

Unité de Pharmacie hospitalière

Maîtrise Universitaire en Pharmacie

Travail de Recherche

Evaluation dans un modèle in vitro de quatre nébuliseurs employés chez des enfants sous ventilation mécanique

présenté à la

Faculté des sciences de
l'Université de Genève

par

Dolci Ugo

Responsable

Prof. A. Pannatier

Superviseur

A.-L. Sidler-Moix

Genève
2008

RESUME

Evaluation dans un modèle in vitro de quatre nébuliseurs employés chez des enfants sous ventilation mécanique

Dolci Ugo

Responsable : Prof. A. Pannatier

Superviseur : A.-L. Sidler-Moix

Service de pharmacie, Centre Hospitalier Universitaire Vaudois, 1011 Lausanne, Suisse.

L'administration de principes actifs via la voie pulmonaire est une pratique clinique privilégiée pour le traitement de pathologies topiques ainsi que pour certaines pathologies systémiques. Cette voie d'administration est très appréciée des cliniciens car en plus d'être une voie d'administration non-invasive, elle permet entre autre une libération de grande quantité de principe actif directement au site d'action, une mise en place rapide de la réponse thérapeutique, un contournement de l'absorption gastro-intestinale et de l'effet de premier passage hépatique ainsi qu'une efficacité dose dépendante supérieure aux voies d'administrations classiques. Son utilisation chez des patients sous ventilation mécanique fut longtemps considérée comme inefficace en raison du faible taux de déposition des particules d'aérosol dans les voies pulmonaires profondes, siège de l'absorption médicamenteuse. Néanmoins, grâce à l'opiniâtreté de certains cliniciens, cette méthode d'administration n'a pas totalement disparue de l'arsenal thérapeutique. De nos jours, elle connaît, par le développement et la mise sur le marché de nouveaux dispositifs de plus en plus performants et efficaces, un net regain d'intérêt. La mise en place de ces nouvelles technologies ne se fait pas sans susciter quelques réadaptations de la pratique.

L'objectif de ce travail est de déterminer, après la mise au point d'un modèle in vitro, les différentes performances et caractéristiques de trois types de nébuliseurs utilisés en ventilation mécanique.

Les trois type de nébuliseurs étudiés dans ce travail sont : Les nébuliseurs pneumatiques Sidestream[®] *disposable*, (Profile Therapeutics, Royaume-Uni), les nébuliseurs ultrasonique, Multisonic[®] infra Control Typ MN 81100, (Schill GmbH, Probstzella, Allemagne) ainsi que les nébuliseurs à maille vibrante Aeroneb[®] Pro et Solo (Aerogen Ltd., Galway, Ireland).

La détermination de leur efficacité est évaluée à partir de la quantité de salbutamol déposée sur les filtres du modèle in vitro (masse inhalée). Le dosage du salbutamol est effectué par chromatographie liquide à haute performance couplée à un détecteur fluorimétrique.

Les résultats obtenus indiquent qu'il existe de grande différence d'efficacité entre les différents types de nébuliseurs étudiés. Les nébuliseurs à maille vibrante Aeroneb[®] Pro et Solo sont, avec des masse de principe actif inhalées équivalentes à respectivement $73.1 \pm 15.3 \%$ et $74.5 \pm 6.1\%$ de la dose initiale de principe actif, considérés comme les nébuliseurs les plus performants parmi les différents modèles étudiés. Ils précèdent le nébuliseur ultrasonique Multisonic[®] Infra control $47.1 \pm 7.4\%$ ainsi que le nébuliseur pneumatique Sidestream[®] $27.6 \pm 6.4\%$.

Au vu de ces résultats il paraît absolument nécessaire, dans le but d'obtenir une aérosol-thérapie sûre et efficace, d'émettre, en fonction du type de dispositif utilisé, des directives d'adaptation posologique.

REMERCIEMENTS

En premier lieu je tiens à remercier infiniment Anne-Laure Sidler-Moix, Pharmacienne en charge de la supervision de ce travail, pour sa disponibilité, son soutien ainsi que pour son dévouement total à la cause de ce travail. Je tiens également à la remercier pour son humour salvateur et son soutien moral lors des moments les plus difficiles.

Je remercie le Professeur André Pannatier, Pharmacien-Chef du Service de Pharmacie du Centre Hospitalier Universitaire Vaudois, pour l'intérêt qu'il a porté à l'évolution de mon travail. Je tiens encore à lui faire part de ma gratitude pour la grande confiance qu'il m'a accordée.

Un immense merci au Docteur Ermindo Di Paolo, Pharmacien responsable de l'Assistance Pharmaceutique de Pédiatrie, pour son suivi assidu ainsi que pour la pertinence de sa collaboration et sa fine touche d'humour toujours appréciable.

Je remercie chaleureusement le Docteur Jacques Cotting, Médecin-Chef du Service de Soins Intensifs de Pédiatrie, pour sa passion et son enthousiasme communicatifs. Je tiens également à le remercier de m'avoir communiqué une partie de son immense connaissance dans le domaine des soins pédiatriques.

Je tiens à remercier le Docteur Lina Berger, Pharmacienne responsable du Laboratoire d'Analyse du Service de Pharmacie, pour sa précieuse aide apportée tout au long de la partie analytique de ce travail ainsi que pour son soutien lors de quelques interminables soirées HPLC.

Un grand merci « tout en bonne humeur » à Quentin De Halleux, Premier Physiothérapeute affilié aux Services de Pédiatrie, pour sa collaboration technique.

Je remercie considérablement Monsieur Danilo Gubian des Ateliers Microtechniques du CHUV pour sa grande disponibilité ainsi que pour les « micro-délais » qu'il m'a toujours accordés.

Je remercie Monsieur Marques-Vidal Pedro Manuel, Chef de clinique adjoint à l'unité de prévention communautaire, pour son aide lors du traitement statistique des résultats.

Je tiens également à remercier l'ensemble des collaborateurs du Service de Pharmacie du CHUV pour l'accueil qu'ils m'ont accordé.

Je tiens à consacrer ces dernières lignes de remerciements à mes parents ainsi qu'à mon amie Jessica pour le soutien sans limite qu'ils m'ont toujours accordé.

TABLE DES MATIERES

1	INTRODUCTION	1
1.1	LE POUMON COMME VOIE D'ADMINISTRATION THERAPEUTIQUE.....	1
1.2	PHYSIOPATHOLOGIE PULMONAIRE PEDIATRIQUE	3
1.3	LA VENTILATION MECANIQUE	5
1.4	PHARMACOLOGIE DU SALBUTAMOL.....	6
1.5	PREPARATION POUR INHALATION : MONOGRAPHIE DE LA PHARMACOPÉE EUROPEENNE	10
1.6	NEBULISEURS PNEUMATIQUES, ULTRASONIQUES ET A MAILLE VIBRANTE	11
1.6.1	<i>Nébuliseurs pneumatiques : principe de fonctionnement</i>	12
1.6.2	<i>Nébuliseurs ultrasoniques : principe de fonctionnement</i>	14
1.6.3	<i>Nébuliseurs à maille : principe de fonctionnement</i>	16
1.6.4	<i>Caractéristiques techniques des différents nébuliseurs étudiés</i>	18
1.7	L'AEROSOL THERAPIE CHEZ L'ENFANT SOUS VENTILATION MECANIQUE.....	19
1.8	REVUE DE LA LITTÉRATURE	21
2	OBJECTIF DU TRAVAIL.....	23
3	MATERIEL ET METHODE : MODELE IN VITRO	24
3.1	NEBULISEURS, SOLUTION A NEBULISER ET MONTAGE	24
3.2	QUANTITES DE SALBUTAMOL NEBULISEES ET RESIDUELLES	25
3.3	DETERMINATION DE LA VARIATION DE TEMPERATURE DE LA SOLUTION A NEBULISER	27
3.4	DETERMINATION DE L'OSMOLALITE DE LA SOLUTION A NEBULISER	27
4	RESULTATS	28
4.1	QUANTITE DE SALBUTAMOL NEBULISEE	28
4.2	DUREE DE LA NEBULISATION ET DEBIT D'AEROSOL.....	29
4.3	VARIATION DE TEMPERATURE DU NEBULISAT AU LIEU DE SA FORMATION	30
4.4	VARIATION DE LA TEMPERATURE DE LA SOLUTION A NEBULISER.....	30
4.5	VARIATION DE L'OSMOLALITE DE LA SOLUTION A NEBULISER	31
5	DISCUSSION.....	33
5.1	QUANTITE DE SALBUTAMOL NEBULISEE	33
5.2	DUREE DE NEBULISATION ET DEBIT D'AEROSOL.....	36
5.3	VARIATION DE LA TEMPERATURE DE LA SOLUTION A NEBULISER.....	38
5.4	VARIATION DE TEMPERATURE DU NEBULISAT AU LIEU DE SA FORMATION	39
5.5	VARIATION DE L'OSMOLALITE DE LA SOLUTION A NEBULISER	41
6	LIMITES DU TRAVAIL.....	42
6.1	OPTIMISATION DE LA METHODE DE LAVAGE DES FILTRES	42
6.2	INTERPRETATION DU MODELE	43
7	PERSPECTIVES D'AVENIR.....	43
8	CONCLUSION.....	44
9	REFERENCES	45
10	ANNEXES.....	49

LEXIQUES DES ABREVIATIONS

A. P.	Aeroneb [®] Pro
A. S.	Aeroneb [®] Solo
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
Bi-PAP	Bi-level positive airway pressure
BPCO	Bronchopneumopathie chronique obstructive
CHUV	Centre Hospitalier Universitaire Vaudois
CPAP	Continuous positive airway pressure
DPF	Dose de particules fines
FDA	Food and Drug Administration
FPF	Fine particle fraction (= fraction respirable)
GSD	Geometric standard deviation (= déviation standard géométrique)
HIV	Human immunodeficiency virus
HPLC	High performance liquid chromatography
ICH	International Conference on Harmonisation (= Conférence Internationale d'Harmonisation)
ISO	Organisation internationale de normalisation
IV	Intraveineux
LCC	Laboratoire de Chimie Clinique
LOD	Limit of detection (= limite de détection)
LOQ	Limit of quantification (= limite de quantification)
MMAD	Mass median aerodynamic diameter (= diamètre aérodynamique médian mas-
sique)	
MMD	Mass median diameter (= diamètre massique moyen)
Ms.	Multisonic [®] Infra control
PaCO ₂	Pression partielle artérielle de CO ₂
PAV	Proportional assist ventilation (= ventilation assistée proportionnelle)
S.	Sidestream [®]
SFSTP	Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques
SIP	Soins intensifs de pédiatrie
VAC	Ventilation assistée contrôlée
VC	Ventilation en volume contrôlé
VM	Ventilation mécanique
VNI	Ventilation non invasive
VPC	Ventilation en pression contrôlée
VRS	Virus respiratoire syncytial (= RSV)
VSAI	Ventilation spontanée avec aide inspiratoire
VS-PEP	Ventilation spontanée en pression expiratoire positive

1 INTRODUCTION

1.1 Le poumon comme voie d'administration thérapeutique

L'administration de principes actifs via l'appareil respiratoire pour l'obtention d'effets thérapeutiques topiques ou systémiques n'est pas une pratique moderne comme pourrait le faire croire l'intérêt qui lui est actuellement porté, mais elle est bien une pratique ancestrale. En effet, bien que le poumon soit un organe qui ait évolué de manière à éliminer la grande majorité des particules inspirées, l'homme s'est rapidement rendu compte que l'inhalation de substances sous forme de fumée, de vapeur ou de fine poudre pouvait avoir une influence sur son corps et son esprit. L'histoire de la médecine relate que pour diminuer les symptômes de l'asthme, la consommation sous forme de fumée d'extraits de plantes (*Datura ferox*, L.) était déjà connue des indiens il y a plus de 4000 ans¹. Un second exemple plus universel et plus intemporel de l'utilisation des voies respiratoires comme voie d'administration de principes actifs, est la consommation à des fins mystiques et même, actuellement, à des fins récréatives, de plantes hallucinogènes, psychotropes et stimulantes sous forme d'extraits séchés et fumés ou inhalés (*Datura stramonium*, L., *Cannabis sativa*, L., *Erythroxylum coca*, Lam.).

La voie d'administration pulmonaire ou aérienne basse est composée de la trachée, des bronches et des alvéoles pulmonaires (figure 1). La trachée est une structure tubulaire cartilagineuse revêtue d'un épithélium cylindrique pseudostratifié cilié pourvu de cellules caliciformes (mucosécrétantes). Les bronches possèdent une structure proche de celle de la trachée. Elles sont revêtues d'un épithélium cylindrique cilié pseudostratifié pourvu lui aussi de cellules caliciformes. La structure de cet épithélium se simplifie au fur et à mesure de la division de l'arbre bronchique pour aboutir à un épithélium cylindrique cilié simple au niveau des bronchioles respiratoires. A ce niveau, un nouveau type de cellules fait son apparition dans la composition cellulaire de l'épithélium, les cellules de Clara. Ces cellules ne sont pas ciliées et ne sécrètent apparemment aucun mucus. Leur fonction n'est pas clairement définie, mais il semblerait qu'elles jouent un rôle protecteur contre les effets nocifs des substances toxiques et cancérogènes inhalées ainsi que contre l'emphysème. On leur attribue aussi les fonctions de production et/ou d'élimination de surfactant, ainsi que le rôle de cellules souches capables de donner naissance aux autres types de cellules de l'épithélium bronchiolaire². Les bronchioles respiratoires aboutissent finalement à la partie distale de l'arbre respiratoire, les alvéoles. Les alvéoles sont assimilables à des petits sacs de 250 µm de diamètre délimités par une mince paroi composée d'une lame basale sur laquelle reposent des pneumocytes de type I et II ainsi que des macrophages alvéolaires². Les pneumocytes de type I représentent environ 40% de la population des cellules alvéolaires, mais ils recouvrent jusqu'à 90% de la surface des alvéoles². Leur épaisseur très fine ainsi que leur fusion ponctuelle avec les capillaires sanguins les rendent particulièrement bien adaptés aux échanges gazeux. Les pneumocytes de type II représentent environ 60% de la population des cellules des alvéoles mais ils n'occupent une surface équivalente qu'à environ 10% de la surface totale des alvéoles². Leur principale fonction est la production de surfactant. Quant aux macrophages alvéolaires leur fonction réside en la phagocytose des poussières fines inhalées ainsi que des bactéries.

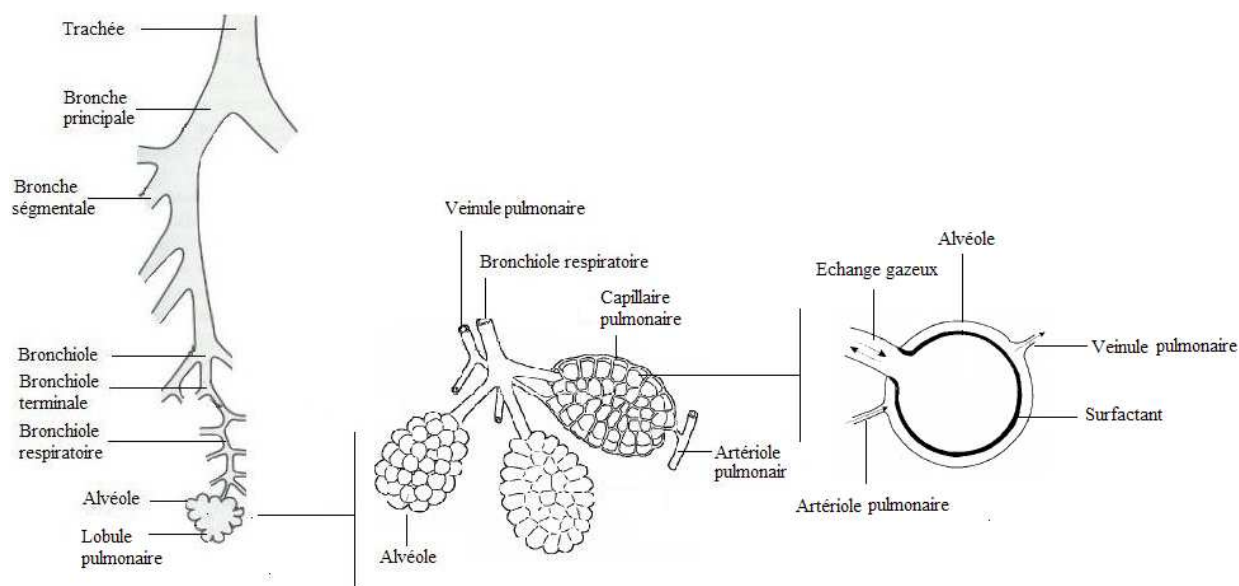


Figure 1 : Subdivision de l'arbre bronchique et structures des voies intrapulmonaires

Dès lors, selon les considérations anatomiques et physiologiques précédentes, il paraît évident que l'évolution de l'appareil respiratoire vers des structures de diamètres de plus en plus faibles ainsi que la présence de mucus, de cils vibratiles et de surfactant, sont autant de facteurs qui rendent la déposition et l'absorption de principes actifs au niveau pulmonaire difficile. Néanmoins, malgré ces obstacles anatomiques et physiologiques, la voie d'administration pulmonaire est considérée de nos jours comme une voie d'administration privilégiée et efficace pour le traitement de pathologies topiques, ainsi que pour le traitement de certaines pathologies systémiques. Le tableau 1 regroupe les différents avantages liés à l'administration de principes actifs par la voie pulmonaire lors de traitements de pathologies pulmonaires et systémiques.

Tableau 1 : Avantages liés à l'administration de principes actifs par la voie pulmonaire³

Pathologies pulmonaires	Pathologies systémiques
Mise en place rapide de la réponse thérapeutique	Voie d'administration non invasive
Diminue la survenue d'effets indésirables systémiques	Permet la dispensation d'une large gamme de principes actifs
Contourne l'absorption gastro-intestinale ainsi que le premier passage hépatique	Contourne le premier passage hépatique
Permet de délivrer de grandes quantités de principes actifs directement au site d'action	Cinétique d'absorption reproductible
Permet d'obtenir avec des doses plus faibles des effets thérapeutiques similaires ou supérieurs à ceux obtenus lors d'administrations par voie systémique de doses usuelles	Présente un métabolisme moins important ainsi qu'un environnement moins hostile que ceux rencontrés dans le tractus gastro-intestinal

1.2 Physiopathologie pulmonaire pédiatrique

Lors de la naissance, l'appareil respiratoire du nouveau-né n'est pas encore totalement arrivé au terme de son développement anatomique et physiologique. Sa maturation postnatal jusqu'à l'âge adulte incite à considérer le système respiratoire de l'enfant comme un système en développement à part entière et non comme une réplique en miniature du système respiratoire adulte. La maturation et la différenciation de tous les éléments composant la sphère broncho-pulmonaire sont progressives et expliquent la fréquence et la gravité des agressions respiratoires à cet âge⁴.

Les troubles respiratoires pédiatriques sont la source, chez le jeune enfant, d'environ une consultation en médecine générale sur deux et d'environ un tiers des admissions pédiatriques en urgence⁵.

Les infections respiratoires sont considérées, avec une fréquence de six à huit infections par an, comme les infections les plus fréquentes de l'enfant d'âge préscolaire⁵. En générale, ces infections sont modérées et leur pronostic vital est bon. Néanmoins, dans certains cas, le pronostic vital de l'enfant malade peut être sérieusement remis en question et une hospitalisation d'urgence doit être envisagée. Les infections respiratoires sont causées dans 80 à 90 % des cas par des virus du type adénovirus, rhinovirus, (para)influenzae et virus respiratoire syncytial (VRS)⁵. Chacun de ces virus peut être à la base de tableaux cliniques différents. A titre d'exemple, le VRS peut engendrer soit une bronchiolite, une laryngite, une pneumonie ou alors une rhinite simple. Les virus ne sont pas la seule source d'infections respiratoires. En effet, un certain nombre de bactéries telles que *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenza*, *Bordetella pertussis*, *Mycoplasma pneumoniae* et *Mycobacterium tuberculosis*⁵ peuvent aussi être à l'origine d'infections respiratoires plus ou moins sévères. Les infections broncho-pulmonaires aiguës les plus couramment observées sont les bronchites, bronchiolites, pneumonies et moins fréquemment, les abcès du poumon et les pneumopathies alvéolo-interstitielles⁶. Toutes ces pathologies doivent faire l'objet d'une prise en charge médicale rigoureuse et attentive afin d'éviter tout risque de survenue de séquelles irréversibles au niveau du poumon.

En regard à ces infections aiguës, de nombreuses broncho-pneumopathies chroniques sont fréquemment prises en charge dans les unités de soins pédiatriques. Parmi celles-ci, les plus fréquentes sont l'asthme, la mucoviscidose, la broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO), l'emphysème, la dyskinésie ciliaire congénitale ainsi que des infections respiratoires simples combinées à une immunodéficience.

L'asthme, en touchant 6 à 10% de la population de moins de quinze ans, est la maladie chronique la plus fréquente chez l'enfant⁶. Elle est actuellement responsable de 10 à 20% de toutes les admissions en urgence des services de pédiatrie et provoque au Royaume Uni 20 à 30 décès par an⁵. Selon la définition du terme *maladie* émise par Louis Pasteur (1822-1895), l'asthme n'est pas une maladie au sens strict mais plutôt un syndrome multifactoriel défini par des symptômes cliniques (sibilance), des résultats fonctionnels (obstruction bronchique), des données anatomo-pathologiques (inflammation bronchique) et des facteurs étiologiques favorisants ou déclenchants (allergènes, effort, inhalation d'irritant ou d'air froid)⁷. L'asthme est engendré par une hyperréactivité bronchique (inflammation et hypersécrétion) et provoque une obstruction bronchique qui peut être spontanément réversible ou nécessiter la mise en place d'un traitement thérapeutique. Plusieurs phénomènes ont été décrits comme responsables de l'obstruction bronchique⁸ :

- Une hypertrophie et une hyperréactivité du muscle lisse qui entoure les voies aériennes (les médiateurs de l'inflammation participent à l'augmentation de sa contractilité).
- Une hypertrophie des glandes à mucus qui contribue à l'épaississement de la paroi.
- Une augmentation de la surface cartilagineuse des bronches de calibre intermédiaire.
- Un pseudo-épaississement de la membrane basale (ou fibrose sous-épithéliale).
- Une inflammation caractérisée par un œdème, un infiltrat cellulaire polymorphe (mastocytes, polynucléaires neutrophiles et éosinophiles, lymphocytes, macrophages) et une hyper-sécrétion bronchique (conséquence des phénomènes précédents).

La stratégie adoptée lors de la prise en charge thérapeutique de l'asthme a pour but d'atteindre trois objectifs principaux⁴. Premièrement, le traitement doit faire disparaître les crises et réduire à son minimum la symptomatologie clinique. Deuxièmement, le traitement doit permettre au patient d'avoir une activité physique normale et troisièmement, il doit permettre de normaliser la fonction ventilatoire en agissant en profondeur sur l'inflammation bronchique. La réalisation de ce triple objectif vise à améliorer la qualité de vie du patient et doit donc également tenir compte du rapport bénéfice/risque et des contraintes liées à la prise des différentes thérapeutiques⁴. Le tableau 2 relate les indications pédiatriques recommandées pour le traitement des épisodes aigus de l'asthme.

Tableau 2 : Indications du traitement médicamenteux des épisodes aigus de l'asthme⁹

	Nourrisson	Enfant < 7ans	Enfant > 7 ans
Accès de sibillance et de toux	Salbutamol solution <i>per os</i> ou spray avec <i>babyhaler</i> [®] ou <i>AeroChamber</i> [®]	β2-adrénergiques avec chambre d'inhalation	β2-adrénergiques spray
Crise d'asthme commune	Salbutamol inhalé 1. aérosol doseur préssurisé 2. nébulisation		Salbutamol nébulisation Corticoïdes <i>per os</i>
Crise d'asthme sévère et attaque d'asthme	Admission aux urgences Inhalation salbutamol +/- anticholinergique 1. aérosol doseur pressurisé 2. nébulisation Corticoïde <i>per os</i> ou IV Oxygène Aminophylline IV (âge > 1an) (pratiquement plus utilisé en Suisse)		
Etat de mal asthmatique	Hospitalisation en soins intensifs Oxygénothérapie Salbutamol IV 1/- en nébulisation IV + anticholinergique Corticostéroïdes IV Aminophylline IV (âge > 1an) (pratiquement plus utilisé en Suisse) Hydratation VM parfois avec curarisation		

De manière générale et ce à de très rares exceptions, la voie nébulisée n'est pas indiquée pour le traitement de fond de l'asthme. En effet, pour un tel traitement l'administration de broncho-dilatateurs et de corticostéroïdes à l'aide d'aérosol-doseur avec chambre d'inhalation ou à l'aide d'inhalateurs de poudre est beaucoup plus efficace et plus simple à mettre en place¹⁰.

1.3 La ventilation mécanique

La mise en place d'une assistance respiratoire de type ventilation mécanique (VM) fait partie des actes médicaux de soutien aux fonctions vitales les plus employés dans les unités de soins intensifs adultes et pédiatriques¹¹. En effet, la diminution de l'apport d'oxygène à l'organisme peut rapidement mettre en péril, selon le degré de l'insuffisance respiratoire, le pronostic vital du patient. Lorsqu'un patient insuffisant respiratoire présente un ou plusieurs des critères énumérés dans le tableau suivant, il est impératif pour sa survie qu'il soit rapidement transféré dans une unité de soins intensifs afin de mettre en place une assistance respiratoire artificielle¹². De manière générale, on distingue la ventilation assistée de la ventilation contrôlée. Dans le premier cas, le respirateur assiste et complète la respiration spontanée alors que dans le second, la totalité de la respiration est prise en charge par le respirateur.

Tableau 3 : Indication de la ventilation mécanique¹³

Insuffisance Ventilatoire :

- PaCO₂ élevée et acidémie
- délabrement thoracique
- évolution défavorable d'une insuffisance respiratoire, avec signe de fatigue, même si l'hypercapnie n'est pas sévère (asthme, pathologies neuromusculaires)

Hyperventilation :

- pour contrôler l'œdème cérébral

Hypoxémie sévère :

- oxygénothérapie et/ou CPAP insuffisante (ou mal tolérée)
- évolution défavorable (signe de fatigue, risque de décompensation brutale)

Insuffisance circulatoire aiguë (choc)

Anesthésie générale ou sédation/analgésie importante

En général, la première intention thérapeutique consiste à mettre en place une ventilation de type non invasive (VNI). Ce type de ventilation permet d'éviter les complications liées à l'intubation endotrachéale⁴ et de réduire dans de nombreux cas le temps d'hospitalisation et le risque d'infection. L'interface patient-machine se présente sous la forme de masques faciaux ou nasals et plus rarement sous la forme d'embouts buccaux reliés à des respirateurs de type volumétrique ou barométrique¹². Les modes de ventilation employés en VNI sont principalement des modes de ventilation dits en pression positive tels que la ventilation spontanée en pression expiratoire positive (VS-PEP), la ventilation spontanée avec aide inspiratoire (VSAI), la ventilation assistée en pression contrôlée (VPC) et la Bi-PAP⁴. La VNI en mode pression négative est beaucoup plus rarement utilisée.

La ventilation en pression positive représente la modalité d'assistance ventilatoire la plus utilisée⁴. Elle consiste à assurer un gradient de pression positive en augmentant, lors de l'inspiration, la pression dans les voies aériennes supérieures au-dessus de la pression atmosphérique. L'expiration passive survient lorsque la pression inspiratoire positive disparaît (ouverture d'une valve). A l'opposé, la ventilation en pression négative abaisse la pression alvéolaire à l'aide d'un système clos qui crée une pression négative autour du thorax. Le retour de la pression périthoracique à la pression atmosphérique permet une expiration passive comme lors de la ventilation spontanée⁴.

Lors d'échecs thérapeutiques de la VNI ainsi que dans les cas où le patient est inconscient et/ou incapable d'assurer de lui-même une respiration suffisante, le passage à la VM s'avère nécessaire.

La ventilation mécanique permet, via des modalités d'assistance ventilatoire en pression positive ou négative, d'apporter un mélange air-oxygène directement aux alvéoles du patient. Les voies respiratoires des patients sous VM sont raccordées au respirateur par l'intermédiaire d'un tube endotrachéal introduit par le nez ou la bouche et plus rarement par l'intermédiaire d'une canule de trachéotomie. Tout comme pour la VNI, plusieurs modalités ventilatoires sont disponibles (tableau 4).

