon chez les patients.

La glucoamylase est une enzyme de la famille des glycosides hydrolases. Elle est naturellement présente dans la muqueuse de l'intestin grêle pour faciliter la digestion de l'amidon d'origine alimentaire. En effet, la plupart des formes de l'enzyme peut rapidement hydrolyser les liaisons 1,4-alpha-D-glucosidiques et 1,6-alpha-D-glucosidiques des résidus terminaux des chaînes oligosaccharidiques de l'amidon [40]. La glucoamylase est l'un des biocatalyseurs les plus anciens et les plus utilisés dans l'industrie alimentaire, pour le traitement des farines et la catalyse des processus de fermentation destinés à la fabrication de boissons alcoolisées. Son utilisation est également autorisée dans divers aliments contenant de l'amidon comme le pain, les farines, les céréales à déjeuner, les produits céréaliers pour bébés, les jus de fruits et de légumes non concentrés et les produits de boulangerie non normalisés [41].

Avec cette préparation, nous souhaitons pouvoir proposer aux patients un kit contenant à la fois une préparation pharmaceutique d'invertase et une autre de glucoamylase. La prise des deux solutions sera faite de manière concomitante, à chaque repas, et permettra d'améliorer la digestion du saccharose et de l'amidon chez les patients tout en limitant les troubles digestifs caractéristiques de la maladie.

Qu'elles soient fabriquées à l'hôpital ou à l'officine, les préparations sont soumises à un cadre législatif strict. Selon l'article L. 5121-5 du Code de la Santé Publique (CSP), leur réalisation doit se faire en conformité avec les Bonnes Pratiques de Préparation (BPP) [42].

L'enzyme nécessaire à la fabrication de la préparation de glucoamylase doit être de qualité pharmaceutique. D'après les BPP, on entend par MPUP : « *Tous les composants d'un médicament [...]. Une substance n'est pas par nature une MPUP [...]. Les MPUP répondent aux spécifications de la pharmacopée quand elles existent et sont conformes avec la monographie de la pharmacopée « substances pour usage pharmaceutique ». [...] Pour l'exécution des préparations, seules les MP répondant aux spécifications de la pharmacopée sont utilisées, sauf en cas d'absence de MP répondant auxdites spécifications disponibles et adaptées à la réalisation de la préparation considérée* » [43].

En l'absence de glucoamylase destinée à un usage pharmaceutique disponible sur le marché, nous avons choisi de faire appel au fournisseur de la solution d'invertase. En effet, le laboratoire agroalimentaire KERRY® fabrique également une solution de glucoamylase appelé AMYLO®. Cependant, compte tenu de son origine, une QP est requise.

Une étude de faisabilité doit également être menée afin d'apprécier la conformité d'une préparation à l'état des connaissances scientifiques, médicales et techniques ainsi que la suffisance des moyens technico-économiques pour la réaliser. Selon les BPP, cette étude doit à *minima* évaluer :

- L'intérêt pharmaco-thérapeutique ;
- Le bon usage de la préparation en termes d'objectif thérapeutique, d'ajustement thérapeutique, de meilleure acceptabilité, d'observance renforcée, de diminution des risques, de traçabilité de la prise ;
- Le risque sanitaire vis-à-vis du patient ;
- La galénique et le contrôle en termes de réalisation technique (formulation, personnel, matériels, locaux).

Le pharmacien est responsable du contrôle et de la validation de la faisabilité d'un tel projet et détient le pouvoir de décision final quant à la réalisation ou non des préparations au sein de l'unité de production pharmaceutique.

II. QUALIFICATION PHARMACEUTIQUE DE LA MATIÈRE PREMIÈRE ENZYMATIQUE

Suivant les BPP, une QP de la MP enzymatique a été effectuée. En l'absence de monographie spécifique relative à la glucoamylase, les contrôles ont été réalisés conformément à la monographie 2034 de la PE en vigueur concernant les substances pour usage pharmaceutique [44]. En amont de la QP, nous avons vérifié les certifications du fournisseur ainsi que les spécifications et le processus de production industriel de la glucoamylase.

1. Contrôle des certifications du fournisseur, du processus de production industriel et des spécifications techniques de la matière première

1.1. Contrôle des certifications du fournisseur

Le groupe KERRY® est un leader mondial dans l'industrie agroalimentaire et pharmaceutique. L'entreprise est notamment certifiée FSSC 22000 pour la fabrication et la fourniture d'enzymes, d'additifs pour boissons et d'auxiliaires de fabrication de boissons pour les industries de l'alimentation humaine, des aliments pour animaux et des aliments pour animaux de compagnie (Figure 4).

La norme FSSC 22000 (Food Safety System Certification) est une certification de la sécurité des aliments. Elle s'appuie principalement sur la norme ISO 22000 relative à la sécurité des denrées alimentaires et reconnue au niveau international, et est complétée par des normes techniques, telles que l'ISO TS 22002-1 pour la fabrication de produits alimentaires et l'ISO TS 22002-2 pour la fabrication d'emballages. La certification FSSC 22000 permet ainsi de garantir la maîtrise des dangers liés à la sécurité des aliments [45].



CERTIFICATE OF REGISTRATION

This is to certify that:

Kerry Food Ingredients (Cork) Ltd

Kilnagleary, Carrigaline, Co Cork, Cork, P43 A597, IRELAND

operates a

FOOD SAFETY MANAGEMENT SYSTEM

which has been assessed and determined to comply with the requirements of

Food Safety System Certification 22000 (FSSC 22000)

Certification scheme for food safety management systems consisting of the following elements: ISO 22000:2018, ISO/TS 22002-1:2009 and additional FSSC 22000 requirements (version 5)

for the following scope

The manufacture and supply of enzymes, beverages additives and beverage processing aids for the food, feed and pet food industries.

Food chain categories: CIV Processing of ambient stable products; and, K Production of (bio) Chemicals.

Exclusions from Scope: None.

Certificate No: FSM43489

Issued: 2 December 2020

Originally Certified: 10 May 2018

Expires: 19 May 2022

Current Certification: 2 December 2020

Heather Mahon
Global Head of Technical Services
SAI Global Assurance



Registered by:

SAI Global Certification Services Pty Ltd (ACN 108 716 669) 680 George Street Sydney NSW 2000 Australia with SAI Global Pty Limited 680 George Street Sydney NSW 2000 Australia ("SAI Global") and subject to the SAI Global Terms and Conditions for Certification. While all due care and skill was exercised in carrying out this assessment, SAI Global accepts responsibility only for proven negligence. This certificate remains the property of SAI Global and must be returned to SAI Global upon its request. To verify that this certificate is current please refer to FSSC 22000 database of certified organizations available on www.fssc22000.com or SAI Global On-Line Certification register at <http://www.saiglobal.com>



Figure 4 : Certification FSSC 22000 de l'entreprise KERRY®

Notons que KERRY® détient également les certifications suivantes :

- Certification ISO 14001:2015 relative au système de management environnemental (disponible en annexe 1) ;
- Certification FAMI-QS relative à la sécurité et la qualité des ingrédients et des spécialités de l'alimentation animale (disponible en annexe 2).

1.2. Contrôle du processus de production industriel de l'enzyme

Industriellement, la glucoamylase est généralement produite à partir de champignons filamenteux pour leur capacité à sécréter de grandes quantités d'enzyme de manière extracellulaire.

La glucoamylase de KERRY® est obtenue à partir d'une souche sélectionnée d'*Aspergillus niger*. Le processus de production industriel des enzymes de KERRY® est divisé en trois étapes (Figure 5) :

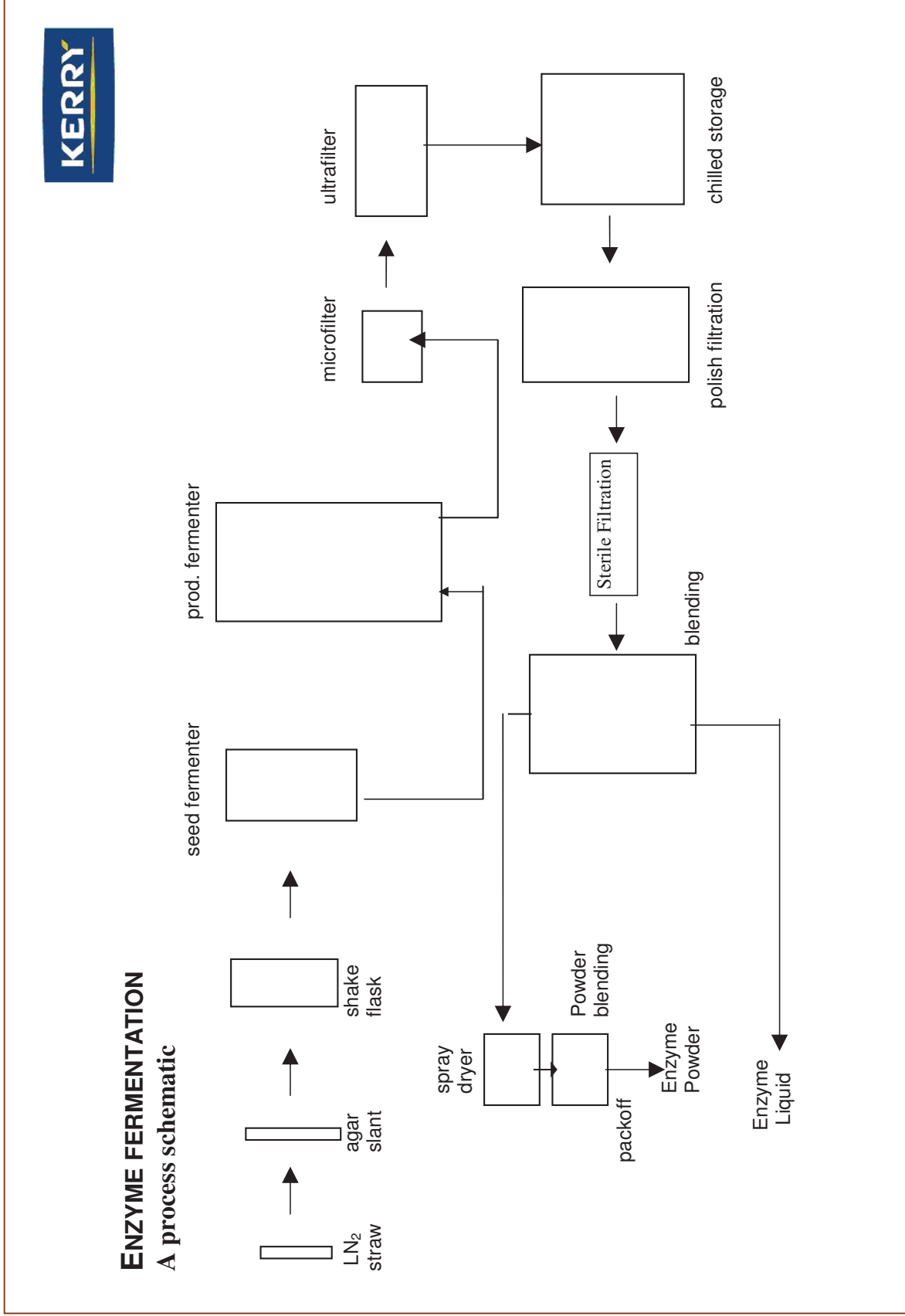
- Étape de laboratoire : la souche du micro-organisme commercialement utilisée pour la production de l'enzyme en question est stockée sous forme aseptique dans une enceinte climatisée tempérée à (-) 170°C par de l'azote liquide. Avant son utilisation, la souche est revivifiée par transfert sur une gélose inclinée en présence de nutriments spécifiques. Au cours des jours suivants, la souche est ravivée avant d'être repiquée dans des flacons agités pour débiter la fermentation aérobie. Un certain nombre de flacons sont préparés pour obtenir un volume de milieu en croissance suffisant (2 à 6 litres) pour être utilisé comme inoculum pour le fermenteur. Au cours de ces étapes, le nombre de cellules est maximisé, mais aucune production d'enzyme significative n'a lieu.
- Étape de fermentation : Des fermenteurs intermédiaires, dont la taille varie de 75 à 2 500 litres, sont utilisés pour fournir un volume de milieu en croissance suffisant pour être utilisé comme inoculum pour le fermenteur de production (qui peut être de 15 000 litres ou de 25 000 litres). L'étape de fermentation intermédiaire dure entre 24 et 48 heures tandis que l'étape de production peut prendre 1 à 10 jours selon le type de micro-organisme et si un fed-batch process¹ est nécessaire. Les nutriments utilisés

¹ Un fed-batch process consiste à introduire un ou plusieurs nutriments dans un fermenteur afin d'optimiser la croissance cellulaire et adapter les taux métaboliques des micro-organismes [46], [47].

dans les fermenteurs intermédiaires et de production sont quasiment identiques (son de blé, orge moulu, pulpe de betterave sucrière, antimousse, minéraux, sels, etc.). Compte tenu de sa taille, un inducteur enzymatique est normalement requis pour la fermentation en fermenteur de production. Les principaux paramètres qui influencent la production d'enzymes sont la température, le pH, les nutriments, le taux d'agitation et le taux d'aération. Ceux-ci doivent être optimisés à chaque étape de la production.

- Étape de purification (DSP - Downstream Purification) : Une fois la fin de l'étape de fermentation atteinte, la partie aseptique du processus est terminée. L'étape de DSP est effectuée dans des conditions hygiéniques. La microfiltration est utilisée pour éliminer toutes les matières insolubles ainsi que l'organisme de production du bouillon de fermentation. Cette étape conduit à une dilution considérable de l'enzyme. Afin de séparer l'enzyme des autres composants du bouillon de fermentation, une étape d'ultrafiltration est nécessaire. Cette étape permet de séparer les composants en fonction de leur masse moléculaire. Les petites molécules tels que l'eau, les sels, les sucres et les petites protéines sont éliminées dans le perméat tandis que l'enzyme (qui est une grosse protéine) est retenue dans le rétentat. Une filtration de polissage est ensuite effectuée sur le rétentat pour éliminer tout léger voile qui pourrait être présent. Une filtration stérilisante finale permet de garantir des taux de micro-organisme extrêmement faibles voire inexistantes. La stabilisation (avec des sels et/ou des polyalcools) et la standardisation à la concentration enzymatique requise sont les étapes restantes de la production d'un produit enzymatique liquide. Lorsqu'un produit en poudre est requis, une étape de séchage par spray drying / microgranulation est introduite après la filtration stérilisante. La poudre microgranulaire résultante est ensuite standardisée avec des diluants ou d'autres composants enzymatiques selon la spécification finale requise.

Figure 5 : Flowchart du processus de production enzymatique de KERRY®



Sous forme liquide, l'enzyme est conditionnée dans un bidon en polyéthylène de haute densité de 25 kg muni d'un bouchon scellé. Un certificat de la conformité des matériaux d'emballage utilisé par KERRY® vis-à-vis de la législation de l'Union Européenne est disponible en annexe 3. Le transport du produit à température contrôlée n'est pas nécessaire, mais un stockage prolongé doit être au sec, à une température contrôlée inférieure ou égale à 18°C. En suivant ces recommandations, l'enzyme maintiendra au moins 95 % d'activité pendant 12 mois. Après cette période, un protocole de retest est conseillé pour garantir son efficacité.

1.3. Contrôle des spécifications techniques de la matière première

N'étant pas d'origine animale, le produit est certifié sans agents transmissibles non conventionnels. Les spécifications techniques d'AMYLO® sont disponibles en annexe 4.

Elles renseignent :

- La liste des composants ;
- L'AE de la glucoamylase ;
- Les critères d'acceptation de la qualité microbiologique ;
- L'absence d'allergènes ;
- Les valeurs nutritionnelles ;
- Les recommandations de stockage et la durée de conservation.

N'étant pas strictement mentionnée dans les spécifications techniques, nous avons demandé à notre fournisseur de nous fournir la composition exacte de la solution de glucoamylase avec les pourcentages de chaque excipient (Figure 6).



Kerry Ingredients & Flavours Ltd.

Global Technology & Innovation Centre
Millennium Park
Naas
Co Kildare
Ireland

Tel: +353 (0) 45 930000
Fax: +353 (0)45 984008

10/07/2021

To whom it may concern,

Product	Material Code	Ingredient Listing (in descending order)
Amylo 300 (25Kg)	20267834	Water 50-60 % Glycerol 20-30 % Enzyme 5-10 % Glucose 2-5 % Salt <2 % Sodium Benzoate <2 % Potassium Sorbate <2 %

Amylo 300 (25Kg) meets requirements for food grade enzymes as designated by JECFA/FCC.

If you have any queries please do not hesitate to contact me.

Regulatory Specialist

This document and the information contained within it, is proprietary to Kerry Ingredients & Flavours Limited and remains the property of Kerry Ingredients & Flavours Limited and must not be disclosed to any third party without the prior written permission of the company. While all reasonable care has been taken in collating the above information, we do not accept any liability for any inaccuracy or the consequences of such inaccuracy.

The information contained in this document is confidential and proprietary information of Kerry Group PLC and its subsidiary companies. Any altering of this information without express written permission of an authorised officer of Kerry Group is expressly forbidden. Kerry Group reserves its right to vindicate its intellectual property rights where necessary

©Kerry 2021

Classified as Public

Figure 6 : Liste des composants (m/V) de l'AMYLO®

De plus, le programme de sûreté et de sécurité des produits alimentaires fabriqués par KERRY® est basé sur une méthode HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point). Il s'agit d'un système d'analyse des risques et de maîtrise des points critiques reconnu par l'OMS comme la méthode la plus rentable pour assurer la qualité et la sécurité des produits finis.

L'adhésion aux principes des Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF) est une condition préalable et constitue la pierre angulaire des plans HACCP [48]. Ce programme assure notamment la qualité des produits du fournisseur en termes de :

- Contamination microbiologique en garantissant l'absence de micro-organismes pathogènes dans le produit final ;
- Contamination physique en garantissant l'absence de corps étrangers et de contaminants physiques dans le produit final ;
- Contamination chimique en garantissant l'absence de contaminants chimiques dans le produit final ;
- Contamination par des métaux lourds en garantissant l'absence des métaux lourds (Plomb, Cadmium, Mercure, Arsenic) dans le produit final ;
- Contamination par des allergènes en garantissant l'absence d'allergènes dans le produit final.

2. Essais menés pour la qualification pharmaceutique de la matière première

Conformément aux BPP et pour compléter les données obtenues auprès de fournisseur, une QP de la MP enzymatique a été effectuée en suivant la monographie générale 2034 de la PE relative aux substances pour usage pharmaceutique [44]. S'agissant d'un produit d'origine biologique destiné à une administration par voie orale, les essais suivants ont été menés : (i) Mesures des caractéristiques physicochimiques ; (ii) Contrôle de la qualité microbiologique ; (iii) Dosage de l'AE de la glucoamylase.

(i) Les caractéristiques physicochimiques de la solution telles que les caractères organoleptiques, la densité (calculée par pesée d'un volume précis de solution), le pH et l'osmolalité (mesurée par abaissement du point de congélation) ont été déterminées. Les résultats sont présentés dans le tableau 4 ci-dessous.

Tableau 4 : Caractéristiques physicochimiques de l'AMYLO®

Paramètres	Valeurs
Caractères organoleptiques	Liquide brun, odeur caractéristique
Densité	1,13
pH	4,5 ± 0,5
Osmolalité (solution diluée au 1/10)	400 ± 20 mOsm/kg

(ii) Conformément aux critères d'acceptation de la qualité microbiologique des substances pour usage pharmaceutique non stériles disponibles dans le chapitre 5.1.4. de la PE relatif à la qualité microbiologique des préparations pharmaceutiques et des substances pour usage pharmaceutique non stériles [44], un bioburden a été effectué afin de vérifier :

- DGAT (Dénombrement des germes aérobies totaux) < 10² UFC/mL ;
- DMLT (Dénombrement des moisissures et levures totales) < 10 UFC/mL ;
- Absence d'*Escherichia coli* dans 1 mL.

L'analyse microbiologique a été conduite par le laboratoire d'hygiène de l'hôpital Édouard Herriot. Les résultats de cette analyse sont disponibles dans la figure 7 ci-dessous.



NH PRODUITS FINIS GHC Upcm

Né(e) : NH PRODUITS FINIS GHC
DDN : 31/12/1901 SEXE : Feminin
N° venue HY10810184

DEMANDE N° **0211240280**

Ref. ext :

Prélevé le 06/07/2021 00:00
Reçu le 08/07/2021 09:15

21590 MT FABRICATION PROD
PHARMACEUTIQUE

EDOUARD HERRIOT

5, place d'Arsonval
69437 LYON CEDEX 03
FRANCE

MICROBIOLOGIE ENVIRONNEMENTALE : Rapport d'analyses

Responsable Biologiste : Dr Pierre CASSIER
Secrétariat : 04 72 00 41 90

Renseignements fournis par le prescripteur

Les informations fournies par le prescripteur sont exonérées de notre responsabilité.

Etablissement : Hôpital Edouard Herriot
Contexte de prélèvement : Test sur échantillon
Nature de l'échantillon : Solution mère d'AMYLO
Prise d'essai = 1 mL équivalent à 1 gramme sauf pour les Salmonella dont la prise d'essai = 25 mL équivalent à 25 grammes

Matrice liquide - Matière première - échantillon N° 021124028001 prélevé le 06/07/21 à 00:00

Dénombrement de la charge microbienne

Résultats

DGAT(Dénombrement des germes aérobies totaux) :	<1	UFC/mL
DMLT (Dénombrement des moisissures et levures totales) :	<1	UFC/mL
Coliformes totaux :	Absence dans 1mL/1g	
Samonella :	Absence dans 25 mL/25g	

Culture stérile

Résultat conforme aux spécifications

*Ces résultats ne se rapportent qu'à l'échantillon soumis à l'essai. La date de réception de l'échantillon figurant sur ce compte rendu correspond à la première date de mise en analyse.
La reproduction de ce compte rendu de résultats est interdite, sinon en entier, sans autorisation du laboratoire.*

Validé par : Dr Isabelle FREDENUCCI

*Les internes valident sous la responsabilité du chef de service

**Identification et coordonnées disponibles au numéro de permanence sus-

Diffusé le 13/07/2021 à 12.44 par : Dr Isabelle FREDENUCCI

Etat : Complet

Page 1/ 1

Figure 7 : Dénombrement microbien de l'AMYLO®

(iii) Le dosage de l'AE de la glucoamylase est détaillé dans la partie II.3 ci-dessous.

3. Contrôle de l'activité enzymatique de la glucoamylase

3.1. Rappels d'enzymologie

3.1.1. Généralités

Les enzymes sont des catalyseurs biologiques permettant d'accélérer très fortement les réactions chimiques nécessaires au maintien de la vie. La grande majorité des processus métaboliques sont catalysés par des enzymes [49].

Les premières démonstrations d'une AE dans des extraits naturels remontent au XVII^e siècle avec l'étude des processus de digestion et de fermentation. En 1897, Eduard Buchner isole une substance capable de reproduire la fermentation *in vitro* à partir de levure de bière. Il faut attendre 1926 pour que la structure protéique des enzymes soit admise par la communauté scientifique, et 1980 pour découvrir la capacité de certains ARN à réaliser la catalyse enzymatique. Qu'il s'agisse de protéines ou d'ARN, les enzymes sont capables de reconnaître très spécifiquement certaines molécules et d'accélérer les réactions de transformation de ces molécules par abaissement de l'énergie d'activation. Au cours d'une réaction, l'enzyme n'est pas modifiée et peut donc catalyser la même réaction de manière successive. L'étude des réactions enzymatiques vise à comprendre les mécanismes réactionnels qui permettent aux enzymes de catalyser les réactions. Il faut ainsi étudier la cinétique des réactions enzymatiques pour comprendre leur mode d'action [49].

3.1.2. Comprendre la cinétique enzymatique

Les premières études de la cinétique enzymatique débutent dans la seconde moitié du XIX^e siècle et sont majoritairement réalisées avec des enzymes impliquées dans des processus de fermentation, en particulier l'hydrolyse enzymatique du saccharose par l'invertase [49].

Comme tous catalyseurs, les enzymes admettent les principes de base suivants :

- Il existe une grande disproportion entre la quantité d'enzyme utilisée et la masse transformée de substrat ;
- L'action de l'enzyme entraîne une modification complète de la courbe d'évolution d'une réaction sans modifier la position des équilibres chimiques ;
- Les enzymes agissent par formation transitoire de complexes Enzyme - Substrat ;

- Les enzymes ne sont pas consommées lors des réactions et n'apparaissent donc pas dans les équations bilans.

Elles diffèrent cependant des autres catalyseurs par la grande stéréospécificité de leur site actif, région particulière au sein de laquelle se déroule la réaction enzymatique proprement dite. Le site actif est défini dans les trois dimensions de l'espace, et sa taille est généralement restreinte par rapport à la taille globale de la protéine. Il est très souvent localisé dans une crevasse caractérisée par un microenvironnement spécifique. C'est l'arrangement des atomes constituant le site actif qui va déterminer la spécificité d'action de l'enzyme et la sélection précise du substrat. Pour expliquer l'interaction entre une enzyme et son substrat, deux modèles ont été développés. Le premier modèle dit de clé-serrure faisait le postulat d'une complémentarité statique entre l'enzyme et le substrat. Il est aujourd'hui considéré comme obsolète. Le second modèle dit d'ajustement induit implique que l'enzyme sélectionne spécifiquement son substrat, et se renferme pour le piéger en son sein (Figure 8). L'enzyme devient active uniquement dans sa forme fermée impliquant une régulation de l'activité par la fixation du substrat [49].

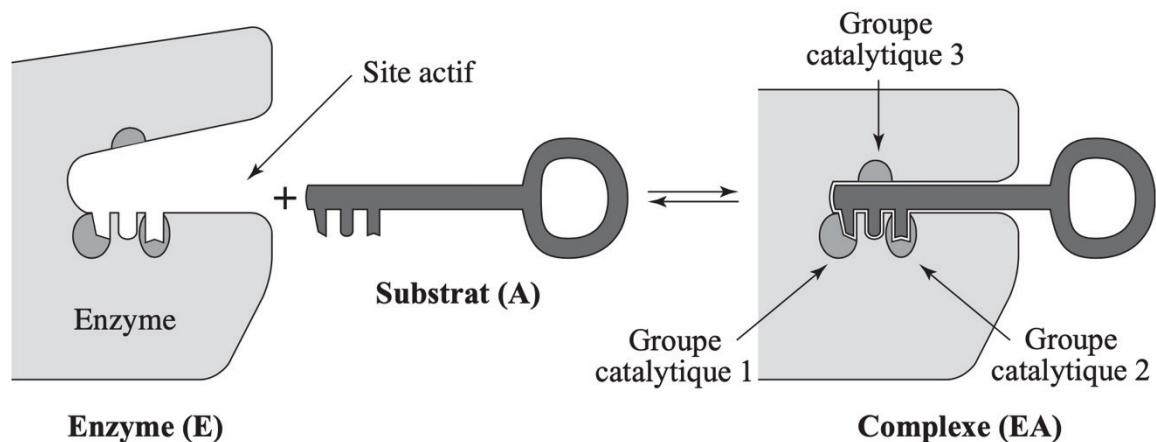


Figure 8 : Modélisation de l'interaction Enzyme - Substrat par ajustement induit [49]

3.1.3. Unité d'activité enzymatique

L'activité d'une enzyme est obtenue par mesure de la vitesse de la réaction qu'elle catalyse dans des conditions définies. D'après l'Union Internationale de Biochimie, l'unité d'AE ou unité d'enzyme est exprimée en Unité Internationale (UI) et représente la quantité d'enzyme qui catalyse la transformation d'une micromole de substrat par minute dans des

conditions standards [47]. L'AE étant fortement dépendante de la température et du pH, ces deux paramètres devraient être systématiquement mentionnés lorsque l'on réalise une mesure de l'AE.

Comme décrit précédemment, l'AE de la glucoamylase peut être définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour libérer 1 μ mole de β -D-glucose par minute à partir d'amidon soluble dans des conditions spécifiques de pH et de température [50].

3.1.4. Mesure de l'activité enzymatique

La caractérisation des systèmes enzymatiques repose sur la mesure de l'AE et donc sur l'existence d'une méthode expérimentale permettant de suivre l'évolution de la réaction au cours du temps. Quelle que soit la méthode analytique choisie, elle doit permettre de distinguer les substrats des produits et de mesurer leur concentration de manière quantitative [49]. Il est important que la vitesse de réaction soit linéaire pendant la période d'incubation, afin de détecter convenablement la formation du produit. En effet, au cours du temps, la vitesse de réaction tend à décroître du fait :

- De la consommation du substrat ;
- De la rétro-inhibition induite par l'accumulation de produit ;
- De la perte progressive de l'AE par la protéine en raison de possibles dénaturations ou liaisons irréversibles de son site actif.

Deux types de méthodes existent pour mesurer l'AE [49] :

- Les méthodes continues : Elles mesurent l'avancement de la réaction de manière continue à l'aide d'un appareil de mesure approprié. Lorsqu'elles sont réalisables, les méthodes continues sont préférées aux méthodes discontinues pour apprécier au mieux l'avancement de la réaction et éviter les approximations.
- Les méthodes discontinues : Elles mesurent l'avancement de la réaction par des prélèvements successifs du milieu réactionnel, analysés indépendamment. Elles ont l'avantage d'être applicables à n'importe quel système enzymatique. L'enzyme est incubée avec son substrat pendant un temps très précis au terme duquel la réaction est arrêtée par dénaturation de l'enzyme. Le produit est ensuite dosé et son évolution est assumée linéaire pendant la période de l'incubation.

Ces méthodes reposent toutes sur la quantification d'un produit final aisément détectable. Il peut s'agir d'un chromophore dosé par spectrophotométrie, d'un fluorophore dosé par fluorimétrie ou encore de l'échange unidirectionnel d'un proton mesurable par pH-métrie. Lorsque ce produit final est le produit de l'enzyme, on parle de détection directe. Cependant, lorsque la réaction étudiée ne donne pas lieu à un signal mesurable, il est possible de suivre la réaction de manière indirecte en l'associant à une autre réaction enzymatique. On parle alors de « systèmes couplés » [49].

3.2. Matériel et méthode

Conformément à la PE, les teneurs en substances pour usage pharmaceutique doivent être déterminées au moyen de méthodes appropriées. En l'absence de monographie spécifique à la glucoamylase, une phase de recherche et de développement a été menée pour mesurer son AE, par spectrophotométrie, à l'aide du réactif R-AMGR3 (MEGAZYME®, Irlande) [51], [52].

3.2.1. Principe de la méthode

La mesure de l'activité fait intervenir une réaction enzymatique couplée devant être réalisée à 40°C et à pH 4,5. Le réactif pour le dosage de l'AE de la glucoamylase est composé de *p*-nitrophényl- β -D-maltoside (substrat chromogène) et d'un excès de β -glucosidase [51]. Le mécanisme d'action est expliqué ci-dessous et illustré dans la figure 9 :

- En présence de glucoamylase, la liaison $\alpha(1-4)$ -D-glucosidique du substrat est hydrolysée libérant une molécule de β -D-glucose et une molécule de *p*-nitrophényl- β -D-glucoside ;
- Le *p*-nitrophényl- β -D-glucoside subit immédiatement une hydrolyse enzymatique par la β -glucosidase en excès libérant une molécule de β -D-glucose et une molécule de *p*-nitrophénol. A ce stade de la réaction, le milieu est incolore ;
- L'alcalinisation du milieu par une solution tampon de TRIS base 2 % (pH 8,5) stoppe la réaction et entraîne la formation d'un ion *p*-nitrophénolate chromophore par déprotonation du *p*-nitrophénol. L'effet bathochrome et hyperchrome de cette réaction est visible par la coloration du milieu qui devient jaune ;
- L'ion *p*-nitrophénolate est dosé par spectrophotométrie à la longueur d'onde d'absorbance $\lambda = 400$ nm.

En l'absence de glucoamylase, le substrat ne subit pas d'hydrolyse. Le chromophore n'est donc pas libéré et le milieu reste incolore.

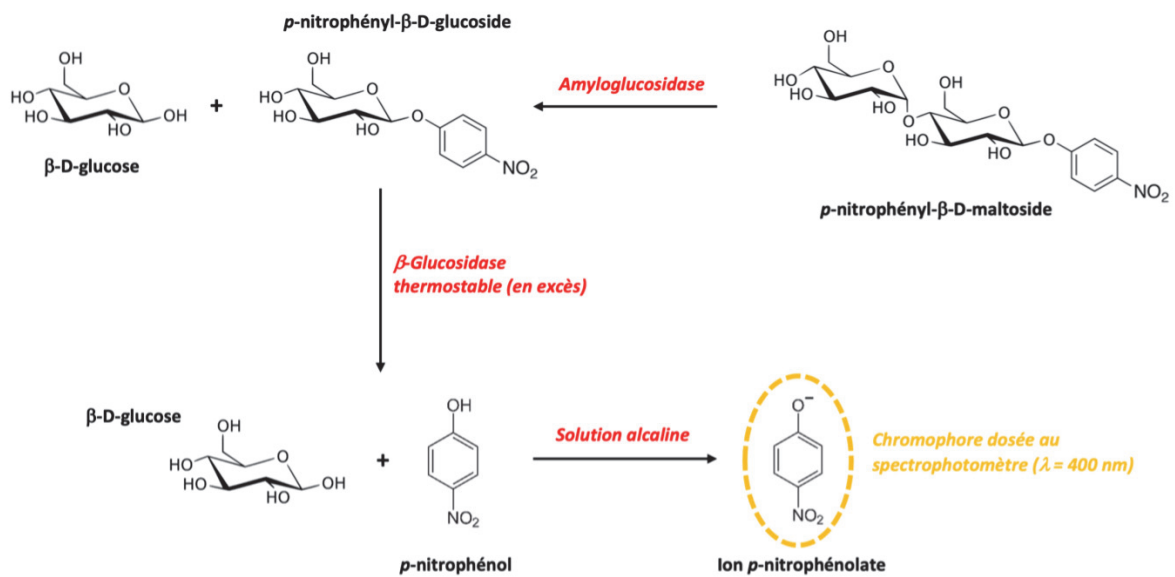
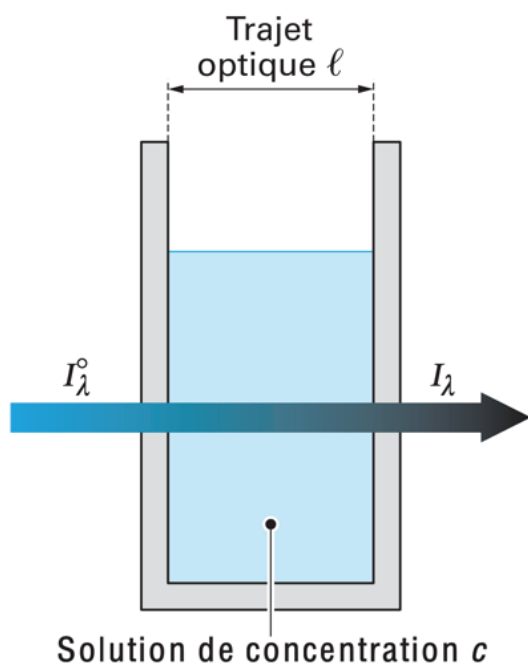


Figure 9 : Mécanisme d'action du dosage de l'AE de la glucoamylase avec le réactif R-AMGR3 (MEGAZYME®)

3.2.2. Instrumentation

L'appareil utilisé est un spectrophotomètre JASCO UV V-730 utilisé avec le logiciel Spectra Manager. La longueur d'onde de travail est de 400 nm.

La spectrophotométrie UV – Visible permet de mesurer à l'aide d'un spectrophotomètre la concentration d'une molécule qui absorbe spécifiquement entre 190 nm et 800 nm [53]. À la longueur d'onde où l'absorption de cette molécule est maximale, il existe une loi entre la quantité de rayonnement transmis par le milieu et la concentration de la molécule qui absorbe : La loi de Beer-Lambert (Figure 10).



$$A_{\lambda} = \lg (I_{\lambda}^{\circ}/I_{\lambda}) = \varepsilon_{\lambda} \ell c$$

Figure 10 : Principe de la spectrophotométrie UV – Visible [53]

3.2.3. Tests préliminaires

Le mode opératoire original fourni par MEGAZYME® et permettant de doser de l'AE de la glucoamylase à l'aide du réactif R-AMGR3 est disponible en annexe 5. Des dosages préliminaires ont été effectués sur la MP enzymatique à différents niveaux de dilution. Les résultats obtenus nous ont permis :

- De mettre en évidence un domaine de mesure linéaire et exploitable pour des concentrations en glucoamylase comprises entre 100 et 2500 mUI/mL ;
- De mesurer une AE moyenne de 5400 ± 400 UI/mL à 40°C et pH 4,5 ;
- D'exclure l'existence d'un effet matrice ;
- D'établir les protocoles pour la préparation des standards de calibration et de validation.

3.2.4. Préparation des standards de calibration

Les standards de calibration ont été réalisés à partir d'une substance chimique de référence (CRS) de glucoamylase à x UI/mg. Les valeurs cibles étaient 500 mUI/mL, 1 000 mUI/mL et 1 500 mUI/mL.

Une solution mère concentrée à 100 UI/mL a été préparée selon le protocole suivant :

- Dans un poudrier, peser 1 000/ x mg (équivalent à 1 000 UI) de poudre CRS de glucoamylase à x UI/mg.
- Ajouter 10 mL de solution tampon d'acétate de sodium 0,1 M (pH 4,5).
- Vortexer jusqu'à dissolution complète.

Une solution fille concentrée à 10 UI/mL a été préparée selon le protocole suivant :

- Dans un tube à essai en polypropylène, prélever 1 mL de la solution mère concentrée à 100 UI/mL.
- Ajouter 9 mL de solution tampon d'acétate de sodium 0,1 M (pH 4,5) (QSP 10 mL).
- Vortexer pendant 5 secondes.

Les standards de calibration bas (SC_1), moyen (SC_2) et haut (SC_3) ont ensuite été fabriqués selon le protocole détaillé dans le tableau 5 ci-dessous.

Tableau 5 : Préparation des standards de calibration

Standards de Calibration (SC)	SC_1	SC_2	SC_3
<i>Solution fille SF_G (μL)</i>	<i>500</i>	<i>1 000</i>	<i>1 500</i>
<i>Solution d'acétate de sodium 0,1 M (pH 4,5) (μL)</i>	<i>9 500</i>	<i>9 000</i>	<i>8 500</i>
<i>Concentration théorique (mUI/mL)</i>	500	1 000	1 500

3.2.5. Préparation des standards de validation

Les standards de validation ont été réalisés à partir de la MP de glucoamylase à 5400 UI/mL. Les valeurs cibles étaient 750 mUI/mL, 1 000 mUI/mL et 1 250 mUI/mL.

Une solution mère concentrée à 50 UI/mL a été préparée selon le protocole suivant :

- Dans une fiole jaugée de 100 mL, prélever 926 μ L de MP enzymatique à 5400 UI/mL.
- Compléter à 100 mL avec une solution tampon d'acétate de sodium 0,1 M (pH 4,5).
- Vortexer pendant 5 secondes.

Une solution fille concentrée à 10 UI/mL a été préparée selon le protocole suivant :

- Dans un tube à essai, prélever 1 mL de la solution mère concentrée à 50 UI/mL.
- Ajouter 4 mL de solution tampon d'acétate de sodium 0,1 M (pH 4,5) (QSP 10 mL).
- Vortexer pendant 5 secondes.

Les standards de validation bas (QC_B), moyen (QC_M) et haut (QC_H) ont ensuite été fabriqués selon le protocole détaillé dans le tableau 6 ci-dessous.

Tableau 6 : Préparation des standards de validation

Contrôles Qualité (QC)	QC_B	QC_M	QC_H
<i>Solution fille SF_{QC} (μL)</i>	<i>750</i>	<i>1 000</i>	<i>1 250</i>
<i>Solution d'acétate de sodium 0,1 M (pH 4,5) (μL)</i>	<i>9 250</i>	<i>9 000</i>	<i>8 750</i>
<i>Concentration théorique (mUI/mL)</i>	<i>750</i>	<i>1 000</i>	<i>1 250</i>

3.2.6. Traitement des solutions à doser

Conformément au protocole de MEGAZYME® (annexe 5) pour la mesure de l'AE de la glucoamylase, les solutions à doser doivent subir le traitement suivant :

- Pré-équilibrer 1 mL de la solution enzymatique à doser à 40°C pendant environ 10 minutes ;
- Dans un tube à essai :
 - Prélever 200 μL de solution de R-AMGR3 pour dosage Glucoamylase.
 - Pré-équilibrer à 40°C pendant environ 10 minutes.
 - Ajouter 200 μL de la solution enzymatique à doser (déjà pré-équilibrée à 40°C pendant environ 10 minutes).
 - Vortexer 3 secondes puis incuber à 40°C pendant exactement 10 min.
 - Stopper la réaction en ajoutant 3 mL de solution tampon de tris base 2 % (pH 8,5).
- Mesurer l'absorbance à 400 nm contre un blanc de réactif préparé comme suit : Dans un tube à essai, prélever 3 mL de solution tampon de tris base 2 % (pH 8,5), ajouter 200 μL de solution de R-AMGR3 pour dosage Glucoamylase, ajouter 200 μL de la solution enzymatique à doser.

L'AE de la solution mère est obtenue par la formule suivante :

$$AE_{SM} = \frac{\Delta A_{400}}{10} \times \frac{3,4}{0,2} \times \frac{1}{18,1} \times Dilution$$

Avec :

- AE_{SM} : AE de la solution à doser (UI/mL)
 - ΔA_{400} : Absorbance de la solution – Absorbance du blanc
 - 10 : Temps d'incubation (min)
 - 3,4 : Volume final après réaction (mL)
 - 0,2 : Volume de solution enzymatique prélevé (mL)
 - 18,1 : Coefficient d'extinction molaire du p-nitrophénol dans la solution tampon tris base 2 % (pH 8,5) à 400 nm
 - *Dilution* : Facteur de dilution de la solution mère
-

Avant d'être adoptée pour les dosages routiniers, le protocole a fait l'objet d'une validation de méthode analytique.

3.3. Protocole de validation

Selon la norme NF EN ISO / CEI 17025, la validation est : « *La confirmation par examen et l'apport de preuves objectives du fait que les exigences particulières en vue d'une utilisation prévue déterminée sont remplies* ».

L'objectif de la méthodologie globale est de fournir les garanties que chaque résultat obtenu en routine est suffisamment proche de la valeur vraie de l'échantillon traité [54].

La validation de la méthode de dosage a été effectuée par la méthode du profil d'exactitude. Validée par la Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques (SFSTP) [55], cette méthodologie s'appuie sur deux concepts complémentaires : la limite d'acceptabilité et l'intervalle de tolérance.

La limite d'acceptabilité sert à chiffrer les objectifs de la méthode en termes de performance globale. Elle est exprimée en pourcentage autour de la valeur de référence et a été fixée à ± 10 % par le Laboratoire de Contrôle Qualité (LCQ) de la PUI [56].

L'intervalle de tolérance délimite un intervalle dans lequel se trouvera une proportion moyenne β % de futures mesures [56].

A l'aide d'un protocole de validation adéquat, le profil d'exactitude étudie les paramètres de validation tels que la spécificité, la linéarité, la précision, l'exactitude, les limites de détection et de quantification.

3.3.1. Choix du protocole de validation

La SFSTP propose différents protocoles de validation en fonction de la présence ou non d'un effet matrice. Aucun effet matrice n'ayant été observé lors des tests préliminaires, la validation de la méthode analytique a été réalisée selon le protocole V2 (Tableau 7).

Tableau 7 : Design des protocoles de validation selon Hubert et al. [55]

Standards	Concentration levels	PROTOCOL				
		V1	V2	V3	V4	V5
CSs without matrix	Low		2		2	
	Mid	2	(2) ^a	2	(2) ^a	
	High	(2) ^b	2	(2) ^b	2	
CSs within matrix	Low				2	2
	Mid			2	(2) ^a	(2) ^a
	High			(2) ^b	2	2
	Additional					(2) ^c
VSs within matrix	Low	3	3	3	3	3
	Mid	3	3	3	3	3
	High	3	3	3	3	3
Minimum number of series	3	3	3	3	3	
Total number of experiments (minimum)	33	45	39	63	45	

3.3.2. Spécificité

La spécificité d'une procédure analytique quantitative est la capacité à établir de manière univoque l'existence de la substance à analyser en présence d'autres composants potentiellement présents [52]. Une procédure d'analyse est dite « spécifique » lorsqu'elle permet de garantir que le signal mesuré est caractéristique de la substance à analyser. Elle est vérifiée par la mesure d'un blanc de réactif lors de chaque dosage, assurant l'absence d'interférences.

3.3.3. Linéarité

La linéarité concerne la relation entre les concentrations calculées à l'aide de la fonction d'étalonnage et les concentrations théoriques [54]. La linéarité d'une méthode peut donc être définie comme sa capacité, dans un certain intervalle de dosage, à obtenir des résultats directement proportionnels à la concentration en substance dosée. Elle a été vérifiée par la réalisation de deux gammes de trois niveaux par jours pendant trois jours, selon les dilutions des standards de calibration (cf. 3.2.4 « préparation des standards de calibration »). Les coefficients de corrélation linéaire sont calculés pour chaque jour et doivent être supérieurs à 95 %.

3.3.4. Précision

La précision exprime l'étroitesse d'accord entre une série de mesures provenant de multiples prises d'un même échantillon. Elle traduit la distribution des erreurs aléatoires et n'a aucune relation avec la valeur théorique attendue [54]. Elle a été vérifiée en passant trois échantillons de trois niveaux de concentrations pendant trois jours, en présence de matrice, selon les dilutions des standards de validation (cf. 3.2.5 « préparation des standards de validation »).

La précision peut être évaluée avec l'étude de la répétabilité et de la reproductibilité, à partir de l'écart-type des résultats d'essais, et peut être exprimée sous forme de coefficient de variation.

La répétabilité est évaluée en passant trois niveaux de contrôle trois fois, sur un jour ($n = 9$). Les coefficients de variation pour chaque niveau de concentration sont calculés par analyse de variance (ANOVA). Ceux-ci doivent être inférieurs à $\pm 5 \%$. La reproductibilité est évaluée en passant trois niveaux de contrôle trois fois, sur trois jours ($n = 27$). Les coefficients de variation pour chaque niveau de concentration sont calculés par analyse de variance (ANOVA). Ceux-ci doivent être inférieurs à $\pm 8 \%$.

3.3.5. Exactitude

L'exactitude exprime l'étroitesse d'accord entre la moyenne des résultats d'un essai et la valeur théorique attendue. Par conséquent, l'exactitude est l'expression de la combinaison de la justesse et de la précision. De ce fait, c'est la caractéristique de performance majeure qui est étudiée dans une approche globale [54]. Elle a été vérifiée en passant trois échantillons de trois niveaux de concentrations pendant trois jours, en présence de matrice, selon les dilutions des standards de validation (cf. 3.2.5 « préparation des standards de validation »). Les inexactitudes pour chaque jour sont calculées par analyse de variance (ANOVA). Celles-ci doivent être inférieures à $\pm 10 \%$.

Un profil d'exactitude doit être construit, conformément aux exigences de la norme ISO 5725, afin de statuer sur la validation de la performance de la méthode.

3.3.6. Limites

Les limites de quantification basse et haute permettent de déterminer la plus faible / plus forte quantité détectable et quantifiable avec précision. Celles-ci sont données par le profil d'exactitude. La limite de quantification basse (LQ) peut également être calculée selon la formule suivante :

$$LQ = \frac{10\sigma}{P}$$

Avec :

- σ l'écart-type de l'ordonnée à l'origine des gammes d'étalonnage
 - P la moyenne des pentes des gammes d'étalonnage
-

La limite de détection (LD) permet de déterminer la valeur la plus faible détectable mais non quantifiable. Elle peut également être calculée selon la formule suivante :

$$LD = \frac{3,3\sigma}{P}$$

Avec :

- σ l'écart-type de l'ordonnée à l'origine des gammes d'étalonnage
 - P la moyenne des pentes des gammes d'étalonnage
-

La méthode EURACHEM est également utilisable pour déterminer la limite de quantification basse.