Tableau 4: Modalités ventilatoires les plus courantes en VM⁴

Modalité ventilatoire	Description
Ventilation en volume contrôlée (VC)	Prise en charge totale de la respiration
Ventilation assistée contrôlée (VAC)	Comparable à la VC avec possibilité de déclencher le cycle inspiratoire par un effort inspiratoire
Ventilation en pression contrôlée (VPC)	Le volume insufflé dépend de la compliance et de la résistance inspiratoire du patient
Ventilation assistée proportionnelle (PAV)	Le respirateur ajuste la pression dans les voies aériennes selon l'effort inspiratoire évalué par le volume inspiré et le débit inspiratoire

Les respirateurs (ou ventilateurs) actuellement utilisés en VM peuvent être divisés selon deux modes de fonctionnement différents, le mode volumétrique et le mode barométrique. Les respirateurs à volume constant délivrent au patient un volume courant de gaz prédéfini. Une fois ce volume délivré, une valve expiratoire s'ouvre et l'expiration commence. Les respirateurs barométriques ne délivrent pas un volume constant de gaz. En effet, avec ce type d'appareil l'inspiration est interrompue uniquement lorsque la pression d'insufflation dépasse un seuil préalablement réglé. Les dernières générations de respirateur permettent de combiner ces deux modes de fonctionnement (p.ex. : ventilateur Galileo, Hamilton Medical Ltd, Rhäzuns, Suisse). Ces appareils possèdent toute une gamme de systèmes de surveillances qui permettent de suivre l'évolution de différents paramètres tels que les volumes insufflés et expirés, les pressions d'insufflation et leurs moyennes, les pressions de fin d'expiration, la fréquence respiratoire, les débits d'insufflation et d'exsufflation, la compliance et la résistance respiratoire⁴.

1.4 Pharmacologie du salbutamol

Le salbutamol (figure 2) est un dérivé synthétique de la noradrénaline appartenant à la famille des agonistes adrénergiques β_2 -sélectifs à courte durée d'action (4-6h)¹⁴.

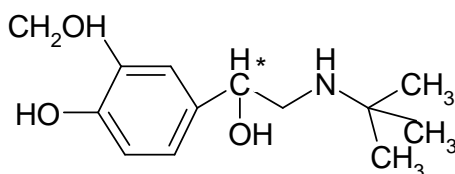


Figure 2 : Formule développée du salbutamol

[[[(1,1-Dimethylethyl)amino]methyl]-4-hydroxy-1,3benzenedimethanol

$C_{13}H_{21}NO_3$, MM = 239.3 g/mol,

$pK_a = 9.3, 10.3,$

$\text{LogP}_{(\text{octanol/eau})} = 0.6$

Le mécanisme d'action des agonistes adrénergiques β_2 -sélectifs repose (figure 3) sur le fait que la stimulation des récepteurs β_2 adrénergiques présents dans la musculature lisse des voies respiratoires induit une relaxation de cette dernière. Le relâchement de la musculature lisse des voies respiratoires, ou broncho-dilatation, est engendré par l'activation de l'adénylate cyclase via une protéine G activatrice (Gs). L'activation de cette enzyme membranaire va provoquer l'augmentation de la concentration intracellulaire d'AMPc. L'augmentation d'AMPc va inactiver par phosphorylation la myosine kinase, rendant ainsi impossible la phosphorylation de la myosine et par conséquent, la contraction musculaire. En plus de leur effet broncho-dilatateur, des molécules telles que le salbutamol présentent un effet broncho-protecteur en diminuant la libération de médiateurs de l'inflammation et en augmentant la clairance mucociliaire. La mise en place de la réponse thérapeutique (broncho-dilatation) a lieu environ cinq minutes après l'inhalation de la dose requise.

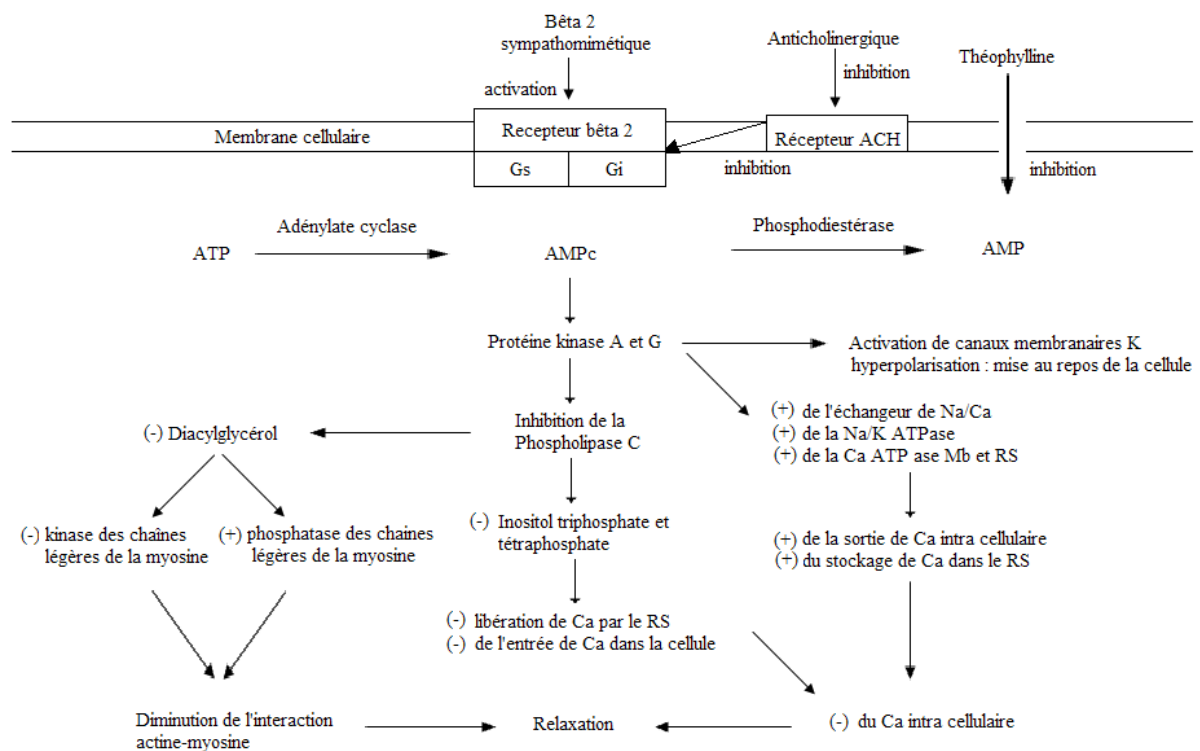


Figure 3 : Mécanisme d'action des agonistes adrénergiques β_2 -sélectifs¹⁵

Comme pour la majorité des β -sympathomimétiques, l'action thérapeutique est principalement liée à l'énantiomère (-)R. Néanmoins, la forme commerciale la plus répandue du salbutamol consiste en un mélange racémique (1:1) des deux énantiomères. Au cours des années 1990, la firme américaine Sepracor (Marlborough, Massachusetts, Etats-Unis) a reçu de la part de la FDA, l'autorisation de mise sur le marché pour une spécialité à base de l'eutomère ((-)R) du salbutamol, le levoalbuterol. L'absence de l'énantiomère (+)S permet de diminuer l'apport de substance exogène dans l'organisme ainsi que les effets indésirables liés au distomère. Selon Nowak et al¹⁶, il a été démontré au cours d'un essai prospectif randomisé, qu'il n'existe pas de différences significatives du point de vue efficacité et sécurité entre les deux traitements. De plus, ils ont montré que la balance coût/bénéfice est largement plus favorable au mélange racémique.

Le tableau 5 regroupe les différentes indications thérapeutiques du salbutamol en fonction de la voie d'administration choisie.

Tableau 5 : Indication du salbutamol selon la voie d'administration¹⁷

Voie d'administration	Indication thérapeutique
Aérosol	<ul style="list-style-type: none"> - Traitement et prévention des bronchospasmes dans l'asthme bronchique et la bronchite chronique avec ou sans emphysème pulmonaire - Traitement du bronchospasme aigu et prévention de l'asthme d'effort - Traitement d'entretien de l'asthme chronique et de la bronchite chronique
Orale (rare)	<ul style="list-style-type: none"> - Traitement et prévention des bronchospasmes dans l'asthme bronchique (asthme d'effort inclus) et la bronchite chronique
Intraveineuse	<ul style="list-style-type: none"> - Traitement des bronchospasmes graves liés à l'asthme ou à la bronchite - Traitement de l'état de mal asthmatique - Traitement des menaces d'accouchement prématuré non compliqué pendant le dernier trimestre de la grossesse (tocolytique)

Les posologies en doses uniques couramment administrées sous forme d'aérosol en soins pédiatriques pour le traitement de l'asthme et pour la prévention du bronchospasme sont regroupées dans le tableau 6.

Tableau 6 : Posologies standards admises pour le traitement d'une crise d'asthme aiguë grave¹⁸

Administration	Posologie
Nébulisation intermittente	150µg/kg ou 0.03 ml/kg (min : 0.3 ml/dose ; max : 1ml/dose) d'une solution à 5mg/ml diluée dans 1.5-3 ml de NaCl 0.9% ; répéter toutes les 1 à 4 h au besoin
Nébulisation en continu	150µg/kg/h ou 0.03 ml/kg/h (max : 1 ml/h) d'une solution à 5 mg/ml diluée dans du NaCl 0.9% ; doubler la posologie, si nécessaire après 20 min et la tripler si nécessaire après 40 min
IV en perfusion continue	Vitesse initiale de 0.7 µg/kg/min, augmenter de 0.2 µg/kg/min toutes les 10-15 min (max : 4 µg/kg/min) jusqu'à ce que l'entrée d'air soit nettement améliorée

Les effets indésirables les plus courants liés à la prise de salbutamol sont regroupés dans le tableau 7.

Tableau 7 : Effets indésirables les plus courants liés à la prise de salbutamol¹⁷

Système / organe	Description	Fréquence [cas]
Système nerveux	Tremblements (en particulier les mains) et céphalées	≥ 1/100 à < 1/10
Cœur	Palpitations (compensation vasodilatation périphérique) et tachycardies	≥ 1/1000 à < 1/100
Système gastro-intestinal	Irritation des muqueuses de la bouche et du pharynx	≥ 1/1000 à < 1/100
Système musculo-squelettique	Crampes	≥ 1/1000 à < 1/100

Il a été clairement établi qu'une tolérance par désensibilisation des récepteurs β-adrénrgiques peut se mettre en place après quelques semaines de traitement. L'apparition de cette tolérance n'a pas de conséquences cliniques majeures. En effet, la réadaptation de la posologie par le

médecin traitant permet de rétablir rapidement un effet bronchodilatateur optimal. Le risque majeur encouru par le patient en cas de survenue d'une tolérance au salbutamol, est le surdosage de principe actif lié à une « auto adaptation posologique ». Les symptômes d'un surdosage au salbutamol se traduisent par une augmentation excessive de la stimulation β -adrénergique et/ou par l'augmentation de l'intensité et/ou de la fréquence des effets indésirables. En général, l'arrêt du traitement permet le retour à une situation normale. Néanmoins, dans le cas de surdosages plus importants, l'administration de sédatifs, de tranquillisants voir de bêtabloquants cardiosélectifs (métoprolol), peut être indiquée. Les cas extrêmes peuvent nécessiter la prise en charge du patient dans une unité de soins intensifs.

L'utilisation du salbutamol est contre indiquée lorsqu'il existe un risque d'hypersensibilité à l'un des composants de la forme galénique, lors du 2e trimestre de la grossesse ainsi que lors d'administration simultanée de bêtabloquants non sélectifs (p.ex. le propranolol). De plus, le salbutamol doit être utilisé avec prudence chez les patients souffrant des affections ou présentant les états suivants¹⁷ : hyperthyroïdie, hypertension, tachycardie, tachyarythmie, myocardiopathie obstructive hypertrophique, infarctus du myocarde récent, cardiopathie coronaire grave, myocardite, vice mitral, syndrome de Wolff-Parkinson-White, phéochromocytome, diabète sucré, tendance aux spasmes, hypokaliémie et traitement antécédent par des sympathomimétiques à hautes doses.

Le métabolisme du salbutamol est de type hépatique et son élimination est prise en charge par le rein (51-64% sous forme inchangée)¹⁸. En cas d'insuffisances rénale et/ou hépatique, il n'est pas nécessaire de procéder à une adaptation posologique particulière¹⁸. Les données pharmacocinétiques principales pour l'administration de salbutamol sous forme d'aérosol sont les suivantes¹⁷ : 10–20% de la dose pénètrent dans les poumons; le reste se dépose dans le pharynx pour être ensuite dégluti ou reste adhérent à l'inhalateur. La fraction qui parvient dans les voies respiratoires inférieures est absorbée au niveau du parenchyme pulmonaire mais n'est pas métabolisée dans le poumon. La liaison aux protéines plasmatiques s'élève jusqu'à 10%. Après avoir atteint la circulation sanguine, la substance est métabolisée par le foie, puis est excrétée par voie rénale sous forme inchangée et sous forme de sulfate de phénol. Après l'absorption gastro-intestinale, la fraction déglutie est largement métabolisée en sulfate de phénol lors de son premier passage hépatique. Le salbutamol administré par voie intraveineuse a une demi-vie d'élimination de 4–6 heures.

Tableau 8: Liste des spécialités disponibles sur le marché helvétique contenant du salbutamol¹⁷

Spécialité	Principe actif	Firme
Ecovent [®] solution pour inhalation	Salbutamol sulfate	Sandoz [®]
Ecovent [®] Easyhaler	Salbutamol sulfate	Sandoz [®]
Salamol [®] 100 Autohaler [®]	Salbutamol sulfate	Teva Pharma [®]
Ventolin ^{®®} Nebuliseur doseur, Diskus, Solution pour inhalation	Salbutamol sulfate	GlaxoSmithKline [®]
Ventolin ^{®®} Sirop	Salbutamol sulfate	GlaxoSmithKline [®]
Ventolin ^{®®} Solution injectable, Concentré pour perfusion	Salbutamol sulfate	GlaxoSmithKline [®]
Dospir [®] solution pour inhalation	Bromure d'ipratropium et Salbutamol sulfate	Boehringer Ingelheim [®]

1.5 Préparation pour inhalation : Monographie de la pharmacopée européenne

La Pharmacopée Européenne 4 définit, sous le chapitre **Préparations pour inhalation** ou **Inhalada**, les préparations destinées à la voie pulmonaire comme des « préparations liquides ou solides destinées à être administrées dans le poumon sous forme de vapeurs ou d'aérosols, en vue d'une action locale ou systémique ». Pour les préparations solides ou liquides devant être converties en aérosols (dispersion de particules solides ou liquides dans un gaz), la pharmacopée européenne préconise l'emploi d'inhalateurs pressurisés à valve doseuse, d'inhalateurs à poudre sèche et de nébuliseurs.

Dans ce travail, seule la dernière catégorie d'appareils précédemment citée va être étudiée.

La préparation de solutions ou de suspensions pour inhalation doit être en mesure de répondre aux *essais de conservation* (5.1.3) et d'*uniformité de la dose délivrée*, exigé par la Ph. Eur.. De plus, afin de garantir qu'une fraction significative se dépose dans les poumons, ces formes pharmaceutiques doivent être soumises à l'*évaluation aérodynamique du diamètre des particules libérées* (2.9.18). En effet, les sites de déposition des particules d'aérosol (figure 4) sont directement liés, par des phénomènes d'impaction, de sédimentation et de mouvements Brownien, à la taille des particules d'aérosol. Il est encore à noter que la déposition de particules d'aérosol dans les alvéoles peut être fortement réduite par différents facteurs physiologiques tels que : la morphologie pulmonaire, l'inspiration buccale, le débit inspiratoire (plus il est élevé, plus la déposition alvéolaire est faible), le tidal volume (= volume inspiratoire ou expiratoire) ainsi que par différents états pathologiques (modification possible de l'architecture broncho-pulmonaire).

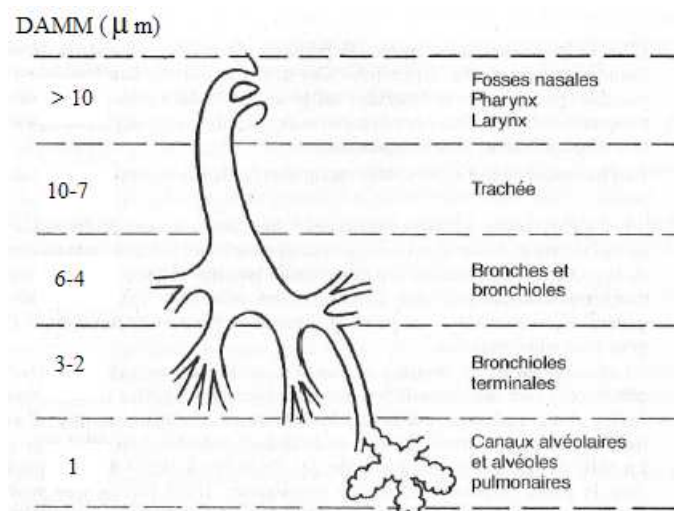


Figure 4 : Niveau de pénétration des particules en fonction de leur diamètre¹⁹
(actualisé à partir de Dautzenberg¹⁰)

L'essai *Evaluation aérodynamique des particules fines* doit être effectué, sauf exception autorisée, avec l'un des appareils suivants : impacteur à cascade en verre, impacteur à cascade en métal, impacteur à cascade multi-étages, échantillonneur granulométrique Andersen. Néanmoins, des appareils à diffraction laser, type granulomètre Malvern Mastersizer S[®], sont couramment employés, dans différentes études, en accord avec les normes britanniques (BS 7711/3, 1994) et australienne/néo-zélandaises (AS/NZS 4236, 1994).

De manière générale, la granulométrie des particules d'aérosol est caractérisée par les paramètres suivants :

- Le diamètre massique moyen (MMD) qui représente le diamètre pour lequel 50% (m/m) des particules possèdent un diamètre supérieur à cette valeur et 50% (m/m) un diamètre inférieur.
- Le diamètre aérodynamique médian massique (MMAD) permet de prendre en considération le diamètre géométrique, la forme et la densité des particules d'aérosol (Il s'agit en fait du produit entre le MMD et la densité des particules de l'aérosol).
- La déviation standard géométrique (GSD) qui est définie comme le ratio des diamètres des particules correspondant au 84% et 50% sur la courbe de distribution cumulative de la masse des particules. Une valeur de GSD inférieure à 1.2 signifie que toutes les particules analysées possèdent la même taille (monodispersion). De manière générale, le GSD des particules d'aérosol est supérieure à 1.2 (polydispersion).
- La dose de particules fines (DPF) représente l'expression de la fraction granulométrique des particules de diamètre inférieur à 5µm. Cette fraction est aussi communément nommée fraction respirable.

La Pharmacopée Européenne stipule que le pH des préparations liquides dispersées au moyen de nébuliseurs doit être compris entre 3.0 et 8.5.

Il est encore important de relever que la pharmacopée européenne n'émet aucune directive ni aucune recommandation sur l'osmolalité des solutions à nébuliser. Cette absence d'information peut sembler surprenante au vue des conséquences cliniques que peut avoir l'administration d'aérosols hypo- ou hyper-osmotiques. En effet, l'administration de tels aérosols peut provoquer chez certains patients des bronchospasmes réactionnels indésirables. Ceux-ci sont aussi communément appelés, lors de l'administration de β_2 -sympathomimétiques, « bronchospasmes paradoxaux » et représentent un effet indésirable rare lié à toute thérapie par aérosol. Plusieurs cas de bronchospasmes paradoxaux ont été relevés lors de l'administration de β_2 -sympathomimétiques sans que leurs mécanismes de survenue ne soient clairement définis. Cocchetto & al²⁰ ont émis l'hypothèse que la survenue de ces bronchospasmes paradoxaux pouvait être liée à trois mécanismes différents. Dans un premier cas, ces bronchospasmes pourraient être engendrés par l'administration de solutions non iso-osmotiques. Dans un second cas, l'évolution de l'acidité de la solution à nébuliser en cours de nébulisation pourrait être la cause des bronchospasmes et troisièmement, cet effet indésirable pourrait être provoqué par la présence d'agents conservateurs (benzalkonium HCl).

1.6 Nébuliseurs pneumatiques, ultrasoniques et à maille vibrante

Les nébuliseurs sont des dispositifs médicamenteux actifs non invasifs destinés à introduire des liquides ou des gaz dans l'organisme (Ordonnance fédérale sur les dispositifs médicamenteux). Depuis 2001, les exigences relatives à leur mise sur le marché sont réglementées au niveau européen. La mise en place de la norme franco-européenne, NF-EN 13544-1²¹, a permis d'établir, en plus d'un standard de qualité, un moyen rapide de connaître les performances et caractéristiques des différents nébuliseurs commercialisés. En effet, les nébuliseurs satisfaisant à cette norme sont marqués de l'estampille CE médical et affichent, conformément aux exigences de la norme, leurs performances de manière claire et compréhensible.

Les performances devant être indiquées de manière générale sont : le volume de remplissage minimal et maximal, la granulométrie des gouttelettes d'aérosol, la quantité d'aérosol produit en fonction de la quantité de solution à nébuliser introduite, le débit de l'aérosol produit, ainsi que l'indication pour laquelle le système est prévu. D'autres indications spécifiques peuvent être exigées selon le type de nébuliseur décrit.

1.6.1 Nébuliseurs pneumatiques : principe de fonctionnement

Le développement des nébuliseurs pneumatiques (jet nebulisers) est basé sur les principes élémentaires de la dynamique des fluides. En effet, selon le traité *Hydrodynamica* publié en 1738 par D. Bernoulli (1700-1782), l'écoulement d'un fluide s'accélère lorsque le diamètre du tube dans lequel il s'écoule diminue. Parallèlement à l'accroissement de la vitesse du fluide, la pression de ce dernier diminue selon l'équation de Bernoulli, [Equation 1] où P représente la pression, ρ la masse volumique du fluide en question, v le débit du flux, g la constante d'accélération gravitationnel et y la hauteur. Cette relation entre la vitesse d'un fluide et sa pression est plus connue sous le nom d'*effet Venturi* du nom du physicien G.B. Venturi (1746 – 1822) qui en apporta la preuve pratique grâce à un dispositif qui lui permis de mesurer la différence de pression entre deux sections de diamètre différent d'un même tube. Ce dispositif fut nommé, en hommage à ses travaux dans le domaine de la dynamique des fluides, *tube de Venturi*.

$$P_1 + \frac{1}{2} \rho v_1^2 + \rho g y_1 = P_2 + \frac{1}{2} \rho v_2^2 + \rho g y_2 \quad [\text{Equation 1}]^{22}$$

L'application de l'équation de continuité [Equation 2] à l'équation de Bernoulli permet, en considérant le cas où la variation d'énergie potentielle gravitationnelle est négligeable ($y_1 = y_2$), de réduire l'expression de l'équation de Bernoulli à l'équation suivante [Equation 3]. Dans les deux équations, S représente la section verticale du tube dans lequel se déplace le fluide et v la vitesse du fluide.

$$S_1 v_1 = S_2 v_2 \quad [\text{Equation 2}]^{22}$$

$$P_1 - P_2 = \frac{1}{2} \rho v_1^2 \left(\frac{S_1^2 - S_2^2}{S_2^2} \right) \quad [\text{Equation 3}]^{22}$$

Dès lors, si la section S_2 est inférieure à la section S_1 , la pression engendrée P_2 est inférieure à la pression P_1 . Dans les nébuliseurs pneumatiques, la dépression engendrée par l'accélération du flux d'air propulseur est à l'origine de la création de particules d'aérosol. En effet, sous l'effet de la chute de pression, la solution à nébuliser est aspirée dans le flux d'air sous la forme d'un film liquide de faible épaisseur^{23,24}. Dès que cette dernière atteint une valeur limite les forces de tension superficielle à l'intérieur du film liquide sont supérieures aux forces de cohésion. Dans une telle situation, l'équilibre est rompu et le film liquide va se fragmenter en gouttelettes afin de minimaliser les forces de tension superficielle. Les gouttelettes issues de cette première fragmentation ont un diamètre moyen compris entre 15 et 500 μm ²⁵. Les gouttelettes formées vont ensuite s'impacter contre le déflecteur, fragmentation secondaire. Dès lors, les gouttelettes de diamètre trop important vont retomber dans le réservoir de solution à nébuliser alors que celles de diamètre plus faible vont pouvoir être nébulisées jusqu'au patient. Les gouttelettes qui franchissent le déflecteur ne représentent que 1 à 3 % des gouttelettes formées lors de la nébulisation primaire^{25,26}.

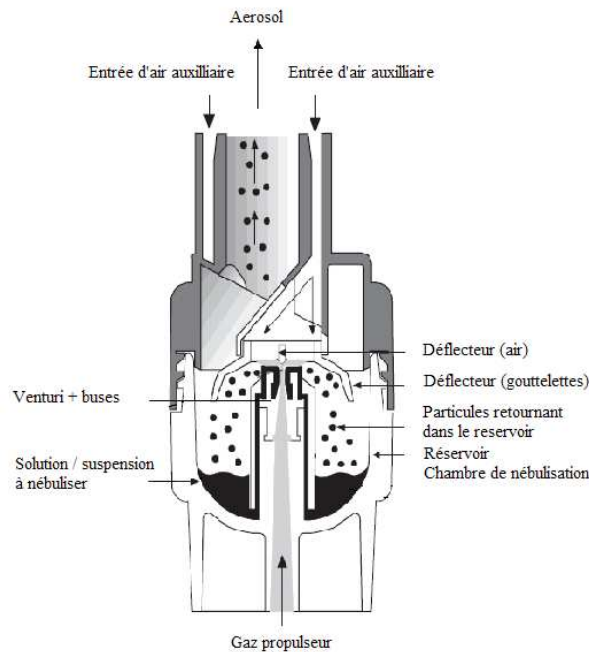


Figure 5 : Nébuliseur pneumatique à double Venturi, Sidestream[®], Profile Therapeutics, Royaume-Uni
(modifié d'après O'Callaghan & Barry²⁴)

La taille des gouttelettes formées est largement dépendante du modèle de nébuliseur pneumatique employé. En effet, selon Newman²⁷, il existe au sein de nébuliseurs pneumatiques (de mêmes ou différentes marques) des variations non négligeables dans le diamètre moyen des gouttelettes obtenues pour un même débit de gaz propulseur. Ces variations dans le diamètre des gouttelettes obtenues peuvent être expliquées par des différences dans la construction (matériaux, design, finitions, reproductibilité de la qualité) des différents nébuliseurs. A titre d'exemple, McCallion & al²⁸ associent ces variations à des différences de diamètre des buses des Venturis. En effet, selon l'équation 3, des buses de diamètre différent engendrent, à l'intérieur des différents modèles de nébuliseurs, des chutes de pression non équivalentes. Plus le diamètre des buses est petit, plus les gouttelettes produites seront petites. Quant à O'Callaghan & Barry²⁴, ils affirment que le design et l'orientation du déflecteur jouent un rôle majeur sur la taille des gouttelettes nébulisées.

D'autres paramètres, tels que le débit du gaz propulseur ainsi que les propriétés physiques de la solution à nébuliser (densité, viscosité et tension superficielle), jouent un rôle non négligeable dans la distribution de la taille des gouttelettes²³.

Le débit du gaz propulseur est considéré comme le facteur ayant la plus grande influence sur le diamètre des particules d'aérosol²⁸. En effet, plus celui-ci augmente, plus le diamètre moyen des gouttelettes diminue^{23,24,27-30}. Clay & al²⁹ ont démontré à l'aide d'une analyse par diffraction laser que le MMAD est diminué de 50 % lorsque le débit du gaz propulseur passe de 4 à 8 l/min. De plus, ils ont montré que cette diminution du MMAD est accompagnée par une augmentation linéaire du nombre de gouttelettes de diamètre inférieure à 5 μm . Ceci peut s'expliquer par le fait que sous un flux d'air plus rapide, les forces de cisaillement auxquelles sont soumis le film liquide et la surface des gouttelettes sont plus grandes. Néanmoins, il a été démontré que l'augmentation du débit du gaz propulseur n'induit pas de différence significative dans la quantité totale de principe actif nébulisé³¹.

A partir de ces observations, il est intéressant de se poser la question si de telles variations de performance n'ont pas un impact clinique sur l'efficacité de la thérapie mise en place.

Loffert & al³² ainsi que Hess & al³³ ont montré que la quantité respirable de principe actif qui atteint le patient peut varier de plus d'un facteur trois entre les différents modèles de nébuliseurs pneumatiques testés. Selon MacNeish & al³¹, la quantité de principe actif disponible pour le patient est aussi liée aux propriétés de la solution à nébuliser. Dès lors, à partir de ces observations, il est possible de conclure que la prédiction de la disponibilité du principe actif après nébulisation devrait être basée sur sa mesure dans un modèle in vitro utilisant la même préparation et le même nébuliseur que ceux utilisés en clinique.

Le modèle de nébuliseur pneumatique étudié au cours de ce travail est le modèle Sidestream[®] *disposable*, (Profile Therapeutics, Royaume-Uni) (figure 5). Il s'agit d'un nébuliseur pneumatique dit à double Venturi ou *open vent nebulisers*. Ce type de nébuliseur représente une évolution technologique des premiers nébuliseurs pneumatiques. Dans le cas des nébuliseurs à double Venturi, le débit d'air engendré par l'inspiration du patient est utilisé de manière à s'ajouter au débit du gaz propulseur. Ainsi, pour un débit de gaz propulseur équivalent, l'entraînement des gouttelettes d'aérosol vers le patient est augmenté. La concentration des gouttelettes dans la chambre de nébulisation étant ainsi réduite, le risque de coalescence et d'impaction contre les parois de la chambre de nébulisation est diminué. Les conséquences directes sur la nébulisation, par rapport à un nébuliseur pneumatique conventionnel (simple venturi), sont : une diminution de la taille des gouttelettes d'aérosol, un temps de nébulisation plus court et un débit de principe actif plus élevé³⁰.