3.4. Résultats et interprétations

Conformément au protocole de validation de méthode analytique décrit précédemment et pour simuler différentes sources d'incertitudes (évolution des échantillons et des réactifs, changements d'opérateurs, modification des réglages, etc.), un plan d'expérience en 45 essais a été mené. Les mesures ont été effectuées sur trois jours différents par trois opérateurs différents. Pour chaque série, les standards de calibration bas, moyen et haut ont été préparés deux fois et les standards de validation bas, moyen et haut ont été préparés trois fois. Les résultats obtenus sont présentés dans les tableaux 8 et 9 ci-dessous.

Tableau 8 : Absorbance des standards de calibration de glucoamylase

Niveaux	Jour	Concentration théorique	Absorbance Analyte	
			Rep1	Rep2
CS1 (Standard de Calibration 1)	j1	500	0,475754	0,437295
	j2	500	0,462881	0,456285
	j3	500	0,434624	0,487409
CS2 (Standard de Calibration 2)	j1	1000	0,972552	0,918166
	j2	1000	0,968288	0,94415
	j3	1000	0,968227	0,891607
CS3 (Standard de Calibration 3)	j1	1500	1,50469	1,41124
	j2	1500	1,45892	1,44369
	j3	1500	1,37973	1,40855

Tableau 9 : Absorbance des standards de validation de glucoamylase

Niveaux	Jour	Concentration théorique	Absorbance Analyte		
			Rep 1	Rep 2	Rep 3
VS1 (Standard de Validation 1)	j1	750	0,7379	0,6922	0,7268
	j2	750	0,7055	0,6989	0,7233
	j3	750	0,7528	0,7103	0,7223
VS2 (Standard de Validation 2)	j1	1000	0,9369	0,9651	0,9294
	j2	1000	0,9574	0,9312	0,9564
	j3	1000	0,9831	1,0096	0,9309
VS3 (Standard de Validation 3)	j1	1250	1,2444	1,1874	1,2146
	j2	1250	1,2075	1,24	1,2287
	j3	1250	1,2605	1,2054	1,2324

Les résultats des paramètres étudiés pour la validation de la méthode de dosage de l'AE de la glucoamylase sont conformes et résumés dans le tableau 10 ci-dessous.

Tableau 10 : Résultats des paramètres de validation du dosage de l'AE de la glucoamylase

Linéarité ($R^2 > 0,95$)	J1	J2	J3
	0,9933	0,9996	0,9946
Exactitude (Inexactitude $< \pm 10 \%$)	J1	J2	J3
	2,49 %	1,08 %	2,84 %
Répétabilité (CV intra jour $< \pm 5 \%$)	VSB	VSM	VSH
	2,67 %	2,86 %	1,98 %
Reproductibilité (CV inter jour $< \pm 8 \%$)	VSB	VSM	VSH
	3,17 %	3,56 %	2,72 %

Le profil d'exactitude a été construit conformément aux exigences de la norme ISO 5725. Il montre une précision comprise entre 90 et 110 %. Les bornes de l'intervalle de tolérance (...) sont comprises à l'intérieur des bornes de seuils (—) (Figure 11).

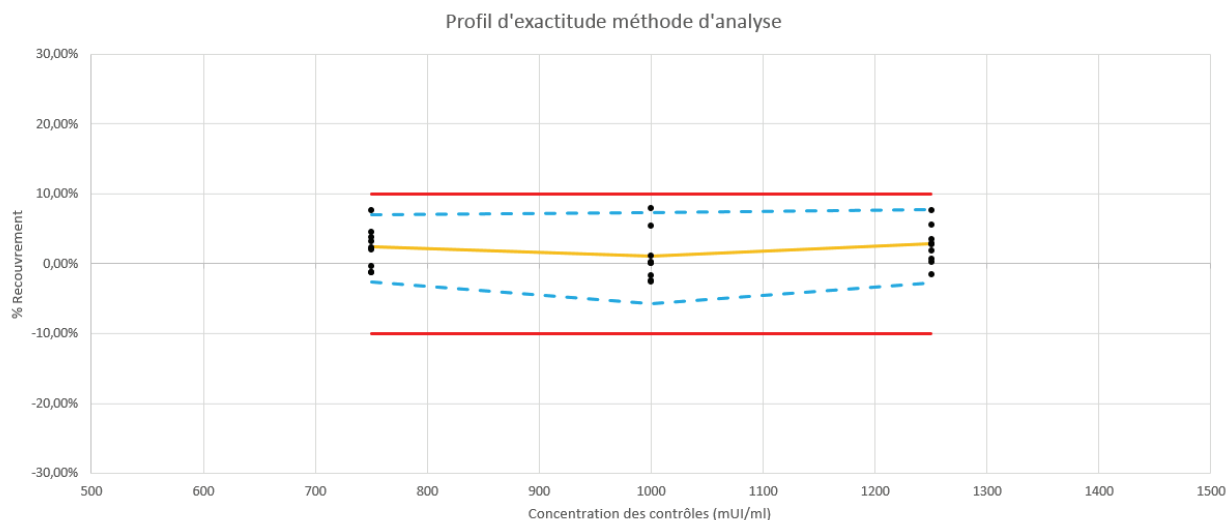


Figure 11 : Profil d'exactitude de la méthode de dosage de l'AE de la glucoamylase

3.5. Validation de la méthode

Tous les paramètres du profil d'exactitude étant conformes, la méthode de dosage de l'AE de la glucoamylase à l'aide du réactif R-AMGR3 (MEGAZYME®, Irlande) est validée conformément aux recommandations de la SFSTP et de l'ICH.



L'activité de la MP enzymatique a été mesurée à 5400 UI/mL (40°C, pH 4,5). Cette valeur ne correspond pas à celle revendiquée par le fournisseur (Annexe 4). Comme décrit précédemment, l'AE est très fortement dépendante de la température et du pH. Or ces paramètres ne sont pas renseignés dans les spécifications techniques du produit et nous n'avons pas pu les obtenir auprès de KERRY®. De plus, il n'existe actuellement aucun rationnel scientifique concernant les conditions expérimentales optimales pour le dosage de l'AE de la glucoamylase. Nous pouvons donc supposer que les paramètres de température et de pH adoptés par le fournisseur diffèrent de 40°C et pH 4,5. Dans un souci de praticité et pour respecter le mode opératoire fourni par MEGAZYME®, nous avons choisi de conserver ces paramètres. L'AE cible des futures mesures effectuées sur la MP sera donc de 5400 ± 540 UI/mL à 40°C et pH 4,5.

Pour garantir la reproductibilité des lots, l'AE de la glucoamylase sera mesurée à chaque réception d'un nouveau contenant de MP. Compte-tenu des résultats obtenus précédemment et conformément à la politique qualité de notre plateforme pharmaceutique, une Procédure Opératoire Standardisée pour le dosage de l'AE de la glucoamylase au LCQ a été rédigée. Il s'agit d'un document qualité interne à la PUI, disponible en annexe 6.

4. Validation de la qualité pharmaceutique de la matière première

Conformément aux exigences de la PE et aux BPP, la solution de glucoamylase de KERRY® a été qualifiée comme MPUP. Elle peut donc être utilisée dans la fabrication de notre préparation pharmaceutique de glucoamylase. Un Bulletin d'Analyse Matière Première (BAMP) a été rédigé (Tableau 11). Il s'agit d'un document qualité interne à la PUI qui détaille l'ensemble des contrôles devant être effectué à chaque réception de la MPUP.

Tableau 11 : BAMP de la glucoamylase liquide

 GH Centre	Bulletin d'analyse matière première Version 03 - Date de mise à jour : 15/11/2020	Service Pharmaceutique UPCM
	ENREGISTREMENT	 CTRL-EN-014

BULLETIN D'ANALYSE MATIERE PREMIERE

Rédaction : R. LAMBERT Modification : Validation : C. MERIENNE Signature :
 Version N° : 1 Validé le : 12/08/2021

<h1>AMYLO®</h1>	Numéro de lot fabricant	
	Numéro d'enregistrement	
	Date	

FICHE D'IDENTITE DE LA MATIERE PREMIERE

Numéro CAS	
Formule	
Masse Molaire	
Nom du fournisseur	KERRY Food Ingredients (Cork) Limited
Nom du fabricant	KERRY
Conditionnement	25 kg
Précaution de manipulation	Liste 1 : habillage adapté selon environnement + gants + masque + lunettes de protection
Conditions de stockage	Entre + 2 °C et + 8 °C
Référentiel	Bulletin d'analyse du fournisseur - FDS 163

UTILISATION DE LA MATIERE PREMIERE

MATIERE PREMIERE NON STERILE

CONFORMITE DE LA RÉCEPTION DE LA MATIERE PREMIERE

Nombre de conditionnements commandés	
Nombre de conditionnements reçus	
Nombre de conditionnements contrôlés	
Bulletin d'analyse du fournisseur	<input type="checkbox"/> : Oui <input type="checkbox"/> : Non

MODALITE DE PRELEVEMENT


Matière première non stérile liquide : le prélèvement s'effectue, après respect des consignes d'habillage, dans la salle liquide B01.00.05 de la ZPNS, sur le premier conditionnement du lot préalablement nettoyé à la lingette désinfectante, avec une pastette stérile et un poudrier stérile à usage unique en respectant les précautions de manipulation inhérentes à la dangerosité de la matière première.

Conformité des prélèvements		Contrôle	Echantillothèque
	Quantité prévue	150 mL	5 mL
	Quantité reçue / prélevée		
	Acheminement conforme		
Prélevé le :		Par :	

ECHANTILLOTHEQUE : PAS DE MISE EN ECHANTILLOTHEQUE

Mise en échantillothèque	Effectuée le		Par :
	N° Echantillothèque		

Page : 1 de 11

 votre santé, notre engagement

 GH Centre	Bulletin d'analyse matière première Version 03 - Date de mise à jour : 15/11/2020	Service Pharmaceutique UPCM
	ENREGISTREMENT	 CTRL-EN-014

BULLETIN D'ANALYSE MATIERE PREMIERE

 Rédaction : R. LAMBERT
 Version N° : 1

Modification :

 Validation : C. MERIENNE
 Validé le : 12/08/2021

Signature :

CONTROLES PHYSICO-CHIMIQUES

Contrôles	Spécifications	Résultats	Conformité	Appareil	Date	Signature
CTRL-IN-025 Conformité du bulletin d'analyse						
Conformité du bulletin d'analyse du fournisseur avec la monographie fournisseur du produit (<i>Bulletin d'analyse fournisseur</i>)	<i>Conforme</i>					
CTRL-IN-010 Caractères organoleptiques						
	<i>Liquide fluide et limpide, couleur ambre, odeur caractéristique</i>					
CTRL-IN-011 pH (Ph. Eur. 2.2.3)						
	<i>4,00 - 5,00</i>			SUP-IN 010		
CTRL-IN-012 Osmolalité (Ph. Eur. 2.2.35)						
<i>D = 1/10</i>	<i>400 ± 40 mOsm/kg Erreur (%) ≤ 10 %</i>			SUP-IN 009		
Dosage activité enzymatique						
<i>CTRL-IN-003 POS SOL BUV GLUCOAMYLASE UV</i>	<i>5400 ± 540 UI/mL*</i>			SUP-IN 012		
CTRL-IN-EXT Analyse extérieure						
<i>CTRL-IN-002 EXT GLYCEROL</i>	<i>Envoi de 30 mL de solution pure 3423 ± 685 mmol/L</i>					

* valeur expérimentale

CONTROLES MICROBIOLOGIQUES

CTRL-IN-019 Dénombrement microbien						
Spécificités de l'échantillon :						
Prélever 30 mL dans un poudrier stérile						
Contrôles	Spécifications	Résultats	Conformité	Appareil	Date	Signature
Flore aérobie totale (DGAT) Moisissures et levures (DMLT) Salmonella Coliformes totaux Escherichia coli	<i>< 100 UFC/g (ou mL) < 10 UFC/g (ou mL) Absence dans 1 g / 1 mL Absence dans 1 g / 1 mL Absence dans 1 g / 1 mL</i>					

COMMENTAIRE

 DECISION : **Accepté / Refusé**

Date :

Nom / Signature :

III. ETUDE DE FAISABILITE DU PROJET

Conformément aux BPP, l'étude de faisabilité d'une préparation de glucoamylase au sein de la plateforme FRIPHARM® a été menée par un pharmacien et moi-même en suivant le plan suivant :

- Statut de la préparation ;
- Conformité réglementaire ;
- Revue des données bibliographiques ;
- Faisabilité technique ;
- Contrôle de la préparation et étude de la stabilité ;
- Analyse des risques ;
- Faisabilité économique.

Les données recueillies au cours de l'étude de faisabilité ont été regroupées dans un formulaire de faisabilité, document qualité interne à la PUI, disponible en annexe 7.

1. Statut de la préparation

1.1. Généralités

Les BPP définissent précisément les différents types de préparations pharmaceutiques. Il existe trois statuts des préparations : (i) La préparation magistrale (PM) ; (ii) La préparation hospitalières (PH) ; (iii) La préparation officinale (PO).

(i) La PM est définie par l'article L. 5121-1 du CSP comme : « *Tout médicament préparé en pharmacie, de manière extemporanée, selon une prescription médicale destinée à un malade déterminé en raison de l'absence de spécialité pharmaceutique disponible disposant d'une AMM, d'une ATU, d'une autorisation d'importation parallèle ou d'une autorisation d'importation délivrée à un établissement pharmaceutique dans le cadre d'une rupture de stock d'un médicament* » [57].

De cette définition, nous pouvons déduire que la PM est préparée extemporanément par l'unité de production pharmaceutique, pour un patient spécifique, et permet de répondre à l'impasse thérapeutique. Le caractère extemporané ainsi qu'un faible nombre d'unités produites permettent une certaine flexibilité vis-à-vis des instances de santé. C'est pourquoi les PM ne font pas l'objet d'une déclaration auprès de l'Agence Nationale de

Sécurité du Médicament et des produits de santé (ANSM). Ce type de préparation est particulièrement utile pour des patients présentant des besoins spécifiques en offrant la possibilité d'adapter la dose de principe actif ou la forme galénique. Ainsi, les PM sont particulièrement utiles chez les populations pédiatrique et gériatrique, pour lesquelles :

- La dose de principe actif administrée doit tenir compte du poids et/ou de la différence de métabolisation par rapport au sujet adulte ;
- L'administration des médicaments est souvent rendue difficile par les risques de fausse route et les troubles de la déglutition.

Elles permettent également de favoriser l'observance, d'améliorer la tolérance d'un traitement ou encore de mettre à disposition de nouvelles molécules visant à traiter des maladies orphelines.

(ii) La PH est définie par l'article L. 5121-1 du CSP comme : « *Tout médicament, à l'exception des produits de thérapies génique ou cellulaire, préparé selon les indications de la pharmacopée et en conformité avec les bonnes pratiques [...], en raison de l'absence de spécialité pharmaceutique disponible ou adaptée disposant d'une autorisation de mise sur le marché, [...] d'une autorisation d'importation parallèle ou d'une autorisation d'importation délivrée à un établissement pharmaceutique dans le cadre d'une rupture de stock d'un médicament, par une PUI d'un établissement de santé, ou par l'établissement pharmaceutique de cet établissement de santé [...]. Les PH sont dispensées sur prescription médicale à un ou plusieurs patients par une PUI dudit établissement* » [57].

Autrement dit, les PH sont préparées à l'avance et en série par l'unité de production pharmaceutique, pour un ou plusieurs patients, à une échelle quasi-industrielle. De ce fait, une vigilance accrue doit être portée au respect des bonnes pratiques. C'est pourquoi elles font l'objet d'une déclaration auprès de l'ANSM. Tout comme les PM, les PH sont particulièrement utiles chez les populations pédiatriques et gériatriques pour lesquelles les besoins sont spécifiques [30].

(iii) La PO est définie par l'article L. 5121-1 du CSP comme : « *Tout médicament préparé en pharmacie selon les indications de la pharmacopée et destiné à être dispensé directement aux patients approvisionnés par cette pharmacie* » [57].

Ces préparations sont réalisées spécifiquement en pharmacie d'officine et sont recensées dans un formulaire national approuvé par l'ANSM.

1.2. Préparation magistrale de glucoamylase

Destinée à une cohorte de 25 patients déjà traités avec la solution buvable d'invertase que nous préparons chez FRIPHARM®, notre solution buvable de glucoamylase sera préparée de manière extemporanée et sur ordonnance médicale. Le circuit de dispensation et de préparation sera identique à celui de la PM d'invertase. Par conséquent, notre solution buvable de glucoamylase porte le statut de PM et ne nécessite aucune déclaration auprès des instances de santé françaises.

2. Conformité réglementaire

La conformité réglementaire évalue l'intérêt pharmaco-thérapeutique et la pertinence de la préparation vis-à-vis de l'indication thérapeutique. Elle permet également de vérifier l'exactitude de la posologie envisagée en tenant compte des données bibliographiques disponibles dans la littérature.

2.1. Pertinence et intérêt pharmacothérapeutique de la préparation magistrale de glucoamylase

En association avec une enzymothérapie substitutive par la PM d'invertase déjà produite par la plateforme FRIPHARM®, notre PM de glucoamylase permettra de compléter la prise en charge thérapeutique du DCSI. Son intérêt pharmaco-thérapeutique a été jugé important en raison de l'absence d'alternative médicamenteuse permettant, à ce jour, de faciliter la digestion de l'amidon chez les enfants atteints de DCSI. La pertinence de la préparation a été confirmée par une balance bénéfice/risque favorable, en raison de la faible dose d'enzyme administrée et de son innocuité. Nous avons donc estimé que le bénéfice thérapeutique attendu du traitement surpasse largement le risque d'effets indésirables dudit traitement.

2.2. Choix d'une posologie

Afin de définir une posologie adaptée aux besoins des patients atteints de DCSI, un certain nombre de considérations biopharmaceutiques ont été prises en compte telles que :

- Le dosage de l'AE de notre solution de glucoamylase en conditions physiologiques ;
- La revue des données bibliographiques concernant les médicaments possédant une activité amylolytique.

2.2.1. Activité enzymatique de la glucoamylase en conditions physiologiques

Physiologiquement, l'amidon alimentaire est majoritairement dégradé dans le duodénum en 30 à 60 minutes [58]. Or en période postprandiale, le duodénum est légèrement acide (pH = 6) [59]. Pour estimer l'action de notre PM de glucoamylase en conditions physiologiques, nous avons réalisé en interne une mesure de son AE à 37°C et à pH = 6, à l'aide du réactif R-AMGR3 (MEGAZYME®, Irlande).

L'AE a été mesurée à 1320 UI/mL (37°C, pH 6).

A titre de rappel, l'AE de la glucoamylase est la quantité d'enzyme nécessaire pour libérer une μ mole de β -D-glucose par minute à partir d'amidon soluble. Les enfants âgés de 6 à 36 mois ingèrent entre 50 et 100 g d'amidon par jour, répartis en quatre repas, soit environ 20 g d'amidon par repas [60]. En approximant que la masse d'amidon ingérée donne une masse équivalente de glucose libéré, nous pouvons en déduire que 2 mL de notre solution de glucoamylase permettront d'hydrolyser la totalité de l'amidon ingéré lors d'un repas en 40 min. De la même manière, les enfants âgés de plus de 36 mois ingèrent entre 100 et 200 g d'amidon par jour, soit environ 40 g d'amidon par repas [61]. Nous pouvons en déduire que 4 mL de notre solution de glucoamylase permettront d'hydrolyser la totalité de l'amidon ingéré lors d'un repas en 40 min.

2.2.2. Spécialités possédant une activité amylolytique

A travers la revue des données disponibles dans la littérature scientifique, nous avons cherché à comparer l'activité amylolytique de différents traitements. Nous avons spécifiquement étudié trois spécialités : Bi-Myconase®, Starchway® et Créon®

2.2.2.1. Bi-Myconase®

Fabriqué par l'entreprise néerlandaise OMEGA PHARMA®, Bi-Myconase® est le seul médicament indiqué dans le traitement du DCSI à avoir proposé un mélange de saccharase et d'amylase [21]. Cette spécialité se présentait sous la forme d'une poudre pour administration orale dosée à 7500 UI d'invertase et 2500 UI de glucoamylase par prise de 500 mg. Bien que son efficacité ait été décrite et rapportée dès 1976 [62], Bi-Myconase® n'est plus commercialisé depuis 1998.

Nous pouvons toutefois souligner qu'une prise de 500 mg de ce médicament permet de faciliter la digestion de 20 à 60 g d'amidon [21].

Notons également que depuis l'arrêt de la commercialisation du Bi-Myconase®, une pharmacie néerlandaise propose une préparation équivalente sous forme de gélules (Figure 12). Cette alternative est toujours en vente au comptoir ou par l'intermédiaire de leur site internet, sur présentation d'une ordonnance médicale [63].



Figure 12 : Alternative au Bi-Myconase® proposée par la pharmacie d'Akker (Apotheek de Akker) [63]

2.2.2.2. Starchway®

Starchway® est un Complément Alimentaire (CA) produit par INTOLERAN® (anciennement DISOLUT®). Chaque gélule de Starchway® contient l'équivalent de 7500 UI d'invertase et 2500 UI de glucoamylase [64].

Du fait de son efficacité, les familles des patients ont rapporté avoir régulièrement recours à ce CA tout en soulignant l'absence de médicaments permettant de faciliter la digestion de l'amidon. En pratique, les symptômes du DCSI sont améliorés de manière significative à partir de trois gélules de Starchway® par repas, soit l'équivalent de 7500 UI de glucoamylase.

Cependant, certains inconvénients non négligeables doivent être notifiés :

- Le coût du traitement est élevé. En effet, il faut compter 54,95 € pour une boîte de 150 gélules soit un coût mensuel supérieur à 100 € pour une prise de 3 gélules par repas ;
- S’agissant d’un CA, Starchway® ne peut revendiquer aucune indication thérapeutique.

D’après le décret n°2006-352 du 20 mars 2006 disponible sur Légifrance, les CA sont : « *Les denrées alimentaires dont le but est de compléter le régime alimentaire normal et qui constituent une source concentrée de nutriments ou d'autres substances ayant un effet nutritionnel ou physiologique seuls ou combinés, commercialisées sous forme de doses, [...] destinées à être prises en unités mesurées de faible quantité* » [65].

Depuis plusieurs années, le marché des CA ne cesse de prendre de l’ampleur. Les études Individuelles Nationales des Consommations Alimentaires (INCA) menées tous les 7 ans par l’ANSES ont mis en évidence que la consommation de CA a presque doublé, entre 2007 et 2014, chez les Français âgés de plus de 3 ans (Tableau 12).

Tableau 12 : Taux de consommateurs (% et IC à 95 %) de CA au cours des 12 derniers mois, selon l’âge, dans les études INCA2 (2006-2007) et INCA3 (2014-2015) [66]

	INCA2 (n=1 455)	INCA3 (n=2 437)
3-6 ans	10,9 [7,4-15,7]	21,4 [16,7-27,0]
7-10 ans	11,6 [8,3-15,8]	18,2 [14,8-22,3]
11-14 ans	11,7 [8,7-15,5]	17,1 [13,5-21,4]
15-17 ans	11,8 [8,7-15,7]	17,1 [13,5-21,5]
Ensemble	11,5 [9,7-13,5]	18,5 [16,1-21,2]

	INCA2 (n=1 455)	INCA3 (n=2 437)
18-44 ans	20,7 [18,0-23,7]	31,7 [28,1-35,6]
45-64 ans	19,7 [16,9-22,8]	27,7 [24-31,8]
65-79 ans	16,7 [12,9-21,3]	21,9 [17,7-26,8]
Ensemble	19,7 [17,8-21,8]	28,5 [26,0-31,3]

Malgré cette croissance importante, il faut rappeler que ces produits ne sont pas des médicaments et ne peuvent donc revendiquer aucun effet thérapeutique. Tout comme les autres denrées alimentaires, les CA ne sont pas déclarés à l’ANSM, mais à la Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes (DGCCRF)

qui contrôle leur composition. Par conséquent, leur fabrication n'est pas soumise aux directives de la PE. De plus, la conclusion de l'ANSES par rapport aux CA est la suivante :
« De manière générale, en l'absence de pathologie, la couverture des besoins nutritionnels est possible par une alimentation variée et équilibrée dans le cadre d'une vie quotidienne physiquement active. La consommation de CA n'est alors pas nécessaire » [67].

2.2.2.3. Créon®

Fabriqué par MYLAN MEDICAL®, Créon® (Pancréatine) est un médicament indiqué dans le traitement de la mucoviscidose et de l'insuffisance pancréatique exocrine [68]. Cette spécialité se présente sous la forme de gélules gastrorésistantes contenant la pancréatine, une poudre de pancréas d'origine porcine permettant de fournir les enzymes nécessaires à la digestion des graisses, des protéines et des glucides.

Bien que Créon® n'ait aucune indication dans le traitement du DCSI, nous pouvons tenir compte de son activité amylolytique pour estimer au mieux la quantité de glucoamylase à administrer à nos patients. La pancréatine apporte 0,8 UI d'activité amylolytique pour 1 UI d'activité lipolytique [69]. La posologie recommandée de la pancréatine est la suivante :

- Chez l'enfant de moins de quatre ans, la dose d'enzymes doit tenir compte du poids et commencer avec 1 000 UI d'activité lipolytique soit 800 UI d'activité amylolytique par kg de poids corporel et par repas [70].
- Chez les enfants de plus de quatre ans et les adultes, la dose d'enzymes doit tenir compte du poids et commence avec 500 UI d'activité lipolytique soit 400 UI d'activité amylolytique par kg de poids corporel et par repas [70].

2.2.3. Conclusion

A travers ces données bibliographiques, nous pouvons retenir que :

- 2500 UI de glucoamylase permettent d'hydrolyser 20 à 60 g d'amidon ;
- 7500 UI de glucoamylase permettent d'améliorer significativement les symptômes du DCSI ;
- La posologie de la pancréatine apporte 800 UI d'activité amylolytique par kg de poids corporel et par repas.

Compte-tenu de l'ensemble des données bibliographiques et des mesures d'AE de la glucoamylase en conditions de test (40°C, pH 4,5) et en conditions physiologiques (37°C, pH 6), la posologie a été définie comme suit :

- Pour les enfants de moins de 15 kg : 2 mL par repas – soit l'équivalent de 10 800 UI de glucoamylase (40°C, pH 4,5) ;
- Pour les enfants de plus de 15 kg : 4 mL par repas – soit l'équivalent de 21 600 UI de glucoamylase (40°C, pH 4,5).

Il faut toutefois rappeler le caractère empirique de cette posologie. En effet, il n'existe aucune donnée sur le dosage relatif des enzymes nécessaires pour traiter les déficits enzymatiques causés par des pathologies comme le DCSI. De même, aucune données scientifiquement valides ne détaillent le moment optimal de la prise de glucoamylase. Dans l'état actuel des connaissances et pour des raisons de praticité (prise concomitante des solutions buvables d'invertase et de glucoamylase), nous recommanderons aux patients de prendre leur traitement au milieu des repas.

3. Données bibliographiques

La revue des données bibliographiques évalue la disponibilité de spécialités pharmaceutiques et les données toxicologiques et cliniques relatives aux composants de la préparation.

Comme nous l'avons déjà évoqué précédemment, il n'existe actuellement en France aucune spécialité pharmaceutique permettant de faciliter la digestion de l'amidon chez les patients atteints de DCSI. Bi-Myconase® n'est plus commercialisé, et les CA disponibles sur le marché ne sont pas autorisés à revendiquer cette indication.

D'après l'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments (EFSA), la glucoamylase obtenue à partir d'*Aspergillus niger* ne présente pas de risque de toxicité pour l'homme [71]. Les données toxicologiques relatives aux excipients de la solution sont mentionnées dans la fiche de données de sécurité du fournisseur, le *Handbook of Pharmaceutical Excipients* [72], et la liste des excipients à effets notoire de l'ANSM [73]. Elles sont résumées dans le Tableau 13 ci-dessous.

Tableau 13 : Rôles, effets notoires et doses seuils des excipients de l'AMYLO®

Excipient	Rôle(s)	Effet(s) notoire(s)	Seuil
Eau	Solvant	N/A	N/A
Glycérol	Solvant, Agent de texture	Troubles digestifs, Maux de tête	10 g / dose
Glucose	Agent liant	Apport calorique	5 g / dose
Sodium	Agent de tonicité	Troubles digestifs, Augmentation de la pression artérielle	23 mg / dose
Benzoate de sodium	Agent de conservation antimicrobien	Nausées, Vomissement, Troubles digestifs, Ictère chez le nouveau-né	0 g / dose
Sorbate de potassium	Agent de conservation antimicrobien	N/A	N/A

D'après le tableau 13, les quantités de glycérol, de glucose et de sodium administrées à nos patients à chaque dose sont inférieures aux valeurs seuils. Seul le benzoate de sodium (E211) est susceptible d'engendrer des effets notoires et doit être pris en considération.

Nous ne connaissons pas précisément la concentration en benzoate de sodium dans l'AMYLO®. Notons toutefois qu'en association avec le sorbate de potassium, la dose de benzoate de sodium en tant qu'additif pour la conservation des solutions de glucoamylase est relativement faible. Une évaluation chimique et technique de la glucoamylase a été menée par l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture. Dans cette évaluation, une composition représentative pour la formulation commerciale d'une solution de glucoamylase est donnée. La quantité de benzoate de sodium est de $0,30 \pm 0,05$ % (m/V) et la quantité de sorbate de potassium est de $0,11 \pm 0,02$ % (m/V) [74].

Compte tenu de la posologie et des données évoquées ci-dessus, nous avons estimé que la quantité journalière en benzoate de sodium apportée par notre traitement est d'environ 28 mg pour les enfants de moins de 15 kg, et d'environ 56 mg pour les enfants de plus de 15 kg.

Selon le poids du patient, nous approchons la limite haute de la Dose Journalière Acceptable (DJA) de l'OMS, comprise entre 0 et 5 mg de benzoate de sodium par kg de

poids corporel [72], [75]. Notons cependant que la DJA ne représente pas un seuil de toxicité mais un niveau d'exposition jugé exempt de tout risque pour le consommateur pendant toute la durée de sa vie. Elle est obtenue à partir d'études de toxicité à long terme chez l'animal, au cours desquelles on détermine la Dose Sans Effet Indésirable Observé (DSEIO). Cette valeur est ensuite divisée par un facteur de sécurité (généralement 100) pour aboutir à la DJA applicable à l'homme [76]. Notons également que d'après l'avis scientifique de l'EFSA sur la réévaluation du benzoate de sodium en tant qu'additif alimentaire, la DJA est très régulièrement dépassée chez les enfants consommant des boissons aromatisées, des fruits et des légumes [77].

Par conséquent, le niveau de risque de toxicité de la PM de glucoamylase a été jugé faible, donc acceptable. La notice de la préparation devra toutefois faire mention de la présence de benzoate de sodium dans la solution et de ses potentiels effets notoires. Une attention particulière sera également portée sur les effets indésirables de notre préparation et le traitement sera immédiatement stoppé en cas de doute.

4. Faisabilité technique

4.1. Matériel et locaux

Pour la réalisation de ces activités, la plateforme FRIPHARM® dispose de 900 m² de locaux, autorisés par l'ARS, pour la production et le contrôle de médicaments hospitaliers et expérimentaux [38]. Sont notamment aménagés au sein de la plateforme :

- Une Zone de Production Non Stérile (ZPNS) pour la préparation des médicaments non stériles ;
- Une Zone de Production Stérile (ZPS) pour la préparation des médicaments stériles ;
- Un LCQ pour le contrôle des MP et des préparations fabriquées.

S'agissant d'une solution buvable, la PM de glucoamylase est une préparation non stérile. Sa fabrication sera donc effectuée dans la salle « liquide » de la ZPNS.

4.2. Personnel

L'ensemble des activités de la plateforme pharmaceutique est assuré par une équipe qualifiée, composée d'opérateurs, de préparateurs en pharmacie, de techniciens de laboratoire, d'internes et de pharmaciens hospitaliers.

La fabrication de la PM de glucoamylase est réalisée spécifiquement par les préparateurs en pharmacie. La protection du personnel et de la PM est assurée par le port d'une blouse stérile, d'une charlotte, d'un masque, de gants stériles et de sur-chaussures. Un lavage des mains suivi d'une désinfection sont effectués conformément aux instructions en vigueur.

Les préparateurs de la plateforme FRIPHARM® sont déjà familiarisés avec le processus de préparation de la solution buvable de glucoamylase car il est très similaire à celui de la solution buvable d'invertase. Par conséquent, leur formation spécifique individuelle n'a pas été jugée nécessaire.

4.3. Formulation galénique

Afin de garantir la compatibilité physico-chimique de l'enzyme et des excipients, nous avons fait le choix de conserver la formulation de l'AMYLO®. Aucun excipient supplémentaire n'est ajouté et la fabrication de la PM consiste simplement à reconditionner la MP en flacons. Cette répartition est effectuée à l'aide d'une pompe péristaltique de la marque INTEGRA®.

En considérant un nombre moyen de quatre repas par jour, la quantité mensuelle de solution buvable nécessaire est de 240 mL pour les enfants de moins de 15 kg et de 480 mL pour les enfants de plus de 15 kg. Pour les familles des patients, il est préférable de posséder plusieurs flacons afin de les répartir dans les différents lieux de vie de l'enfant (à la maison, à l'école, chez l'assistante maternelle, etc.). Nous avons donc opté pour un conditionnement en flacons de 60 mL. Ainsi, chaque mois, quatre flacons seront dispensés aux enfants de moins de 15 kg et huit aux enfants de plus de 15 kg.

4.4. Circuit de la matière première et des articles de conditionnement

S'agissant d'un simple reconditionnement, la MP provenant de KERRY® est le seul composant de la fabrication de la PM de glucoamylase. Les contrôles effectués sur cette MP sont détaillés dans le BAMP (Tableau 11).

Les articles de conditionnement ainsi que le dispositif d'administration utilisés sont adaptés à un usage pharmaceutique et sont composés de matériaux décrits à la PE. Il s'agit :

- De flacons en verre ambré (type II) de 60 mL ;
- De bouchons blancs inviolables en polyéthylène (pour le joint du bouchon en contact direct avec la PM) et en polypropylène (pour la coque et la bague d'invulnabilité n'étant pas en contact avec la PM) ;
- De seringues graduées de 5 mL en polypropylène permettant de faciliter le prélèvement et l'administration de la solution buvable de glucoamylase.

4.5. Circuit de préparation, de contrôle et de libération d'un lot

Une fiche de fabrication illustrée a été rédigée. Il s'agit d'un document qualité interne à la PUI. Un Dossier de Lot Electronique (DLE) a également été créé conformément à la politique qualité de notre plateforme pharmaceutique. Il permet de traçage et la validation des lots fabriqués. Le processus de préparation de la solution buvable de glucoamylase comporte 5 étapes :

- La pré-production ;
- La production ;
- La post-production ;
- Les contrôles ;
- La libération.

4.5.1. Pré-production

Les opérateurs réalisent les opérations de pré-production au plus tard la veille de la production. Ces opérations consistent à préparer le matériel nécessaire :

- Articles de conditionnement : flacons en verre ambré (type II) de 60 mL, bouchons blancs inviolables ;

- Matériel pharmaceutique : bécher de 5 L, éprouvette graduée de 100 mL, Pompe péristaltique INTEGRA® et tubulure ;
- Étiquettes.

En fonction de la taille du lot qui doit être fabriqué, un nombre suffisant de flacons ambrés et de bouchons inviolables est collecté puis lavé. Les flacons sont ensuite autoclavés et les bouchons non-autoclavables sont mis en sachet. Ensuite, les préparateurs réalisent la cueillette du matériel.

Les opérations de pré-production doivent être tracées dans le DLE.

4.5.2. Production

La MP doit être récupérée dans la chambre froide. Le bidon est nettoyé à la lingette désinfectante avant d'entrer dans la ZPNS.

La répartition de la MP dans les flacons s'effectue sur la paillasse de la salle « Liquide », selon le protocole suivant :

- Verser de la solution d'AMYLO® dans un bécher propre de 5 L.
- Peser un flacon ambré type II de 60 mL avec son bouchon blanc inviolable et faire la tare.
- Mettre en place la tubulure dans la pompe péristaltique INTEGRA®.
- Mettre une extrémité de la tubulure dans le bécher (l'autre extrémité de la tubulure servira à remplir les flacons).
- Sélectionner le programme adéquat.
- Sélectionner « Amorcer » pour purger la tubulure.
- Une fois la tubulure purgée, sélectionner « Calibrer » pour ajuster le volume de la pompe à 60 mL. Faire la calibration dans une éprouvette de 100 mL. Pour ce faire, sélectionner « Dose ».
- *Si le volume lu à l'éprouvette ne correspond pas au volume attendu, aller sur « Volume mesuré » et changer par le volume lu à l'éprouvette puis sélectionner « Continuer ». Répéter l'étape de calibration jusqu'à obtenir un volume lu à l'éprouvette qui correspond au volume attendu dans chaque flacon.*
- Une fois la calibration finie, sélectionner « Start » pour commencer le remplissage des flacons.

Après leur remplissage, les flacons sont bouchés par un deuxième préparateur puis pesés. Toutes les pesées doivent être reportées dans le DLE. Pour finir, chaque flacon est étiqueté avec une étiquette provisoire dont le numéro doit correspondre au numéro du tableau de traçabilité des pesées du DLE.

L'interne de pharmacotechnie doit vérifier la totalité des données relatives aux étapes de pré-production et de production dans le DLE.

4.5.3. Post-production

Un vide de ligne est réalisé. Il consiste à s'assurer de l'absence de flacons dans la salle de production et à nettoyer le matériel et les surfaces contaminées. Cette opération doit être réalisée après chaque changement de lot. Il s'agit d'une exigence réglementaire et d'une condition indispensable à l'assurance de la qualité pharmaceutique et la sécurité du patient.

Dans la salle « Post-production », les flacons préparés sont étiquetés avec une étiquette définitive puis regroupés dans un carton. Quatre flacons sont pris au hasard dans le lot fabriqué :

- Deux unités conformes de la PM sont adressées au LCQ pour des analyses physico-chimiques et microbiologiques ;
- Bien que non obligatoire pour les PM, deux autres unités conformes sont conservées pour l'échantillothèque.

En attendant la libération du lot, le carton contenant les flacons est étiqueté avec une étiquette bleue « EN CONTRÔLE » (Figure 13) puis mis en quarantaine dans la chambre froide conformément aux recommandations pour le stockage de la solution de glucoamylase. La date de mise en quarantaine doit figurer sur l'étiquette.

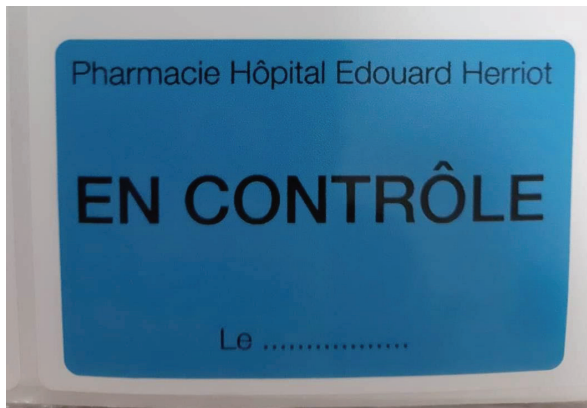


Figure 13 : Étiquette bleu « EN CONTRÔLE » pour la mise en quarantaine du lot fabriqué



4.5.4. Contrôles

A l'issue de la répartition, deux flacons choisis au hasard dans le lot de production sont acheminés vers le LCQ pour subir une série de contrôles à caractères libératoires. Ces contrôles réalisés sur site ou externalisés consistent à :

- Évaluer la conformité des caractères organoleptiques ;
- Mesurer le pH de la solution ;
- Déterminer la charge microbienne conformément aux spécifications de la PE.

Un Bulletin d'Analyse Produit Fini (BAPF) a été rédigé (Tableau 14). Il s'agit d'un document qualité interne à la PUI qui détaille l'ensemble des contrôles devant être effectué sur les médicaments, après leur fabrication. Les résultats des analyses physico-chimiques et microbiologiques doivent être renseignés dans le DLE.

Tableau 14 : BAPF de la PM de glucoamylase

 GH Centre	BULLETIN D'ANALYSE PRODUIT FINI Version 04 - Date de mise à jour : 03/11/2020 ENREGISTREMENT	Service Pharmaceutique UPCM  FRI PHARM CTRL-EN-015
--	---	--

BULLETIN D'ANALYSE PRODUIT FINI
 Rédaction : R. LAMBERT Modification : Validation : C. MERIENNE Signature :
 Version N° : 1 Validé le : 13/08/2021

SOLUTION BUvable DE GLUCOAMYLASE - 60 mL	Lot	
	Ordonnancier	
	Date	

Indication	Déficit congénital en Saccharase Isomaltase		
Conditionnement	Flacon en verre ambré de 60 mL		
Masse ou volume de remplissage	60 mL		
Formulation pour 1 unité	Glucoamylase	5400 UI/mL	
	Glycérol	20 - 30 %	
	Eau	50 - 60 %	
Précaution de manipulation	Liste 0		
Conditions de stockage	Entre + 2 et + 8°C, à l'abri de la lumière		

Conformité des prélèvements		Contrôle	Echantillonnage
	Nombre d'unités prévues	2	2
	Nombre d'unités reçues		
	Acheminement conforme		
	Conformité des unités		
Nombre d'unités prévues			
Physicochimie	Comptage particulaire	Stérilité	Endotoxines
1			1

CONTROLES PHYSICO CHIMIQUES

Contrôles	Spécifications	Résultats	Conformité	Appareil Réactifs	Date	Signature
CTRL-IN-010 Caractères organoleptiques	Liquide fluide et limpide, couleur ambre, odeur caractéristique					
CTRL-IN-011 pH (Ph. Eur. 2.2.3)	4,00 - 5,00			SUP-IN 010		


CONTROLES MICROBIOLOGIQUES

CTRL-IN-019 Contrôle microbiologique des produits non stériles : essais de dénombrement microbien (Ph. Eur.: 2.6.12)						
Spécificités de l'échantillon : 1 flacon						
Contrôles et spécifications	Norme	Résultats	% Erreur - Conformité	Appareil	Date	Signature
Flora aérobie totale à 30°C (DGAT)	< 100 UFC/g (ou mL)					
Moisissures et levures totales (DMLT)	< 10 UFC/g (ou mL)					
<i>Escherichia coli</i>	Absence dans 1 g / 1 mL					

COMMENTAIRES:

3.2 BILAN DE BAPF: CONFORMITES DES CONTROLES

NOM DU PHARMACIEN	
DATE	



Page : 1 de 1

votre santé, notre engagement

L'interne et le pharmacien du laboratoire de contrôle réalisent la validation technique et pharmaceutique des contrôles.

4.5.5. Libération

À l'issue de toutes ces opérations, un pharmacien vérifie l'ensemble du DLE et procède à la libération du lot de PM de glucoamylase. Les préparateurs réalisent la sortie de quarantaine et le carton contenant les flacons est étiqueté avec une étiquette verte « ACCEPTÉ » (Figure 14). La date de sortie de quarantaine doit figurer sur cette étiquette. Enfin, le DLE est sauvegardé électroniquement, imprimé et classé.

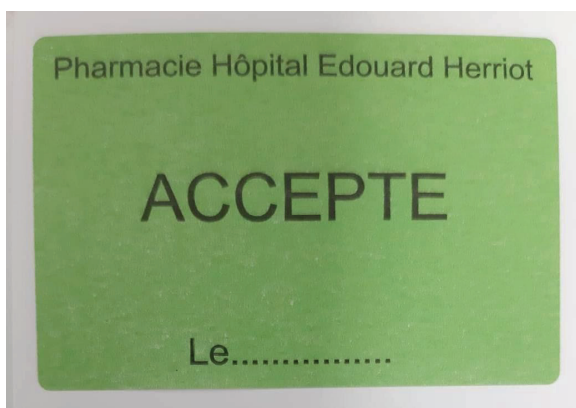


Figure 14 : Étiquette verte « ACCEPTÉ » pour la sortie de quarantaine du lot fabriqué

Avant leur délivrance, chaque flacon de PM de glucoamylase est ensaché dans un sachet thermosoudable avec une notice et une seringue de 5 mL.

5. Contrôle de la stabilité de la préparation

La stabilité des préparations pharmaceutiques est un élément essentiel de leur bon usage. Une préparation est considérée comme stable lorsque ses propriétés essentielles sont inchangées ou que leurs variations ne dépassent pas les limites d'acceptabilités.

Les causes d'instabilité sont multiples et mettent essentiellement en jeu des phénomènes d'ordre chimique, physique ou microbiologique.

Les altérations chimiques peuvent survenir de manière spontanée ou retardée, et font intervenir des réactions d'hydrolyse, d'oxydoréduction, de photolyse, de racémisation et d'épimérisation. L'instabilité physique peut se traduire par l'apparition d'un trouble, d'une précipitation, d'un changement de la coloration ou de la viscosité du produit. Lorsque l'intégrité du conditionnement de la préparation est altérée, une instabilité d'ordre microbiologique peut également apparaître [78].

Afin de garantir la stabilité d'une préparation pharmaceutique une étude de stabilité doit être conduite pour étudier l'évolution des paramètres clés dans des conditions de stress. L'étude de la stabilité de notre PM de glucoamylase sera menée sur un lot pilote. Les flacons seront conservés dans des conditions défavorables de température et d'Humidité Relative (HR) pendant des durées déterminées aux termes desquelles, les paramètres clés seront contrôlés. Trois conditions de conservation seront étudiées :

- Vieillissement normal : $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$
- Vieillissement accéléré : $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$
- Vieillissement accéléré : $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$; HR $75 \pm 5\%$

Identiques à ceux réalisés sur la MP, les contrôles seront effectués immédiatement après la fabrication du lot (J0), et après un mois (M1), deux mois (M2), trois mois (M3) et six mois (M6) de conservation. Un Bulletin d'Analyse Etude de Stabilité (BAES) a été rédigé (Tableau 15). Il s'agit d'un document qualité interne à la PUI qui guide la réalisation de l'étude de stabilité.



GH Centre

Bulletin d'analyse étude de stabilité

Version n°04 -Date de mise à jour : 11/08/2021

ENREGISTREMENT

Service Pharmaceutique
UPCM



FRI PHARM

CTRL-EN-018

BULLETIN D'ANALYSE ETUDE DE STABILITE

Rédaction : R. LAMBERT

Modification :

Validation : C. MERIENNE

Signature :

Version N° : 1

Validé le : 13/08/2021

CONTROLES MICROBIOLOGIQUES

⑤ CTRL-IN-019 Contrôle microbiologique des produits non stériles : essais de dénombrement microbien (Ph. Eur.: 2.6.12)

Spécificités de l'échantillon :

Prélever 30 mL dans un poudrier stérile

Contrôles	Spécifications	Résultats	Conformité	Appareil Réactifs	Date	Signature
Salmonella	Absence dans 1 g / 1 mL					
Flora aérobie totale (DGAT)	< 100(0) UFC/g (ou mL)					
Moisissures et levures (DMLT)	< 10(0) UFC/g (ou mL)					
Bactérie spécifique 1	Absence dans 1 g / 1 mL					
Bactérie spécifique 2	Absence dans 1 g / 1 mL					

COMMENTAIRE



GH Centre

Bulletin d'analyse étude de stabilité

Version n°04 -Date de mise à jour : 11/08/2021

ENREGISTREMENT

Service Pharmaceutique
UPCM



FRI PHARM

CTRL-EN-018

BULLETIN D'ANALYSE ETUDE DE STABILITE

Rédaction : R. LAMBERT

Modification :

Validation : C. MERIENNE

Signature :

Version N° : 1

Validé le : 13/08/2021

PLANIFICATION

PLANNING DES CONTRÔLES ET NOMBRES D'UNITES NECESSAIRE

Période de stabilité	Analyses réalisées	Nombre d'unités nécessaires	Conditions de conservation (Enceinte climatique)
J0	①②③④⑤	5	Viellissement normal : 5 ± 3°C
		5	Viellissement accéléré : 25 ± 2°C
		5	Viellissement accéléré : 40 ± 2°C ; HR 75 ± 5%
M1	①②③④⑤	5	Viellissement normal : 5 ± 3°C
		5	Viellissement accéléré : 25 ± 2°C
		5	Viellissement accéléré : 40 ± 2°C ; HR 75 ± 5%
M2	①②③④⑤	5	Viellissement normal : 5 ± 3°C
		5	Viellissement accéléré : 25 ± 2°C
		5	Viellissement accéléré : 40 ± 2°C ; HR 75 ± 5%
M3	①②③④⑤	5	Viellissement normal : 5 ± 3°C
		5	Viellissement accéléré : 25 ± 2°C
		5	Viellissement accéléré : 40 ± 2°C ; HR 75 ± 5%
M6	①②③④⑤	5	Viellissement normal : 5 ± 3°C
		5	Viellissement accéléré : 25 ± 2°C
		5	Viellissement accéléré : 40 ± 2°C ; HR 75 ± 5%

COMMENTAIRE

DECISION : Accepté / Refusé

Date:

Nom / Signature:

L'étude de la stabilité de la PM de glucoamylase permettra d'estimer la Date Limite d'Utilisation (DLU). En attendant les résultats de cette étude, la DLU a été fixée à 6 mois après la fabrication, sous réserve qu'elle ne dépasse pas la DLU de la MP.