Au cours de ce travail, en raison de la conception du modèle in vitro utilisé, le nébuliseur Sidestream[®] est utilisé comme un nébuliseur pneumatique conventionnel. En effet, la connexion du dispositif au modèle engendre l'obstruction du second venturi. Néanmoins, l'obstruction du second venturi n'est pas délétère à l'évaluation du nébuliseur Sidestream[®] puisque cette situation correspond à l'utilisation clinique du nébuliseur Sidestream[®] lors de nébulisation sous VM.

1.6.2 Nébuliseurs ultrasoniques : principe de fonctionnement

Les nébuliseurs ultrasoniques (ultrasonic nebulisers) mettent à profit la technologie piézo-électrique pour générer un aérosol à partir de la solution à nébuliser. Le courant électrique est converti, via la vibration d'un cristal piézo-électrique, en ondes ultrasoniques de haute fréquence (1.3 – 2.3 MHz). Ces ondes ultrasoniques, une fois transmises à la solution à nébuliser, créent à la surface de cette dernière des ondes capillaires (ou fontaine de cavitation) à partir desquelles des gouttelettes de tailles variables sont formées. Selon Mercer³⁴, l'amplitude minimale nécessaire à la génération d'ondes capillaires est définie par l'équation suivante [Equation 4] où A représente le seuil d'amplitude minimal, η la viscosité, f la fréquence du signal acoustique et l la longueur de l'onde capillaire.

$$A = \frac{4 \cdot \eta}{f \cdot l} \quad [\text{Equation 4}]^{34}$$

Les gouttelettes sont formées, à partir des crêtes des ondes, dès que l'amplitude de l'onde capillaire excède d'un facteur supérieur ou égal à quatre fois le seuil d'amplitude minimale A . Selon l'équation 5, où l représente la longueur de l'onde capillaire, le diamètre moyen des gouttelettes produites, D_{mn} , est directement proportionnelle à cette dernière³⁴. La constante de

proportionnalité est indépendante de la fréquence acoustique, de la nature de la solution à nébuliser et du mode d'atomisation³⁴.

$$D_{nm} = 0.34 \cdot l \quad [\text{Equation 5}]^{34}$$

La longueur de l'onde capillaire est déterminée par l'équation suivante [Equation 6] où σ représente la tension superficielle de la solution à nébuliser, ρ sa masse volumique et f la fréquence du signal acoustique.

$$l = \sqrt[3]{\frac{8 \cdot \pi \cdot \sigma}{\rho \cdot f^2}} \quad [\text{Equation 6}]^{35}$$

Dès lors, à partir des équations 5 et 6, il est possible d'affirmer premièrement que le diamètre moyen des gouttelettes formées est proportionnel aux deux tiers de la puissance de la fréquence acoustique²⁴ et deuxièmement, les propriétés physicochimiques de la solution à nébuliser jouent un rôle important sur le diamètre des gouttelettes produites³⁶.

Tout comme dans les nébuliseurs pneumatiques, un déflecteur empêche la nébulisation des gouttelettes de diamètre trop important.

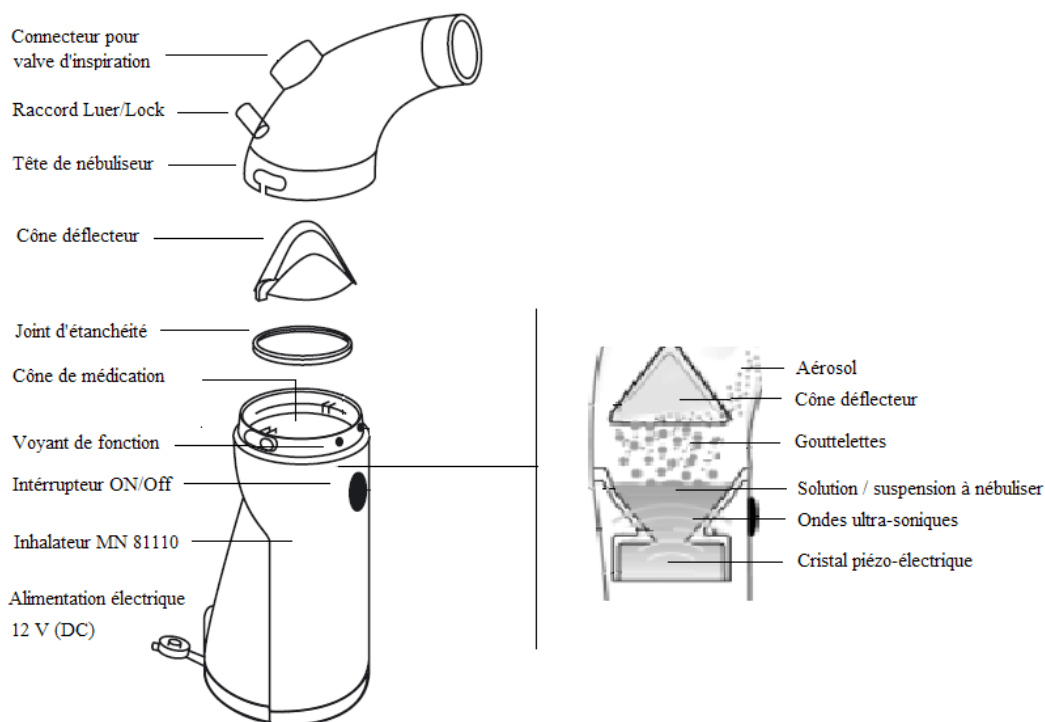


Figure 6: Nébuliseur ultrasonique, Multisonic® Infra Control, Schill GmbH, Probstzella, Allemagne
(modifié d'après la manuel d'utilisateur Multisonic® Infra Contrôl, Schill GmbH)

De part leur conception, les nébuliseurs ultrasoniques ont tendance à augmenter de manière significative la température de la solution à nébuliser dans le cône de médication. En effet, ces appareils n'utilisent, pour produire des gouttelettes, qu'une faible fraction de l'énergie mise à disposition par la vibration du cristal piézo-électrique. Dès lors, l'excès d'énergie disponible est converti en énergie thermique³⁷. Différentes études^{38,39} ont montré une élévation de la température de la solution à nébuliser de plus de 20°C par rapport à la température ambiante. Il s'agit là de la limitation majeure à l'utilisation systématique de ce type de nébuliseur. En effet, une telle élévation de température rend l'utilisation de ce type d'appareil incompatible

avec la nébulisation de principes actifs thermosensibles. Afin de limiter l'augmentation de la température de la solution à nébuliser une seconde génération de nébuliseur ultrasonique à vu le jour. Dans ces nouveaux appareils une interface solide remplie d'eau diminue le transfert d'énergie entre le cristal piézo-électrique et le réservoir contenant la solution à nébuliser. De plus, cette interface solide permet également de rendre l'appareil plus facilement nettoyable.

Le nébuliseur ultrasonique étudié au cours de ce travail est l'inhalateur Multisonic[®] infra Control, (Schill GmbH, Probstzella, Allemagne) (figure 6).

Dans cet appareil, la production d'aérosol est contrôlée par un dispositif infrarouge. Cette dernière est interrompue en cas de saturation en aérosol du cône de médication puis réactivée lorsque le patient inspire ou que la densité de l'aérosol dans le cône de médication diminue. Lorsque le cône de médication ne contient plus suffisamment de solution à nébuliser un signal sonore retenti et la nébulisation cesse automatiquement.

1.6.3 Nébuliseurs à maille : principe de fonctionnement

Les nébuliseurs à maille font partie de la nouvelle génération de dispositifs de nébulisation. Introduit sur le marché au cours des années 1980, ce type de nébuliseur se conjugue en deux versions : les nébuliseurs à maille statique et les nébuliseurs à maille vibrante.

Dans le cas des nébuliseurs à maille statique, la solution à nébuliser est poussée au travers de la maille sous l'action de forces engendrées par un système piézo-électrique vibrant.

Les nébuliseurs à maille vibrante fonctionnent selon trois technologies différentes : la technologie Aerogen[®], Omron[®] et Odem^{®40}. Le principe fondamental de développement de ces trois technologies est relativement similaire. En effet, dans les trois cas, les vibrations d'un élément piézo-électrique sont transmises à la maille et converties ainsi en énergie mécanique qui force le passage de la solution à nébuliser au travers d'une maille. La taille des gouttelettes ainsi formées est donc fortement dépendante du diamètre des orifices de la maille.

Les nébuliseurs à maille vibrante étudiés au cours ce travail sont l'Aeroneb[®] Pro & Solo (Aerogen Ltd., Galway, Ireland) (figure 7). D'un point de vue technologique, rien ne distingue ces deux appareils. En effet, tout les deux utilisent le générateur d'aérosol OnQ[®] d'Aerogen[®]. La principale différence entre les deux modèles réside, outre le design, uniquement dans le fait que l'Aeroneb[®] Pro est autoclavable alors que l'Aeroneb[®] Solo non.

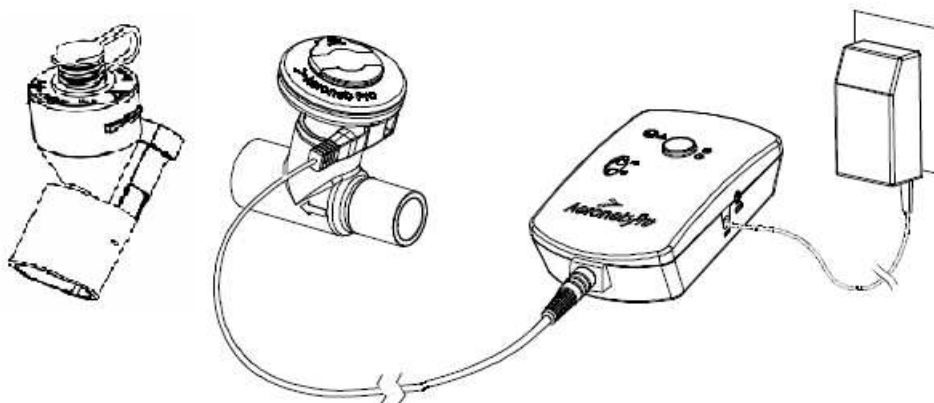


Figure 7 : Aeroneb[®] Solo, Aeroneb[®] Pro fixé sur la pièce en T, boîtier de commande et adaptateur c.a/c.c
(modifié d'après les manuels d'utilisateur Aeroneb[®] Pro & Solo, Aerogen[®] Ltd.)

Les dispositifs utilisant la technologie Aerogen[®] (figure 8) sont composés d'une maille en forme de dôme fixée à une céramique piézo-électrique circulaire. Sous l'influence d'un courant électrique l'élément piézo-électrique va se dilater et se contracter de manière répétée engendrant ainsi un mouvement d'oscillation verticale de la maille. Les oscillations de la maille vont provoquer un phénomène de micro-pompage qui va entraîner la solution à nébuliser au travers des orifices de la maille.

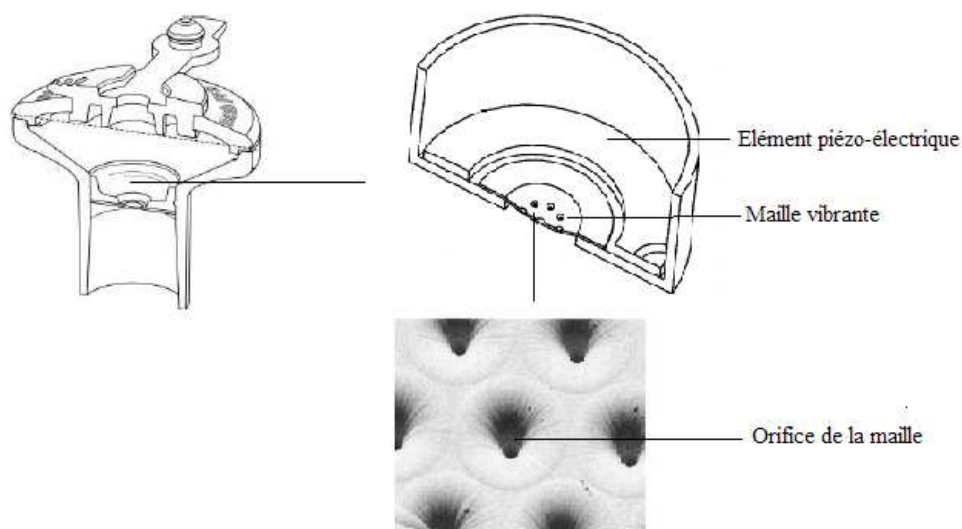


Figure 8 : Aeroneb[®] Pro : Technologie Aerogen[®] + vue microscopique de la maille vibrante
(modifié d'après Fink & Power⁴¹)

L'énergie nécessaire à la nébulisation étant transmise à la maille, et non pas directement à la solution à nébuliser, ces dispositifs présentent alors l'avantage, par rapport aux nébuliseurs ultrasoniques, de ne pas augmenter de manière significative la température de la solution⁴¹. Ainsi, leur utilisation pour la nébulisation de principes-actifs thermosensibles ne semble pas être contre indiquée. En revanche, il a été démontré que les performances (débit et masse de principe actif inhalé) des nébuliseurs à mailles peuvent être réduites lorsque des suspensions possédant de fortes tensions superficielles sont nébulisées⁴². Néanmoins, les nébuliseurs à maille s'avèrent être des dispositifs beaucoup plus efficaces que les nébuliseurs pneumatique et ultrasonique⁴³. Par conséquent, afin d'éviter tout risque de réponse thérapeutique exagérée, il est nécessaire d'adapter la posologie lors de leur utilisation.

1.6.4 Caractéristiques techniques des différents nébuliseurs étudiés

Le tableau 9 indique les performances et caractéristiques mentionnées par les fabricants dans les manuels d'utilisation des différents nébuliseurs étudiés.

Tableau 9 : Caractéristiques techniques issues de la documentation fournie par les fabricants

	Sidestream [®] disposable	Multisonic [®] Infra Control	Aeroneb [®] Pro & Solo
Volume de remplissage [ml]	n.c.	≤ 5*	Pro : ≤ 10* Solo : ≤ 4*
Débit de l'aérosol [ml/min]	0.37 [†] / 0.46 [‡]	≈ 0.5	moyenne ≈ 0.4
MMAD / GSD [μm]	3.0 [†] / 2.75 [‡]	dm ⁵⁰ ≈ 3.5	Pro : < 3.0 / ≤ 2.2 Solo : 3.4 / 2.4
Volume résiduel [ml]	1.9 pour 2.5 nébulisé	< 1.0	Pro : < 0.3 pour 3.0 nébulisé Solo : < 0.1 pour 3.0 nébulisé
Production de l'aérosol	en continu	à l'inspiration	en continu / en intermittent
Recours à des gaz propulseurs pour la génération du nébulisé	oui (6 – 8 [l/min])	non	non
Arrêt de la nébulisation	manuel	manuel / automatique (contrôlé par IR)	manuel / automatique (après 15 ou 30 min)
Stérilisation	non	autoclave (134°C) sauf l'inhalateur MN 81110 stérilisable à l'OEt	Pro : autoclave (134°C) Solo : non autoclavable
Durée de vie	1 à 2 semaines max.	liée à l'entretien	Pro : > 1 an Solo : 28 j. en intermittent (4x/J) et 7 j. en continu
Utilisation multi patient	non	oui	Pro : oui Solo : non
Nouveau- né	oui	n.c.	oui
Enfant	oui	oui	oui
Adulte	oui	oui	oui
Autonomie sur accu [min]	-	60	45
Système de protection contre la surchauffe	-	oui	-
Fréquence	-	2.4 [MHz]	128 [KHz]

n.c. = non communiqué par le fabricant

* la solution à nébuliser peut être rajoutée en cours de nébulisation sans interruption de cette dernière

[†] débit gaz propulseur : 6 l/min

[‡] débit gaz propulseur : 8 l/min

1.7 L'aérosol thérapie chez l'enfant sous ventilation mécanique

Les premières tentatives d'administration d'aérosols à des patients sous VM furent relativement peu efficaces et on en eut pour conséquence de considérer la VM comme un obstacle majeur à la mise en place d'une thérapie par aérosol efficace⁴⁴. De nos jours, l'administration d'aérosols à des patients sous VM est toujours considérée comme un processus complexe faisant intervenir de nombreux facteurs différents⁴⁵ (tableau 10). Néanmoins, l'amélioration des connaissances des différents facteurs influençant l'efficacité de cette dernière et la mise sur le marché de nébuliseurs spécialement conçus pour ce mode d'administration, ont permis d'améliorer sensiblement son efficacité.

Tableau 10 : Facteurs influençant en VM la déposition d'aérosol dans les voies aériennes basses⁴⁵

Propriétés physico-chimiques de la solution à nébuliser

Caractéristiques du générateur d'aérosol employé
--

Emplacement du générateur d'aérosol dans le circuit de ventilation
--

Paramètres de ventilation

Caractéristique du circuit de ventilation et du tube endotrachéal

Humidité de l'air inspiré

Anatomie et sécrétions des voies aériennes du patient

L'administration d'aérosols aux patients sous VM peut être effectuée à l'aide d'aérosols-doseurs pressurisés couplés à une chambre d'inhalation ainsi qu'à l'aide de nébuliseurs pneumatiques, ultrasoniques et depuis peu à l'aide de nébuliseurs à membrane vibrante. L'utilisation d'inhalateurs à poudre sèche n'est pas adaptée à la VM pour des raisons physiques (débit inspiratoire insuffisant) et pratiques (aggrégation de la poudre le long du circuit de ventilation)⁸.

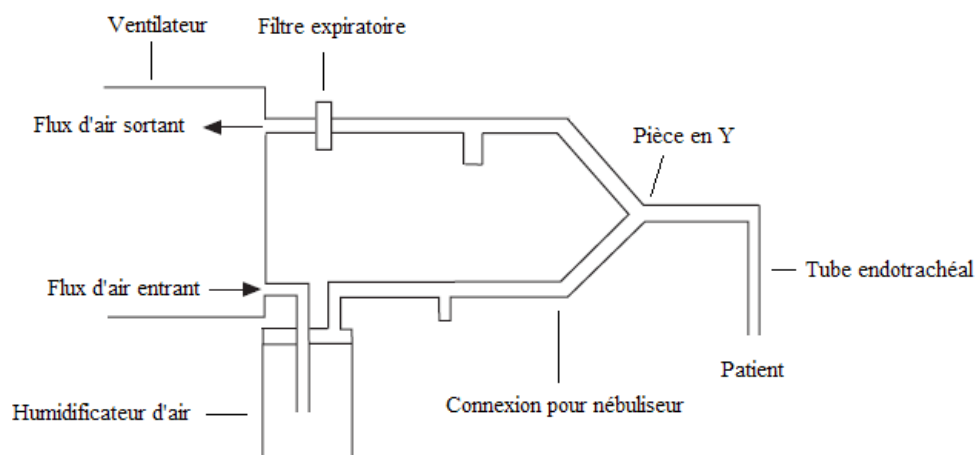


Figure 9 : Représentation schématique d'un système de ventilation mécanique
(modifié d'après Harvey & al⁴⁶)

La quantité de principe actif déposée dans les poumons par ces différents appareils lors de la VM est le sujet de nombreuses études in vitro et in vivo. O'Doherty et Thomas⁴⁷ ont réunis et comparés les résultats de plusieurs de ces études et ont conclu que parmi les trois méthodes de nébulisation suivantes : aérosols-doseurs pressurisés couplés à une chambre d'inhalation, nébuliseurs pneumatiques et ultrasoniques aucune n'apparaît être réellement appropriée à une administration efficace d'aérosol à des patients sous VM. En effet, les faibles taux de dépositi-

tion observés dans les études in vivo ne semblent pas être compatibles avec une réponse thérapeutique efficace. Néanmoins, de nombreuses études confirment, en s'appuyant sur des observations cliniques, l'efficacité de l'administration de principes actifs sous forme d'aérosol lors de la VM. Dès lors, il est nécessaire, afin de déterminer le niveau de pertinence d'une thérapie par aérosol sous VM, de mesurer son efficacité aux travers d'essais cliniques sur des patients respirant spontanément⁴⁷. Le tableau 11 regroupe quelques recommandations du bien fondé de la mise en place d'une thérapie par aérosol sous VM.

Tableau 11 : Niveaux de preuve justifiant la nébulisation de médicaments chez les patients en VM⁴⁷

Indication	Médicament
Utilité probable	
Bronchospasme, asthme	β_2 agonistes, anticholinergiques
Utilité possible	
Infection à VRS de l'enfant	Ribavirine
Dysplasie broncho-pulmonaire de l'enfant	Corticostéroïdes
Syndrome de détresse respiratoire	Surfactant
Infections broncho-pulmonaires	Antibiotiques
Hypertension artérielle pulmonaire	Prostacycline

La nébulisation de principes actifs à des patients pédiatriques est encore considérée de nos jours comme une méthode d'administration relativement empirique¹⁰. En effet, il n'existe actuellement, principalement pour des raisons éthiques, que très peu de données sur la déposition pulmonaire d'aérosols issues d'études in vivo chez l'enfant. Deux études différentes ont permis de déterminer par radio-marquage le taux de déposition pulmonaire de la tobramycine chez 27 enfants atteints de mucoviscidose⁴⁸, ainsi que le taux de déposition pulmonaire de la pentamidine chez 12 enfants et 6 adultes atteints du virus HIV⁴⁹. Dans la première étude, le taux de déposition moyen observé était de 6.7% par rapport à la dose initiale présente dans le nébuliseur et ce avec des taux de variation interindividuelle relativement importants. La seconde étude a permis de déterminer que les taux de déposition pulmonaire pédiatrique et adulte de la pentamidine administrée à l'aide d'un nébuliseur Respigard® II n'étaient pas statistiquement différents (2.5% de la dose initiale) et que par conséquent, les patients pédiatriques pouvaient bénéficier, pour l'obtention de concentrations en principe actif au niveau pulmonaire équivalentes, de nébulisations plus courtes.

La déposition pulmonaire des particules d'aérosol dépend du cycle inspiratoire. En effet, une respiration à débit inspiratoire lent et à grand volume courant augmente le dépôt pulmonaire périphérique alors qu'au contraire, un débit inspiratoire élevé favorise l'impaction des particules au niveau des voies aériennes supérieures et des bronches proximales¹⁰. Le cycle inspiratoire physiologique du jeune enfant est caractérisé par un faible volume courant et une fréquence rapide ce qui permet d'expliquer pourquoi l'enfant inhale finalement, par rapport à son poids, une grande quantité de principe actif. En raison de son faible volume inspiratoire, un nourrisson inhale par rapport à un enfant plus âgé un aérosol « pur » (figure 10). En effet, plus le volume inspiratoire de l'enfant augmente, plus le volume d'air inspiré dépasse le volume d'aérosol généré par le nébuliseur ce qui engendre une dilution de l'aérosol (figure 10).

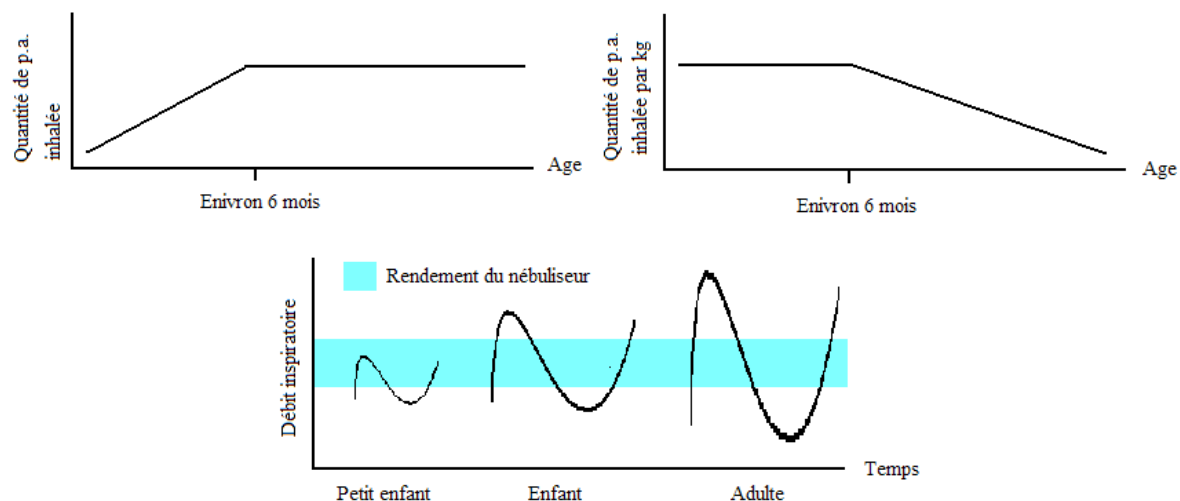


Figure 10 : Inhalation d'un aérosol en fonction de l'âge⁵⁰

Bien que l'administration de salbutamol aux patients sous VM soit une pratique thérapeutique d'efficacité non clairement démontrée^{47,51}, elle est utilisée, relativement fréquemment, au sein de l'unité de soins intensifs de pédiatrie du CHUV (SIP) pour rétablir les troubles de la fonction respiratoire. Sa mise en place n'est pas systématique et fait l'objet d'un diagnostic individualisé basé sur l'évolution des différents paramètres respiratoires (résistance pulmonaire, temps d'expiration, profil de la droite ET CO₂). Il est à noter que malgré sa faible efficacité, ce mode d'administration est préférée à l'administration de salbutamol IV qui présente le désavantage de provoquer un nombre important d'effets indésirables sévères qui auraient pour conséquence de diminuer le pronostic vital de patients déjà passablement affaiblis.

1.8 Revue de la littérature

La détermination du pourcentage de la dose initiale de principe actif nébulisée ainsi que la « qualité » du nébulisat libéré par les différents types de nébuliseurs fait l'objet de nombreuses études in vitro. De manière générale, les études in vitro sont beaucoup plus fréquentes que les études in vivo plus difficiles à mettre en place d'un point de vue technique, financier et éthique. Il existe tout de même un certain nombre d'études in vivo effectuées sur des volontaires sains dont l'objectif est de quantifier de manière exacte la quantité de principe actif qui atteint le poumon du volontaire intubé. En effet, il est important, à ce niveau, de faire la distinction entre les paramètres effectivement mesurés dans chacun des deux types d'études mentionnées. Les études in vitro permettent de déterminer la quantité de principe actif qui atteint les voies respiratoires basses alors que les études in vivo permettent de déterminer quelle quantité de principe actif atteint le poumon du patient⁵². Cette distinction est importante à effectuer car il a été clairement établi que seul une fraction de la quantité de principe actif qui atteint les voies respiratoires basses et ensuite acheminée jusqu'aux alvéoles pulmonaires⁵².

Malgré le fait que l'évaluation en laboratoire des performances d'un nébuliseur ne prenne pas en considération tous les facteurs physiopathologiques rencontrés en clinique, la mise au point d'un modèle in vitro optimisé (ventilation adulte, pédiatrique, néonatale, différents mode de ventilation) doit être réalisée afin de disposer d'un outil prédictif de qualité permettant dans un premier temps d'évaluer de manière rigoureuse les performances d'un nouveau type ou modèle de nébuliseur et, dans un deuxième temps, d'optimiser les pratiques d'administration d'aérosol sous VM.

La revue de la littérature effectuée ci-dessous n'a pas la prétention d'être exhaustive mais elle a plutôt pour but de permettre de réunir de manière succincte, sous la forme d'un tableau, les résultats de différentes études in vitro ayant eut comme objectif principal de comparer différents types de nébuliseurs entre eux. Les études retenues pour cette revue de la littérature possèdent, en commun avec ce travail, au minimum un modèle de nébuliseur étudié (cf. 1.6-1.9).