6. Analyse et gestion des risques

Le risque est un événement potentiel qui peut entraver la réalisation des objectifs, porter atteinte à la santé, causer des dommages à la propriété et à l'environnement du lieu de travail ou une combinaison de ces éléments. Il peut survenir à tout moment lors du processus de fabrication.

6.1. Généralités

Pour identifier, évaluer et prévenir ces événements, la gestion de risques est indispensable. Elle soutient la réalisation des objectifs en identifiant, évaluant et prévenant les événements qui entraverait la réalisation desdits objectifs. Supportée par une stratégie d'amélioration continue, elle contribue à assurer la qualité des produits, la sécurité des patients et du personnel médical, et à préserver l'environnement. C'est un processus qui supporte et facilite une meilleure prise de décision lorsqu'un problème survient, et qui permet une prise de décision plus éclairée. Les étapes de la gestion du risque sont les suivantes : (i) Identification du risque ; (ii) Analyse du risque ; (iii) Maîtrise du risque ; (iv) Évaluation du risque global de la préparation ; (v) Acceptation du risque.

(i) L'identification des risques consiste à déterminer les modes de défaillances potentielles, les causes premières de ces défaillances, et les conséquences potentielles pour chaque étape qui compose le processus de fabrication du médicament. En pratique, les modes de défaillance ainsi que les causes premières sont identifiés par la question suivante : « Qu'est-ce qui pourrait aller mal et pourquoi ? ».

(ii) L'analyse des risques identifiés suit la méthode AMDEC (Analyse des Modes de Défaillance, de leurs Effets, et de leur Criticité). Elle consiste à relier de manière qualitative ou quantitative, la probabilité d'apparition et la gravité de la défaillance. La probabilité qu'une défaillance entraîne des conséquences peut être minimisée grâce à la capacité à détecter et à maîtriser cette défaillance avant que ces conséquences n'arrivent. En pratique, pour chaque risque identifié, la fréquence de survenue, la sévérité et la détectabilité seront évaluées par les questions suivantes :

- « Quelle est la probabilité du risque ? »
- « Quelles sont les conséquences du risque ? »
- « Quelle est notre capacité à détecter l'événement ? »

Des tables de cotation (Tableau 16) permettent d'attribuer un score à chacun de ces 3 facteurs et de calculer la criticité par la formule suivante :

$$\text{Criticité} = \text{Fréquence} \times \text{Sévérité} \times \text{Déteçtabilité}$$

Tableau 16 : Tables de cotation AMDEC pour la fréquence, la sévérité et la déteçtabilité des risques

FREQUENCE	PROBABILITE	INDICE
Inexistante <i>Pas d'occurrence connue</i>	1 / 10 000	1
Basse <i>Possible mais pas de données existante</i>	1 / 5 000	4
Modéré <i>Documentée mais peu fréquente</i>	1 / 200	6
Élevée <i>Documentée et fréquente</i>	1 / 50	8
Très élevée <i>Erreur pratiquement certaine</i>	1 / 10	10
SEVERITE		INDICE
Ennui léger		1
Problème systémique léger		3
Problème systémique majeur		5
Atteinte mineure du patient		6
Atteinte majeure du patient		7
Atteinte terminale ou décès du patient		9
DETECTABILITE	PROBABILITE	INDICE
Très élevée <i>Détection systématique</i>	9 / 10	1
Élevée <i>Forte probabilité de détection</i>	7 / 10	3
Modérée <i>Probabilité moyenne de détection</i>	5 / 10	6
Basse <i>Faible probabilité de détection</i>	2 / 10	8
Inexistante <i>Détection impossible dans le système</i>	0 / 10	9

(iii) Afin de réduire le risque à un niveau acceptable, des actions de mitigations peuvent être mises en œuvre telles que la suppression de la cause première, la réduction des conséquences, de l'impact ou de la probabilité ou encore l'augmentation de la détectabilité de la défaillance. En pratique, nous devons être capable de répondre aux questions suivantes :

- « Que peut-il être fait pour réduire ou éliminer le risque ? »
- « Quel est le bon équilibre entre les avantages, les risques et les ressources ? »
- « De nouveaux risques seront-ils introduits à la suite de la mise en œuvre des actions de réduction de risque ? »

(iv) Le niveau de risque global de la préparation est évalué par la détermination de la criticité moyenne (Tableau 17) et différentes actions peuvent être exigées en fonction de son importance. Ainsi, un niveau de risque global très faible est directement acceptable sans actions complémentaires. Pour un niveau de risque global allant de faible à modéré, le traitement et la réduction des risques peuvent être recommandés. La seule obligation de maîtrise des risques demeure lorsque le niveau de risque global est important. Les actions de mitigation envisagées devront alors être instaurées en amont de la réalisation de l'activité.

Tableau 17 : Niveau de risque global en fonction de la criticité moyenne

Risque global	IC moyen
Important	336-810
Modéré	180-336
Faible	36-180
Très faible	1-36

(v) L'acceptation du risque est la dernière étape dans le processus de gestion des risques. Il s'agit d'une décision formelle d'approuver le risque à un niveau jugé acceptable. Ce niveau est spécifique à chaque évaluation de risque et est préalablement défini.

6.2. Analyse et gestion des risques de la préparation

Conformément au processus d'analyse et de gestion des risques décrit précédemment, une cartographie des risques a priori liée à la fabrication de la PM de glucoamylase a été réalisée (Tableau 18). Les indices de criticité calculés et moyennés ont permis l'obtention d'un score total correspondant à un risque global faible et acceptable (Tableau 19).

Tableau 18 : Analyse de risques de la PM de glucoamylase

N°	Etapes de production	Situation de danger	Causes	Conséquences	Moyens de maîtrise	Fréquence	Sévérité	Déteçtabilité	Indice de criticité	Proposition d'amélioration
PRE-PRODUCTION										
1	Préparation du matériel nécessaire	1. Erreur de choix du matériel 2. Matériel manquant	1. Erreur humaine 2. Organisation	Retard de production	1. Rangement et préparation à l'avance du matériel nécessaire par les OP dans une caisse 2. Mise en place d'une étape de pré-production dans les DLE (Checklist du matériel et vérification tracé des préparateurs du matériel avant l'entrée en salle)	6	1	1	6	
2	Décontamination à la lingette du bidon	Mauvaise décontamination	CTA défectueuse	Risque de contamination microbiologique	Vérification de la CTA	4	3	3	36	
3	Engagement des matières premières	1. Confusion entre deux MP dans la chambre froide 2. Informations manquantes dans DLE (Laboratoire + DLU + lot + quantité) 3. Utilisation de MP périmées ou à DLU courte	1. Erreur humaine 2. Organisation 3. Etiquetage/rangement 4. Oubli de traçabilité du DLE	Non-conformité du mélange	1. Séparation du bidon de glucoamylase des bidons d'invertase dans la CF 2. Double contrôle par préparateurs	4	9	3	108	
4	Lavage des mains et hygiènes	1. Lavage des mains mal réalisé 2. Oubli de retirer bijoux et maquillages	1. Erreur humaine 2. Organisation 3. Non respect des procédures	Risque de contamination microbiologique	1. Flacon de solution hydroalcoolique à l'entrée de la ZPHS 2. Formation & Habilitation & Déshabilitation	6	5	6	180	
5	Habillage	Habillage non conforme aux procédures	1. Erreur humaine 2. Organisation 3. Non respect des procédures	Risque de contamination microbiologique	1. Présence d'une affiche sur les bonnes pratiques 2. Formation & Habilitation & Déshabilitation	6	5	6	180	
6	Préparation paillasse (nettoyage + champ + matériel de production)	Nettoyage mal réalisé	1. Erreur humaine 2. Organisation	Risque de contamination microbiologique	Standardisation des pratiques pour toutes les préparations et automatisme enseigné aux préparateurs	6	5	3	90	
PRODUCTION										
7	Prélèvement de la matière première et remplissage des flacons	Imprécision sur la pesée de la MP	Défaut de visibilité du niveau de liquide	Non-conformité du volume final	Double contrôle par les préparateurs	4	3	3	36	
8	Fermeture de flacons Bouchage / Sertissage manuel par rotation du bouchon	Mauvais bouchage et contamination microbiologique	1. Erreur humaine 2. Pas d'équipement adéquat 3. Etape fastidieuse et douloureuse	1. Risque de contamination particulaire et/ou microbiologique 2. Risque pour le personnel de troubles musculo-squelettiques	1. Inspection visuelle 2. Demande de financement d'une boucheuse sertisseuse automatique	6	7	3	126	En attendant un équipement de bouchage automatique des flacons pour diminuer les risques de troubles musculo-squelettiques
POST-PRODUCTION										
9	Etiquetage	1. Oubli d'étiquetage 2. Information erronée sur l'étiquetage (Nom du patient, DLU, non prise en compte des MP)	1. Erreur humaine 2. Organisation	Non-conformité de la préparation	1. Impression du nombre exact d'étiquettes + foliotage 2. Double contrôle des étiquettes par 2 préparateurs 3. Validation de production par un pharmacien 4. Libération du lot par un autre pharmacien	8	6	3	144	
10	Dénombrement	Mauvais dénombrement	1. Erreur humaine 2. Organisation	Lot refusé	1. Impression du nombre exact d'étiquettes + foliotage 2. Dénombrement après chaque étape (avant et après les étapes de réparation, de sertissage, d'étiquetage, et d'encartonnage)	4	3	3	36	
11	Emballage / Encartonnage	1. Mauvais emballage 2. Oubli de l'emballage 3. Oubli de stockage dans le réfrigérateur	1. Erreur humaine 2. Organisation	Altération du produit à long terme si non respect de la température de conservation	1. Double contrôle du préparateur 2. Contrôle par préparateur du stockage au réfrigérateur 3. Suivi des températures avec sondes reliées à un logiciel	4	6	3	72	
12	Nettoyage / Vide de ligne de la salle	Nettoyage du matériel, des surfaces et de la salle	Mauvais nettoyage, mauvaise information/formation	Non aseptisé	Procédure entretien et nettoyage des locaux	4	3	6	72	
13	Mise en quarantaine	Sortie de quarantaine avant libération	1. Erreur humaine 2. Organisation	Utilisation d'un produit avec contrôle pharmaceutique non accepté	Etiquetage de chaque lot en quarantaine avec mention de la date de mise en quarantaine	4	3	3	36	
14	Echantillonnage (laboratoire de contrôle et échantillonnage)	Echantillonnage non réalisé	1. Erreur humaine 2. Organisation	Pas de (re)contrôle possible du lot fabriqué	1. Affiche 2. Echantillonnage tracé dans DLE 3. Echantillonnage tracé dans la GEODP	4	3	6	12	
15	Contrôles de la préparation	Résultats des contrôles bactériologiques (bioburden), et physicochimiques erronés	1. Erreur humaine 2. Organisation	Libération d'un lot contaminé ou dosage non conforme	1. Vérification du bulletin d'analyse de la MP et du produit fini dans le dossier de lot 2. Validation initiale des méthodes analytiques dans la phase de développement analytique 3. Validation continue via Contrôle qualité à chaque analyse 4. Validation technique	4	9	3	108	
16	Libération du lot	Vérification du dossier de lot par les pharmaciens habilités	Mauvais remplissage du dossier de lot	Libération d'un lot non conforme	Revue écrite tous les étapes de la fabrication du lot de manière claire et lisible	4	6	3	72	

Tableau 19 : Résultats de l'analyse de risque de la PM de glucoamylase

IC total	1314
IC moyen	82
IC max	180

7. Faisabilité économique

La PUI de l'hôpital Édouard Herriot a mis en place un outil automatisé pour le calcul du coût des préparations pharmaceutiques magistrales et hospitalières. Ce dispositif permet de valoriser son activité et de facturer les préparations aux services consommateurs, conformément à l'article L. 162-16-5 du Code de la Sécurité Sociale [81], et à l'article 281 octies du Code Général des Impôts [82]. Trois situations ont été définies [83] :

- Un prix 1, appliqué aux cessions internes des unités de soins des HCL. Il correspond à la somme des coûts des consommables utilisés au cours de la fabrication ;
- Un prix 2, appliqué à la rétrocession des préparations par les PUI des HCL. Il comprend le coût des consommables et les dépenses liées au personnel, majoré de la TVA et d'une marge forfaitaire de rétrocession [84] ;
- Un prix 3, appliqué aux cessions des établissements extérieurs aux HCL. Il comprend le coût des consommables, les dépenses liées au personnel et des frais de structure et de logistique pour lesquels une TVA est appliquée.

Le coût unitaire défini est rapporté au nombre d'unités libérées permettant de prendre en compte celles dédiées au contrôle et à l'échantillothèque. Le nombre d'unités libérées doit permettre le traitement mensuel d'un enfant de plus de 15 kg (posologie maximale). Les coûts obtenus ayant permis la demande de codification à la Pharmacie Centrale des HCL afin de pouvoir facturer la PM sont ainsi de :

- Prix 1 : 10,1 € ;
- Prix 2 : 30,9 € ;
- Prix 3 : 38,6 €.

Si ces prix semblent élevés, rappelons la nécessité de réaliser la PM en atmosphère contrôlée, avec des matériaux de qualité pharmaceutique, et des contrôles en post-production. Notons également que les coûts de la préparation ont été calculés sur un lot de 100 unités et pourront être réévalués si les lots fabriqués sont plus conséquents.

IV. DISCUSSION GENERALE

Notre travail s'est intéressé à la mise au point d'une préparation pharmaceutique de glucoamylase au sein de la plateforme FRIPHARM® pour compléter la prise en charge thérapeutique du DCSI.

En l'absence de glucoamylase destinée à un usage pharmaceutique disponible sur le marché, nous avons choisi de faire appel à un laboratoire agroalimentaire comme fournisseur de MP. Bien que son origine ait suscité des interrogations quant à la qualité de la MP, la littérature fait mention de plusieurs préparations pharmaceutiques ayant été réalisées à partir de MP non référencées dans la PE. Citons notamment la PM d'invertase que nous fabriquons au sein de FRIPHARM®, également réalisée à partir d'une enzyme alimentaire [30].

Le choix du fournisseur s'est naturellement porté sur KERRY® auprès duquel nous commandons notre invertase depuis 2017. En effet, le recul de 5 ans d'expérience auprès de ce laboratoire agroalimentaire a constitué un élément décisif.

Compte tenu de son origine, nous avons réalisé en interne une QP de la MP conformément à la PE en vigueur [44]. S'agissant d'un produit d'origine biologique destiné à une administration par voie orale, plusieurs essais ont été menés tels que la mesure des caractéristiques physicochimiques, le contrôle de la qualité microbiologique et le dosage de l'AE de la glucoamylase. Nous n'avons pas pu effectuer le screening des solvants résiduels ni vérifier l'absence de métaux lourds. Toutefois, la glucoamylase est destinée à un usage alimentaire et répond de ce fait à un certain nombre de critères d'innocuité. En effet, le programme de sûreté et de sécurité des produits alimentaires fabriqués par KERRY® est basé sur une méthode HACCP attestant l'absence de métaux lourds et de contaminants chimiques, physiques, microbiologiques et allergéniques dans la MP. Les résultats des caractéristiques physicochimiques et de l'analyse microbiologique de la solution ont été conformes aux spécifications du fournisseurs et aux exigences de la PE. Du fait de son osmolalité élevée, la solution de glucoamylase devra être diluées au moins dix fois avant son administration *per os*. L'AE de la glucoamylase a été mesurée à 5400 ± 400 UI/mL (40°C, pH 4,5) à l'aide d'une méthode enzymatique validée par profil d'exactitude. Cette valeur ne correspond pas à celle revendiquée par le fournisseur (Annexe 4).

Cependant, il faut rappeler que l'AE est fortement dépendante de la température et du pH. Or ces paramètres ne sont pas renseignés dans les spécifications techniques du produit et nous n'avons pas pu les obtenir auprès de KERRY®. De plus, il n'existe actuellement aucun rationnel scientifique concernant les conditions expérimentales optimales pour le dosage de l'AE de la glucoamylase. Nous pouvons donc supposer que les conditions opératoires adoptées par le fournisseur pour mesurer cette activité sont différentes des nôtres. Dans un souci de praticité et pour respecter la méthode validée en interne, nous avons choisi de conserver nos paramètres. L'AE cible des futures mesures effectuées sur la MP sera donc de 5400 ± 540 UI/mL à 40°C et pH 4,5. Pour garantir la reproductibilité des lots, l'activité de la glucoamylase sera mesurée à chaque réception d'un nouveau contenant de MP.

La fabrication d'une PM de glucoamylase au sein de la plateforme FRIPHARM® a fait l'objet d'une étude de faisabilité conformément aux BPP. A travers cette étude, nous avons validé la pertinence d'une telle préparation en recours dans le traitement du DCSI. En effet, l'absence d'alternatives thérapeutiques est une situation inconfortable pour les patients. Nous avons envisagé les spécifications réglementaires, scientifiques et économiques de la préparation ainsi que les aspects techniques et logistiques inhérents à sa réalisation.

La posologie a fait l'objet d'un consensus scientifique basé sur un ensemble de considérations biopharmaceutiques. Compte tenu des apports journaliers recommandés en amidon chez les enfants en fonction de leur âge et de l'AE de la glucoamylase mesurée dans les conditions physiologiques (37°C, pH 6), la posologie optimale a été définie comme suit : 2 mL par repas pour les enfants de moins de 15 kg ; 4 mL par repas pour les enfants de plus de 15 kg. Soulignons toutefois le caractère empirique de cette posologie. En effet, il n'existe aucune donnée sur le dosage relatif des enzymes nécessaires pour traiter les déficits enzymatiques causés par des pathologies comme le DCSI. La posologie de la PM de glucoamylase devra éventuellement être ajustée en fonction de l'évolution des patients sous ce traitement.

L'innocuité des excipients a également été étudiée. Une attention particulière s'est portée sur le benzoate de sodium dont nous ne connaissons pas précisément la concentration dans la MP. Cependant, en association avec le sorbate de potassium, cet additif est utilisé à des doses relativement faibles. D'après une évaluation chimique et technique de la glucoamylase menée par l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et

l'agriculture [74], nous avons estimé que la quantité journalière en benzoate de sodium apportée par notre traitement est d'environ 28 mg pour les enfants de moins de 15 kg, et d'environ 56 mg pour les enfants de plus de 15 kg. La DJA de l'OMS étant comprise entre 0 et 5 mg de benzoate de sodium par kg de poids corporel [72], [75], le niveau de risque de toxicité de notre PM de glucoamylase a été jugé acceptable. La notice de la préparation devra toutefois faire mention de la présence de benzoate de sodium dans la solution et de ses potentiels effets notoires. Une attention particulière sera également portée sur les effets indésirables de notre préparation et le traitement sera immédiatement stoppé en cas de doute.

Les modalités de production, de contrôle et de libération d'un lot ont été supportées par une analyse de risques. La fabrication de la PM de glucoamylase étant sensiblement équivalente à celle de la PM d'invertase, FRIPHARM® dispose de tous les moyens nécessaires à sa réalisation. Afin de dispenser un mois de traitement, la plateforme pharmaceutique devra préparer 240 mL de solution buvable pour les enfants de moins de 15 kg et 480 mL pour les enfants de plus de 15 kg. A la demande des familles, nous avons opté pour un conditionnement en flacons de 60 mL afin de multiplier le nombre de contenants. Ainsi, chaque mois, quatre flacons seront délivrés aux enfants de moins de 15 kg et huit aux enfants de plus de 15 kg. Des seringues graduées de 5 mL seront également fournies permettant de faciliter la prise du traitement.

La faisabilité de la préparation ayant été validée, un lot pilote doit être produit prochainement afin d'initier une étude de stabilité. Cette étude permettra de suivre l'évolution des caractéristiques physicochimiques, de la qualité microbiologique et de l'AE de la glucoamylase dans des conditions de vieillissement accéléré. La prédiction de la stabilité de notre solution buvable permettra d'estimer au mieux sa DLU. La production du lot pilote permettra également de valider le protocole de fabrication. Après cela, nous serons en mesure de proposer notre PM de glucoamylase aux patients atteints de DCSI. En attendant les résultats de l'étude de stabilité, la DLU sera fixée à 6 mois après la fabrication, sous réserve qu'elle ne dépasse pas la DLU de la MP. Un suivi des patients sous traitement devra également être mis en place. Une étude observationnelle pourra notamment être initiée afin de suivre l'efficacité, la tolérance et la qualité de vie des patients.

CONCLUSIONS

THESE SOUTENUE PAR M. LAMBERT REMI

Le déficit congénital en saccharase-isomaltase est une maladie génétique rare qui apparaît lors de la diversification alimentaire. Une forme acquise de la maladie est également possible en association avec diverses pathologies digestives. Le déficit en saccharase-isomaltase affecte la capacité de l'organisme à hydrolyser le saccharose et l'amidon en monosaccharides et se révèle, après leur ingestion, par des crampes d'estomac, des ballonnements, des diarrhées et des vomissements. Ces problèmes digestifs peuvent conduire à une malnutrition et entraîner des retards de croissance chez l'enfant. La thérapie de substitution enzymatique offre une alternative aux régimes sans saccharose et sans amidon et permet de traiter efficacement les symptômes de la maladie. Notre plateforme pharmaceutique propose déjà une solution buvable d'invertase (11 600 UI/mL) pour améliorer la digestion du saccharose.

Face au besoin d'un traitement permettant de faciliter la digestion de l'amidon, la pharmacie de l'hôpital Edouard Herriot a été sollicitée pour mettre au point une préparation magistrale de glucoamylase en complément de la solution d'invertase. La glucoamylase est une enzyme dérivée d'*Aspergillus niger*, largement utilisée dans le brassage et la distillation d'alcool pour sa capacité à hydrolyser l'amidon en glucose.

L'objectif de notre travail était dans un premier temps d'effectuer la qualification pharmaceutique d'une solution de glucoamylase de qualité alimentaire, conformément à la Pharmacopée Européenne concernant les substances pour usage pharmaceutique. La solution enzymatique provient de la société KERRY® auprès de laquelle nous commandons la solution d'invertase depuis 2015. Les essais de qualification ont permis : (i) de vérifier la conformité des caractéristiques physicochimiques de la solution telles que les caractères organoleptiques, la densité, le pH et l'osmolalité ; (ii) de contrôler la qualité microbiologique de la solution ; (iii) de mesurer l'activité enzymatique de la glucoamylase

par une méthode enzymatique colorimétrique préalablement validée par profil d'exactitude. Cette étape nous a permis d'accepter la solution de glucoamylase comme matière première à usage pharmaceutique, et de définir les modalités de contrôle de cette matière première.

Dans un second temps, nous avons réalisé l'étude de faisabilité concernant la mise au point d'une préparation magistrale de glucoamylase au sein de notre plateforme. Nous avons envisagé les spécifications réglementaires, scientifiques et économiques d'une telle préparation ainsi que les aspects techniques et logistiques inhérents à sa réalisation. Les modalités de production, de contrôle et de libération d'un lot ont été supportées par une analyse de risques. Cette étape ayant validé la faisabilité de la préparation, nous allons produire un lot pilote afin d'initier une étude de stabilité au terme de laquelle nous serons en mesure de dispenser la solution de glucoamylase.

Pour conclure, notre travail s'inscrit dans une mission indispensable de la pharmacie hospitalière par la réalisation d'une préparation magistrale, selon les bonnes pratiques, en réponse à un besoin thérapeutique particulier et en l'absence de spécialité pharmaceutique disponible. Notre solution buvable de glucoamylase (5400 UI/mL) sera proposée aux patients déjà traités par invertase. Il sera également intéressant de mener une étude observationnelle afin de suivre l'efficacité, la tolérance et la qualité de vie des patients.