Tableau 12 : Revue bibliographique

Auteur	Ventilation	Nébuliseur Marqueur	Récolte Analyse	Résultats
Fink ⁵³ 2007	n.c. adulte	A. P. Salbutamol sulfate	n.c.	MMAD±GSD : 2.1±2.2 FPF (<5µm) : 83.2% V. résiduel : 0.2-0.4 ml % dose déposée : 13
Fink ⁴¹ 2001	Ventilateur 6, 30 et 60 l/min tube endotra- chéal	A. P. salbutamol sulfate 0.083%	Filtre absolute® Anderson MKII	MMAD : 3.5 µm V. résiduel : 0.2 ml ΔT° sol. à néb. : 2±1°C Débit d'aérosol : 0.35±0.03 ml/min
Fink & Sim- mons ⁵⁴	ventilateur adulte	A. P. salbutamol sulfate	Filtre absolute® HPLC	% dose déposée : 35±2 Durée de néb : 7.0±0.2 min
Mercier & al 2002 ⁵⁵	Ventilateur adulte	A. P. Amikacin	Filtre absolute® HPLC	MMAD : 3.0±0.2 % FPF(1.1-4.7 µm) : 76±2 % dose déposée : 31±4
Abhiram & al ⁵⁶ 2008	O ₂ 3 l/min canule nasale pédiatrique	A. S. Tc-99m	Filtre HEPA Radioisotopi- que Mastersizer	% dose déposée : 18.1±4.2 Durée de néb : 13.0±0.0 min VMD : 1.9±0.3 µm
Winterhalter & al ⁵⁷ 2008	Ventilateur (VCV) 12 l/min canule endo- trachéale	MS. Tc-99m 5 ml	γ-scintigraphie	Dose déposée : 1.61±0.41ml (32±8%) Durée de néb:10.13±1.71min
Steckel & Eskandar ⁵⁸ 2002	Compresseur 12 l/min	MS. NaCl 0.9%	HELOS (laser) Tensiomètre Viscosimètre	T° sol à néb t ₁₀ : 40.13±2 °C [Conc.] t ₁₀ : 148.01±0.09% MMAD : f(t _{néb})
Di Paolo & al ⁵⁹ 2005	Ventilateur pédiatrique continu	S. (6 l/min) salbutamol	Filtre Respir- gard® 301 HPLC	Rét. filtre insp : 5.0±0.7% Rét. filtre exp : 44.2±0.7% Rét. nébuliseur : 32.4±1.6% Rét. circuit ventilateur : 18.4±2.5%

Di Paolo & al ⁶⁰ 2000	O ₂ 6 l/min	S. (6 l/min) salbutamol 0.05mg/ml	RP-HPLC/UV Mastersizer cryo- osmomètre	Osm t ₁₅ : + 110±2% [Salbutamol] t ₁₅ : + 108±8% T _[min] sol. à néb : Δ-11.3°C
Barry & O'Callaghan ⁶¹ 1999	Simulateur de respiration pédiatrique	S. salbutamol (5mg)	filtre RP-HPLC/UV Mastersizer	MMAD : 3.9±1.9µm FPF (<5µm) : 69% Dose nébulisée : 11.9±1.1%
Loffert & al ³² 1994	Compresseur 12.3 l/min	S. Salbutamol 2 ml NaCl 0.9% + 0.5 ml salbu- tamol	n.c.	Quantité nébulisée : 74.4±1.6% Durée de néb : 7.14±0.47 min FPF (<5µm) : 71.95±2.73 Débit d'aérosol : 0.1905±0.0175 ml/min VMD : 3.77µm

n.c. : non communiqué

FPF : fraction respirable (<5µm)

[X] : concentration

2 OBJECTIF DU TRAVAIL

L'objectif de ce travail est de déterminer, après la mise au point d'un modèle in vitro, les différentes performances et caractéristiques de trois types de nébuliseurs utilisés en ventilation mécanique.

Dans une première phase, l'objectif du travail consiste, pour chacun des trois types de nébuliseurs étudiés, à doser par HPLC la quantité de principe actif nébulisée qui atteint les filtres Respirad[®] 303 (simulation des poumons) après des nébulisations de durée déterminées ou jusqu'à cessation. La détermination de cette quantité permet d'évaluer quel pourcentage de la dose initiale de principe actif est susceptible d'atteindre les poumons d'un patient sous VM. Ces valeurs vont permettre de déterminer les efficacités respectives de chacun des trois types de nébuliseurs étudiés et par conséquent, d'émettre pour chaque type d'appareil d'éventuelles recommandations d'adaptation posologique. D'autres paramètres tels que la quantité de principe actif nébulisée non disponible pour le poumon, la quantité de principe actif non nébulisée (résiduelle), la durée de nébulisation (débit d'aérosol), les variations de température du nébulisat au cours de la nébulisation, les variations de pression interne du modèle au cours de la nébulisation ainsi que le volume résiduel au terme de la nébulisation vont aussi être déterminés à partir des nébulisations nécessaires au dosage de la quantité de principe actif disponible au niveau du poumon. Une seconde série de nébulisations est effectuée selon les mêmes protocoles afin de déterminer les variations de température au cours de la nébulisation de la solution à nébuliser.

Dans une seconde phase, l'étude de l'osmolalité de la solution à nébuliser va permettre, grâce à des prélèvements successifs en cours de nébulisation, de déterminer l'évolution de l'osmolalité de la solution à nébuliser ainsi que l'évolution des concentrations du salbutamol, du sodium et du chlorure. L'analyse de ces différentes concentrations va permettre de déterminer si les vitesses de nébulisation des trois solutés en question sont identiques ou si l'une d'entre elles est significativement différente.

3 MATERIEL ET METHODE : MODELE IN VITRO

3.1 Nébuliseurs, solution à nébuliser et montage

Les nébuliseurs étudiés au cours de ce travail sont les suivants :

- Sidestream[®] *disposable*, (Profile Therapeutics, Royaume-Uni), lot n°29100702X (figure 5).
- Multisonic[®] infra Control Typ MN 81100, (Schill GmbH, Probstzella, Allemagne), numéro d'appareil T 811112814 (figure 6)
- Aeroneb[®] Pro, Aerogen Ltd., Galway, Ireland, lot n° 9002060810 et 9002060202, n° de série : 056077-011 ; 056077-054 ; 056071-167 et 055866-118, 055906-048 (figure 7)
- Aeroneb[®] Solo, Aerogen Ltd., Galway, Ireland, lot n° 06675675, n° de série : 075058-043, 075058-062, 075058-112, 075058-161, 075058-186 (figure 7).

La solution de salbutamol nébulisée provient de mono-doses de Ventolin[®] 2.5 ml à 0.05% (1.25mg/ml de salbutamol sulfate) prêtes à l'emploi pour appareils aérosols, GlaxoSmithKline (AG, Münchbuchsee, Suisse), lot 7N004.

Le raccord en T utilisé pour les nébuliseurs Sidestream[®], Aeroneb[®] Solo et Aeroneb[®] Pro est le modèle d'adaptateur pédiatrique autoclavable (Aerogen Ltd, numéro de commande AG-AS3020). Afin de pouvoir relever la variation de la pression interne du système au cours de la nébulisation, un orifice a été percé dans la partie supérieure du raccord en T afin d'y introduire un tube métallique de 15 x 3 mm. Ce tube métallique sert de connecteur pour le branchement d'un tube à eau.

Les différentes pièces métalliques du montage, pièce porte-filtres, coude, connecteurs et adaptateurs pour la connexion au système d'approvisionnement en air comprimé ont été fabriquées par les ateliers de micromécanique du CHUV. La pièce porte-filtres est thermostatée à une température de $37.5 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ par un corps de chauffe de 15 W (230V-50Hz) relié à un variateur de tension (0-230V). La propulsion du nébulisat ainsi que, dans le cas du nébuliseur Sidestream[®], sa génération, sont assurées par un flux contrôlé d'air comprimé en bouteille, Carbogas, (Gümligen, Suisse). Le contrôle du débit du flux d'air comprimé est assuré par un débitmètre à flotteur série 1100, Wisag, (Zurich, Suisse), numéro de série M66105D/05. Un régulateur de flux massique EL-Mass Flow Meter F201C-FB-22-V, Bronkhorst High Tech BV, (Ruurlo, Pays-Bas), permet de maintenir le flux d'air comprimé constant tout au long de la nébulisation.

Les filtres utilisés pour retenir le salbutamol nébulisé sont des filtres antibactériens et antiviraux Respirgard[®] II 303, Vital Signs Ltd, (Littlehampton West Sussex, Royaume-Uni), lot 3677F.

Les pesées des différents éléments du montage et des prélèvements de la solution à nébuliser sont effectuées pour les éléments de moins de 210g sur une balance analytique Mettler Toledo PG203-S et, pour les éléments plus lourds, sur une balance technique Mettler Toledo PG5002-S DeltaRange (Mettler Toledo Ltd. Nänikon-Uster, Suisse).

Les mesures de température du nébulisat, de la solution à nébuliser et de la pièce porte-filtres sont effectuées à l'aide d'un thermomètre Testo 735-2 équipé d'une sonde de température aiguille étanche (Réf. 0628 0026) munie d'un certificat d'étalonnage standard et d'une sonde de température de contact coudée (Réf. 0602 0993) (Testo AG, Mönchaltrof, Suisse).

3.2 Quantités de salbutamol nébulisées et résiduelles

Les quantités de salbutamol nébulisées (filtres et coude) et résiduelles (intérieure du nébuleur) sont déterminées pour chaque type de nébuleur selon la répartition suivante. Pour les modèles Sidestream[®] et Aeroneb[®] Solo, les mesures sont effectuées sur cinq appareils différents issus d'un même lot (intra-lot). Pour le modèle Multisonic[®], les mesures sont effectuées à cinq reprises sur le même appareil (répétabilité) et finalement, pour le modèle Aeroneb[®] Pro, les mesures sont effectuées sur deux séries de nébuleurs (3+2) issus de deux lots différents (intra et inter-lot).

Des photographies des différents montages ainsi que les protocoles de manipulation utilisés pour chaque type de nébuleur sont présentés en annexe (ANNEXE 1 et 2). L'utilisation de deux filtres Respirgard[®] 303 en série (filtres 1 et 2) est préférée à l'utilisation d'un seul filtre afin de s'assurer qu'aucune perte de principe actif ne puisse avoir lieu en cas de diminution de l'imperméabilité des premiers filtres.

Au terme de la nébulisation, les filtres Respirgard[®] ainsi que les solutions de lavage de l'intérieur du nébuleur et de l'ensemble pièce en T, coude, pièce porte filtres sont congelés à -18°C. Les essais de recouvrements effectués par Di Paolo E.R.⁸ sur des filtres Respirgard[®] 301 garantissent que la molécule de salbutamol ne subit pas une dégradation majeure au cours de la congélation : recouvrement de 98.6±0.6% après huit semaines de congélation.

Afin de procéder au dosage du salbutamol déposé sur les filtres Respirgard[®] 303 (1 et 2) les filtres sont décongelés à température ambiante pendant 60 minutes et le salbutamol déposé à leur surface lors de la nébulisation est récupéré de manière quantitative par une méthode de rinçage à l'eau de qualité HPLC, Merck KGaA, (Darmstadt, Allemagne). La validation de l'extraction ainsi que la procédure de la méthode de lavage figurent en annexe (ANNEXE 3).

Les dosages des solutions de lavage des filtres ainsi que des solutions de lavage de l'intérieure du nébuleur et de l'ensemble pièce en T, coude et pièce porte-filtres sont effectués en duplicat par un système de chromatographie liquide à haute performance (HPLC) Varian[®], Palo Alto, Etats-Unis, couplée à un détecteur fluorimétrique Jasco[®], (Tokyo, Japon). L'appareil chromatographique employé est composé d'un AutoSampler Varian ProStar model 410, n° série 20203, d'une pompe Varian ProStar modèle 230, n° série 00925 et d'un détecteur fluorimétrique Jasco[®] FP-920 intelligent Fluorescence Detector. Le système est entièrement piloté par informatique à l'aide du logiciel Star[®] LC Workstation 5.0[®]. Les paramètres chromatographiques utilisés pour les dosages sont regroupés dans le tableau 13. Le développement et la mise au point de la méthode utilisée ont été le sujet d'un travail de diplôme de thèse en pharmacie hospitalière effectué au sein du Service de pharmacie du CHUV⁶². Le protocole utilisé pour la préparation des solutions d'étalonnages et des solutions des contrôle qualité est présenté en annexe (ANNEXE 4) A titre d'exemple, un rapport d'analyse chromatographique et son chromatogramme sont visibles en annexe (ANNEXE 5).

Tableau 13 : Paramètres chromatographiques

HPLC	
Pré-colonne ¹	Chromolith™ Performance RP 18 ^e (10 · 4.6 mm)
Colonne	Chromolith™ Performance RP 18 ^e (100 · 4.6 mm)
Phase aqueuse (φA)	1% V/V d'acide acétique ² + B-7 5mM ³ dans H ₂ O ⁴
Phase organique (φO)	1% V/V d'acide acétique dans MeOH ⁵
Phase mobile φA/φO	80/20
Débit	2.0ml/min
Temps de rétention du salbutamol	3.4 min
Volume d'injection	50µl
Fluorimètre	
Excitation	275nm
Emission	310nm
Slit position	18nm
Gain	100
LOQ inférieure	22.24 ng/ml
LOQ supérieure	200.0 ng/ml

¹ Mise en place pour les dosages du salbutamol dans des milieux biologiques (travail de thèse en cours)

² Acide acétique glacial (Merck KGaA, Darmstadt, Allemagne, art. 1.00066)

³ Low UV Pic B7 (acide heptano-sulfonique) (Waters, Milford, USA, art. Wat 084282)

⁴ Eau de qualité HPLC (Merck KGaA, Darmstadt, Allemagne, art. 1.15333)

⁵ Méthanol de qualité gradient (Merck KGaA, Darmstadt, Allemagne, art. 1.80030)

La méthode de dosage du salbutamol in vitro a été validée selon les critères du guide de validation analytique de la Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques (SFSTP). Le traitement des données issues de la validation est effectué à l'aide du système en ligne e.noval[®] de Arlenda intégrant les différentes exigences de l'ICH, de la FDA et de ISO. Les critères retenus pour la validation de la méthode sont reportés en annexe (ANNEXE 6).

La détermination de la quantité totale de principe actif (salbutamol) initialement introduite dans chaque nébuliseur est déterminée à partir des différentes pesées de la solution à nébuliser (cf protocole ANNEXE 2) ainsi que de sa concentration pratique (déterminée par HPLC) et de sa masse volumique. La masse volumique moyenne a été déterminée sur 5 mono-doses de Ventolin[®] 0.05% différentes à l'aide d'un densitomètre, Density meter, DMA 48, (AP PAAR, Autriche).

Pour chaque dosage, la valeur de la concentration en salbutamol retenue pour l'analyse des résultats correspond à la moyenne arithmétique des concentrations obtenues pour chacun des deux duplicatas. Les résultats des différents dosages sont traités avec le logiciel Microsoft Office Excel 2003. Les résultats numériques sont présentés sous la forme d'une moyenne ± son intervalle de confiance. Dans les histogrammes et graphiques les barres d'erreurs représentent les écarts types de chaque moyenne.

En second lieu, une analyse statistique des résultats obtenus est effectuée afin de confirmer ou d'infirmer les différences significatives observées visuellement sur les différentes représentations graphiques des résultats. Cette analyse est effectuée sur les résultats exprimés en termes de masse (valeurs continues) (ANNEXE 7) et non sur les résultats exprimés en termes de pourcentage de la dose initiale de salbutamol (valeurs discontinues). Afin de déterminer si les tests statistiques à effectuer (analyse de variance, ANOVA) doivent être de types paramétri-

ques ou non paramétriques l'ensemble des données de chaque série de nébulisations est soumis au test de Kolmogorov-Smirnov.

3.3 Détermination de la variation de température de la solution à nébuliser

La mesure de la température de la solution à nébuliser est effectuée sur une seconde série de nébulisations. En effet, le thermomètre Testo 735-2 ne possédant que deux canaux de connexion pour sonde de température, il n'est pas possible d'effectuer cette mesure simultanément aux séries de nébulisations précédentes (cf. 3.2). Les protocoles de manipulation à suivre sont identiques à ceux décrits précédemment (ANNEXE 2) à l'exception du fait que les filtres ne sont pas conservés à la fin de la nébulisation et que les différentes pièces du montage ne sont pas rincées de manière quantitative. Des photographies des différents positionnements de la sonde de température sont présentées en annexe (ANNEXE 8).

3.4 Détermination de l'osmolalité de la solution à nébuliser

Afin de déterminer l'évolution de l'osmolalité de la solution à nébuliser au cours de la nébulisation, une fraction de cette dernière (aussi grande que possible) est prélevée de l'intérieure du nébuliseur après des nébulisations de durée déterminée (tableau 14). Pour chaque type de nébuliseur l'étude de l'évolution de l'osmolalité est effectuée en triplicata sur un seul dispositif. Les protocoles de manipulation suivis sont présentés en annexe (ANNEXE 9).

Tableau 14 : Plan de prélèvements pour l'étude de la variation de l'osmolalité de la solution à nébuliser

Nébuliseur	N°lot / n° de série	Prélèvement* [min]
Aeroneb [®] Pro	9002060810 / 056071-167	0, 1.5, 3.0, 4.5, 6.0, 7.5, 9.0
Aeroneb [®] Solo	9127080404 / 075046-026	0, 1.5, 3.0, 4.5, 6.0, 7.5, 9.0
Multisonic [®]	T 811112814	0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0
Sidestream [®]	29100702X	0, 1.5, 3.0, 4.5, 6.0, 7.5, 10.0, 15.0

* Chacun des prélèvements est issu d'une nouvelle nébulisation, le dispositif est lavé, séché et pesé après chaque nébulisation.

Les mesures de l'osmolalité des différents prélèvements de la solution à nébuliser sont effectuées à l'aide d'un cryo-osmomètre, the advanced Osmometer Model 3D3, Advanced Instruments Inc. Norwood, Massachusetts, Etats-Unis, préalablement calibré avec une solution standard de NaCl 0.9% à 290 mOsm/kg, Clinotrol 290 Reference solution, Advanced Instruments Inc. Norwood, Massachusetts, Etats-Unis. Un échantillon de la solution standard à 290mOsm/kg est analysé au début ainsi qu'au terme de chaque série de mesure, afin de s'assurer que l'appareil soit bien resté calibré tout au long de la série de mesures. Dans le cas des nébuliseurs Aeroneb[®] Pro & Solo, pour les prélèvements correspondant à t = 9.0 [min], le volume nécessaire à la détermination de l'osmolalité est récupéré au terme de la mesure afin de posséder un volume suffisant pour les déterminations de l'évolution des concentrations de salbutamol, sodium et chlorure au cours de la nébulisation.

Les dosages du salbutamol des différents échantillons de solution à nébuliser sont effectués en duplicata, après dilution d'un facteur 10000, à l'aide de la même méthode HPLC que celle employée précédemment, cf 3.2. Là aussi, les concentrations retenues pour l'analyse des résultats correspondent à la moyenne des concentrations obtenues pour chaque duplicata.

La détermination des concentrations de sodium et de chlorure sont effectuées par le Laboratoire de Chimie Clinique (LCC) du CHUV à l'aide d'un automate Modular[®] (potentiométrie indirecte à électrodes sélectives). Cette méthode d'analyse étant calibrée pour les dosages en

milieu biologique (plasma et urine), il a été demandé, en guise de contrôle, d'effectuer sur un nombre réduit d'échantillon ($n = 3$) la même analyse avec les techniques analytiques dites de références soit respectivement la photométrie de flamme et la chloridométrie (ANNEXE 10).

4 RESULTATS

4.1 Quantité de salbutamol nébulisée

La détermination exacte de la concentration en salbutamol (ANNEXE 11) des mono-doses de Ventolin® 0.05% est de 0.528 ± 0.028 mg/ml. Afin de simplifier le traitement des résultats (propagation de l'erreur initiale sur la valeur de concentration initiale de la solution de salbutamol) il a été décidé de considérer cette dernière comme étant égale à 0.528 mg

Le test de Kolmogorov-Smirnov confirme la distribution normale (Gaussienne) de l'ensemble des résultats obtenus. Le test statistique choisi pour comparer chacune des série de nébulisation est une analyse de variances paramétriques (one-way ANOVA) suivie du test *post hoc* de Tuckey-Kramer.

Tableau 15 : Paramètres expérimentaux applicables aux points 4.1, 4.2 et 4.3

Nébuliseur	Masse solution à nébuliser [g]	Volume solu- tion à nébuliser [ml]	Masse de salbutamol [mg]	Débit du gaz propulseur [l/min]	Température ambiante [°C]
A. P.	4.028 ± 0.022	4.002 ± 0.022	2.081 ± 0.012	10.0	23.36 ± 0.57
A. S.	4.030 ± 0.019	4.004 ± 0.018	2.114 ± 0.009	10.0	23.20 ± 0.16
Ms.	4.04 ± 0.02	4.014 ± 0.020	2.119 ± 0.011	10.0	23.18 ± 0.31
S.	4.030 ± 0.010	4.014 ± 0.020	2.119 ± 0.011	6.0 + 4.0	22.91 ± 0.27

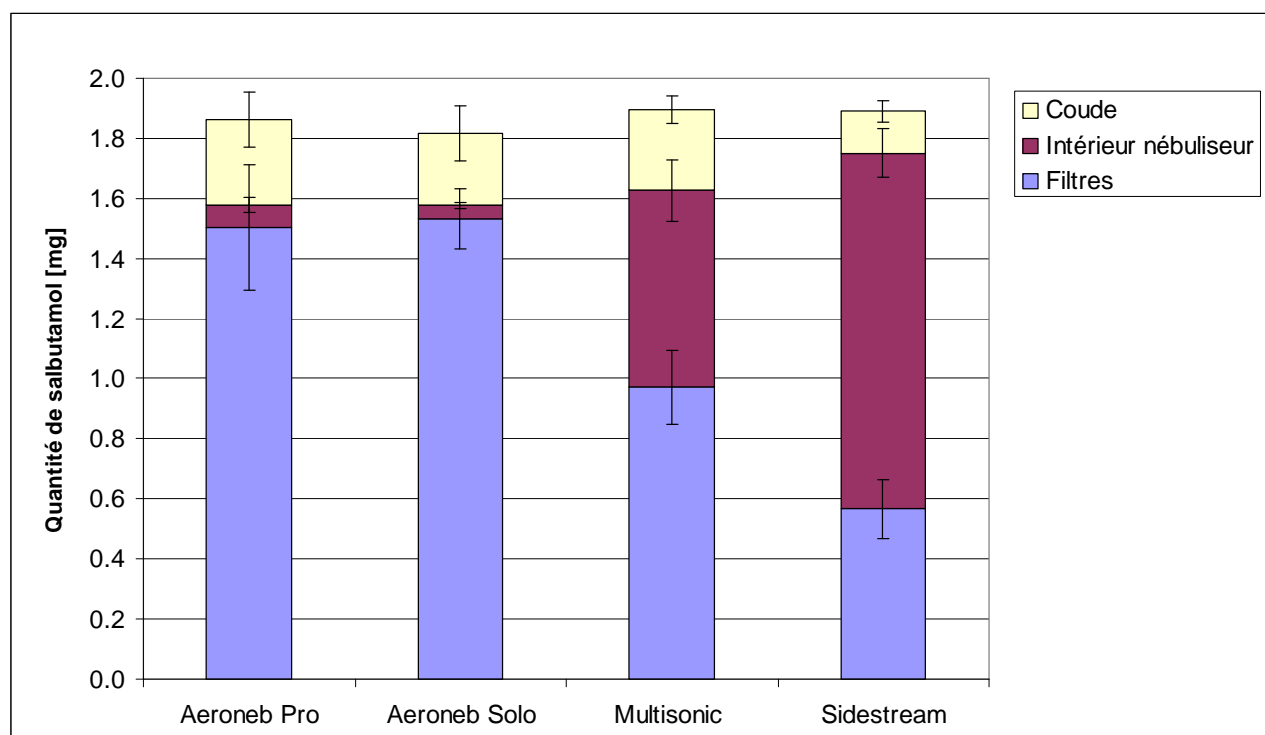


Figure 11: Répartition du salbutamol après nébulisation

La figure 11, représente, les quantités de salbutamol déposées dans les différentes parties du modèle in vitro après nébulisation (ANNEXE 7). La répartition en termes de pourcentage de la dose initiale de salbutamol à nébuliser est indiquée dans le tableau suivant.

Tableau 16 : Répartition en termes de pourcentage de la dose initiale de salbutamol à nébuliser

Nébuliseur	Coude [%]	Intérieur nébuliseur [%]	Filtres [%]	Total [%]
A. P.	13.8 ± 7.2	3.6 ± 1.9	73.1 ± 15.3	90.5 ± 7.2
A. S.	11.5 ± 5.5	2.2 ± 0.5	74.5 ± 6.1	88 ± 4.8
Ms.	13.0 ± 2.7	31.8 ± 6.2	47.1 ± 7.4	91.9 ± 4.2
S.	6.7 ± 2.1	57.6 ± 5.0	27.6 ± 6.4	91.9 ± 3.4

Tableau 17 : Quantité de salbutamol déterminée : ANOVA et test de comparaison multiple Tukey-Kramer

Comparaison	Coude		Intérieur nébuliseur		Filtre	
	P	différence	P	différence	P	différence
A. P. vs A. S.	>0.05	ns	>0.05	ns	>0.05	ns
A. P. vs Ms.	>0.05	ns	<0.001	***	<0,001	***
A. P. vs S.	<0.05	*	<0.001	***	<0,001	***
A. S. vs Ms.	>0.05	ns	<0.001	***	<0,001	***
A. S. vs S.	>0.05	ns	<0.001	***	<0,001	***
Ms. vs S.	>0.05	ns	<0.001	***	<0,001	**

ns : non significatif, * : significativement différent, ** : fortement significativement différent, *** : extrêmement significativement différent

4.2 Durée de la nébulisation et débit d'aérosol

Tableau 18 : Durée de la nébulisation, débit d'aérosol : ANOVA et test de comparaison multiple Tukey-Kramer

Nébuliseur	Durée de nébulisation [†] [min]	Débit d'aérosol [†] [mg/min]
A. P.	9.55 ± 2.35	0.153 ± 0.055
A. S.	10.19 ± 1.27	0.151 ± 0.014
Ms.	5.79 ± 0.74	0.168 ± 0.021
S.	15.0 [‡]	0.038 ± 0.008

[†]La représentation de ces résultats sous forme d'histogrammes est présentée en annexe (ANNEXE 12)

[‡]La durée de nébulisation a été fixée à 15 minutes (=utilisation clinique)

Tableau 19 : Durée de nébulisation, débit d'aérosol : ANOVA et test de comparaison multiple Tukey-Kramer

Comparaison	Durée de nébulisation		Débit d'aérosol	
	P	différence	P	différence
A. P. vs A. S.	>0.05	ns	>0.05	ns
A. P. vs Ms.	<0.001	***	>0.05	ns
A. P. vs S.	<0.001	***	<0.001	***
A. S. vs Ms.	<0.001	***	>0.05	ns
A. S. vs S.	<0.001	***	<0.001	***
Ms. vs S.	<0.001	***	<0.001	***

ns : non significatif, * : significativement différent, ** : fortement significativement différent, *** : extrêmement significativement différent