Le Président de la thèse,

Nom : Fabrice PIROT

Signature :



VU ET PERMIS D'IMPRIMER, Lyon le **14 FEV. 2022**

Vu, le Directeur de l'Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Faculté de Pharmacie.

Pour le Président de l'Université Claude Bernard Lyon 1,

Professeur C. DUSSART



REFERENCES

1. Knigge KL. Inflammatory bowel disease. Clin Cornerstone. 2002;4(4):49-60. Disponible sur : [https://doi.org/10.1016/S1098-3597\(02\)90005-0](https://doi.org/10.1016/S1098-3597(02)90005-0)
2. Torres J, Mehandru S, Colombel J-F, Peyrin-Biroulet L. Crohn's disease. Lancet Lond Engl. 29 avril 2017;389(10080):1741-55. Disponible sur : [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31711-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31711-1)
3. Ungaro R, Mehandru S, Allen PB, Peyrin-Biroulet L, Colombel J-F. Ulcerative colitis. Lancet Lond Engl. 29 avril 2017;389(10080):1756-70. Disponible sur : [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)32126-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)32126-2)
4. Fumery M, Savoye G, Pariente B, Turck D, Gower-Rousseau C. Épidémiologie et histoire naturelle des maladies inflammatoires chroniques intestinales : 30 ans de registre EPIMAD. Mini-Rev. février 2018;25(2):145-52. Disponible sur : <https://www.jle.com/10.1684/hpg.2017.1572>
5. VIDAL. Rectocolite hémorragique [En ligne]. [cité le 14 février 2022]. Disponible sur : <https://www.vidal.fr/maladies/recommandations/rectocolite-hemorragique-4021.html#prise-en-charge>
6. VIDAL. Crohn (maladie de) [En ligne]. [cité le 14 février 2022]. Disponible sur : <https://www.vidal.fr/maladies/recommandations/crohn-maladie-de-3751.html#d5017e329>
7. Lebwohl B, Sanders DS, Green PHR. Coeliac disease. Lancet Lond Engl. 6 janvier 2018;391(10115):70-81. Disponible sur : [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(17\)31796-8](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(17)31796-8)
8. CNPHGE. MALADIE CÉLIAQUE [En ligne]. [cité le 14 février 2022]. Disponible sur : <https://www.cnp-hge.fr/maladie-coeliaque/>
9. HAS. Quelles recherches d'anticorps prescrire dans la maladie coéliqua ? [En ligne]. juin 2008 [cité le 14 février 2022]. Disponible sur : https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/fiche_buts_maladie_coeliaque.pdf
10. Mearin F, Lacy BE, Chang L, Chey WD, Lembo AJ, Simren M, et al. Bowel Disorders. Gastroenterology. 18 février 2016;S0016-5085(16)00222-5. Disponible sur : <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.02.031>
11. Torres MJ, Sabate J-M, Bouchoucha M, Buscaïl C, Hercberg S, Julia C. Food consumption and dietary intakes in 36,448 adults and their association with irritable bowel syndrome: Nutrinet-Santé study. Ther Adv Gastroenterol. 2018;11. Disponible sur : <https://doi.org/10.1177/1756283x17746625>
12. CNPHGE. SYNDROME DE L'INTESTIN IRRITABLE [En ligne]. [cité le 14 février 2022]. Disponible sur : <https://www.cnp-hge.fr/syndrome-de-lintestin-irritable/>
13. VIDAL. Syndrome de l'intestin irritable [En ligne]. [cité le 14 février 2022]. Disponible sur : <https://www.vidal.fr/maladies/recommandations/syndrome-de-l-intestin-irritable-2499.html#prise-en-charge>
14. DAS AM. Déficit congénital en saccharase-isomaltase [En ligne]. Orphanet; 2020 [cité le 14 février 2022]. Disponible sur : https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?lng=FR&Expert=35122
15. Ringrose RE, Preiser H, Welsh JD. Sucrase-isomaltase (palatinase) deficiency diagnosed during adulthood. Dig Dis Sci. mai 1980;25(5):384-7. Disponible sur : <https://doi.org/10.1007/bf01308064>
16. Mainguet P, Vanderhoeden R, Loeb H, Eggermont E. Congenital maltase-sucrase and maltase-isomaltase deficiency in an adult. Digestion. 1973;8(4):353-9. Disponible sur : <https://doi.org/10.1159/000197335>
17. Belmont JW, Reid B, Taylor W, Baker SS, Moore WH, Morriss MC, et al. Congenital sucrase-isomaltase deficiency presenting with failure to thrive, hypercalcemia, and nephrocalcinosis. BMC Pediatr. 25 avril 2002;2:4. Disponible sur : <https://doi.org/10.1186/1471-2431-2-4>
18. OMIM. SUCRASE-ISOMALTASE DEFICIENCY [En ligne]. [cité le 14 février 2022]. Disponible sur : <https://omim.org/entry/222900>
19. Treem WR. Congenital sucrase-isomaltase deficiency. J Pediatr Gastroenterol Nutr. juillet 1995;21(1):1-14. Disponible sur : <https://doi.org/10.1097/00005176-199507000-00001>
20. Marcadier JL, Boland M, Scott CR, Issa K, Wu Z, McIntyre AD, et al. Congenital sucrase-isomaltase deficiency: identification of a common Inuit founder mutation. CMAJ Can Med Assoc J J Assoc Medicale Can. 3 février 2015;187(2):102-7. Disponible sur : <https://doi.org/10.1503/cmaj.140657>
21. Dumond P. Le déficit congénital en saccharase-isomaltase : étude rétrospective de 53 cas diagnostiqués en France de 1963 à 2003 [En ligne] [Thèse de docteur en médecine spécialisée]. [Nancy - France]: Université Henri Poincaré; 2006 [cité le 14 février 2022]. Disponible sur : <https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01732160/document>

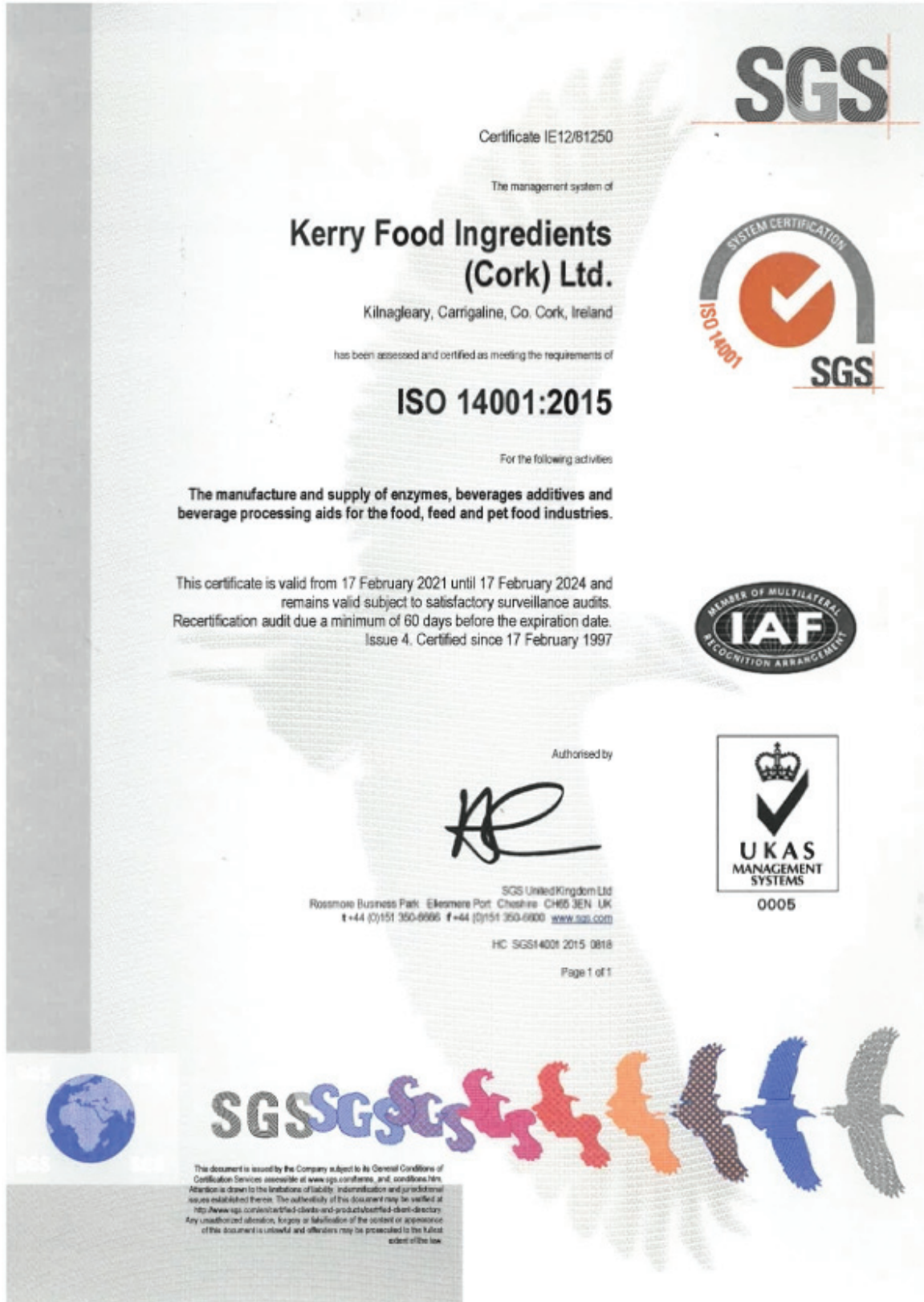
22. El Kaoutari A, Armougom F, Raoult D, Henrissat B. Le microbiote intestinal et la digestion des polysaccharides. *médecine/sciences*. mars 2014;30(3):259-65. Disponible sur : <https://doi.org/10.1051/medsci/20143003013>
23. La vie sans sucre. Les symptômes du DCSI [En ligne]. [cité le 14 février 2022]. Disponible sur : <https://www.la-vie-sans-sucre.fr/symptomes-du-dcsi/>
24. Treem WR. Clinical aspects and treatment of congenital sucrase-isomaltase deficiency. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. novembre 2012;55 Suppl 2:S7-13. Disponible sur : <https://doi.org/10.1097/01.mpg.0000421401.57633.90>
25. Weijers HA, va de KAMER JH, Dicke WK, Ijsseling J. Diarrhoea caused by deficiency of sugar splitting enzymes. I. *Acta Paediatr*. janvier 1961;50:55-71. Disponible sur : <https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.1961.tb08022.x>
26. Metz G, Jenkins DJ, Newman A, Blends LM. Breath hydrogen in hyposucrasia. *Lancet Lond Engl*. 17 janvier 1976;1(7951):119-20. Disponible sur : [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(76\)93157-3](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(76)93157-3)
27. Holzel A. Sugar malabsorption due to deficiencies of disaccharidase activities and of monosaccharide transport. *Arch Dis Child*. août 1967;42(224):341-52. Disponible sur : <https://doi.org/10.1136/adc.42.224.341>
28. Robayo-Torres CC, Diaz-Sotomayor M, Hamaker BR, Baker SS, Chumpitazi BP, Opekun AR, et al. 13C-Labeled-Starch Breath Test in Congenital Sucrase-isomaltase Deficiency. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. juin 2018;66 Suppl 3:S61-4. Disponible sur : <https://doi.org/10.1097/mpg.0000000000001858>
29. Nichols BL, Auricchio S. 50 years of progress since congenital sucrase-isomaltase deficiency recognition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. novembre 2012;55 Suppl 2:S2-7. Disponible sur : <https://doi.org/10.1097/01.mpg.0000421400.50010.2a>
30. VONESCH-DUVINAGE M-A. Mise au point et évaluation d'une préparation pharmaceutique dans la prise en charge thérapeutique en recours du Déficit Congénital en Saccharase-Isomaltase [Mémoire pour le diplôme d'études spécialisées en pharmacie hospitalière]. [Lyon - France]: Université Claude Bernard Lyon 1; 2018.
31. McMeans AR. Congenital Sucrase-Isomaltase Deficiency: Diet Assessment and Education Guidelines. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. novembre 2012;55(Supplement 2):S37-9. Disponible sur : <https://doi.org/10.1097/01.mpg.0000421410.72880.ae>
32. La vie sans sucre. Régime alimentaire [En ligne]. [cité le 14 février 2022]. Disponible sur : <https://www.la-vie-sans-sucre.fr/regime-alimentaire/>
33. Harms HK, Bertele-Harms RM, Bruer-Kleis D. Enzyme-substitution therapy with the yeast *Saccharomyces cerevisiae* in congenital sucrase-isomaltase deficiency. *N Engl J Med*. 21 mai 1987;316(21):1306-9. Disponible sur : <https://doi.org/10.1056/nejm198705213162104>
34. QOL Medical. Sucraid.com [En ligne]. [cité le 14 février 2022]. Disponible sur : <https://www.sucraid.com>
35. Treem WR, McAdams L, Stanford L, Kastoff G, Justinich C, Hyams J. Sacrosidase therapy for congenital sucrase-isomaltase deficiency. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. février 1999;28(2):137-42. Disponible sur : <https://doi.org/10.1097/00005176-199902000-00008>
36. Slawson MH. Phenotypic observations by the CSID Dietary and Medical Support Group. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. novembre 2012;55 Suppl 2:S30-32. Disponible sur : <https://doi.org/10.1097/01.mpg.0000421406.80504.1d>
37. FDA. Sucraid (sacrosidase) Oral Solution, 8,500 IU/mL [En ligne]. 2008 [cité le 14 février 2022]. Disponible sur : https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/applletter/2008/020772s005ltr.pdf
38. HCL. FRIPHARM® : Fabrication, recherche et innovation pharmaceutique [En ligne]. [cité le 14 février 2022]. Disponible sur : <https://www.chu-lyon.fr/fripharm>
39. Sander P, Alfalah M, Keiser M, Korponay-Szabo I, Kovács JB, Leeb T, et al. Novel mutations in the human sucrase-isomaltase gene (SI) that cause congenital carbohydrate malabsorption. *Hum Mutat*. janvier 2006;27(1):119. Disponible sur : <https://doi.org/10.1002/humu.9392>
40. UniProt. UniProtKB - P69328 (AMYG_ASPNG) [En ligne]. [cité le 14 février 2022]. Disponible sur : <https://www.uniprot.org/uniprot/P69328>
41. Bureau d'innocuité des produits chimiques, Direction des aliments, Direction générale des produits de santé et des aliments. Avis de modification à la Liste des enzymes alimentaires autorisées afin de permettre l'utilisation de la glucoamylase issue d'*Aspergillus niger* 41SAM2-54 à titre d'enzyme alimentaire dans une variété d'aliments [En ligne]. Canada: WTO; mai 2018 [cité le 14 février 2022] p. 4. Report N° : NOM/ADM-0116. Disponible sur : https://members.wto.org/crnattachments/2018/SPS/CAN/18_2869_00_f.pdf
42. Code de la santé publique. Code de la santé publique - Article L5121-5 [En ligne]. 17 juillet 2016 [cité le 14 février 2022]. Disponible sur : https://www.legifrance.gouv.fr/codes/article_lc/LEGIARTI000032906195/
43. ANSM. Bonnes pratiques de préparation. 2007.

44. European Pharmacopoeia (Ph. Eur.) 10th Edition.
45. AFNOR Certification. Certification FSSC 22000 - Food Safety System Certification [En ligne]. [cité le 14 février 2022]. Disponible sur : <https://certification.afnor.org/qualite/certification-fs-22000-food-safety-system-certification>
46. Kongjan P, Usmanbaha N, Khaonuan S, Jariyaboon R, O-Thong S, Reungsang A. Butanol production from algal biomass by acetone-butanol-ethanol fermentation process. *Clean Energy and Resources Recovery*. Elsevier; 2021;421-46. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85223-4.00014-2>
47. Doran PM. *Reactor Engineering. Bioprocess Engineering Principles*. Elsevier; 2013;761-852. Disponible sur : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780122208515000149>
48. Bryan, Frank L & WHO. L'analyse des risques - points critiques pour leur maîtrise : comment apprécier les risques liés à la préparation et à la conservation des aliments [En ligne]. 1994 [cité le 14 février 2022]. Disponible sur : <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/39631/9242544337.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
49. CORNISH-BOWDEN A, JAMIN M, SAKS V. *Cinétique enzymatique*. EDP Sciences; 2005. (Grenoble Sciences).
50. Sigma-Aldrich. *Enzymes and Reagents for Alternative Energy*. Biofiles. Volume 5, Number 5 [En ligne]. 2010 [cité le 14 février 2022]. Disponible sur : https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/marketing/global/documents/410/390/biofiles_v5_n5.pdf
51. MEGAZYME. Amyloglucosidase Assay Reagent [En ligne]. [cité le 14 février 2022]. Disponible sur : <https://www.megazyme.com/amyloglucosidase-assay-reagent?sSearch=r-amgr>
52. McCleary BV, Bouhet F, Driguez H. Measurement of amyloglucosidase using P-nitrophenyl β -maltoside as substrate. *Biotechnol Tech*. juillet 1991;5(4):255-8. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1007/BF02438658>
53. Di Benedetto D, Breuil P. Spectrophotométrie d'absorption dans l'ultraviolet et le visible. *Tech Anal* [En ligne]. août 2015 [cité le 14 février 2022]; Disponible sur : <https://www.techniques-ingenieur.fr/doi/10.51257/a/v2/p2795>
54. ANSES. *Guide de validation des méthodes d'analyses* [En ligne]. 2015 [cité le 14 février 2022]. Disponible sur : https://www.anses.fr/fr/system/files/ANSES_GuideValidation.pdf
55. 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 II. *J Pharm Biomed Anal*. 21 septembre 2007;45(1):70-81. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2007.06.013>
56. Feinberg M. Validation des méthodes d'analyse quantitatives au moyen du profil d'exactitude. *Qual Au Lab* [En ligne]. août 2015 [cité le 14 février 2022]; Disponible sur : <https://www.techniques-ingenieur.fr/doi/10.51257/a/v2/p224>
57. Code de la santé publique. Code de la santé publique - Article L5121-1 [En ligne]. 25 décembre 2021 [cité le 14 février 2022]. Disponible sur : https://www.legifrance.gouv.fr/codes/article_lc/LEGIARTI000037950971/
58. Miao M, Jiang B, Cui SW, Zhang T, Jin Z. Slowly digestible starch--a review. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2015;55(12):1642-57. Disponible sur : <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.704434>
59. Fallingborg J. Intraluminal pH of the human gastrointestinal tract. *Dan Med Bull*. juin 1999;46(3):183-96.
60. Fantino M, Gourmet E. Apports nutritionnels en France en 2005 chez les enfants non allaités âgés de moins de 36 mois. *Arch Pédiatrie*. avril 2008;15(4):446-55. Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.arcped.2008.03.002>
61. Trumbo P, Schlicker S, Yates AA, Poos M, Food and Nutrition Board of the Institute of Medicine, The National Academies. Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein and amino acids. *J Am Diet Assoc*. novembre 2002;102(11):1621-30. Disponible sur : [https://doi.org/10.1016/S0002-8223\(02\)90346-9](https://doi.org/10.1016/S0002-8223(02)90346-9)
62. Lücking T, Burdelski M. Congenital saccharase-isomaltase deficiency: a six-year survey. *Dtsch Med Wochenschr* 1946. 4 juin 1976;101(23):897-900. Disponible sur : <https://doi.org/10.1055/s-0028-1104138>
63. Apotheek de Akker. ALTERNATIEF BI-MYCONASE [En ligne]. [cité le 14 février 2022]. Disponible sur : <https://www.serviceapotheek.nl/akker/blog/alternatief-bi-myconase>
64. Intoleran. *Starchway* [En ligne]. [cité le 14 février 2022]. Disponible sur: <https://www.intoleran.com/product/starchway-50-capsules/>
65. Décret n°2006-352 du 20 mars 2006 relatif aux compléments alimentaires - Article 2. [En ligne]. [cité le 14 février 2022]. Disponible sur : <https://www.legifrance.gouv.fr/loda/id/JORFTEXT000000638341/>

66. ANSES. Étude individuelle nationale des consommations alimentaires 3 (INCA 3) - Avis de l'Anses [En ligne]. Maisons-Alfort - France; juin 2017 [cité le 14 février 2022] p. 535. Report. 2014-SA-0234. Disponible sur : <https://www.anses.fr/fr/system/files/NUT2014SA0234Ra.pdf>
67. ANSES. Les compléments alimentaires, nécessité d'une consommation éclairée [En ligne]. 2021 [cité le 14 février 2022]. Disponible sur : <https://www.anses.fr/fr/content/les-compléments-alimentaires-nécessité-d'une-consommation-éclairée>
68. HAS. COMMISSION DE LA TRANSPARENCE - CREON (PANCRÉATINE) 35 000 U, gélule gastro-résistante [En ligne]. 2020 [cité le 14 février 2022]. Disponible sur : https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2020-03/creon_pic_ins_avisdef_ct17809.pdf
69. VIDAL. CREON gélule gastrorésistante : mise à disposition d'un nouveau dosage à 35 000 U [En ligne]. 2020 [cité le 14 février 2022]. Disponible sur : <https://www.vidal.fr/actualites/26372-creon-gelule-gastroresistante-mise-a-disposition-d-un-nouveau-dosage-a-35-000-u.html>
70. Mylan. CREON MINIMICROSPHERES - Monographie de produit [En ligne]. 2019 [cité le 14 février 2022]. Disponible sur : <https://www.mylan.ca/-/media/mylanca/documents/french/product-pdf/creonpmf.pdf?la=fr-ca>
71. EFSA Panel on Food Contact Materials, Enzymes, Processing Aids (CEP), Silano V, Barat Baviera JM, Bolognesi C, Brüscheiler BJ, Coconcelli PS, et al. Safety of the food enzyme glucoamylase from a genetically modified *Aspergillus niger* (strain NZYM-BF). EFSA J [En ligne]. octobre 2018 [cité le 14 février 2022];16(10). Disponible sur : <https://data.europa.eu/doi/10.2903/j.efsa.2018.5450>
72. Rowe RC, Sheskey PJ, Owen SC. Handbook of pharmaceutical excipients. 5th ed. Pharmaceutical Press; 2006.
73. ANSM. Répertoire des médicaments génériques [En ligne]. 2021 [cité le 14 février 2022]. Disponible sur : <https://ansm.sante.fr/uploads/2021/03/09/47b2dc40ecb31ecac9fcd93ed07d7ac.pdf>
74. JECFA - FAO/OMS. Glucoamylase from *Trichoderma reesei* expressed in *Trichoderma reesei* - Chemical and Technical Assessment [En ligne]. 2013 [cité le 14 février 2022]. Disponible sur : <https://www.fao.org/3/at939e/at939e.pdf>
75. WHO. BENZOIC ACID AND SODIUM BENZOATE - Concise International Chemical Assessment Document 26 [En ligne]. Geneva; 2000 [cité le 14 février 2022]. Disponible sur : <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42310/924153026X.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
76. ANSES. Seuil de préoccupation toxicologique pour l'analyse de risque sanitaire des substances chimiques dans les aliments [En ligne]. mai 2005 [cité le 14 février 2022] p. 44. Disponible sur : <https://www.anses.fr/en/system/files/AAAT-Ra-PreoccupationToxico.pdf>
77. EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources (ANS). Scientific Opinion on the re-evaluation of benzoic acid (E 210), sodium benzoate (E 211), potassium benzoate (E 212) and calcium benzoate (E 213) as food additives. EFSA J [En ligne]. mars 2016 [cité le 14 février 2022];14(3). Disponible sur : <https://data.europa.eu/doi/10.2903/j.efsa.2016.4433>
78. Sautou V. Guide méthodologique des études de stabilité des préparations [En ligne]. 2013 [cité le 14 février 2022]. Disponible sur : https://www.gerpac.eu/IMG/pdf/guide_de_stabilite_vf_avril2013.pdf
79. DigestScience - Fondation de recherche sur les maladies de l'appareil digestif et la nutrition. Maladie de Crohn, rectocolite hémorragique, maladie coeliaque, syndrome du côlon irritable [En ligne]. [cité le 14 février 2022]. Disponible sur : <https://www.digestscience.com/fr/pathologies/presentation>
80. RN'Bio - Sorbonne Université. Entrée des oses dans la glycolyse : les diholosides [En ligne]. [cité le 14 février 2022]. Disponible sur : https://rnbio.upmc.fr/Biochimie_metabolisme_glycolyse_oses3
81. Code de la sécurité sociale. Code de la sécurité sociale - Article L162-16-5 [En ligne]. 25 décembre 2021 [cité le 14 février 2022]. Disponible sur : https://www.legifrance.gouv.fr/codes/article_lc/LEGIARTI000042685893
82. Code général des impôts. Code général des impôts - Article 281 octies [En ligne]. 01 janvier 2022 [cité le 14 février 2022]. Disponible sur : https://www.legifrance.gouv.fr/codes/article_lc/LEGIARTI000044983676
83. Tall ML, Yebba S, Diouf E, Pirot F, Pivot C. Valorisation d'une activité de fabrication de médicaments au sein d'un centre hospitalo-universitaire : évaluation des coûts des préparations pharmaceutiques. Congrès HOPIPHARM. La Rochelle, France. mai 2014 [cité le 14 février 2022]. Disponible sur : https://www.synpreph.org/files/archives/hopi2014_poster-208.pdf
84. VIDAL. Prescription et délivrance des médicaments : rétrocession [En ligne]. Décembre 2021 [cité le 14 février 2022]. Disponible sur : <https://www.vidal.fr/infos-pratiques/prescription-et-delivrance-des-medicaments-retrocession-id14192.html>

ANNEXES

Annexe 1 : KERRY® – Certification ISO 14001:2015



Annexe 2 : KERRY® – Certification FAMI-QS



Certificate NL18/619943324
FAMI-QS Registration Number: FAM-0795

Kerry Ingredients & Flavours Kerry Food Ingredients Cork

Kilnagleary, Crosshaven Road,
P43 A597, Carrigaline, Co. Cork,
Ireland

has implemented and maintains a Feed Safety and Quality Management System including Good Manufacturing Practice (GMP) in compliance with:

FAMI-QS Code

(Version 6.0, 2 October 2018)

Activity:
Production on the market of Specialty Feed Ingredients from Bioprocess /

Feed Chain Category:
K

Scope:
- A1 Feed Additives, Category 4 Zootechnical additives, function group A Digestibility enhancers
- B1 Premixes

The Operator implements measures for feed fraud / feed defense according to the FAMI-QS Supply Chain Integrity Module V2

This certificate is valid from 5 December 2019 until 4 December 2022 and remains valid subject to satisfactory surveillance audits.
For the validity of this certificate please check www.fami-qs.org

Authorized by



J. Janssens
SGS Nederland B.V.
SGS Product & Process Certification
PG Box 200
3200 AE Spijknisse, The Netherlands
t +31(0)68-2143333 - www.sgs.com








This document is issued by the Company subject to the Terms of Conditions of Certification Services, which can be found at www.sgs.com or sgs@sgs.com. The validity of this document may be verified at www.fami-qs.org. Any unauthorized use, reproduction or distribution of this document is strictly prohibited. Copyright © 2019 SGS. All rights reserved.