4.3 Variation de température du nébulisat au lieu de sa formation

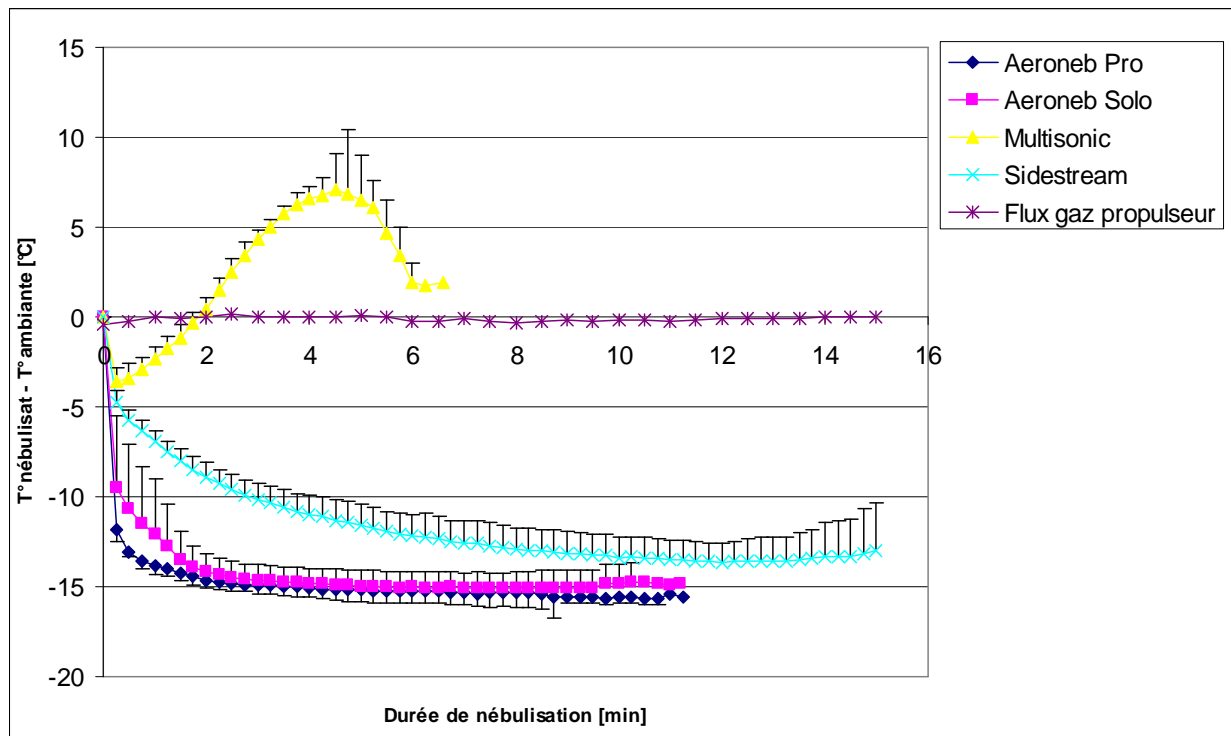


Figure 12 : Variation de la température du nébulisat au lieu de sa formation

4.4 Variation de la température de la solution à nébuliser

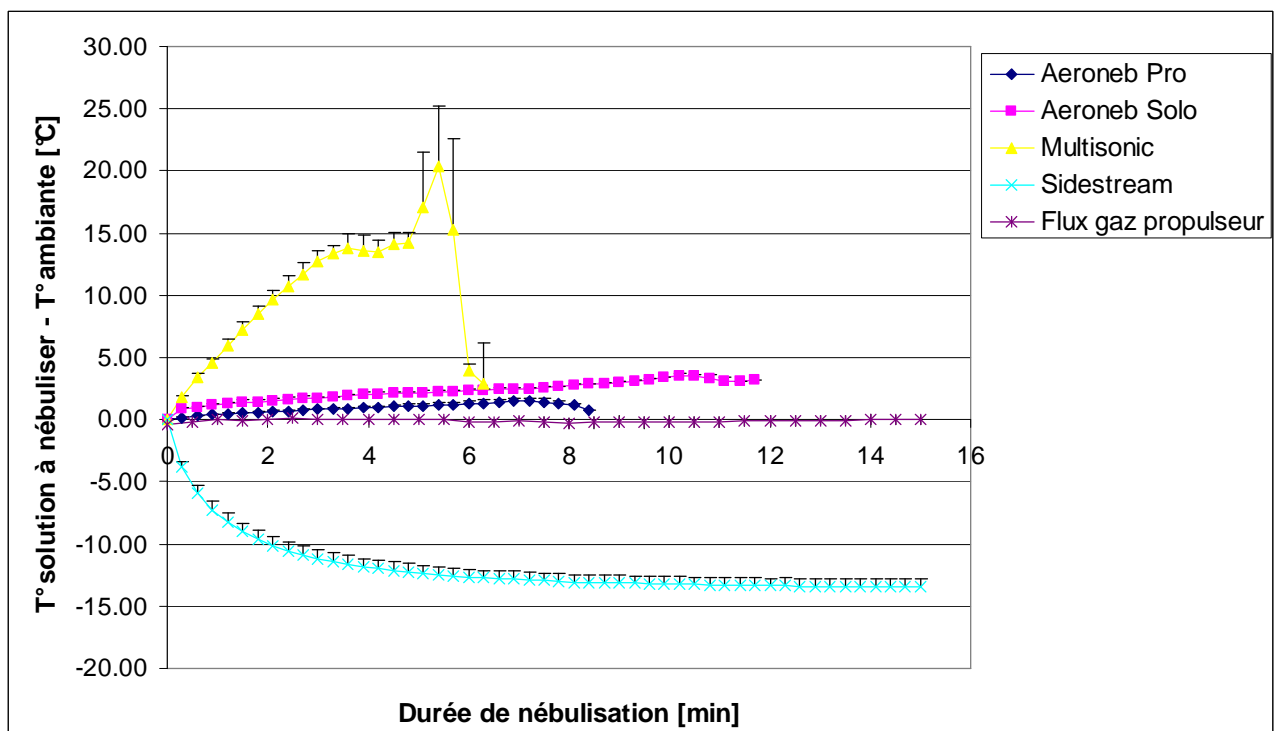


Figure 13 : Evolution de la température de la solution à nébuliser en cours de nébulisation

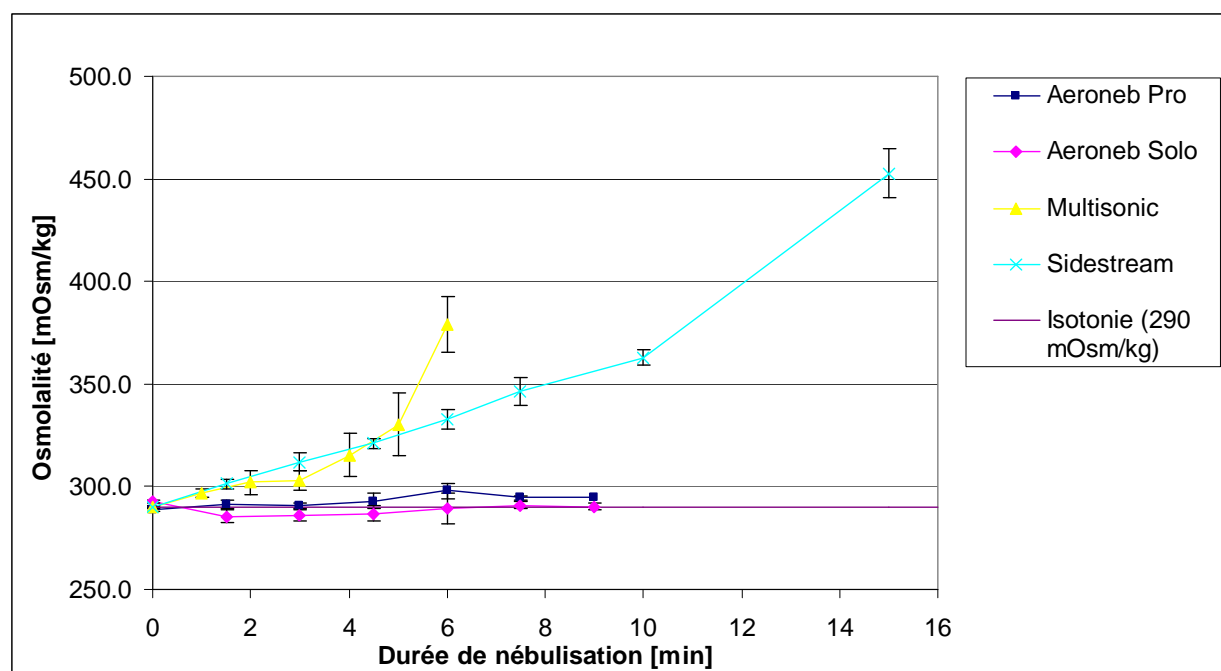
Tableau 20 : Paramètres expérimentaux applicables aux points 4.5

Nébuliseur	Masse solution à nébuliser [g]	Volume solution à nébuliser [ml]	Masse de salbutamol [mg]	Débit du gaz propulseur [l/min]	Température ambiante [°C]
A. P.	3.932 ± 0.004	3.907 ± 0.004	1.954 ± 0.002	10.0	22.68 ± 0.24
A. S.	3.986 ± 0.003	3.961 ± 0.003	1.980 ± 0.002	10.0	22.75 ± 0.20
Ms.	4.006 ± 0.003	3.980 ± 0.003	1.990 ± 0.002	10.0	22.44 ± 0.11
S.	3.978 ± 0.01	3.952 ± 0.001	1.976 ± 0.001	6.0 + 4.0	22.64 ± 0.04

4.5 Variation de l'osmolalité de la solution à nébuliser

Tableau 21 : Paramètres expérimentaux applicables aux points 4.5

Nébuliseur	Masse solution à nébuliser [g]	Volume solution à nébuliser [ml]	Masse de salbutamol [mg]	Débit du gaz propulseur [l/min]	Température ambiante [°C]
A. P.	4.015 ± 0.019	3.989 ± 0.019	1.994 ± 0.001	10.0	23.23 ± 1.31
A. S.	4.017 ± 0.002	3.991 ± 0.002	1.996 ± 0.001	10.0	23.49 ± 1.51
Ms.	4.02 ± 0.02	3.99 ± 0.02	2.00 ± 0.01	10.0	23.22 ± 1.81
S.	4.017 ± 0.020	3.991 ± 0.020	1.996 ± 0.010	6.0 + 4.0	23.08 ± 1.42

**Figure 14 : Variation en cours de nébulisation de l'osmolalité de la solution à nébuliser****Tableau 22 : Osmolalité de la solution à nébuliser au terme de la nébulisation**

Nébuliseur	Osmolalité[mOsm/kg]
Aeroneb [®] Pro	294.7 ± 2.9
Aeroneb [®] Solo	290.3 ± 3.8
Multisonic [®]	379.0 ± 33.8
Sidestream [®]	452.7 ± 29.8

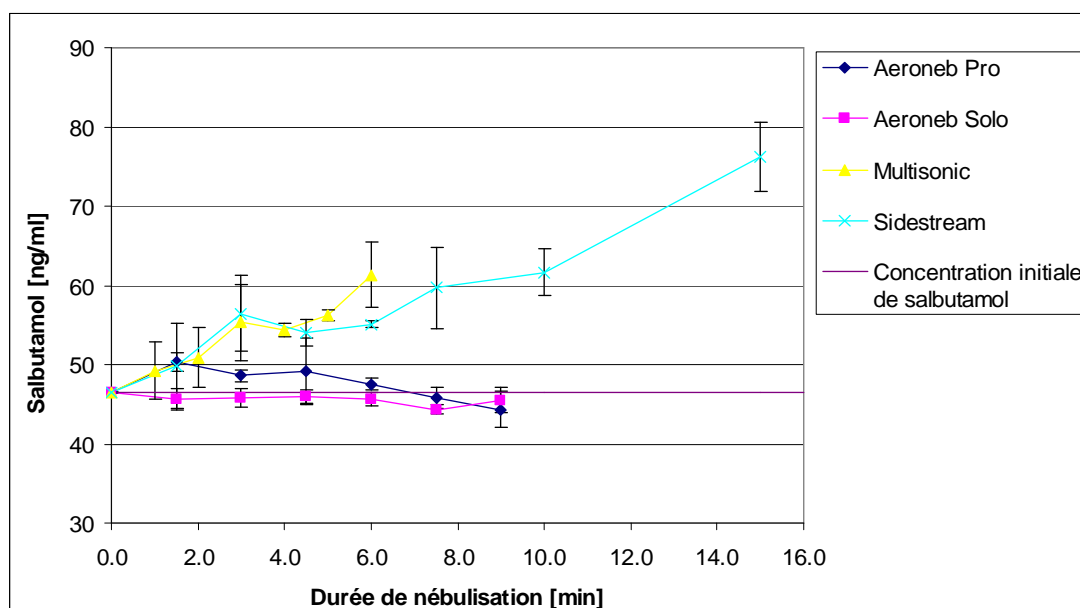


Figure 15 : Evolution de la concentration du salbutamol de la solution à nébuliser en cours de nébulisation

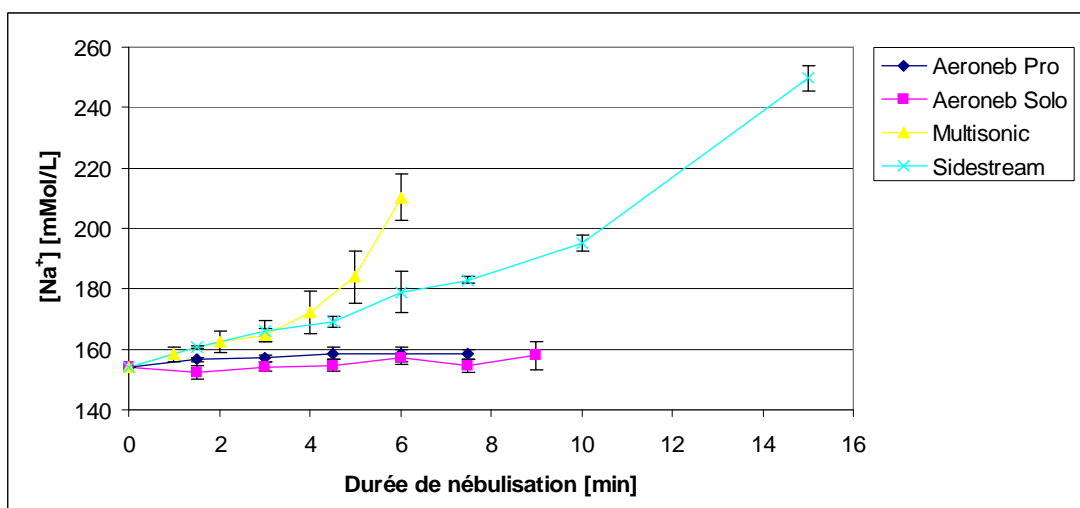


Figure 16 : Evolution de la concentration du sodium de la solution à nébuliser en cours de nébulisation

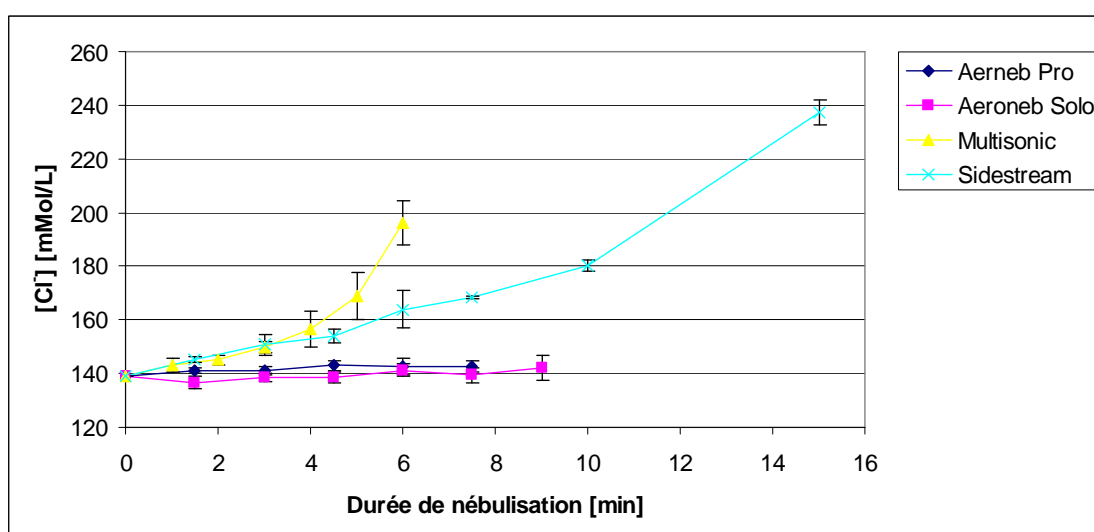


Figure 17 : Evolution de la concentration du chlorure de la solution à nébuliser en cours de nébulisation

5 DISCUSSION

5.1 Quantité de salbutamol nébulisée

Les résultats suivants sont traités avec un recouvrement de la quantité de salbutamol de $90.5 \pm 7.2 \%$ pour l'Aeroneb[®] Pro, de $88 \pm 4.8 \%$ pour l'Aeroneb[®] Solo, de $91.9 \pm 4.2\%$ pour le Multisonic[®] et de $91.9 \pm 3.4\%$ pour le Sidestream[®]. Le re-lavage des premiers filtres droite et gauche ainsi que dans un deuxième temps le lavage des seconds filtres en série droite et gauche avec un volume de 100ml d'H₂O de qualité HPLC n'ont pas permis de récupérer des quantités significatives de salbutamol. En effet, les quantités mesurées se trouvent toutes en-dessous de la limite de quantification inférieure de la méthode (LOQ = 22,22ng/ml).

En premier lieu, une analyse visuelle de la figure 11 permet d'établir l'existence d'une nette différence de performance entre les trois types de nébuliseurs étudiés. En effet, avec des quantités de salbutamol déposées sur les filtres de $73.1 \pm 15.3\%$ et de $74.5 \pm 6.1\%$ de la dose initiale à nébuliser, les nébuliseurs à maille vibrante, respectivement les Aeroneb[®] Pro et Solo, représentent, par rapport aux nébuliseurs ultrasoniques, $47.1 \pm 7.4\%$, et pneumatiques, $27.6 \pm 6.4\%$, le type de nébuliseurs le plus performant parmi ceux étudiés dans ce travail.

D'une manière générale, le modèle in vitro utilisé indique que les masses de principe actif déposées sur les filtres par les modèles de nébuliseurs à maille vibrante sont respectivement de ~ 1.6 et ~ 2.7 fois plus importantes que celles déposées par les modèles de nébuliseurs pneumatique et ultrasonique.

Dans un design d'étude in vitro relativement similaire, Fink & al⁵⁴ ont eux aussi cherché à comparer les performances d'un modèle de nébuliseur à maille vibrante (technologie OnQ[®]) avec différents modèles de nébuliseurs pneumatiques et ultrasoniques. L'élément principal de comparaison utilisé dans cette étude est la masse de principe actif inhalée (inhaled Mass) qui coïncide à la quantité de principe actif récoltée sur le filtre du modèle. D'une manière générale, ils sont parvenus à la conclusion que la masse de principe actif inhalée émise par le modèle de nébuliseur à maille vibrante équivaut à environ 1.3 à 4.5 fois celle émise par les modèles de nébuliseurs pneumatiques testés et à environ 0.8 à 2.4 fois celle émise par les nébuliseurs ultrasoniques testés. Dans une seconde étude Fink⁵³ compare les performances de l'Aeroneb[®] Pro à trois modèles de nébuliseurs pneumatique et parvient, pour l'Aeroneb[®] Pro, aux conclusions suivantes : la fraction de particules respirables ainsi que la quantité de dose déposée sont supérieures jusqu'à respectivement 1.3 et 15 fois les valeurs obtenues pour les nébuliseurs pneumatiques testés et le MMAD ainsi que le volume résiduel sont plus faible.

Harvey & al⁴⁶ ont comparé, en mesurant le pourcentage de la dose initiale de principe actif déposé dans les poumons de 7 patients, les performances d'un nébuliseur ultrasonique et d'un nébuliseur pneumatique. Ils concluent que les taux de déposition obtenus avec le nébuliseur ultrasonique étaient significativement plus importants que ceux obtenus avec le nébuliseur pneumatique.

Les résultats de ces différentes études coïncident avec les résultats obtenus dans ce travail et laissent donc envisager qu'il existe effectivement une différence significative entre les niveaux de performance des nébuliseurs à maille vibrante, pneumatiques et ultrasoniques.

Dès lors, au vue de ces grandes différences d'efficacité, il est important d'envisager, en fonction de la quantité de principe actif susceptible d'atteindre les parties basses du poumon, des

adaptations posologiques relativement importantes en fonction du type de nébuliseur utilisé. En effet, les posologies actuellement en vigueur ont été établies à partir de résultats cliniques obtenus à l'aide de nébuliseurs pneumatiques d'ancienne génération et dont les rendements de nébulisation étaient peu élevés en regard des rendements des dispositifs de dernière génération. Par conséquent, il est possible d'extrapoler, dans un cas totalement fictif d'un nébuliseur à maille vibrante générant un aérosol de qualité équivalente à un nébuliseur pneumatique classique, que la dose reçue par le patient serait jusqu'à 15 fois⁵³ plus élevée que la posologie indiquée. Il paraît donc évident dans une telle situation que le risque de surdosage médicamenteux ainsi que le risque de survenue d'effets indésirables, potentiellement graves, liés à une trop grande concentration de principe actif dans l'organisme voient leurs prévalences grandement augmentées.

La détermination des quantités de principe actif restées dans la cupule de chacun des nébuliseurs au terme de la nébulisation (= quantité résiduelle) indique, elle aussi, l'existence de nettes différences de performances entre les trois types de nébuliseurs étudiés. La quantité de principe actif restée dans la cupule du modèle de nébuliseur pneumatique (Sidestream[®]) représente $57.6 \pm 5.0\%$ en terme de masse de la dose initiale de principe actif alors que pour les nébuliseurs ultrasonique (Multisonic[®]) et à maille vibrante (Aeroneb[®] Pro et Solo) elle s'élève respectivement à $31.8 \pm 6.2\%$, $3.6 \pm 1.9\%$, et $2.2 \pm 0.5\%$. Il est important de noter qu'il existe une différence entre la détermination d'une quantité résiduelle de principe actif en terme de masse de principe actif et en terme de volume (ou masse) de solution à nébuliser. Dans le premier cas, la quantité de principe actif est déterminée par dosage et représente donc exactement la quantité (masse) de principe actif présente dans la cupule au terme de la nébulisation, alors que dans le second cas, il s'agit uniquement d'un volume (ou d'une masse) d'une solution de concentration inconnue. De manière générale, une quantité résiduelle exprimée en volume ou masse de solution à nébuliser a tendance, en raison de phénomène de concentration de la solution à nébuliser (nébuliseurs ultrasoniques et pneumatiques), à minimiser la quantité de principe actif résiduelle. Il paraît donc légitime, d'un point de vue clinique, de s'interroger sur la pertinence de l'expression d'une quantité résiduelle en terme de volume ou de masse de solution à nébuliser.

La comparaison des résultats obtenus avec la littérature indique que pour le modèle de nébuliseur pneumatique étudié, la quantité résiduelle de principe actif déterminée est supérieure aux résultats obtenus par Di Paolo E.R.⁵⁹ ($32.4 \pm 1.6\%$, nébulisation de 30 minutes). D'une manière générale, pour les nébuliseurs pneumatiques la proportion de principe actif retenu dans le volume résiduel est plus importante pour des volumes de remplissage faibles et diminue en fonction de l'augmentation du débit du gaz propulseur²⁸. Pour les nébuliseurs Multisonic[®] et Aeroneb[®] Pro et Solo aucunes valeurs de référence en termes de quantité de principe actif n'ont été trouvées dans la littérature consultée. Dès lors, afin de comparer les résultats obtenus avec la littérature, il a été décidé d'exprimer la quantité résiduelle de principe actif en termes de masse résiduelle de solution à nébuliser.

Dans les cas où la densité de la solution à nébuliser est proche de 1.0, l'erreur engendrée par la conversion de masse en volume peut être considérée comme négligeable et permet par conséquent de comparer des masses à des volumes sans avoir à déterminer la masse volumique de la solution à nébuliser résiduelle. L'expression de la quantité résiduelle de principe actif en termes de volume est communément dénommée « volume mort ».

Tableau 23 : Quantité résiduelle de solution à nébuliser

Nébuliseur	Quantité résiduelle de solution à nébuliser [g]
Aeroneb [®] Pro	0.16 ± 0.07
Aeroneb [®] Solo	0.08 ± 0.04
Multisonic [®]	1.07 ± 0.15
Sidestream [®]	1.72 ± 0.24

Les valeurs du tableau 22 ont été déterminées par pesée des différents nébuliseurs au terme de la nébulisation. Les valeurs obtenues coïncident relativement bien avec les valeurs fournies par les fabricants (tableau 9) et les valeurs de la littérature^{53,57,63}.

Les nébuliseurs qui engendrent le plus de pertes en termes de quantité de principe actif non nébulisé sont le Sidestream[®] et le Multisonic[®]. Outre leur mode de fonctionnement respectif, ces nébuliseurs se distinguent des nébuliseurs à maille vibrante de par leur conception. En effet, la présence d'un déflecteur interne au système engendre une augmentation non négligeable de leur surface interne et ainsi augmente la fraction de solution à nébuliser qui reste adhérente à leur paroi interne. En pratique clinique, la perte de principe actif engendrée par ces deux types de nébuliseurs peut être diminuée en faisant retomber les gouttelettes adhérentes aux parois dans la cupule du nébuliseur. Pour cela, il suffit d'agiter légèrement le nébuliseur ou de « tapoter » doucement ses parois externes en fin de nébulisation.

La quantité de salbutamol récupéré dans le coude (= pièce en T+ coude + pièce porte-filtres) est indicative des pertes subies par l'aérosol lors de son passage du nébuliseur jusqu'aux filtres (poumon). Ces pertes sont provoquées par des phénomènes d'impaction et de sédimentation et sont donc liées, en plus de la nature turbulente du flux du gaz propulseur, à la qualité du nébulisé. En effet, plus la taille des particules d'aérosol et par conséquent leur masse augmentent, moins leur probabilité d'atteindre les filtres (poumon) est élevée. Les quantités de principe actif mesurées sont relativement homogènes pour l'ensemble des nébuliseurs analysés à l'exception du Sidestream[®] dont la quantité de principe actif déposé au niveau du coude est environ deux fois moins élevée que pour les nébuliseurs à maille vibrante et ultrasonique. Il est intéressant de noter pour les nébuliseurs Aeroneb[®] Pro et Solo qu'une quantité non négligeable d'aérosol condense au niveau de la pièce en T. Ce phénomène peut s'expliquer par le fait que dans le cas des nébuliseurs à maille vibrante c'est la pièce en T qui joue le rôle de déflecteur. En effet, il est facilement concevable d'imaginer que les particules de diamètre trop élevé vont être trop lourdes pour être entraînées par le flux de gaz propulseur et vont donc venir s'impacter contre les parois de la pièce en T. Ce mode de fonctionnement présente un certain risque pour le patient. En effet, le volume de solution médicamenteuse reformé au niveau de la pièce en T n'est pas négligeable et risque d'être inspiré accidentellement par le patient. Dans de telles situations, des effets indésirables graves liés à un surdosage du médicament en question peuvent survenir rapidement et mettre en péril la survie du patient.

Les résultats de l'ANOVA et du test *post hoc* de Tukey-Kramer (tableau 17) indiquent, pour ce qui concerne la masse inhalée de principe actif (masse déposée sur les filtres) et la quantité de principe actif «piégé» dans le volume résiduel, que les nébuliseurs à maille vibrante, ultrasonique et pneumatique sont de fortement à extrêmement significativement différents ($P < 0.001$). Ce résultat confirme l'analyse visuelle de la figure 11. L'analyse statistique permet également de confirmer l'hypothèse que les deux modèles de nébuliseurs Aeroneb[®] Pro et Solo ne sont pas statistiquement différents ($P > 0.05$).

L'analyse statistique des quantités de salbutamol récoltées au niveau du coude indique qu'il n'existe pas de différence significative entre les différents type de nébuliseurs à l'exception de la paire comparative Aeroneb[®] Pro et Sidestream[®] ($P > 0.05$). Etant donné que les Aeroneb[®] Pro et Solo utilisent le même générateur d'aérosol (OnQ[®]), il paraît surprenant que les quantités de salbutamol récoltées au niveau du coude pour l'Aeroneb[®] Pro et le Sidestream soient significativement différentes, alors que celles de l'Aeroneb[®] Solo et du Sidestream ne le sont pas. De plus, il ne serait pas paru anormal, au vue des répartitions massiques des dépôts de solution à nébuliser au niveau du coude (Aeroneb[®] Pro : 0.370 ± 0.326 , Aeroneb[®] Solo : 0.273 ± 0.252 , Multisonic[®] : 0.072 ± 0.071 et Sidestream[®] 0.046 ± 0.038 [g]), que les quantités de principes actif récupérées au niveau du coude pour les nébuliseurs à maille vibrante soient fortement à extrêmement significativement différentes des quantités récupérées pour les nébuliseurs pneumatique et ultrasonique. Cette absence de différence significative (à l'exception de l'Aeroneb[®] Pro vs Sidestream[®]) pourrait être expliquée par des différences de concentration en salbutamol des différents aérosols produits.

5.2 Durée de nébulisation et débit d'aérosol

Les temps de nébulisation observés dans ce travail pour les nébuliseurs ultrasonique et à maille vibrante indiquent le laps de temps nécessaire pour nébuliser, jusqu'à cessation, un volume de ~ 4.0 ml d'une solution de salbutamol 0.05%. Avec une durée de nébulisation de 5.79 ± 0.74 minutes, le nébuliseur Multisonic[®] est beaucoup plus rapide que les nébuliseurs Aeroneb[®] Pro et Solo, 9.55 ± 2.35 et 10.19 ± 1.27 minutes.

La durée de nébulisation du nébuliseur Sidestream[®] a été, conformément à son utilisation clinique, fixée à 15 minutes. Cette durée correspond, selon les observations effectuées, au temps dit de pulvérisation ou «sputtering time». Ce terme décrit le moment à partir duquel la nébulisation devient erratique et qu'une agitation douce du nébuliseur est nécessaire à la poursuite de la nébulisation²⁸.

Pour les nébuliseurs à maille vibrante les temps de nébulisation indiqués dans la littérature coïncident relativement bien avec les résultats obtenus. En effet, pour l'Aeroneb[®] Pro, Fink & Simmons⁶⁴ obtiennent un temps de nébulisation de 7min. 1 sec. \pm 13 sec. et de 1min. \pm 22 sec pour la nébulisation de 3.0ml et 0.5ml d'une solution de salbutamol sulfate. Si l'on considère que la nébulisation reste constante au cours du temps, il est possible d'extrapoler (produit en croix) le temps nécessaire à la nébulisation de 4.0ml de la même solution soit : 9.33 min \pm 13 sec. et 10.76 min \pm 1.02 min. Ces observations peuvent sans autre être applicables à l'Aeroneb[®] Solo.

Pour le nébuliseur Multisonic[®], Winterhalter & al⁵⁷ obtiennent un temps de nébulisation de 10.13 ± 1.71 min. pour la nébulisation de 5.0ml d'une solution de Tc-99m 0.9% NaCl. En procédant de la même manière que précédemment, le temps de nébulisation ramener à un volume de 4.0ml est de : 8.10 ± 1.37 min. Ce résultat est relativement proche de celui obtenu et confirme que le nébuliseur Multisonic[®] est plus rapide que les nébuliseurs Aerogen Pro et Solo.

Pour la comparaison des durées de nébulisation des nébuliseurs pneumatiques, il est important de choisir des résultats obtenus avec des débits de gaz propulseur identiques. En effet, pour ce type de nébuliseur la durée de nébulisation décroît sensiblement en fonction de l'augmentation du débit du gaz propulseur²⁹. D'une manière générale, les 15 minutes de nébulisation fixées

pour le nébuliseur Sidestream[®] sont plus élevées que les temps de nébulisation référencés dans la littérature [(~7.5min⁶⁵), (~8min³³)].

L'analyse statistique des résultats obtenus (Tableau 19) indique que les durées de nébulisation des différents types de nébuliseurs sont toutes significativement différentes à l'exception de la paire comparative Aeroneb[®] Pro et Aeroneb[®] Solo. Comme précédemment, ce résultat n'est pas surprenant puisque les deux nébuliseurs en question utilisent le même générateur d'aérosol.

De manière générale, le temps de nébulisation a un impact non négligeable sur la compliance des patients sous traitement par aérosol thérapeutique. En effet, plus ce dernier est long, plus la probabilité que les patients stoppent leur traitement en cours de nébulisation est élevée^{24,28}. Cette considération ne s'applique pas au patient sous VM mais joue un rôle important dans la rapidité de la mise en place d'une thérapie d'urgence. Dans de telles situations, il est impératif de disposer d'un matériel capable de délivrer de manière rapide une quantité suffisante de principe actif au niveau des poumons. Cette propriété est caractérisée par le débit d'aérosol.

La norme franco européenne NF EN 13544-1²¹ définit le débit d'aérosol comme : « la quantité d'aérosol délivrée par le système de nébulisation par unité de temps ». Il est intéressant de relever que cette définition n'introduit aucune notion quant à l'unité dans laquelle doit être exprimé ce débit. Le problème n'est pas de savoir s'il faut exprimer ce débit en [ml/min] ou en [g/min] mais plutôt en fonction de quoi exactement. En effet, le débit d'aérosol peut être exprimé en termes de masse de principe actif ou en termes de masse (volume) de solution à nébuliser. A titre d'exemple, les débits d'aérosol déterminés dans ce travail sont exprimés dans le tableau suivant une fois en termes de quantité de principe actif et une seconde fois en termes de volume de solution à nébuliser.

Tableau 24 : Mode d'expression du débit d'aérosol

Nébuliseur	Débit en termes de quantité de principe actif nébulisé [mg/min]	Débit en termes de masse de solution nébulisée [g/min]
Aeroneb [®] Pro	0.153 ± 0.055	0.42 ± 0.12
Aeroneb [®] Solo	0.151 ± 0.014	0.39 ± 0.05
Multisonic [®]	0.168 ± 0.021	0.52 ± 0.06
Sidestream [®]	0.038 ± 0.008	0.15 ± 0.02

La détermination du débit d'aérosol par pesée (différence de masse du nébuliseur entre le début et le terme de la nébulisation) n'est pas vraiment représentative de la réalité et a tendance, pour les nébuliseurs pneumatiques et ultrasoniques, à surestimer les débits d'aérosol. En effet, ce mode d'expression ne prend en considération ni les phénomènes de concentration de la solution à nébuliser, ni les pertes d'aérosol le long de la tubulure du système de ventilation. Dès lors, il est possible de douter de la pertinence clinique d'un débit indiqué dans une telle unité. Néanmoins, il est intéressant de noter que dans les manuels d'utilisation ainsi que dans la documentation publicitaire fournis par les fabricants des trois types de nébuliseurs étudiés (tableau 9), le débit d'aérosol est exprimé en termes de masse de solution nébulisée par unité de temps et non en termes de quantité de principe actif nébulisée par unité de temps.

Les débits expérimentaux exprimés en termes de quantité de solution à nébuliser coïncident bien aux débits d'aérosol fournis par les différents fabricants (tableau 9) à l'exception du nébuliseur Sidestream[®]. Le débit du Sidestream[®] déterminé dans ce travail équivaut à ~1/2 fois le débit annoncé par le fabricant. D'autres cas de débits inférieurs à celui indiqué par le fa-

bricant se retrouvent dans la littérature^{32,63}. L'explication d'une telle différence pourrait résider dans le fait que le débit d'aérosol fourni par le fabricant a été déterminé à l'aide d'un système permettant le fonctionnement du double Venturi alors que celui-ci est obstrué dans les modèle de VM.

L'analyse statistique des différents débits indique que les nébuliseurs à maille vibrante et ultrasonique étudiés possèdent des débits non significativement différents ($P > 0.05$), alors que le débit d'aérosol du nébuliseur Sidestream[®] est significativement différent ($P < 0.001$) des débits des deux autres types de nébuliseurs.

5.3 Variation de la température de la solution à nébuliser

Afin de pouvoir faire des liens entre les profils de température de la solution à nébuliser et les profils de température du nébulisat, il a été préféré, par soucis de clarté, de traiter le point 4.4 avant le point 4.3.

Les profils de température des solutions à nébuliser de chacun des trois types de nébuliseurs étudiés indiquent clairement trois tendances évolutives différentes. Il est important de noter en guise de remarque générale que la température du flux de gaz propulseur reste égale à la température tout au long de la durée de nébulisation

Dans le cas du nébuliseur pneumatique Sidestream[®], le profil de température de la solution à nébuliser indique un rapide abaissement de la température de la solution aux cours des deux à trois premières minutes de nébulisation puis se stabilise au cours du temps jusqu'à atteindre une valeur limite minimale. La température moyenne minimale enregistrée est de $-13.47 \pm 0.8^\circ\text{C}$ par rapport à la température ambiante ($22.64 \pm 0.04^\circ\text{C}$). Cet abaissement de température peut être expliqué par l'évaporation de la solution à nébuliser engendrée par le flux de gaz propulseur (air comprimé)³⁹. En effet, ce dernier étant passablement anhydre, il se charge en vapeur de solution à nébuliser (eau) lors de son passage dans la cupule, déplaçant ainsi l'équilibre entre la solution et sa pression de vapeur saturante. Le rétablissement de cet équilibre est à la base du principe de l'évaporation et nécessite pour avoir lieu un apport énergétique fourni par la chaleur latente du solvant en question.

Ce phénomène d'évaporation est à la base de plusieurs phénomènes différents repris plus tard dans ce travail: augmentation de la concentration en principe actif et de l'osmolalité de la solution à nébuliser.

Le même phénomène d'abaissement de température a été observé, avec différents modèles de nébuliseurs pneumatiques, dans différentes études^{28,29,58}.

Le profil de température de la solution à nébuliser contenue dans le nébuliseur Multisonic[®] décrit une augmentation progressive de température jusqu'à un plateau d'environ $+ 14.5^\circ\text{C}$, puis la dernière minute de nébulisation est caractérisée par une brusque élévation de température culminant à $+ 23.67 \pm 1.52^\circ\text{C}$. La suite de la courbe de température représente l'évolution de la température à l'intérieur de la cupule du nébuliseur avant l'arrêt automatique de l'appareil. L'augmentation de la température de la solution est provoquée par la transformation de l'énergie excédentaire fournie par l'élément piézo-électrique (cf : 1.6.2).

L'augmentation de température de la solution à nébuliser a pour conséquence d'augmenter la pression saturante en vapeur de la solution et donc, par conséquent, d'augmenter son évaporation. Ainsi, tout comme dans le cas des nébuliseurs pneumatiques, la solution à nébuliser voit sa concentration en principe actif et son osmolalité augmentées au cours de la nébulisation.

Pour le même appareil, Steckel & Eskandar⁵⁸ ont observé, pour une solution aqueuse de NaCl 0.9%, une augmentation de température maximale de $+21.4 \pm 0.7^\circ\text{C}$. D'autres études^{37,39} effectuées avec différents modèles de nébuliseurs ultrasonique ont révélé des résultats relativement similaires. D'un point de vue clinique, cette élévation de température rend les nébuliseurs ultrasoniques peu voir non compatibles avec l'administration de principes actifs thermolabiles.

Dans le cas des nébuliseurs à maille vibrante Aeroneb[®] Pro et Aeroneb[®] Solo, la température de la solution à nébuliser tend à rester très proche de la température ambiante avec une légère tendance à l'échauffement. Les élévations maximales de température pour chacun de ces deux nébuliseurs sont respectivement de $1.51 \pm 0.34^\circ\text{C}$ et $3.65 \pm 0.15^\circ\text{C}$. La différence d'élévation de température entre les deux dispositifs peut être expliquée par la localisation au sein du nébuliseur de la sonde de mesure de température. En effet, plus on se rapproche de l'élément piézo-électrique, plus le rayonnement de la chaleur qu'il émet est important.

La chaleur émise par l'élément piézo-électrique est nettement inférieure dans le cas des nébuliseurs à maille vibrante que dans le cas des nébuliseurs ultrasoniques. Ceci peut être expliqué par les différentes fréquences oscillatoires utilisées par chacun des deux types d'appareil (tableau 9). En effet, plus la fréquence oscillatoire est basse, moins l'énergie électrique à fournir à l'élément piézo-électrique est élevée.

Dans une étude comparative des performances d'un nébuliseur ultrasonique versus l'Aeroneb[®] Pro, Fink & al⁴¹ ont observé pour l'Aeroneb[®] Pro un profil d'élévation de température ($2 \pm 1^\circ\text{C}$) relativement similaire à celui observé dans ce travail.

5.4 Variation de température du nébulisat au lieu de sa formation

Selon le profil de l'évolution de la température du gaz propulseur (figure 12), il est possible d'exclure une quelconque influence de la détente du gaz propulseur sur les variations de température des différents nébulisats. En effet, la détente subie par le gaz lors de sa libération n'est pas suffisante pour induire une chute significative de sa température.

Pour les nébuliseurs Sidestream[®] et Multisonic[®], les profils de température des nébulisats suivent les mêmes tendances évolutives que les profils de température de la solution à nébuliser précédemment observés (figure 13). En effet, dans les deux cas la quantité de chaleur de la solution à nébuliser est conservée lors du passage de la solution à nébuliser en aérosol. Les variations maximales de température sont de $-13.96 \pm 1.31^\circ\text{C}$ pour le nébuliseur Sidestream[®] et de $+8.18 \pm 1.74^\circ\text{C}$ pour le nébuliseur Multisonic[®]. Dans ce dernier cas, la différence de température entre la solution à nébuliser et l'aérosol peut être expliquée par des phénomènes d'évaporation et de refroidissement au contact de l'air.

Dans le cas des nébuliseurs à maille vibrante Aeroneb[®] Pro et Solo, l'évolution de la température du nébulisat en cours de nébulisation est nettement différente de celle observée pour la solution à nébuliser. En effet, la température chute, par rapport à la température ambiante, de $15.75 \pm 1.18^\circ\text{C}$ pour l'Aeroneb[®] Pro et de $15.19 \pm 1.06^\circ\text{C}$ pour l'Aeroneb[®] Solo. En premier

lieu, il est envisageable d'imaginer que cette chute de température est uniquement provoquée par l'évaporation induite par le flux du gaz vecteur. Néanmoins, une série de nébulisation (n=3) effectuée sans gaz vecteur a permis de démontrer que la température du nébulisat mesurée directement sous la maille vibrante était de $16.46 \pm 0.58^\circ\text{C}$, soit une chute de $6.34 \pm 3.13^\circ\text{C}$ par rapport à la température ambiante. Dès lors, en l'absence d'information aussi bien officielle (Aerogen Incorporation) qu'indépendante (littérature), il a été décidé, afin de proposer une éventuelle voie d'explication à cette baisse de température, de formuler l'hypothèse suivante :

- Hypothèse « Venturi »

Dans cette hypothèse, on pourrait imaginer que chaque pore de la membrane vibrante (n = 1000) se comporte comme un micro venturi (cf. 1.6.1) et que la somme des micro évaporations qui s'y produirait soit suffisante pour expliquer la perte de température du nébulisat. Un moyen de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse serait de suivre l'évolution de l'osmolalité du nébulisat directement à sa sortie de la maille vibrante.

A titre d'orientation, une nébulisation de 2.5ml de Ventolin[®] 0.05% a été effectuée, des fractions de l'aérosol généré ont été récupérées dans des cupules plastiques à trois reprises au cours de la nébulisation. L'osmolalité moyenne de ces trois prélèvements est de 290.3 ± 1.4 mOsm/kg.

Dans la mesure où la valeur de l'osmolalité de l'aérosol déterminée précédemment semble réfuter cette première hypothèse, il est possible d'imaginer que le phénomène mis en jeu au niveau de la membrane vibrante est capable d'abaisser la température de la solution sans en influencer l'osmolalité. Dès lors, si l'osmolalité de l'aérosol est identique à la solution à nébuliser, cela signifie que la concentration en espèces ioniques de l'aérosol reste constante et qu'il n'y a donc pas d'évaporation d'aérosol au niveau de la membrane vibrante. Une telle baisse de température pourrait être expliquée par une détente adiabatique. En effet, cette dernière consiste en un phénomène thermodynamique capable d'abaisser la température d'un fluide sans en changer la concentration. Le terme de transformation adiabatique décrit une transformation dans laquelle il n'y a aucun transfert de chaleur à travers la surface qui limite le système²². D'une manière générale, une transformation qui survient soudainement tend à être adiabatique. Si l'on transpose le mécanisme de fonctionnement de la détente adiabatique au nébuliseur à maille vibrante, il est possible d'avancer l'hypothèse suivante :

La fréquence d'oscillation de la membrane vibrante est de 128[Khz], soit 128'000 battements par seconde. Il est donc possible d'imaginer que « l'éjection » d'une gouttelette de solution à nébuliser au-travers d'un micro pore de la maille vibrante soit considérée comme un processus rapide. Dès lors, lors de l'éjection de la gouttelette vers l'extérieur (pression atmosphérique), cette dernière effectue un travail positif vers l'extérieur et ainsi comme la variation d'énergie interne du système est égale à la valeur négative du travail (Equation 7), l'énergie interne de la gouttelette et sa température diminue.

$$\Delta U = -W \quad [\text{Equation 7}]^{22}$$

Cette hypothèse théorique pourrait être renforcée en effectuant un plus grand nombre de mesures de température et d'osmolalité de l'aérosol au niveau de son éjection de la maille vibrante.

La comparaison des résultats obtenus pour cette section avec la littérature a uniquement permis de confirmer les résultats obtenus pour le nébuliseur Sidestream[®]. En effet, parmi la littérature consultée seul E.R. Di Paolo & al⁶⁰ ont procédé à la mesure de la température du nébulisat.

Il est important de noter que d'un point de vue clinique l'administration d'un aérosol froid peut engendrer une hyperréactivité bronchiale et par conséquent induire un bronchospasme indésirable⁷.

5.5 Variation de l'osmolalité de la solution à nébuliser

L'évaluation de l'osmolalité de la solution à nébuliser au cours du temps indique clairement deux types de comportements. En effet, pour les nébuliseurs Sidestream[®] et Multisonic[®], l'osmolalité de la solution croît rapidement au cours de la nébulisation alors que dans le cas des nébuliseurs à maille vibrante, Aeroneb[®] Pro et Solo, cette dernière reste constante tout au long de la nébulisation.

Tableau 25 : Augmentation au terme de la nébulisation de l'osmolalité et de la concentration en salbutamol de la solution à nébuliser

Nébuliseur	Augmentation de l'osmolalité au terme de la nébulisation [%]	Augmentation de la concentration du salbutamol au terme de la nébulisation [%]
A. P.	101.3 ± 1.0	95.6 ± 11.8
A. S.	100.1 ± 1.3	98.1 ± 8.8
Ms.	130.6 ± 11.7	132.0 ± 21.2
S.	156.1 ± 10.3	164.3 ± 28.2

Dans le cas des nébuliseurs pneumatique et ultrasonique, l'augmentation de l'osmolalité de la solution à nébuliser est liée, comme vu précédemment au point 5.4, à l'évaporation de la dite solution. Dès lors, selon le principe de conservation de la matière, il est possible d'affirmer que les aérosols produits par ces deux types de nébuliseurs sont de nature hypotonique.

Pour les nébuliseurs Aeroneb[®] Pro et Solo, le mécanisme de génération de l'aérosol n'engendre pas de concentration ou de dilution de la solution à nébuliser. Néanmoins, il n'est pas possible d'affirmer que les aérosols générés sont isotoniques. En effet, comme l'indique la figure 12, la température de l'aérosol chute drastiquement au cours de la nébulisation. Selon les hypothèses formulées ainsi que les nébulisations effectuées au point 5.5, il est possible d'affirmer qu'une grande partie de la perte de température de l'aérosol est liée à des phénomènes d'évaporation. Etant donné que l'évaporation engendre la concentration de l'aérosol, il est possible de conclure que les aérosols générés par les nébuliseurs Aeroneb[®] Pro et Solo sont hypertoniques.

Il est important de noter que d'un point de vue clinique l'administration d'un aérosol non isotonique peut être un des facteurs déclenchant du bronchospasme réactionnel (bronchospasme paradoxal) parfois observé lors de la mise en place d'une aérosol thérapie²⁰.

La comparaison visuelle des figures 15, 16 et 17 avec la figure 14 indique que les évolutions des concentrations au cours de la nébulisation du salbutamol, du sodium et du chlorure suivent le même profil que celui déterminé pour l'évolution de l'osmolalité de la solution à nébuliser. Ce résultat n'est pas surprenant puisque l'osmolalité d'une solution dépend directement de sa concentration en espèces ioniques. La représentation graphique des évolutions au cours de la

nébulisation des concentrations de salbutamol, de sodium et de chlorure versus l'osmolalité, permet de confirmer la corrélation entre l'évolution de ces concentrations et l'osmolalité de la solution à nébuliser (ANNEXE).

Tableau 26 : Coefficient de corrélation entre l'évolution des différentes espèces ioniques en solution et l'évolution de l'osmolalité de la solution à nébuliser

Nébuliseur	$R^2_{[\text{Salbutamol}]}$	$R^2_{[\text{Sodium}]}$	$R^2_{[\text{Chlorure}]}$
A.P.	0.095	0.594	0.442
A.S.	0.016	0.159	0.6296
Ms.	0.795	0.993	0.985
S.	0.957	0.997	0.994

Selon le tableau 26, pour les nébuliseurs Aeroneb[®] Pro et Solo, les coefficients de corrélation entre les différentes espèces ioniques en solution et l'osmolalité de la solution à nébuliser ne sont pas représentatifs d'une corrélation. Cette absence de corrélation peut être expliquée par le fait que l'osmolalité de la solution à nébuliser, pour ces deux modèles de nébuliseurs, n'évolue pas au cours de la nébulisation.

Dans le cas des nébuliseurs Multisonic[®] et Sidestream[®], les coefficients de corrélation indiquent clairement le lien entre l'évolution de l'osmolalité de la solution à nébuliser et les concentrations respectives de chacune des espèces ioniques étudiées.

Les résultats obtenus pour le nébuliseur Sidestream[®] coïncident avec la littérature⁶⁰.

6 LIMITES DU TRAVAIL

6.1 Optimisation de la méthode de lavage des filtres

Dans un premier temps, la méthode de lavage pourrait être optimisée afin de se rapprocher le plus possible d'un taux de recouvrement en salbutamol de 100%. En effet, malgré un taux de recouvrement de $100.5 \pm 0.3\%$ lors de la validation de la méthode d'extraction des filtres, il semblerait que la méthode d'extraction soit moins efficace lorsqu'il s'agit d'extraire de la masse filtrante le salbutamol déposé par nébulisation. Il est donc possible d'imaginer que sous l'influence de l'évaporation de l'aérosol (provoquée par le flux du gaz propulseur), les molécules de salbutamol déposées sur la surface des filtres pénètrent plus profondément dans la structure de la masse filtrante que lors d'un simple dépôt (chargement) à leur surface. Par conséquent, il est possible que lors du lavage l'eau ne parvienne pas jusqu'aux molécules de salbutamol les plus enfouies dans la masse filtrante. Deux pistes d'amélioration relativement simples à mettre en place sont envisageables pour tenter d'extraire une plus grande quantité de salbutamol :

- L'utilisation des ultrasons pourrait permettre une meilleure solubilisation du salbutamol « piégé » dans les mailles de la masse filtrante.
- L'utilisation d'un mélange hydro-organique ou d'un agent mouillant pourrait permettre d'augmenter l'affinité du solvant d'extraction pour la masse filtrante hydrophobe.

La méthode de chargement des filtres pourrait aussi être modifiée afin de la rendre la plus similaire à un dépôt d'aérosol. En effet, il serait envisageable, avant son extraction, d'évaporer sous un flux d'air (10 l/min) la solution de chargement déposée sur la surface du filtre.

6.2 Interprétation du modèle

Il est important à ce niveau d'interprétation des résultats de bien réaliser qu'il s'agit là d'un modèle *in vitro* simple dont la mise au point est justifiable dans le cadre d'études de plus grande envergure. En effet, l'élaboration de ce modèle prend tout son sens en tant que modèle d'orientation dont le but est de mieux décrire et comprendre les comportements de nouveaux modèles de nébuliseurs destinés à être utilisés en VM.

Il est important de noter que les quantités de salbutamol récupérées à la surface des filtres ne représentent en aucun cas la quantité effective de principe actif susceptible d'atteindre les poumons d'un patient sous VM. En effet, les quantités de salbutamol récupérées sur les filtres reflètent uniquement un rendement de nébulisation d'un certain type de nébuliseur et ne sont interprétables que dans le cadre du modèle *in vitro* utilisé. Afin de réaliser un lien entre la quantité de principe actif récupérée au niveau des filtres du modèle *in vitro* et la quantité de principe actif susceptible d'atteindre les poumons d'un patient intubé, il est nécessaire de connaître la « qualité » de l'aérosol généré ainsi que les performances sous ventilateur des nébuliseurs étudiés. La qualité de l'aérosol est définie en fonction du profil de distribution granulométrique des particules d'aérosol. En effet, plus la quantité de particules de taille comprise entre 1 et 5 μm (fraction respirable) est importante, plus la quantité d'aérosol susceptible d'atteindre les alvéoles pulmonaires est élevée. Malheureusement, la détermination du profil aérodynamique des particules d'aérosols générées par les trois types de nébuliseurs étudiés sort du cadre de ce travail. Il s'agit là de la principale limite du modèle développé, car sans ces données il est difficile de comparer les différents nébuliseurs de manière objective. L'utilisation des profils aérodynamiques présentés dans la littérature s'avère être relativement périlleuse. En effet, malgré les efforts de standardisation (norme franco-européenne EN-13544-1²¹), les profils aérodynamiques d'un même modèle de nébuliseur peuvent être relativement différents d'une étude à l'autre. Il serait donc intéressant de mettre au point, en parallèle à ce modèle, un protocole standard de détermination du profil aérodynamique des particules d'aérosol.

7 PERSPECTIVES D'AVENIR

Au terme de ce travail, les voies d'investigations futures ouvertes peuvent être réparties en deux groupes. Le premier groupe aurait pour objectif de poursuivre les investigations menées dans ce travail, alors que le second aurait pour but le développement du modèle *in vitro* utilisé vers un modèle plus proche des conditions rencontrées en VM.

Ainsi, dans un premier temps, il serait envisageable d'approfondir les investigations effectuées dans ce travail afin d'y apporter des compléments de réponses.

En effet, par faute de temps il n'a pas été possible de poursuivre les investigations concernant la chute de température des aérosols générés par les nébuliseurs Aeroneb® Pro et Solo. Il serait donc intéressant dans un travail futur de se pencher de manière plus rigoureuse sur ce phénomène de refroidissement et de vérifier le bien fondé des deux hypothèses de mécanisme présentées dans ce travail.

Une seconde piste d'investigations à approfondir est celle de la caractérisation des propriétés physico-chimiques du nébulisat. En effet, il serait intéressant d'un point de vue clinique de connaître en plus de sa température, les évolutions de son osmolalité ainsi que de son pH. .

Dans un second temps, il serait envisageable de faire évoluer le modèle in vitro étudié vers un modèle plus complet et plus représentatif de la situation sous VM.

En effet, comme mentionné précédemment (6.2), la mise au point d'une méthode standardisée (EN-13544-1²¹) de détermination de la taille des particules d'aérosol permettrait de disposer, avec le modèle in vitro étudié, d'un banc d'essai relativement complet capable d'évaluer de manière équivalente les performances de tout nouveau type de nébuliseur destiné à être utilisé en VM. De plus, le côté prédictif du modèle pourrait être amélioré en remplaçant la source d'alimentation en gaz propulseur (bonbonne d'air comprimé) par un ventilateur permettant de prendre en considération les différents paramètres respiratoires liés à la VM (p.ex. ventilateur type Galileo[®]).

Le but ultime à atteindre serait la mise en place d'un protocole d'étude in vivo ayant pour objectif de déterminer, sur la base d'une réponse clinique, les efficacités thérapeutiques de chacun des trois types de nébuliseurs étudiés.

8 CONCLUSION

Au regard des résultats obtenus, l'ensemble des objectifs fixés en début de travail peuvent être considérés comme atteints.

L'évaluation au travers du modèle in vitro mis au point dans ce travail a permis, en fonction de la masse de principe actif inhalée (masse de salbutamol récoltée sur les filtres), d'évaluer les performances de quatre modèles de nébuliseurs différents.

Les nébuliseurs à maille vibrante Aeroneb[®] Pro et Solo sont, avec des masses de principe actif inhalées équivalentes à respectivement $73.1 \pm 15.3 \%$ et $74.5 \pm 6.1\%$ de la dose initiale de principe actif, considérés comme les nébuliseurs les plus performants parmi les différents modèles étudiés. Ils précèdent par le nébuliseur ultrasonique Multisonic[®] Infra control $47.1 \pm 7.4\%$ et le nébuliseur pneumatique Sidestream[®] $27.6 \pm 6.4\%$.

L'analyse statistique des résultats (ANOVA) indique que les masses de principe actif inhalées sont, pour chacun des trois types de nébuliseurs, statistiquement différentes ($P < 0.001$).

L'impact de ces résultats sur la pratique clinique de l'aérosol thérapie sous ventilation mécanique réside dans le fait qu'il est absolument nécessaire, dans le but d'obtenir une médication sûre et efficace, d'émettre, en fonction du type de dispositif utilisé, des directives d'adaptation posologique.

9 REFERENCES

- 1 Gandevia, B., Historical review of the use of parasympatholytic agents in the treatment of respiratory disorders. *Postgrad Med J* **51** (7 Suppl), 13 (1975).
- 2 Stevens, A., Lowe, J., *Histologie Humaine*. (De Boeck Université, Bruxelles, 1997).
- 3 Desai, A., Lee, M., *Gibaldi's Drug Delivery Systems in pharmaceutical care*. (American Society of Health-System Pharmacists, Bethesda, 2007).
- 4 Huchon, G. and Aéache, J.-M., *Pneumologie pour le praticien*. (Masson, Paris, 2001).
- 5 Lissauer, Tom and Clayden, Graham, *Pédiatrie : manuel illustré*. (De Boeck Université, Bruxelles, 1998).
- 6 Tournier, Guy, Sardet-Frismand, Anne, and Baculard, Armelle, *Pneumologie pédiatrique*. (Masson, Paris ; Milan [etc.], 1996).
- 7 Labbé, André and Albertini, Marc, *Asthme du nourrisson et du petit enfant*. (Arnette, Paris, 1998).
- 8 Di Paolo, E. R., in *Optimisation de la nébulisation de salbutamol chez l'enfant sous ventilation mécanique* (Thèse de doctorat, Faculté des Sciences de l'Université de Lausanne, 2000).
- 9 Global Strategy for Asthma Management and Prevention, the GINA, Available at <http://www.ginasthma.com>, (05.2008); Société suisse de pédiatrie, *Paediatrica* vol.15, n°1, 2004, Available at <http://www.swiss-paediatrics.org>, (2008).
- 10 Dautzenberg, B., Diot, P., *L'aérosolthérapie par nébulisation*, 2 ed. (Margauxorange, Paris, 2006).
- 11 Perel, Azriel, *Handbook of mechanical ventilatory support*. (Williams & Wilkins, Baltimore ; Hong Kong [etc.], 1992).
- 12 Fattorusso, Vittorio and Ritter, Otto, *Vademecum clinique : du diagnostic au traitement*, 16e éd. ed. (Masson, Paris, 2001).
- 13 Vincent, J.-L., *Le manuel de réanimation, soins intensifs et médecine d'urgence*, 2 ed. (Springer, Paris, 2005).
- 14 Katzung, Bertram G., *Pharmacologie fondamentale et clinique*, 9e éd. ed. (Piccin, Padova, 2006).
- 15 Marchand-Adam, S., Girard, F., *Pneumologie*. (ESTEM, Bruxelles, Paris, 2002).
- 16 Nowak, R., Emerman, C., Hanrahan, J.P., Parsey, M.V., Hanania, N.A., Claus, R., Schaefer, K., Baumgartner R.A., A comparison of levalbuterol with racemic albuterol in the treatment of acute severe asthma exacerbations in adults. *American Journal of Emergency Medicine* **24**, 259 (2006).
- 17 *Compendium suisse des médicaments 2008 : informations professionnelles et patients*. (Documed, Bâle, 2008).
- 18 Lacroix, Jacques, *Urgences et soins intensifs pédiatriques*, 2e éd. ed. (Ed. du CHU Sainte-Justine, Montréal, 2007).
- 19 Le Hir, Alain, *Pharmacie galénique : bonnes pratiques de fabrication des médicaments*, 8e éd. rév. et augm ed. (Masson, Paris, 2001).
- 20 Cocchetto, D. M., Sykes, R. S., and Spector, S., Paradoxical bronchospasm after use of inhalation aerosols: a review of the literature. *J Asthma* **28** (1), 49 (1991).
- 21 AFNOR, Norme EN NF 13544-1, Respiratory Therapy Equipment - Part 1: Nebulizing systems and their components. (Fevrier 2002).