Annexe 3 : KERRY® – Conformité des emballages à la législation européenne



KERRY EUROPE & RUSSIA Conformance of Packaging Materials to EU legislation

Further to your recent query, please note Kerry Europe & Russia is fully aware of the current European legislation regarding packaging materials. This includes the following legislation and relevant amendments:

- Directive 94/62/EC regarding the reduction of packaging waste and the impact of packaging waste on the environment.
- Framework Regulation 1935/2004/EC for materials and articles intended to come into contact with foodstuffs.
- Regulation 10/2011/EC relating to plastic materials and articles intended to come into contact with foodstuffs.
- Regulation 2023/2006/EC requiring good manufacturing practices to be used for the materials and articles required to come into contact with food together with related regulations and subsequent legislative amendments.
- Regulation 282/2008 on recycled plastic materials and articles intended to come into contact with foodstuffs.
- Regulation 450/2009 relating to active and intelligent materials intended to come into contact with food.

Kerry Europe & Russia can confirm that it only uses packaging from approved suppliers, purchased against agreed specifications, and that the packaging materials used for products manufactured by Kerry Europe & Russia, are in compliance with all relevant EU legislation.

Kerry Europe & Russia
02 July 2018

This document and the information contained within it, is proprietary to Kerry Ingredients & Flavours Limited and remains the property of Kerry Ingredients & Flavours Limited and must not be disclosed to any third party without the prior written permission of the company. While all reasonable care has been taken in collating the above information, we do not accept any liability for any inaccuracy or the consequences of such inaccuracy.
The information contained in this document is confidential and proprietary information of Kerry Group PLC and its subsidiary companies. Any altering of this information without express written permission of an authorised officer of Kerry Group is expressly forbidden. Kerry Group reserves its right to vindicate its intellectual property rights where necessary
© Kerry 2018

Annexe 4 : KERRY® – Spécifications techniques de l'AMYLO®



Kerry Food Ingredients (Cork) Limited
Kilnagleary,
Carrigaline,
Cork Ireland

Phone: +353214376400
Fax: +353214376480

PRODUCT SPECIFICATION

PRODUCT DETAILS

Product Name Amylo 300 (25Kg)
Kerry Code 20267834
Legacy

Product Description Amylo 300 is an amyloglucosidase system derived from a selected strain of *Aspergillus niger*. This product is made from a natural raw material and as such may be subject to some batch to batch colour and/or odour variation, but these variations are not an indicator of enzyme activity and do not impact on product performance.

INGREDIENT LISTING

Water, Glycerol, Enzyme, Glucose, Salt, Sodium Benzoate, Potassium Sorbate

USAGE / APPLICATION INFORMATION

Amyloglucosidase can hydrolyse sequentially both exo alpha 1,4 and alpha 1,6 glycosidic linkages and can therefore be used to degrade starch polymers and maltose to glucose. Applications for Amylo 300 include the production of glucose syrups, low carbohydrate beers and high alcohol production by fermentation in grain and spirit distilling industries.

Benefits

- Allows new, more cost effective, local raw material sources to be used, but maintains final product integrity
- Increases extract yield in standard, high gravity and high adjunct brewing processes
- Longer filtration runs
- Low calorie beer
- Reduces total cost (optimum cost per hl of beer)
- Reduces carbon footprint

For any specific application, it is recommended that trials should be carried out in order to optimise the dose rate.

KEY PARAMETERS

Test	Min	Max	Units
Amyloglucosidase	1045	1265	u/ml

MICROBIOLOGICAL DATA

Total Viable Count	<10000 cfu/ml
Coliforms	<30 cfu/ml
E. coli	Absent/25 ml
Salmonella	Absent/25 ml

Kerry Code 20267834
Spec Version: 003
Spec Status: Commercialised Kerry Approved

Issue date: 03/07/2017
Revision Date: 01/11/2017
Page 1 of 4



Kerry Food Ingredients (Cork) Limited
 Kilnagleary,
 Carrigaline,
 Cork Ireland

Phone: +353214376400
 Fax: +353214376480

ALLERGEN DATA	
Allergen	Present Yes/No
Beef and products thereof	No
Carrot and products thereof	No
Celery and products thereof	No
Cereals containing gluten(1)	No
Chicken meat and products thereof	No
Cocoa and products thereof	No
Coriander and products thereof	No
Corn/maize and products thereof	No
Crustaceans and products thereof	No
Egg and products thereof	No
Fish and products thereof	No
Glutamate and products thereof	No
Milk and products thereof (including lactose)	No
Mustard and products thereof	No
Nuts (other than peanuts) and products thereof(2)	No
Molluscs and products thereof	No
Legumes and products thereof	No
Lupin and products thereof	No
Peanuts and products thereof	No
Pork and products thereof	No
Sesame Seeds and products thereof	No
Soybeans and products thereof(3)	No
Sulphur Dioxide/Sulphites > 10ppm	No
Wheat and products thereof(4)	No
<p>Note: All reasonable precautions that could be expected of a responsible manufacturer have been taken to prevent cross contamination in the raw materials used and in the manufacturing process. Product has been produced in a plant that handles cereals containing gluten (primary wheat flour).</p> <p>Definitions conform to Regulation (EU) 1169/2011 as amended, US Food Allergen Labelling and Consumer Protection Act (FALCP) and ALBA-List.</p> <p>(1) i.e. wheat, rye, barley, oats, spelt, kamut or their hybridised strain</p> <p>(2) Nut allergens: Almond <i>Prunus dulcis</i> (Rosaceae) Beech nut <i>Fagus</i> spp. (Fagaceae), Brazil nut <i>Bertholletia excelsa</i> (Lecythidaceae), Butternut <i>Juglans cinerea</i> (Juglandaceae), Cashew <i>Anacardium occidentale</i> (Anacardiaceae), Chesnut (Chinese, American, European, Seguin) <i>Castanea</i> spp.(Fagaceae), Chinquapin <i>Castanea pumila</i> (Fagaceae), Coconut <i>Cocos nucifera</i> L. (Arecaceae (alt. Palmae)), Fibert/Hazelnut <i>Corylus</i> spp. (Betulaceae), Ginko nut <i>Ginkgo biloba</i> L.(Ginkgoaceae), Hickory nut <i>Carya</i> spp.(Juglandaceae), Lichee nut <i>Litchi chinensis</i> Sonn. (Sapindaceae), Macadamia nut/Bush nut <i>Macadamia</i> spp.(Proteaceae), Pecan <i>Carya illinoensis</i> (Juglandaceae), Pine nut/Pinon nut <i>Pinus</i> spp. (Pineaceae), Pili nut <i>Canarium ovatum</i> (Burseraceae), Pistachio <i>Pistacia vera</i> L. (Anacardiaceae), Sheanut <i>Vitellaria paradoxa</i> (Sapotaceae), Walnut (English, Persian, Black, Japanese, California), Heartnut, <i>Juglans</i> spp.(Juglandaceae)</p> <p>(3) Enzyme fraction is extracted from Soya Hulls; however Soya Protein cannot be detected in final product at a detection limit of 1 ppm.</p> <p>(4) i.e. common wheat, durum wheat, club wheat, spelt, semolina, Einkorn, emmer, kamut and triticale</p>	

Kerry Code: 20267834
 Spec Version: 003
 Spec Status: Commercialised Kerry Approved

Issue date: 03/07/2017
 Revision Date: 01/11/2017
 Page 2 of 4



Kerry Food Ingredients (Cork) Limited
Kilnagleary,
Carrigaline,
Cork Ireland

Phone: +353214376400
Fax: +353214376480

SUITABILITY DATA	Yes = Suitable, No = Unsuitable	Comment/Certification Status
Vegetarian (Ova-lacto)	Yes	
Vegan	Yes	
	Certified / Not Certified	Comment
Halal	Certified	Suitable
Kosher	Certified	Suitable

NUTRITION INFORMATION		
Nutrient	Typical Value	Unit
Energy	730	kJ/100 g
Energy	172	kCal/100 g
Total Carbohydrates	34	g/100 g
Total Fat	0	g/100 g
Protein	8	g/100 g
Moisture	55	g/100 g
Ash	2	g/100 g
Data Source		
Values quoted are typical and should be used for guidance purposes only.		

PROCESS SUMMARY
Kerry has implemented and maintains food hygiene standards and HACCP Plans in line with the requirements of food legislation. The Carrigaline, Co Cork site is certified against the requirements of FSSC22000 and ISO14001.

RECOMMENDED SHELF-LIFE & STORAGE	
Transport & Storage Conditions:	Temperature controlled transport is not required, but prolonged storage should be dry, at 18°C or below. When stored at 18°C or below, product will maintain at least 95% activity for a minimum of 12 months. After this time period reassay is advisable.
Shelf life (original package):	365 days (12 months)

PACKAGING	
Pack Size (Net)	25 Kg
Pack Type Inner	Plastic drums
Pack Type Outer	Plastic drums

HEALTH & SAFETY DATA
Liquid enzyme products may cause skin or eye irritation and inhalation of aerosol can result in sensitisation of susceptible individuals. Standard handling procedures should be followed to prevent direct contact with the product or inhalation of aerosol. A separate Safety Data Sheet (SDS) is available on request.

Kerry Code: 20267834
Spec Version: 003
Spec Status: Commercialised Kerry Approved

Issue date: 03/07/2017
Revision Date: 01/11/2017
Page 3 of 4



Kerry Food Ingredients (Cork) Limited
Kilnagleary,
Carrigaline,
Cork Ireland

Phone: +353214376400
Fax: +353214376480

LEGISLATION & WARRANTY STATEMENT

We warrant that the product is manufactured in accordance with the specification and is manufactured and packaged in compliance with all EU food and food safety legislation applicable to products of this nature at time of manufacture and sale by us. We warrant that the product also complies with the food purity specifications for food-grade enzymes recommended by the JECFA and recommended in the Food Chemical Codex.

We make no further warranty in relation to the product or as to the suitability of the product for any specific purpose or application. The user should satisfy itself as to the suitability of the product as an ingredient in a specific application or for any use whatsoever. The information supplied in this specification sheet is in accordance with our product formulation, is also based on manufacturing plant data and on data provided by our raw material suppliers and is accurate to the best of our knowledge at the date of issue of this specification. Local national regulations should also be consulted by user in relation any specific application and in relation to appropriate ingredient declarations as legislation may vary from country to country.

CONFIDENTIALITY

This document and the information contained within it remains the property of Kerry Group and must not be disclosed to any third party without prior written permission of the company.

Kerry Code 20267834
Spec Version: 003
Spec Status: **Commercialised Kerry Approved**


Issue date: 03/07/2017
Revision Date: 01/11/2017
Page 4 of 4

Annexe 5 : MEGAZYME® – Protocole de dosage de l'AE de la glucoamylase avec le réactif R-AMGR3

Megazyme
www.megazyme.com

ASSAY OF
AMYLOGLUCOSIDASE
using
**p-NITROPHENYL
β-MALTOSE**
plus
Thermostable β-Glucosidase

R-AMGR3 08/18



Megazyme

© Megazyme 2018

NOTE:

The AMG assay reagent previously supplied by Megazyme contained *p*-nitrophenyl- β -maltoside (4 mM), plus **almond seed β -glucosidase** (25 U/mL). While this substrate worked well, its use was limited to a narrow pH and temperature range. Also, stability was limited by the purity of the almond β -glucosidase then available. Recently, this substrate has been improved by replacing almond β -glucosidase with a thermostable β -glucosidase. The advantages are:

1. The high purity of the thermostable β -glucosidase means that the substrate is stable for longer periods of time.
2. Because the enzyme is thermostable, the reagent can be used at temperatures up to 60°C (the preferred temperature for the assay of AMG).

However, because thermostable β -glucosidase is unstable at very low salt concentrations, salt and buffer are added to the dry reagent. When dissolved, the substrate solution will have a pH of ~ 6.0 (the optimal pH for stability of the β -glucosidase).

SUBSTRATE:

***p*-Nitrophenyl- β -maltoside (4 mM),
plus thermostable β -glucosidase (5 U/mL).**

Dissolve the contents of one vial in 10 mL of distilled water, divide into aliquots of 2-3 mL and store frozen. Store on ice during use.

BUFFER:

100 mM Sodium acetate buffer (pH 4.5).

Add 5.9 mL of glacial acetic acid (1.05 g/mL) to 900 mL of distilled water. Adjust the pH to pH 4.4 by addition of 1 M (4 g/100 mL) NaOH solution. Adjust the volume to 1 L and store in a well sealed bottle at 4°C.

SAMPLE PREPARATION:

Add 1 mL of enzyme preparation to 9 mL of 100 mM sodium acetate buffer (pH 4.5) and mix well. Repeat this dilution step until the enzyme is suitably diluted for assay.

ASSAY PROCEDURE:

1. Pre-equilibrate enzyme solution at 40°C for 5 min.
2. To 0.2 mL of pre-equilibrated substrate solution add 0.2 mL of suitably diluted (and pre-equilibrated) enzyme solution. Mix well and incubate at 40°C for exactly 10 min.

1

3. Terminate the reaction and develop the colour by adding 3.0 mL of 2% tris base buffer (pH ~ 8.5; Megazyme **B-TRIS500**).
4. Measure the absorbance at 400 nm against a reagent blank.

NOTE:

The reagent blank is prepared by adding 3.0 mL of Tris base buffer (2%) to 0.2 mL of reagent mixture with vigorous stirring, followed by the enzyme solution (0.2 mL) with stirring.

CALCULATION OF ACTIVITY:

$$\text{Activity (U/mL)} = \frac{\Delta A_{400}}{10} \times \frac{3.4}{0.2} \times \frac{1}{18.1} \times \text{Dilution}$$

where:

U = International units of enzyme activity. One Unit is the amount of enzyme which releases one μmole of *p*-nitrophenol from the substrate per minute at the defined pH and temperature

ΔA_{400} = Absorbance (reaction) - Absorbance (blank)

10 = Incubation time

3.4 = Final reaction volume (mL)

0.2 = Volume of enzyme assayed (mL)

18.1 = E_{mM} *p*-nitrophenol in 2% tris base (pH ~ 8.5) at 400 nm

The Units of amyloglucosidase activity obtained using the above assay, can be related to activity on maltose (10 mg/mL) or soluble starch (10 mg/mL) at 40°C and pH 4.5, using the following equations:

Enzyme Units on Maltose = 1.8 x Units on *pNP*- β -maltoside.

Enzyme Units on Starch = 11.5 x Units on *pNP*- β -maltoside.

REFERENCE:

McCleary, B. V., Bouhet, F. & Driguez, H. (1991). "Measurement of amyloglucosidase using *p*-nitrophenyl β -maltoside as substrate" *Biotechnology Techniques*, **5**, 255-258.

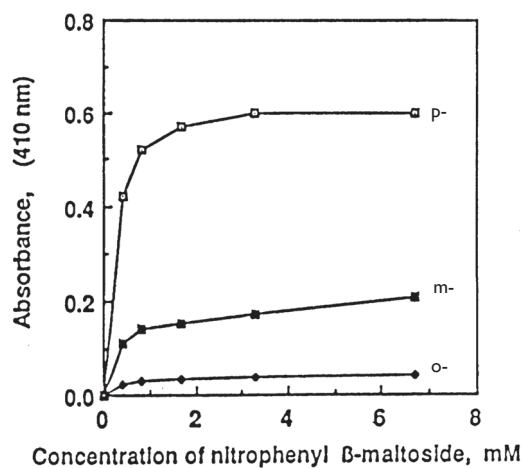


Figure 1. Optimisation of the concentration of nitrophenyl β -maltoside in the reagent mixture.
Substrates: ■, *m*-; ♦, *o*-; □, *p*-nitrophenyl β -maltosides



**Bray Business Park, Bray,
Co. Wicklow,
IRELAND.**

**Telephone: (353.1) 286 1220
Facsimile: (353.1) 286 1264
Internet: www.megazyme.com
E-Mail: info@megazyme.com**

WITHOUT GUARANTEE

The information contained in this booklet is, to the best of our knowledge, true and accurate, but since the conditions of use are beyond our control, no warranty is given or is implied in respect of any recommendation or suggestions which may be made or that any use will not infringe any patents.

Annexe 6 : POS pour le dosage de l'AE de la glucoamylase au LCQ

 GH Centre	Procédure opératoire standardisée Version n°01 –Date : 09/04/2021	Service Pharmaceutique UPCM  FRI PHARM
	INSTRUCTION	CTRL-IN-003

POS – SOL BUV GLUCOAMYLASE (5400 UI/mL) – SPECTROPHOTOMETRE UV-VISIBLE

Rédaction : R. LAMBERT Modification : Validation : C. MERIENNE Signature :
Version N° : 1 Validé le :

GLUCOAMYLASE

CAS : 9032-08-0

NA

NA

1. Champs d'application

Dosage quantitatif par la technique SPECTROPHOTOMETRE UV-VISIBLE de l'activité enzymatique d'une solution buvable de glucoamylase 60 mL (5400 UI/mL).

2. Documents de référence

2.1. Référentiels externes

Pharmacopée Européenne en vigueur
United States Pharmacopeia en vigueur
Bonnes Pratiques de Préparation en vigueur
Bonnes Pratiques de Fabrication en vigueur
Norme NF 17025 : 2017

2.2. Référentiels internes

SUP-IN-012 Utilisation du spectrophotomètre UV-VISIBLE
CTRL-EN-011 Préparation des réactifs
CTRL-IN-008 Gestion des contrôles internes de qualité CIQ
CTRL-IN-016 Uniformité de teneur
SUP-IN-006 Utilisation de la balance de précision

3. Matériel

3.1. Appareil et pipettes

Balance de précision
Bain-marie
Vortex
Spectrophotomètre UV-Visible JASCO V730
Pipettes 5 000 µL, 1000 µL et 200 µL

3.2. Verrerie

Béchers
Fioles jaugées de 100 mL et 50 mL
Tubes à essai en verre

3.3. Matériels

Poudriers

/Volumes/RLAMBERT/transfert dernier jour/GLUCOAMYLASE/Documents Qualité/CTRL-IN-003 POS SOL BUV GLUCOAMYLASE SPECTROPHOTOMETRE UV-VISIBLE.docx



Page 1/5

Photocopie Interdite

 GH Centre	Procédure opératoire standardisée Version n°01 –Date : 09/04/2021	Service Pharmaceutique 
	INSTRUCTION	CTRL-IN-003

Tubes à essai en PP
 Bouchons en PP pour centrifugation

3.4. Colonne

NA

4. Réactifs

4.1. Standards

Glucoamylase poudre CRS à x UI/mg, ref : E-AMGDFPD (MEGAZYME)

4.2. Solvants

Eau déminéralisée

Solution tampon d'acétate de sodium 0,1 M (pH 4,5) REA 68/...

Solution tampon de tris base 2 % (pH 8,5) REA 69/...

Solution de R-AMGR3 pour dosage Glucoamylase REA 71/...

4.3. CIQ

AMYLO 300 (KERRY code : 20267834) : matière première à usage pharmaceutique (MPUP)

4.4. Phases mobiles

NA

5. Calibrations et contrôles

5.1. Gamme de calibration

➤ Préparation solution mère de calibration $SM_G = 100$ UI/mL

Dans un poudrier :

- ✓ Prélever 10 mL de solution tampon d'acétate de sodium 0,1 M (pH 4,5)
- ✓ Peser $\frac{1\,000}{x}$ mg (équivalent à 1 000 UI) de poudre CRS de glucoamylase à x UI/mg

➤ Préparation solution fille de calibration $SF_G = 10$ UI/mL

Dans un tube à essai en PP :

- ✓ Prélever 1 mL de la SM_G
- ✓ Ajouter 9 mL de solution tampon d'acétate de sodium 0,1 M (pH 4,5) (QSP 10 mL)

➤ Préparation des standards de calibration

Réaliser les standards de calibration 1, 2 et 3 à partir de SF_G dans des tubes à essai en PP :

Standards de Calibration (SC)	SC ₁	SC ₂	SC ₃
Solution fille SF_G (μL)	500	1 000	1 500
Solution d'acétate de sodium 0,1 M (pH 4,5) (μL)	9 500	9 000	8 500
Concentration théorique (mUI/mL)	500	1 000	1 500

 GH Centre	Procédure opératoire standardisée Version n°01 –Date : 09/04/2021	Service Pharmaceutique 
	INSTRUCTION	CTRL-IN-003

5.2. Contrôles qualité (ou standards de validation SV)

➤ Préparation solution mère de contrôle $SM_{QC} = 50 \text{ UI/mL}$

Dans une fiole jaugée de 100 mL :

- ✓ Prélever 926 μL (équivalent à 5 000 UI) d'AMYLO 300 MPUP
- ✓ Compléter jusqu'au trait de jauge avec la solution tampon d'acétate de sodium 0,1 M (pH 4,5) (QSP 100 mL)

➤ Préparation solution fille de contrôle $SF_{QC} = 10 \text{ UI/mL}$

Dans un tube à essai en PP :

- ✓ Prélever 1 mL de la SM_{QC}
- ✓ Ajouter 4 mL de solution tampon d'acétate de sodium 0,1 M (pH 4,5) (QSP 5 mL)

➤ Préparation des contrôles de qualité

Réaliser les contrôles de qualité à partir de SF_{QC} dans des tubes à essai en PP :

Contrôles Qualité (QC)	QC_B	QC_M	QC_H
Solution fille SF_{QC} (μL)	750	1 000	1 250
Solution d'acétate de sodium 0,1 M (pH 4,5) (μL)	9 250	9 000	8 750
Concentration théorique (mUI/mL)	750	1 000	1 250

En routine, seuls les standards haut et bas (QC_H et QC_B) sont réalisés.