- 22 Hecht, Eugene, Becherrawy, Tamer, and Martin, Joël, *Physique*. (De Boeck Université, Paris [etc.], 1999).
- 23 Hess, D. R., Nebulizers: principles and performance. *Respir Care* **45** (6), 609 (2000).
- 24 O'Callaghan, C., Barry, P. W., The science of nebulised drug delivery. *Thorax* **52 Suppl 2**, S31 (1997).
- 25 Nerbrink, O., Dahlback, M., and Hansson, H. C., Why do medical nebulizers differ in their output and particle size characteristics? *J Aerosol Med* **7** (3), 259 (1994).
- 26 Smye, S. W., Jollie, M. I., and Littlewood, J. M., A mathematical model of some aspects of jet nebuliser performance. *Clin Phys Physiol Meas* **12** (3), 289 (1991).
- 27 Newman, S. P., Pellow, P.G.D., Clarke, S.W., Droplet size distribution of nebulised aerosols for inhalation therapy. *Clin Phys Physiol Meas* **7** (2), 139 (1986).
- 28 McCallion, O.N.M., Taylor, K. M.G., Bridges, P.A., Thomas, M., Taylor, A.J., Jet nebulisers for pulmonary drug delivery. *Int J Pharm* (130), 1 (1995).
- 29 Clay, M. M., Pavia, D., Newman, S. P., Lennard-Jones, T., Clarke, S. W., Assessment of jet nebulisers for lung aerosol therapy. *Lancet* **2** (8350), 592 (1983).
- 30 Le Brun, P. P., de Boer, A. H., Heijerman, H. G., and Frijlink, H. W., A review of the technical aspects of drug nebulization. *Pharm World Sci* **22** (3), 75 (2000).
- 31 MacNeish, C. F. et al., A comparison of pulmonary availability between Ventolin (albuterol) nebulizer and Ventolin (albuterol) Respirator Solution. *Chest* **111** (1), 204 (1997).
- 32 Loffert, D. T., Ikle, D., and Nelson, H. S., A comparison of commercial jet nebulizers. *Chest* **106** (6), 1788 (1994).
- 33 Hess, D. et al., Medication nebulizer performance. Effects of diluent volume, nebulizer flow, and nebulizer brand. *Chest* **110** (2), 498 (1996).
- 34 Mercer, T.T., Production of therapeutic aerosols : principles and techniques. *Chest* **80** (suppl), 813 (1981).
- 35 Lang, R.J., Ultrasonic atomisation of liquids. *J. Acoust. Soc. Am* **34**, 6 (1962).
- 36 Knoch, M., Keller, M., The customised electronic nebuliser : a new category of liquid aerosol drug delivery systems. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2** (2), 377 (2005).
- 37 Khatri, L., Taylor, K. M., Craig, D. Q., and Palin, K., An assessment of jet and ultrasonic nebulisers for the delivery of lactate dehydrogenase solutions. *Int J Pharm* **227** (1-2), 121 (2001).
- 38 Taylor, K.M.G., Venthoye, G., Chawla, A., Pentamidine isethionate delivery from jet nebulisers. *Int J Pharm* **85**, 203 (1992).
- 39 Phipps, P.R., Gonda, I., Droplets produced by medical nebulizers : some factors affecting their size and solute concentration. *Chest* **97**, 1327 (1990).
- 40 Dhand, R., New Nebuliser Technology - Aerosol Generation by using a Vibrating Mesh or Plate with Multiple Apertures. *Technology & Sciences* (2003).
- 41 Fink, J.B., Power J., Comparison of a Novel Aerosol Generator with standard Ultrasonic Nebulizer Designed for use During Mechanical Ventilation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med* **163**, A127 (2001).
- 42 Vecellio, L., The mesh nebuliser : a recent technical innovation for aerosol delivery. *Breathe* **2** (3) (March 2006).
- 43 Fink, J.B., Uster, P., Simon, M., In-vitro Evaluation of Budesonide Nebulizing Suspension with a

- Novel Aerosol Generator. *J Aerosol Med* **14** (3), 387 (2001); Fink, J.B., Brazza, P., Bisgaard, J., Aerosol Delivery During Mechanical Ventilation with High Frequency Oscillation : An In-Vitro Evaluation. *Chest* **120**, S277 (2001).
- 44 Dhand, R., Aerosol therapy during mechanical ventilation: getting ready for prime time. *Am J Respir Crit Care Med* **168** (10), 1148 (2003).
- 45 Duarte, A. G., Inhaled bronchodilator administration during mechanical ventilation. *Respir Care* **49** (6), 623 (2004).
- 46 Harvey, C. J. et al., Comparison of jet and ultrasonic nebulizer pulmonary aerosol deposition during mechanical ventilation. *Eur Respir J* **10** (4), 905 (1997).
- 47 O'Doherty, M. J. and Thomas, S. H., Nebuliser therapy in the intensive care unit. *Thorax* **52 Suppl 2**, S56 (1997).
- 48 Mukhopadhyay, S., & al., The quantitative distribution of nebulized antibiotic in the lung in cystic fibrosis. *Respir Med* **88** (3), 203 (1994).
- 49 O'Doherty, M.J., & al., Lung deposition of nebulised pentamidine in children. *Thorax* **48** (3), 220 (1993).
- 50 Collis, GG., Cole, CH, Le Souef, PN. , Dilution of nebulised aerosol by air entrainment in children. *Lancet* **336**, 341 (1990).
- 51 Everard, M. L., Inhalation therapy for infants. *Adv Drug Deliv Rev* **55** (7), 869 (2003).
- 52 Dhand, R., Basic techniques for aerosol delivery during mechanical ventilation. *Respir Care* **49** (6), 611 (2004).
- 53 Fink, J.B., New Technology offers New Opportunities : Continuous Bronchodilator therapy During Mechanical Ventilation. *Respiratory therapy* **2** (4) (2007).
- 54 Fink, J.B., Simon, M., MacLoughlan R., Behan N., in *In Vitro Comparison of a Novel Nebulizer with Ultrasonic and Pneumatic Nebulizers* <http://www.aerogen.com> (05.2008) (Aerogen Inc., Mountain View, CA.).
- 55 Mercier, E. & al, in *Aerosol Delivery of Amikacin by Three Nebulizers of Varying Efficiency in Patients on Mechanical Ventilators*, <http://www.aerogen.com> (05.2008) (Mountains View, CA.).
- 56 Abhiram, R., & al, Aerosol Delivery through Nasal Cannulas : An In Vitro Study. *J Aerosol Med* **21** (2) (2008).
- 57 Winterhalter & al, Aerosol Delivery by an ultrasonic nebulizer during different mechanical ventilation settings in a lung model - a pilot study. *Drug Design, Development and Therapy* **2** (2008).
- 58 Steckel, H. and Eskandar, F., Factors affecting aerosol performance during nebulization with jet and ultrasonic nebulizers. *Eur J Pharm Sci* **19** (5), 443 (2003).
- 59 Di Paolo, E. R., Pannatier, A., and Cotting, J., In vitro evaluation of bronchodilator drug delivery by jet nebulization during pediatric mechanical ventilation. *Pediatr Crit Care Med* **6** (4), 462 (2005).
- 60 Di Paolo, E. R., Cotting, J., Pannatier, A., Physicochemical Aspects of Nebulization: Comparison of Five Models of Jet Nebulizers. *EHP* **6** (3) (2000).
- 61 Barry, P. W. and O'Callaghan, C., An in vitro analysis of the output of budesonide from different nebulizers. *J Allergy Clin Immunol* **104** (6), 1168 (1999).
- 62 Sidler-Moix, A.-L., in *Optimisation de la nébulisation du salbutamol chez l'enfant sous ventilation mécanique* (Travail de thèse en cours, Service de Pharmacie CHUV, Lausanne, 2004).

- ⁶³ Antadir Federation, Commission Medico-Technique & Sociale., Porta-neb Lite / Sidestream, Available at <http://www.antadir.org>, (05.2008).
- ⁶⁴ Fink, J.B., Simmons, R., in *The Role of Dose Volume in Delivering Albuterol Sulfate with a Low Residual Volume Nebulizer* <http://www.aerogen.com> (05.2008) (Mountain View, CA.).
- ⁶⁵ Kendrick, A. H., Smith, E. C., and Denyer, J., Nebulizers--fill volume, residual volume and matching of nebulizer to compressor. *Respir Med* **89** (3), 157 (1995).

10 ANNEXES

ANNEXE 1 : Photographie du modèle in Vitro

ANNEXE 2 : Protocole de manipulations : Salbutamol

ANNEXE 3 : Méthode de lavage des filtres Respigard® 303

ANNEXE 4 : Protocole HPLC

ANNEXE 5 : Chromatogramme du salbutamol

ANNEXE 6 : Validation de la méthode de dosage HPLC du salbutamol « in vitro »

ANNEXE 7 : Résultats dosage du salbutamol dans les différentes parties du modèle in vitro

ANNEXE 8 : Photographies des zones d'insertion de la sonde de température

ANNEXE 9 : Protocoles de manipulations : Osmolalité

ANNEXE 10 : Automate Modular® vs IL-943® et chloridométrie

ANNEXE 11 : Dosage mono-dose de Ventolin® 0.05%

ANNEXE 12 : Durée de la nébulisation et débit d'aérosol

ANNEXE 1 : Photographies du modèle in Vitro

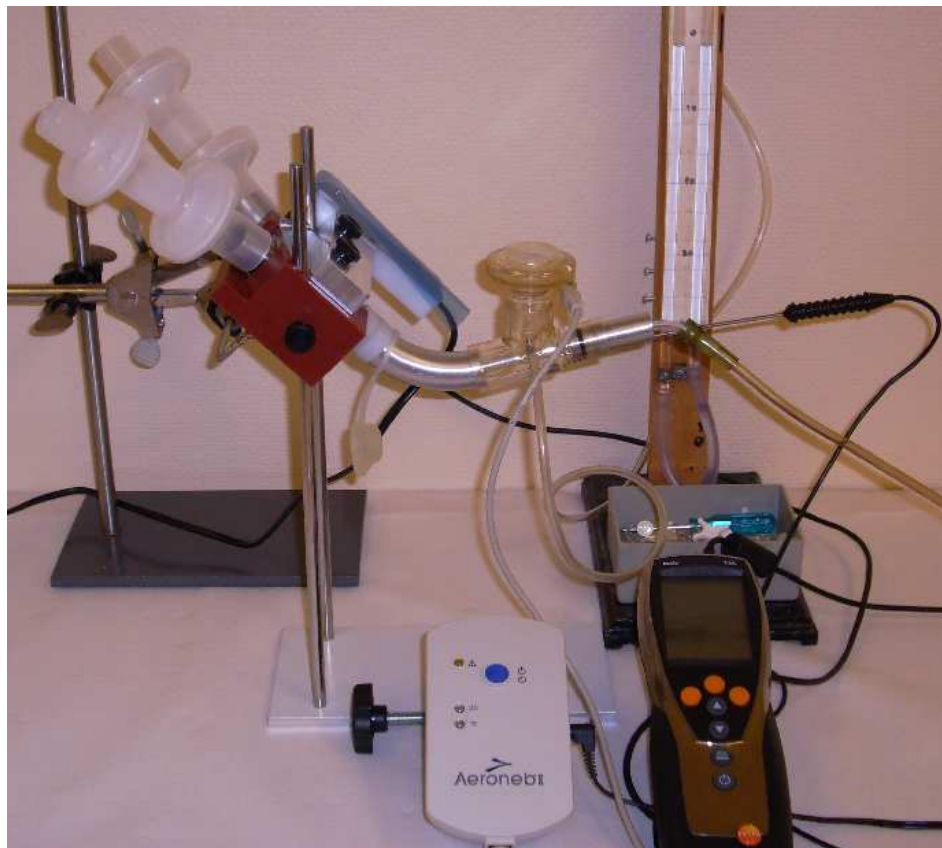


Figure 18 : Montage Aeroneb Pro

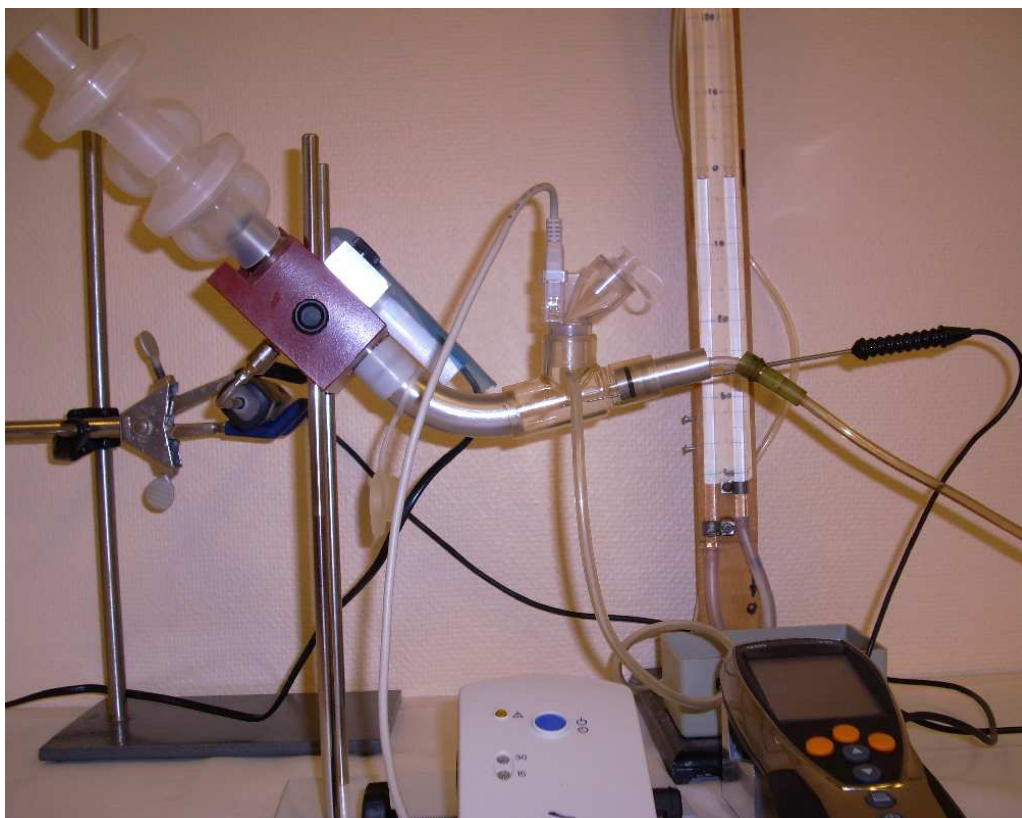


Figure 19 : Montage Aeroneb Solo



Figure 20 : Montage Multisonic Infra Control

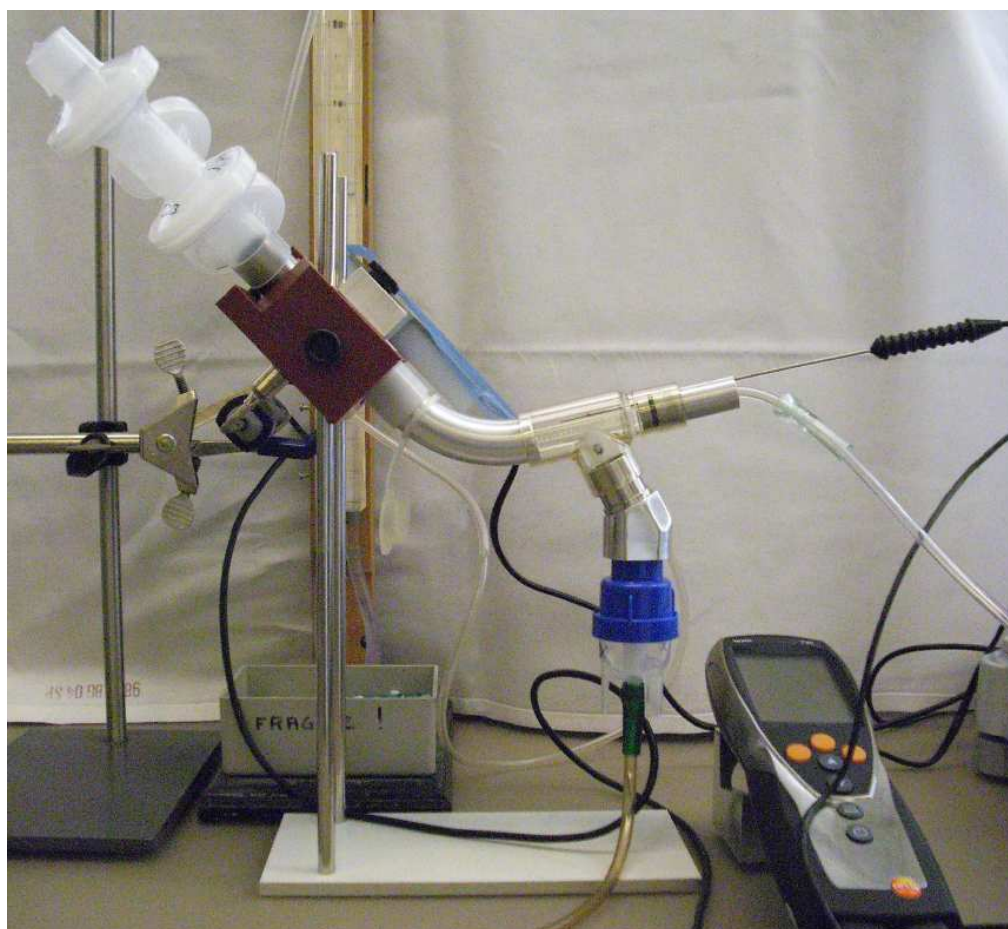


Figure 21 : Montage Sidestream

date

Protocole de manipulation**Aeronéb Pro & Solo****Avant mise en marche du système**

		a	b	c	d	e
1	Pesée et marquage des filtres Respirgard 303, droit 1 et 2					
2	Pesée et marquage des filtres Respirgard 303, gauche 1 et 2					
3	Pesée de la pièce porte filtres sans système de chauffage					
4	Pesée de la pièce en T avec système d'alimentation en air + coude					
5	Pesée du nébuliseur vide + relever n° de lot et de série					
6	Mise en place de la sonde de température soudée au niveau du statif la pièce porte-filtres					
7	Installation de la pièce porte filtres sur statif + mise en place des filtres Respirgard gauche et droit et du système de chauffage (220V ->37°C puis 150V)					
8	Programme Testo : fréquence des mesures de T° des canaux 1 & 2 = 3 secondes					
9	Démarrage programme Testo Chauffage de la pièce porte-filtres à une température de 37.5 ± 0.5°C					
10	Mise en place du coude et de la pièce en T					
11	Réglage du débit de la source d'air à 10.0 l/min (10.5 l/min sur le rotamètre)					
12	Arrêt de l'approvisionnement d'air sur l'appareil Bronkhorst					
13	Connexion de l'alimentation d'air sur le montage					
14	Connexion de la sortie métallique de la pièce en T avec l'appareil de mesure de pression + contrôle du zéro					
15	Relever T° ambiante moyenne (sonde aiguille 30 sec.)					
16	Mise en place de la sonde de mesure de température du nébulisat, contrôle du positionnement et de l'étanchéité (7.0 cm à l'ext.)					
17	Prélèvement de 4.0 ml de la solution à nébuliser avec une pipette semi automatique de 5.0 ml					
18	Peser, dans la cupule de l'Aeronéb, la masse des 4.0 ml de la solution à nébuliser prélevés					
19	Mise en place du nébuliseur (capuchon d'alimentation fermé) sur la pièce en T					

Mise en marche du système

		a	b	c	d	e
20	Contrôle de la T° de la pièce porte filtre, la manipulation se poursuit si la température de la pièce porte filtres est de 37.5 ± 0.5°C					
21	Mesure de la T° moyenne à l'intérieure de la pièce en T (30 sec) Immédiatement après le dernier relevé de T° : noter le n° de la mesure en cours et ouverture de la source d'air à 10 l/min et mise en marche simultanée du nébuliseur pour une période de 30 minutes					
22	Relever la variation de pression interne du système toutes les 60 secondes					

Arrêt du système

		a	b	c	d	e
23	Dès disparition du nébulisat au niveau la pièce en T, noter le n° de la dernière mesure en cours					
24	Arrêt du programme de mesure de température TESTO, de l'approvisionnement en air et de l'Aeronéb 60 sec après la disparition (de visu) du nébulisat					

Récolte du matériel et des données

		a	b	c	d	e
25	Délai de 60 secondes entre l'arrêt du système et les pesées des différents éléments					
26	Pesée des filtres Respirgard droit 1 et 2 + obstruction des orifices avec du parafilm					
27	Pesée des filtre Respirgard gauche 1 et 2 + obstruction des orifices avec du parafilm					
28	Dépôt des 2 filtres dans un sachet plastique de congélation préalablement étiqueté					
29	Pesée du coude connecté avec la pièce en T + pièce d'approvisionnement en air et nébuliseur					
30	Rinçage de la partie inférieure du nébuliseur à l'eau distillée (3 x ~2 ml). L'eau de rinçage est récupérée dans un ballon jaugé de 100 ml préalablement étiqueté					
31	Pesée du nébuliseur avec partie inférieure séchée					
32	Pesée de la pièce porte-filtres sans système de chauffage					
33	Rinçage à l'eau distillée (~85 ml) des dépôts d'aérosol dans la pièce porte-filtres., le coude et dans la pièce en T. L'eau de rinçage est récupérée dans le même ballon jaugé de 100 ml que précédemment (cf. 30).					
34	Rinçage à l'eau distillée de l'intérieur du nébuliseur et récupération de l'eau de rinçage dans un ballon jaugé de 25 ml préalablement étiqueté.					
35	Récolte des données de température et des pesées dans le classeur Excel					
36	Transfert du contenu des ballons jaugés dans des tubes d'échantillonnage (3X) préalablement étiquetés					
37	Conservation réfrigérée des différents tubes et filtres (-18°C)					

Rétablissement de l'appareillage

		a	b	c	d	e
38	Nettoyage et remplacement du nébuliseur					
39	Rinçage à l'eau déminéralisée de l'intérieur de la pièce porte filtre, du coude et de la pièce en T					
40	Séchage des pièces lavée au point 40					

date

Protocole de manipulation

Multisonic

Avant mise en marche du système

		a	b	c	d	e
1	Pesée et marquage des filtres Respirgard 303 droit 1 et 2					
2	Pesée et marquage des filtres Respirgard 303 gauche 1 et 2					
3	Pesée de la pièce porte filtres sans système de chauffage					
4	Pesée coude connecté à : connecteur métallique + tête du nébuliseur avec embouts de connexion à la source d'air					
5	Pesée du nébuliseur vide + cône déflecteur (sans tête du nébuliseur) + relever n° de série					
6	Mise en place de la sonde de mesure de température de la pièce porte filtre					
7	Installation de la pièce porte-filtres sur statif + mise en place des filtres Respirgard gauche et droit et du système de chauffage (220V -> 37°C puis 150V)					
8	Programme Testo : fréquence des mesures de T° des canaux 1 & 2 = 3 secondes					
9	Démarrage du programme Testo Chauffage de la pièce porte filtres à une température de 37.5 ± 0.5°C					
10	Prélèvement de 4.0 ml de la solution à nébuliser avec une pipette semi-automatique de 5.0 ml					
11	Peser la masse, dans le nébuliseur avec déflecteur et sans sa tête amovible, des 4.0 ml de la solution à nébuliser					
12	Mise en place du coude, du connecteur métallique et de la tête du nébuliseur avec système de connexion à la source d'air					
13	Réglage du débit de la source d'air à 10.0 l/min (10.5 l/min sur le rotamètre)					
14	Mesure de la T° ambiante à l'aide de la sonde aiguille insérée pendant 30 sec.					
15	Arrêt de l'approvisionnement d'air sur l'appareil Bronkhorst					
16	Connexion de l'alimentation d'air sur la tête du nébuliseur					
17	Mise en place de la sonde aiguille pour la mesure de T° du nébulisa, contrôle du positionnement (12.0 cm à l'ext.)					
18	Contrôle du montage					

Mise en marche du système

		a	b	c	d	e
20	Contrôle de la T° de la pièce porte filtre, la manipulation se poursuit si la température de la pièce porte filtres est de 37.5 ± 0.5°C					
21	Mesurer la T° à l'intérieur du nébuliseur, la manipulation se poursuit si T° interne du nébuliseur est = à T° ambiante ± 1.0°C					
22	Immédiatement après dernier relevé de la T° interne du nébuliseur, noter le N° de la mesure et mettre en marche simultanément le nébuliseur et la source d'air (commutateur Bronkhorst)					

Arrêt du système

		a	b	c	d	e
23	Arrêt simultané de l'arrivée d'air (sur le commutateur Bronkhorst) et du nébuliseur 60 sec après que le signal sonore de fin de nébulisation ait retenti					

Récolte des données

		a	b	c	d	e
24	Délai de 60 secondes entre la fin de la nébulisation et les pesées des différents éléments					
25	Pesée des filtres Respirgard 303 droit 1 et 2 + obstruction des orifices avec du parafilm					
26	Pesée des filtres Respirgard 303 gauche + obstruction des orifices avec du parafilm					
27	Dépôt des 2 filtres dans un sachet plastique de congélation préalablement étiqueté					
28	Pesée du coude connecté à connecteur métallique + tête du nébuliseur					
29	Pesée de la pièce porte filtres sans système de chauffage					
30	Pesée du nébuliseur sans tête du nébuliseur					
31	Rinçage à l'eau distillée des dépôts d'aérosol dans la pièce porte filtre, le coude, le connecteur métallique et dans la tête du nébuliseur. L'eau de rinçage est récupérée dans un ballon jaugé de 100 ml préalablement étiqueté					
32	Rinçage à l'eau distillée de l'intérieur du nébuliseur et récupération de l'eau de rinçage dans de ballon jaugés de 25 ml préalablement étiquetés					
33	Récolte des données de température et des pesées dans le classeur Excel					
34	Transfert du contenu des ballons jaugés dans des tubes d'échantillonnage (3X) préalablement étiquetés					
35	Conservation réfrigérée des tubes d'échantillonnage et des filtres					

Rétablissement de l'appareillage

		a	b	c	d	e
36	Rinçage à l'eau déminéralisée de l'intérieur du nébuliseur et du déflecteur					
37	Rinçage à l'eau déminéralisée de l'intérieur de la pièce porte filtre, du coude, du connecteur métallique et de la tête du nébuliseur					
38	Séchage des différentes pièces et du nébuliseur					

Protocole de manipulation

Sidestream

Avant mise en marche du système

		a	b	c	d	e
1	Pesée et marquage des filtres Respirgard droit 1 et 2					
2	Pesée et marquage des filtres Respirgard gauche 1 et 2					
3	Pesée de la pièce porte-filtres sans système de chauffage					
4	Pesée du coude connecté à : la pièce en T avec système d'alimentation en air + connecteur métallique					
5	Pesée du nébuliseur vide + relever n° de lot					
6	Mise en place de la sonde de mesure de température de la pièce porte filtre					
7	Installation de la pièce porte filtres sur statif + mise en place des filtres Respirgard gauche et droit et du système de chauffage (220V->37°C puis 150V)					
8	Programme Testo : fréquence des mesures de T° d es canaux 1 & 2 = 3 secondes					
9	Démarrage du programme Testo Chauffage de la pièce porte filtres à une température de $37.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$					
10	Installation du coude, de la pièce en T et du connecteur métallique					
11	Prélèvement de 4.0 ml de la solution à nébuliser ave une pipette semi-automatique de 5.0 ml					
12	Pesée, dans le nébuliseur, de la masse des 4.0 ml de la solution à nébuliser prélevés					
13	Mise en place du nébuliseur contenant les 4.0 ml de solution à nébuliser					
14	Réglage du débit de la source d'air : A à 6 l/min (6.3 l/min sur le rotamètre) B 4 l/min (4.2 l/min sur le rotamètre)					
15	Mesure de la T° ambiante avec la sonde aiguille, 30 sec.					
16	Arrêt de l'approvisionnement d'air A sur l'appareil bronkhorst					
17	Connexion de l'alimentation d'air A sur le nébuliseur					
18	Mise en place de la sonde de mesure de température du nébulisa, contrôle du positionnement (en butée, 7.0 cm à l'ext)					
19	Connexion de la sortie métallique de la pièce en T avec l'appareil de mesure de la pression + contrôle du zéro					
20	Contrôle du montage					

Mise en marche du système

		a	b	c	d	e
21	Contrôle de la T° de la pièce porte filtre, la manipulation se poursuit si la température de la pièce porte filtres est de $37.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$					
22	Mesure de la T° moyenne à l'intérieure de la pièce en T (60 sec.) Immédiatement après le dernier relevé de T°, noter le n° de la mesure et Ouverture simult anée de la source d'air A à 6.0l/min (sur le commutateur Bronkhorst)					
23	Connexion de l'alimentation en air B 4.0 l/min à la pièce en T					

24	Relever la variation de pression interne du système toutes les 60 sec.					
----	--	--	--	--	--	--

Arrêt du système

		a	b	c	d	e
25	La nébulisation est considérée comme terminée après 15.0 min.					
26	Arrêt du programme de mesure de température TESTO et des sources d'arrivée d'air A et B dès le terme de la nébulisation					

Récolte des données

		a	b	c	d	e
27	Délai de 60 secondes entre la fin de la nébulisation et les pesées des différents éléments					
28	Pesée des filtres Respirgard droit 1 et 2 + obstruction des orifices avec du parafilm					
29	Pesée des filtres Respirgard gauche 1 et 2 + obstruction des orifices avec du parafilm					
30	Dépôt des 2 filtres dans un sachet plastique de congélation préalablement étiqueté					
31	Pesée de la pièce porte filtres sans système de chauffage					
32	Pesée du coude connecté à : pièce en T avec système d'approvisionnement en air + nébuliseur avec connecteur métallique					
33	Pesée du nébuliseur					
34	Rinçage à l'eau distillée des dépôts d'aérosol dans la pièce porte-filtres, le coude et dans la pièce en T + connecteur métallique. L'eau de rinçage est récupérée dans un ballon jaugé de 100 ml préalablement étiqueté.					
35	Rinçage à l'eau distillée de l'intérieur du nébuliseur et récupération de l'eau de rinçage dans un ballon jaugé de 50 ml préalablement étiqueté.					
36	Récolte des données de température et des pesées dans le classeur Excel					
37	Transfert du contenu des ballons jaugés dans des tubes d'échantillonnage (3x) préalablement étiquetés					
38	Conservation réfrigérée des différents tubes d'échantillonnage et des filtres					

Rétablissement de l'appareillage

		a	b	c	d	e
37	Remplacement du nébuliseur					
38	Rinçage à l'eau déminéralisée de l'intérieur de la pièce porte filtre, du coude et du connecteur métallique					
39	Séchage des pièces					

ANNEXE 3 : Méthode de lavage des filtres Respirgard 303

Matériel :

- H₂O qualité HPLC
- Cylindre gradué 100ml
- Pipette Pasteur
- Ballon jaugé 100ml + bouchon
- Entonnoir
- Parafilm
- Erlenmeyer à vide
- Tube Falcon 50ml (2x)

Méthode :

Tableau 27 : Méthode de lavage des filtres Respirgard® 303

Etape	Volume H2O [ml]
Rinçage des 2 faces du filtre	2 x (3x5ml)
1 ^{er} cycle de lavage sous vide	1 x 30 ml en triple recirculation
2 ^{ème} cycle de lavage sous vide	1 x 30 ml en triple recirculation
Aspiration forcée du volume d'H2O retenu dans la masse filtrante	-
Rinçage des 2 tubes Falcon®	1 x 5 ml
Compléter au trait de jauge	ad 100ml

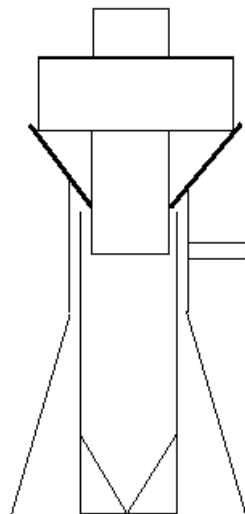


Figure 1 : Schéma système de lavage sous vide

Validation :

La méthode de lavage a été validée sur 10 filtres Respirgard® 303 préalablement chargés avec 2.5 ml d'une solution Ventolin® 1.25mg/2.5ml. Chaque échantillon a été injecté en triplicata. Les aires sous le pic de chacun des 30 dosages ont été comparées à l'aire sous le pic moyenne de trois témoins de contrôle.