Contrôler chaque niveau de QC selon l'instruction CTRL-IN-008 Gestion des contrôles internes de qualité CIQ et l'enregistrement CTRL-EN-005 Préparation des contrôles internes de qualité CIQ. Si les QC sont validés, ceux-ci sont aliquotés dans des tubes Eppendorfs de 1,5 mL, étiquetés et stockés à -20°C .

6. Préparation de l'échantillon

6.1. Echantillonnage

Méthode d'échantillonnage	Prélèvement après production
Matériel d'échantillonnage	Aucun
Quantité à prélever ou à diviser	2 flacons
Instruction spécifique d'échantillonnage	Prélever aléatoirement 2 flacons conformes étiquetés
Conditionnement	Flacon ambré type II de 60 mL
Identification du contenant	Numéro de lot de fabrication
Précaution particulière	NA
Conditions de stockage	Entre 2 et 8°C
Nettoyage du matériel de prélèvement	NA

6.2. Protocole d'extraction

NA

 GH Centre	Procédure opératoire standardisée Version n°01 –Date : 09/04/2021	Service Pharmaceutique  UPCM FRI PHARM
	INSTRUCTION	CTRL-IN-003

6.3. Traitement de l'échantillon

➤ Préparation solution échantillon $S_{E1} = 50 \text{ UI/mL}$

Dans une fiole jaugée de 100 mL :

- ✓ Prélever 926 μL (équivalent à 5 000 UI) d'AMYLO 300 MPUP
- ✓ Compléter jusqu'au trait de jauge avec la solution tampon d'acétate de sodium 0,1 M (pH 4,5) (QSP 100 mL)

➤ Préparation solution échantillon $S_{E2} = 1\,000 \text{ mUI/mL}$

Dans une fiole jaugée de 50 mL :

- ✓ Prélever 1 mL de S_{E1}
- ✓ Compléter jusqu'au trait de jauge avec la solution tampon d'acétate de sodium 0,1 M (pH 4,5) (QSP 100 mL)

7. Méthode de dosage

➤ Procédure de dosage de l'activité enzymatique

Dans un tube à essai en PP :

- ✓ Prélever 1 mL de la solution enzymatique à doser
- ✓ Pré-équilibrer à 40°C pendant environ 10 minutes

Dans un tube à essai en verre :

- ✓ Prélever 200 μL de solution de R-AMGR3 pour dosage Glucoamylase
- ✓ Pré-équilibrer à 40°C pendant environ 10 minutes
- ✓ Ajouter 200 μL de la solution enzymatique à doser (déjà pré-équilibrée à 40°C pendant environ 10 minutes)
- ✓ Vortexer 3 secondes puis incuber à 40°C pendant **exactement 10 min**
- ✓ Stopper la réaction en ajoutant 3 mL de solution tampon de tris base 2 % (pH 8,5)

Mesurer l'absorbance à 400 nm contre un blanc de réactif (voir « préparation du blanc de réactif » ci-dessous)

➤ Préparation du blanc de réactif

Dans un tube à essai en PP :

- ✓ Prélever 3 mL de solution tampon de tris base 2 % (pH 8,5)
- ✓ Ajouter 200 μL de solution de R-AMGR3 pour dosage Glucoamylase
- ✓ Ajouter 200 μL de la solution enzymatique à doser

➤ Paramètres de la méthode

Les méthodes sont enregistrées sur le serveur : « S:\UPCM\08 CTRL Contrôles\03 PHYSICOCHIMIQUE\METHODES »

Nom de la méthode : 20210809 GLUCOAMYLASE UV

 GH Centre	Procédure opératoire standardisée Version n°01 –Date : 09/04/2021	Service Pharmaceutique  UPCM FRI PHARM
	INSTRUCTION	CTRL-IN-003

Paramètres analytiques :

- ✓ Longueur d'onde : $\lambda = 400 \text{ nm}$
- ✓ Cuve : plastique visible
- ✓ Faire un auto-zéro à vide
- ✓ Blanc : voir « préparation du blanc de réactif » ci-dessus

8. Rendu des résultats

Les résultats bruts doivent être enregistrés en PDF sur le serveur selon l'instruction de l'appareil utilisé.

Concentration cible :

- ✓ L'activité enzymatique cible de la S_{E2} est de 1 000 mUI/mL

Traitement des résultats selon l'enregistrement :


CTRL-EN-010 Rapport d'essai contrôle de teneur Spectrophotomètre UV

En cas de résultats hors spécification, une investigation doit être réalisée selon l'enregistrement : CTRL-EN-013 Rapport d'investigation d'un résultat hors spécification.

9. Version de la POS

Version	Date	Rédigé par	Validé par	Motif de la version
01	27/07/2021	R. LAMBERT	C. MERIENNE	Création de la POS

Annexe 7 : Formulaire d'étude de faisabilité du projet

	Formulaire de l'analyse de faisabilité	Service Pharmaceutique UF « PREPARATION ET CONTROLE DE MEDICAMENT » 5, Place d'arsonval 69437 LYON Cedex 03
	GLUCOAMYLASE, SOLUTION BUVABLE, 324 000 UI – 60 mL, 5400 UI/mL	

Glucoamylase, solution buvable, 324 000 UI – 60 mL, 5400 UI/mL

GLUCOAMYLASE
5400 UI/mL - 60 mL
 Solution buvable - Voie orale

Glucoamylase 324 000 UI
 Eau 33 mL
 Glycérol 15 mL
 Glucose 2,1 mL

Flacon de 60 mL

Date d'ouverture :/...../.....
 Date limite d'utilisation :/...../..... (1 mois après ouverture)

RESPECTER LES DOSES PRESCRITES

Uniquement sur ordonnance
 A conserver entre 2°C et 8°C


1

Pharmacie Groupement Hospitalier Centre
 Hospices Civils de Lyon
 69437 Lyon Cedex 03
 N°ordonnancier :
 Lot :
 EXP :
 Numéro d'enregistrement :
 Patient :


PREPARATION HOSPITALIERE
 PREPARATION HOSPITALIERE POUR ESSAI CLINIQUE
 PREPARATION MAGISTRALE

ÉTIQUETTE PATIENT


I. CONFORMITÉ REGLEMENTAIRE	
Faisabilité pharmaco-thérapeutique	Commentaires
Intérêt pharmaco-thérapeutique de la préparation : <input checked="" type="checkbox"/> Important <input type="checkbox"/> Modéré <input type="checkbox"/> Faible <input type="checkbox"/> Insuffisant	Seul médicament permettant de faciliter la digestion de l'amidon chez les patients atteints de DCSI (Cf. en infra « Disponibilité de spécialités pharmaceutiques »).
Pertinence de la préparation (balance Bénéfice / Risque évaluée) : <input checked="" type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON	En complément d'une enzymothérapie substitutive par INVERTASE (11 600 UI/mL).
Indication thérapeutique	Déficit en saccharase-isomaltase chez les patients déjà traités par INVERTASE (11 600 UI/mL).
Posologie	<ul style="list-style-type: none"> Enfant < 15 kg : 2 mL (10 800 UI) par repas Enfant > 15 kg : 4 mL (21 600 UI) par repas Posologie établie de manière empirique en tenant compte de : (i) l'activité enzymatique de la glucoamylase ; (ii) la quantité journalière d'amidon ingérée par les enfants en fonction de leur âge [1], [2] ; (iii) la durée physiologique de dégradation de l'amidon alimentaire [3] ; (iv) les quantités de glucoamylase contenues des divers traitements et compléments alimentaires (cf. en infra « Disponibilité de spécialités pharmaceutiques »). Cette posologie doit permettre d'hydrolyser la totalité de l'amidon ingéré lors d'un repas en 40 min. La posologie de la PM pourra éventuellement être ajustée en fonction de l'évolution des patients sous ce traitement.
Dosage	Dosage enzymatique : <ul style="list-style-type: none"> 5 400 UI/mL à 40°C, pH 4,5 1300 UI/mL en conditions physiologiques (37°C, pH 6) [4]

	Formulaire de l'analyse de faisabilité GLUCOAMYLASE, SOLUTION BUVABLE, 324 000 UI – 60 mL, 5400 UI/mL	Service Pharmaceutique UF « PREPARATION ET CONTROLE DE MEDICAMENT » 5, Place d'arsonval 69437 LYON Cedex 03
---	---	---


II. DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES	
Données bibliographiques	Commentaires
Disponibilité de spécialités pharmaceutiques <input type="checkbox"/> OUI <input checked="" type="checkbox"/> NON	Pas de spécialités pharmaceutiques disponibles en France : <ul style="list-style-type: none"> • BI-MYCONASE® (invertase 7500 UI + glucoamylase 2500 UI / 500 mg de poudre) était commercialisé aux Pays-Bas sous forme de poudre pour administration orale [5]. Efficacité décrite et rapportée dès 1976 [6], mais arrêt de la commercialisation en 1998. • Une PM équivalente au BI-MYCONASE® est toujours commercialisée par une pharmacie néerlandaise [7]. Il existe des compléments alimentaires contenant de la glucoamylase pour faciliter la digestion : <ul style="list-style-type: none"> • STARCHWAY® (invertase 7500 UI + glucoamylase 2500 UI / gélule [8]) a été rapporté comme efficace à partir de 3 gélules par repas. Cependant : <ul style="list-style-type: none"> - Posologie difficilement modulable - Coût du traitement est élevé (>100 € / mois) - Statut de complément alimentaire La Glucoamylase utilisée pour la fabrication de notre solution buvable provient de l'entreprise Kerry. Il s'agit d'une MP conforme aux spécifications des enzymes alimentaires, qualifiée par la PUI comme MPUP selon la Pharmacopée Européenne [9].
Données toxicologiques et cliniques relatives au(x) substance(s) active(s) et excipients de la préparation <input checked="" type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON	FDS disponible dans le dossier RDI GLUCOAMYLASE. D'après l'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments (EFSA), la glucoamylase obtenue à partir d' <i>Aspergillus niger</i> ne présente pas de risque de toxicité pour l'homme [10]. Excipients à effets notoires : <ul style="list-style-type: none"> • Glycérol • Glucose • Sodium chlorure • Sodium benzoate • Potassium sorbate Analyse de non-toxicité des excipients effectuée selon : <ul style="list-style-type: none"> • La FDS du fournisseur • Le <i>Handbook of Pharmaceutical Excipients</i> [11] • La liste des excipients à effets notoires de l'ANSM [12] • L'évaluation chimique et technique de la glucoamylase menée par l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture [13] • La dose journalière admissible de l'OMS en sodium benzoate [14] • L'avis de l'EFSA sur le dépassement de la dose journalière admissible en sodium benzoate [15] → Disponible dans le dossier RDI/APR GLUCOAMYLASE
Données sur les voies d'administration <input checked="" type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON	Administration <i>per os</i> décrite dans la littérature : <ul style="list-style-type: none"> • La spécialité BI-MYCONASE® était commercialisée sous forme de poudre pour administration orale [5] • Le complément alimentaire STARCHWAY® est commercialisé sous forme de gélules à avaler [8]

	Formulaire de l'analyse de faisabilité	Service Pharmaceutique UF « PREPARATION ET CONTROLE DE MEDICAMENT » 5, Place d'arsonval 69437 LYON Cedex 03
	GLUCOAMYLASE, SOLUTION BUVABLE, 324 000 UI – 60 mL, 5400 UI/mL	


	<p>Amylo 300 préparé par KERRY ; Enzyme de grade alimentaire utilisée dans la distillerie et le brassage.</p> <p>Innocuité de l'enzyme selon l'EFSA [10].</p> <p>Notre PM de glucoamylase sera administrée <i>per os</i> sous forme de solution buvable.</p>
Données sur la stabilité et sur la formulation <input type="checkbox"/> OUI <input checked="" type="checkbox"/> NON	Amylo 300 préparé par KERRY ; Certificat d'analyse fournisseur + Contrôles PUI. Prévoir une étude de stabilité.
Données sur le contrôle de la substance active et MP <input checked="" type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON	Amylo 300 préparé par KERRY ; Spécifications du fabricant (pH, osmolalité, densité), Certificat d'analyse fournisseur, Flowchart de production. Mise en place d'un dosage de l'activité enzymatique au laboratoire de contrôle qualité – plateforme FRIPHARM®.

	Formulaire de l'analyse de faisabilité	Service Pharmaceutique UF « PREPARATION ET CONTROLE DE MEDICAMENT » 5, Place d'arsonval 69437 LYON Cedex 03
	GLUCOAMYLASE, SOLUTION BUVABLE, 324 000 UI – 60 mL, 5400 UI/mL	

III. FAISABILITE TECHNIQUE	
Formulation galénique	Commentaires
Choix des excipients et leur inertie <input type="checkbox"/> OUI <input checked="" type="checkbox"/> NON	Amylo 300 préparé par KERRY ; pas de modification de la matière première (uniquement un reconditionnement).
Excipients à effet notoire <input checked="" type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON	Excipients à effets notoires : <ul style="list-style-type: none"> • Glycérol • Glucose • Sodium chlorure • Sodium benzoate • Potassium sorbate Analyse de non-toxicité des excipients effectuée selon : <ul style="list-style-type: none"> • La FDS du fournisseur • Le <i>Handbook of Pharmaceutical Excipients</i> [11] • La liste des excipients à effets notoire de l'ANSM [12] • L'évaluation chimique et technique de la glucoamylase menée par l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture [13] • La dose journalière admissible de l'OMS en sodium benzoate [14] • L'avis de l'EFSA sur le dépassement de la dose journalière admissible en sodium benzoate [15] → Disponible dans le dossier RDI/APR GLUCOAMYLASE
Compatibilité physico-chimique de la substance active et excipients <input checked="" type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON	Amylo 300 préparé par KERRY ; Pas d'ajout d'excipients supplémentaires. Prévoir une étude de stabilité.
Formulation galénique validée <input checked="" type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON	Amylo 300 préparé par KERRY.
Procédé de fabrication défini et validé <input checked="" type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON	Répartition à l'aide d'un système de pompe péristaltique adapté aux flacons en verre ambré (type II) de 60 mL avec bouchons inviolables.
<input type="checkbox"/> Préparations stériles : <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> A usage parentéral <input type="checkbox"/> Hors usage parentéral <input checked="" type="checkbox"/> Préparations non stériles	Amylo 300 préparé par KERRY ; Formulation avec 2 conservateurs antimicrobiens ; Contrôles microbiologiques effectué par Kerry. Un bioburden de la MP sera réalisé en routine par le laboratoire d'hygiène de l'hôpital Édouard Herriot afin de vérifier la conformité de la qualité microbiologique de la solution conformément à la Pharmacopée Européenne [9].
Personnel	Commentaires
Personnel qualifié et disponible <input checked="" type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON	Cf reconditionnement invertase
Maîtrise et connaissance du process <input checked="" type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON	Cf reconditionnement invertase
Formation spécifique nécessaire <input type="checkbox"/> OUI <input checked="" type="checkbox"/> NON	Cf reconditionnement invertase
Protection du personnel <input checked="" type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON	La manipulation s'effectue en « salle liquide » B01-00-05 ZPNS : <ul style="list-style-type: none"> • Port de sur-chaussures • Port d'une blouse

	Formulaire de l'analyse de faisabilité	Service Pharmaceutique UF « PREPARATION ET CONTROLE DE MEDICAMENT » 5, Place d'arsonval 69437 LYON Cedex 03
	GLUCOAMYLASE, SOLUTION BUVABLE, 324 000 UI – 60 mL, 5400 UI/mL	

	<ul style="list-style-type: none"> • Port d'une charlotte • Port d'un masque • Lavage simple des mains + désinfection • Port de gants Pas de protection spécifique pour cette préparation.	
Risque personnel <input type="checkbox"/> Important <input type="checkbox"/> Modéré <input type="checkbox"/> Faible <input checked="" type="checkbox"/> Très faible	Cf reconditionnement invertase	
Matériel et locaux	Commentaires	
Locaux de fabrication, de contrôle, de stockage et de mise en quarantaine disponibles <input checked="" type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON	« salle liquide » B01-00-05 ZPNS , chambre froide pour le conditionnement.	
Matériel adapté disponible <input checked="" type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON	Fiche de Fabrication disponible dans le dossier RDI GLUCOAMYLASE.	
Autres contraintes spécifiques sur les locaux et les équipements à prévoir <input type="checkbox"/> OUI <input checked="" type="checkbox"/> NON	Cf reconditionnement invertase ; « salle liquide » B01-00-05 ZPNS.	
Risque vis-à-vis de l'environnement et précautions spécifiques (à préciser) <input type="checkbox"/> OUI <input checked="" type="checkbox"/> NON	MP agroalimentaire.	
Circuit des Matières Premières et Articles de Conditionnement	Commentaires	
Matière première (MP)	AMYLO 300	
Provenance de la MP	Fabricant	Kerry Kilnagleary, Carrigaline, Co. Cork, Ireland
	Distributeur	Kerry Kilnagleary, Carrigaline, Co. Cork, Ireland
MP décrits à la Pharmacopée européenne (PE)	<input type="checkbox"/> OUI <input checked="" type="checkbox"/> NON	
Fournisseur européen possède un certificat GMP et/ou CEP pour chaque MP fournie	<input type="checkbox"/> OUI <input checked="" type="checkbox"/> NON	
Fournisseur est un distributeur ou importateur européen possédant un certificat GMP	<input type="checkbox"/> OUI <input checked="" type="checkbox"/> NON	
Fabricant ou importateur non européen avec certificat GMP et/ou CEP, certificat ASMF ou DMF	<input type="checkbox"/> OUI <input checked="" type="checkbox"/> NON	
Demande d'un certificat d'analyse au fournisseur	<input checked="" type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON Conformité aux spécifications des produits alimentaires.	
Non disponibilité des MP en vrac : utilisation des spécialités pharmaceutiques existantes comme source de MP	<input type="checkbox"/> OUI <input checked="" type="checkbox"/> NON	
MP à Usage Pharmaceutique disponibles chez un ou plusieurs fournisseurs, lesquels	<input type="checkbox"/> OUI <input checked="" type="checkbox"/> NON	
Articles de Conditionnement (AC)	Commentaires	
AC adaptés à la préparation, à lister <input checked="" type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON	Selon la posologie : <ul style="list-style-type: none"> • Enfant < 15 kg : 2 mL par repas soit 8 mL par jour donc production mensuelle de 240 mL (4 flacons de 60 mL par mois et par enfant) • Enfant > 15 kg : 4 mL par repas soit 16 mL par jour donc production mensuelle de 480 mL (8 flacons de 60 mL par mois et par enfant) 	

	Formulaire de l'analyse de faisabilité	Service Pharmaceutique UF « PREPARATION ET CONTROLE DE MEDICAMENT » 5, Place d'arsonval 69437 LYON Cedex 03
	GLUCOAMYLASE, SOLUTION BUVABLE, 324 000 UI – 60 mL, 5400 UI/mL	

	Flacons en verre ambré (type II) 60 mL et bouchons blancs inviolables / Réducteur. Seringues de 5 mL.
Matériau décrit à la PE <input checked="" type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON	N/A
Interactions contenu-contenant réalisées ou, le cas échéant, documentées <input checked="" type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON	Conditionnement de la MP en PEHD et non dans un conditionnement en verre.
Inviolabilité du conditionnement <input checked="" type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON	N/A
Conditions de conservation déterminées et validées <input checked="" type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON	Conservation entre +2 et +8°C, identique à la MP.
Contrôles et stabilité	Commentaires
Contrôle de la MP <input checked="" type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON	Bulletin d'analyse du fournisseur. A réception : <ul style="list-style-type: none"> • Caractères organoleptiques • Mesure du pH et de l'osmolalité • Dosage de l'activité enzymatique • Dosage du glycérol • Dénombrement microbien (flore aérobie totale à 30°C, coliformes totaux, Escherichia coli et Salmonella, flore fongique) [9]
Contrôle du Produit Fini (PF) <input checked="" type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON	Sur deux unités prélevées au hasard dans le lot préparé : <ul style="list-style-type: none"> • Caractères organoleptiques • Mesure du pH • Contrôles microbiologiques (flore aérobie totale à 30°C ; Escherichia coli ; moisissures et levures totales)
Mise au point et validation d'une méthode de dosage <input checked="" type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON	Réactif de dosage MEGAZYME R-AMGR3 [16], [17] ; mesure de l'absorbance à 400 nm dans les conditions opératoires suivantes : 40°C, pH = 4,5
Méthode de dosage adaptée au suivi des stabilités <input checked="" type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON	Méthode de contrôle enzymatique, bioburden, pH et osmolalité, aspects macroscopiques.
Contrôle réalisable sur site <input checked="" type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON	Laboratoire de contrôle qualité – plateforme FRIPHARM®.
Contrôle à sous-traiter, à préciser <input checked="" type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON	Dosage du glycérol au laboratoire de biochimie du CHLS.
Cas particuliers : Si MP apyrogène, contrôle des endotoxines bactériennes à réaliser <input type="checkbox"/> OUI <input checked="" type="checkbox"/> NON Si utilisation d'isotopes stables : Contrôles adéquats prévus : dosage, enrichissement isotopique, toxicité anormale, spectre IR, analyse des schémas de synthèse de la MP <input type="checkbox"/> OUI <input checked="" type="checkbox"/> NON	N/A
Étude de stabilité nécessaire <input checked="" type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON	N/A

6

L'ISPB - Faculté de Pharmacie de Lyon et l'Université Claude Bernard Lyon 1 n'entendent donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.

L'ISPB - Faculté de Pharmacie de Lyon est engagé dans une démarche de lutte contre le plagiat. De ce fait, une sensibilisation des étudiants et encadrants des thèses a été réalisée avec notamment l'incitation à l'utilisation d'une méthode de recherche de similitudes.

LAMBERT Rémi

Mise au point d'une préparation magistrale de glucoamylase en recours dans le traitement du Déficit Congénital en Saccharase-Isomaltase.

Th. D. Pharm., Lyon 1, 2022, 124 p.

RESUME

Le Déficit Congénital en Saccharase-Isomaltase est une maladie génétique rare, qui affecte la capacité de l'organisme à hydrolyser le saccharose et l'amidon en monosaccharides. Un déficit acquis est également possible, en association avec d'autres pathologies digestives. Il se révèle après ingestion de saccharose ou d'amidon par des crampes d'estomac, des ballonnements, des diarrhées et des vomissements. Ces problèmes digestifs peuvent entraîner un retard de croissance et une malnutrition. La thérapie de remplacement enzymatique offre une alternative aux régimes sans saccharose et sans amidon pour diminuer les symptômes. Notre plateforme pharmaceutique propose déjà une solution d'invertase pour améliorer la digestion du saccharose.

Face au besoin d'un traitement permettant de faciliter la digestion de l'amidon, la pharmacie de l'hôpital Edouard Herriot a été sollicitée pour mettre au point une préparation magistrale de glucoamylase en complément de la solution d'invertase.

Notre travail s'est articulé en deux temps. Nous avons tout d'abord réalisé la qualification pharmaceutique d'une solution de glucoamylase de qualité alimentaire conformément à la Pharmacopée Européenne, et développé une méthode de mesure de son activité enzymatique pour effectuer des dosages en routine. Nous avons ensuite envisagé les spécifications réglementaires, scientifiques et économiques d'une telle préparation ainsi que les aspects techniques et logistiques inhérents à sa réalisation. Cette étape ayant été validée, un lot pilote doit être préparé pour vérifier le protocole de fabrication et initier une étude de la stabilité de la préparation.

Au terme de cette étude, nous serons en mesure de dispenser une solution de glucoamylase aux patients déjà traités par notre solution d'invertase. Il sera également intéressant de mener une étude observationnelle afin de suivre l'efficacité, la tolérance et la qualité de vie des patients.

MOTS CLES

Glucoamylase	Déficit Congénital en Saccharase-Isomaltase
Activité enzymatique	Préparation magistrale
Qualification pharmaceutique	Etude de faisabilité

JURY

Monsieur Fabrice PIROT, Professeur des Universités – Praticien Hospitalier
Monsieur Camille MERIENNE, Praticien Hospitalier
Monsieur Alain LACHAUX, Professeur des Universités – Praticien Hospitalier
Madame Chloé MARCHAND, Pharmacien Assistant Spécialiste
Madame Florence VILLARD-TRUC, Praticien Hospitalier

DATE DE SOUTENANCE

29 mars 2022

CONTACT

fabrice.pirot@univ-lyon1.fr