Les témoins de contrôle (3 fois 2.5 ml d'une solution Ventolin®) ont subi la même procédure de lavage que les filtres tests.

Tableau 28 : Résultats des dosages des solutions de lavage des filtres Respirgard® + rendement d'extraction

Injection	Echantillon	[c] µg/ml	AUC	Rendement extr [%]
1	TC_1_H2O_04_041	11.6891	3923845	
2	TC_2_H2O_04_041	11.4980	3860478	AUC moyenne
3	TC_3_H2O_04_041	11.5544	3879171	3887831.333
4	Lavage_A_04_041	11.5805	3887824	100.0%
5	Lavage_A_04_042	11.5022	3861879	99.3%
6	Lavage_A_04_043	11.6249	3902569	100.4%
7	Lavage_B_04_041	11.5058	3863064	99.4%
8	Lavage_B_04_042	11.4949	3859454	99.3%
9	Lavage_B_04_043	11.4879	3857122	99.2%
10	Lavage_C_04_041	11.6292	3913327	100.7%
11	Lavage_C_04_042	11.5944	3892461	100.1%
12	Lavage_C_04_043	11.5719	3892824	100.1%
13	Lavage_D_04_041	11.6520	3913841	100.7%
14	Lavage_D_04_042	11.5300	3873554	99.6%
15	Lavage_D_04_043	11.5678	3883635	99.9%
16	Lavage_E_04_041	11.5746	3885893	100.0%
17	Lavage_E_04_042	11.6416	3909823	100.6%
18	Lavage_E_04_043	11.6488	3910485	100.6%
19	Lavage_F_04_041	11.6905	3926939	101.0%
20	Lavage_F_04_042	11.6560	3912880	100.6%
21	Lavage_F_04_043	11.6614	3914666	100.7%
22	Lavage_G_04_041	11.6936	3927468	101.0%
23	Lavage_G_04_042	11.4949	3859454	101.1%
24	Lavage_G_04_043	11.4879	3857122	101.0%
25	Lavage_H_04_041	11.7052	3932499	101.1%
26	Lavage_H_04_042	11.5058	3863064	101.2%
27	Lavage_H_04_043	11.5623	3881783	101.7%
28	Lavage_I_04_041	11.5623	3881783	99.8%
29	Lavage_I_04_042	11.6806	3921034	100.9%
30	Lavage_I_04_043	11.7415	3941235	101.4%
31	Lavage_J_04_041	11.6539	3913823	100.7%
32	Lavage_J_04_042	11.7372	3939820	101.3%
33	Lavage_J_04_043	11.7057	3929368	101.1%

Tableau 29 : Taux de recouvrement de la méthode de lavage

moyenne	100.5%
écart type	0.0069
cv	0.7%
min	99.2%
max	101.7%
int de conf	0.3%
t student	2.042
nombre	30

Le taux de recouvrement en salbutamol de la méthode de lavage est de $100.5 \pm 0.3\%$

ANNEXE 4 : Protocole HPLC

Enregistrement-Validation

N° de Version	Date d'émission	Classement	Elaboration - Modification	Approbation Date Nom et Visa(s)	
1	18.04.2008			18.04.2008	ALSI

Dosage du salbutamol par LC-Fluorescence Méthode In Vitro

Principe de la méthode

Etape 1 :

- **Matériel, appareillage et réactifs**
- **Propriétés physicochimiques des analytes et de l'étalon interne**
- **Choix des conditions chromatographiques d'une méthode appropriée de séparation du salbutamol, étalon interne et (métabolites) et d'interférences de la matrice.**

Etape 2 :

- **Protocole d'analyse des échantillons de salbutamol**

Dosage du salbutamol in vitro par LC-Fluorescence
--

Principe de la méthode

Le salbutamol est extrait du filtre après la nébulisation (durant l'expirium, l'inspirium ou en continu) par rinçage à l'eau de qualité HPLC et dosé par HPLC avec détection par fluorimétrie.

Sécurité

Les règles de sécurité générales du laboratoire doivent être suivies ainsi que les procédures pour l'élimination des déchets.

Matériel, appareillages et réactifs

Pour faire l'analyse le matériel ci-dessous est nécessaire :

Appareils

Micropipettes ajustables (200 µl, 1000 µl)
Balance Analytique (Mettler AT 250)
Appareil HPLC (Varian) piloté par ordinateur logiciel Star Varian Inc.
Pompe Prostar 230
DéTECTEUR Fluorimètre Jasco 920
Injecteur Prostar 410

Matériel

HPLC :

- Ballons jaugés
- Embouts jaunes (5 à 200 µl)
- Embouts Bleus (200 à 1000 µl)

- Tubes en polypropylène + bouchons
- Colonne ChromolithTM Performance RP-18^e (100 x 4.6 mm) (VWR)
- Pré-colonne ChromolithTM Performance RP-18^e (10 x 4.6 mm) (VWR)

Lavage Filtre :

- Entonnoir
- Système de filtration sous vide
- Tubes Falcon 50 ml
- Parafilm
- Ballons jaugés 100ml

Réactifs

Tous les solvants et les réactifs utilisés pour l'analyse sont de qualité HPLC : Acide ortho-phosphorique 85% (art. N° 1.00552.0250, Merck, Darmstadt, Allemagne), eau pour chromatographie (art. N° 1.15333.2500, Merck, Darmstadt, Allemagne) et méthanol gradient grade pour la chromatographie en phase liquide (art. N° 1.06007.2500, Merck, Darmstadt, Allemagne) et acide acétique (crystallisable) 100% (art. N° 1.00066.1000, Merck, Darmstadt, Allemagne) sont obtenus par VWR International (Dietikon, Suisse).

Standards

Salbutamol sulfate DAB 10, BP 93 (art. N° 701154, Synopharm, Barsbüttel, Hambourg).

Propriétés physico-chimiques de salbutamol et de baméthane

Salbutamol:

Masse molaire :

$$\text{C}_{13}\text{H}_{21}\text{NO}_3 = 239.3 \text{ g/mol}$$

Solubilité :

1 : 70 ds H₂O
 1 : 25 dans l'éthanol
 légèrement soluble dans l'éther

pK_a :

9.3 ; 10.3

Salbutamol sulphate

Masse molaire:

$$(\text{C}_{13}\text{H}_{21}\text{NO}_3)_2, \text{H}_2\text{SO}_4 = 576.7 \text{ g/mol}$$

Solubilité :

1 :4 ds H₂O

légèrement soluble dans l'éthanol, le chloroforme et l'éther

pK_a :

9.3 ; 10.3

Méthode HPLC

Conditions Chromatographiques :

- Colonne : ChromolithTM Performance RP18e (100 x 4.6 mm) avec comme pré-colonne ChromolithTM Performance RP18e (10 x 4.6 mm)
- Détecteur Fluorimètre Jasco-920 : Excitation 275 nm et Emission 310 nm.
- Débit = à 2 ml/min.
- Pression du système = 90-95 bars
- Température : Température ambiante (23°C ± 1°C)
- Volume d'injection : V= 50 µl, mode pick-up.
- Le temps total de l'analyse est de 5 minutes.
- Phase Mobile : A / B 20/80 V/V.

Préparation des phases :

- A) Prélever 20.0 ml d'acide acétique 100% ad 2.0 L avec MeOH (1% V/V d'acide acétique dans du méthanol).

Dégazer pendant 30 min la phase organique aux ultrasons juste avant l'utilisation.

- B) Prélever 20 ml d'acide acétique à 100% + 2 flacons de B-7* ad 2.0L H₂O (1% V/V d'acide acétique + B-7 5mM dans H₂O)

pH_{phase aqueuse} : 2.8

Nettoyage de la colonne :

- se fait chaque 40 injections : - A / B 40 :60 pendant 10 mn.
- A 100% pendant 30 mn.

Protocole Expérimental :

Avant l'analyse des échantillons de salbutamol, une droite de calibration doit être réalisée.

Avant la première analyse un QC sera analysé, puis un QC sera dosé chaque 10 échantillons de salbutamol pour s'assurer que la droite d'étalonnage est toujours valable. Si un QC donne

un résultat s'éloignant de plus de 5% de la valeur cible, une nouvelle droite d'étalonnage sera faite avant tout nouveau dosage.

Les QC seront pris sur tout l'intervalle de dosage.

La méthode a été validée selon le modèle de régression linéaire pondérée (1/x²). Ce modèle doit être programmé dans la méthode d'analyse du programme Varian pour une lecture directe des résultats d'analyse.

Préparation des solutions :

Solution Stock de Salbutamol, IV_Sa_1 [5 mg/ml] : Peser exactement 60.3 mg de salbutamol sulfate les dissoudre dans 4 ml d'eau HPLC (conserver la pesée datée et identifiée) et compléter à 10.0 ml avec le même solvant.

Solution Stock de Salbutamol, IV_Sa_2 [50 µg/ml] : Prélever 1.0 ml (à la pipette Hamilton) de IV_Sa_1 et compléter à 100.0 ml avec la phase mobile entière.

Solution Stock de Salbutamol, IV_Sa_3 [500 ng/ml] : Prélever 1.0 ml (à la pipette Hamilton) de IV_Sa_2 et compléter à 100.0 ml avec la phase mobile entière.

Solution Stock de Salbutamol, IV_Sa_4 [50 ng/ml] : Prélever 1.0 ml (à la pipette Hamilton) de IV_Sa_3 et compléter à 10.0 ml avec la phase mobile entière

Droite de calibration

Tableau 1 : Standards de calibration de Salbutamol Sa à préparer directement dans les vials d'analyse (sauf pour IV_V3 où il faut d'abord faire la dilution dans un tube en pp) à la micropipette (toujours la même).

Concentration finale de Salbutamol dans la solution aqueuse [ng/ml]		Volume et concentration de la solution source de Salbutamol		Volume du diluant [µl]	Volume Total [ml]	Facteur de dilution	Nombre d'injections
IV_1	10	200 µl	De IV_Sa_4 à 50ng/ml	800	1.0	10	2
IV_2	25	500 µl	De IV_Sa_4 à 50ng/ml	500	1.0	2	2
IV_3	50	200 µl	De IV_Sa_3 à 500ng/ml	1800	2.0	10	2
IV_4	100	200 µl	De IV_Sa_3 à 500ng/ml	800	1.0	5	2
IV_5	200	400 µl	De IV_Sa_3 à 500ng/ml	600	1.0	2.5	2

On utilise comme diluant la phase mobile entière

Préparation des solutions de contrôle de qualité (QC)

Solution Stock de Salbutamol, IV_Sa_QC_1 [5 mg/ml] : Peser exactement 60.3 mg de salbutamol sulfate les dissoudre dans 4 ml de NaCl 0.9% (conserver la pesée datée et identifiée) et

compléter à 10.0 ml avec le même solvant (*comme NaCl 0.9% utiliser le B Braun dans le eco-flac*).

Solution Stock de Salbutamol, IV_Sa_QC_2 [50 µg/ml] : Prélever 1.0 ml (à la pipette Hamilton) de IV_Sa_QC_1 et compléter à 100.0 ml avec la phase mobile entière.

Solution Stock de Salbutamol, IV_Sa_QC_3 [500 ng/ml] : Prélever 1.0 ml (à la pipette Hamilton) de IV_Sa_QC_2 et compléter à 100.0 ml avec la phase mobile entière.

Solution Stock de Salbutamol, IV_Sa_QC_4 [50 ng/ml] : Prélever 1.0 ml (à la pipette Hamilton) de IV_Sa_QC_3 et compléter à 10.0 ml avec la phase mobile entière

Tableau 2 : QC de Salbutamol

Concentration finale en ng/ml		Volume et concentration de la solution source de salbutamol		Volume du diluant [µl]	Volume Total [ml]	Facteur dilution	Nbre d'injections
QC_IV_1	10	200 µl	De IV_Sa_QC_4 à 50ng/ml	800	1.0	5	2
QC_IV_2	25	500 µl	De IV_Sa_QC_4 à 50ng/ml	500	1.0	2	2
QC_IV_3	50	200 µl	De , IV_Sa_QC_3 à 500ng/ml	1800	1.0	10	2
QC_IV_4	200	400 µl	De , IV_Sa_QC_3 à 500ng/ml	600	1.0	5	2

comme diluant utiliser la phase mobile entière

Remarque :

Les solutions IV_Sa_QC_1, IV_Sa_QC_2, IV_Sa_QC_3 et IV_Sa_QC_4 seront aliquotées dans plusieurs tubes en pp de 10 ml, étiquetées et congelées à -20°C. Elles pourront être utilisées durant toute la durée de l'analyse.

Note Importante:

Avant chaque série d'analyse 2 tests sont réalisés pour vérifier les paramètres de la méthode HPLC (temps de rétention, séparation, résolution, aspect des pics) sont conformes aux spécifications établies lors du développement de la méthode.

Pour se faire

Injecter 50 µl de la solution IV_1.

Injecter 50 µl de la phase mobile utilisée pour la reconstitution des échantillons et QC (phase mobile entière).

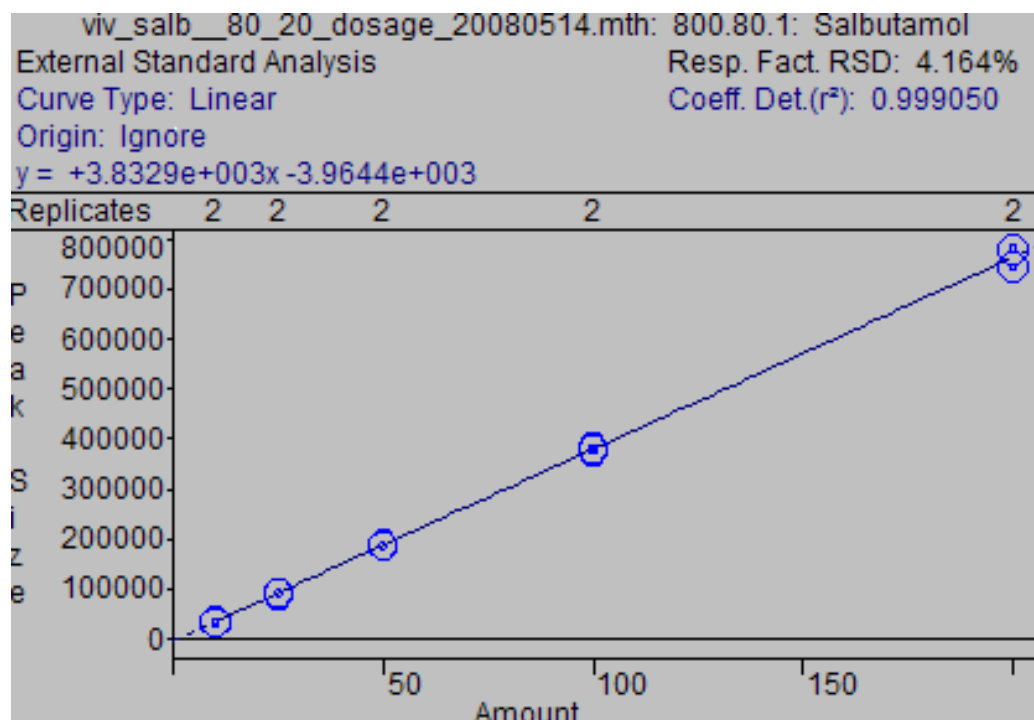


Figure 1 : Droite d'étalonnage pour le dosage du salbutamol des solution de lavage des filtres, du coude et de l'intérieur du nébuliseur

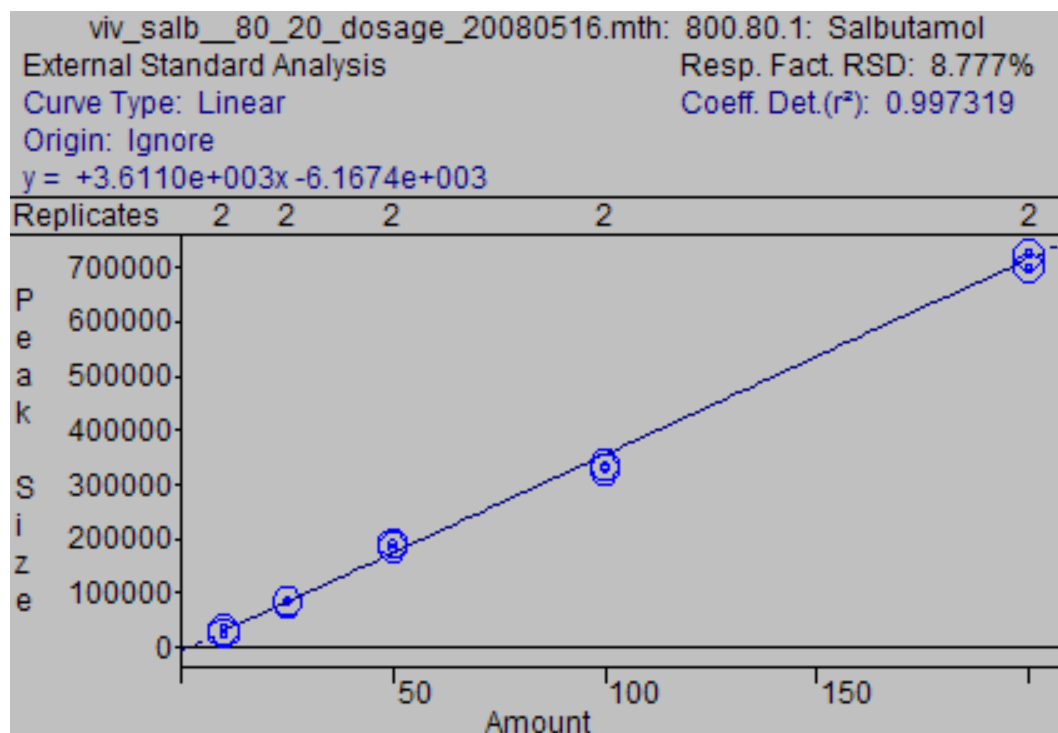


Figure 2 : Droite d'étalonnage pour le dosage du salbutamol lors de l'étude de l'évolution de l'osmolalité de la solution à nébuliser

ANNEXE 5 : Chromatogramme du salbutamol

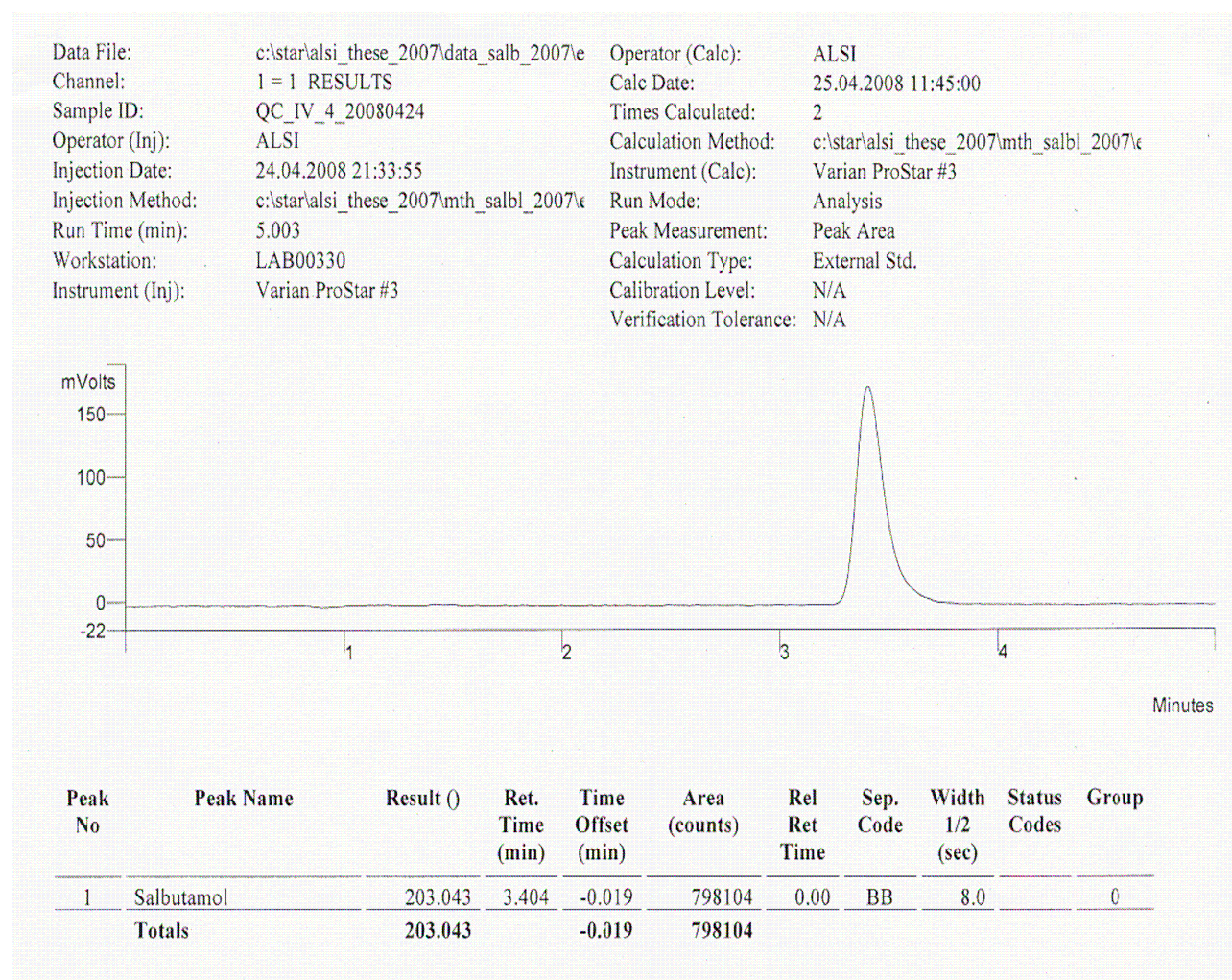


Figure 1 : Chromatogramme Salbutamol

ANNEXE 6 : Validation de la méthode de dosage HPLC du salbutamol « in vitro »

La méthode de dosage du salbutamol in vitro a été validée selon les critères du guide de validation analytique de la Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques (SFSTP). Le traitement des données issues de la validation a été effectué à l'aide du système en ligne e.noval[®] de Arlanda intégrant les différentes exigences de l'ICH, de la FDA et de ISO. Pour cette méthode, les critères de validation retenus sont :

La fonction de réponse

La fonction réponse est déterminée en utilisant cinq standards de calibration (25, 50, 100, 200 ng/ml). Dans cet intervalle la meilleure corrélation linéaire entre le rapport des surfaces de pics et les concentrations correspondantes est obtenue par régression linéaire pondérée par $1/X^2$. Le tableau ci-dessous présente les paramètres de régression de la droite de calibration des trois séries de dosages réalisées pour la validation.

Tableau 1 : Paramètres de régression linéaire de la droite de calibration réalisée pour la validation du dosage du salbutamol in vitro.

Série	Ordonnée à l'origine (y)	Pente (x)	Coefficient de corrélation (r ²)
1	$-5.24 \cdot 10^2$	$2.6 \cdot 10^4$	0.9998
2	$3.72 \cdot 10^2$	$2.63 \cdot 10^4$	0.999
3	$1.9 \cdot 10^2$	$2.62 \cdot 10^4$	1

La linéarité

Un modèle de régression linéaire est établi en corrélant, pour l'ensemble des standards de calibration des trois séries, les valeurs de concentration calculées en retour par rapport aux concentrations nominales initialement préparées. La corrélation linéaire définie par l'équation (1) est obtenue avec un coefficient de corrélation (r²) de 0.9999 (n=27).

$$y = -0.02938 + 1.001 x \quad (1)$$

La précision est déterminée par l'évaluation de la répétabilité (précision intra-essai) et de la précision intermédiaire (précision inter-essai).

La répétabilité est déterminée en mesurant quatre répliquats de quatre standards de validation ayant des concentrations de 10 ng/ml, 25 ng/ml, 50 ng/ml et 200 ng/ml.

La précision intermédiaire est établie en répétant cette série de dosages pour chacune des trois séries de validation.

Le tableau 2 présente les répétabilités et précisions intermédiaires de cette méthode pour le dosage du salbutamol in vitro, exprimées par les déviations standards (SD) et déviations standards relatives (SD%) obtenues pour chaque niveau de concentration.

Tableau 2 : Répétabilité et Précision intermédiaires observées pour la méthode de dosage du salbutamol in vitro

Concentration [ng/ml]	Répétabilité		Précision intermédiaire	
	SD [ng/ml]	RSD [%]	SD [ng/ml]	RSD [%]
10	0.41	4.09	0.42	4.15
25	0.16	0.63	0.27	1.09
50	0.47	0.94	0.56	1.13
200	0.7	0.35	1.12	0.56

Exactitude

L'exactitude est déterminée en calculant l'erreur absolue, l'erreur relative et le pourcentage de recouvrement sur les concentrations calculées de chacun des standards de validation par rapport aux concentrations nominales préparées (tableau 3).

Tableau 3 : Paramètres d'exactitude calculés pour la méthode de dosage du salbutamol in vitro.

Conc. nominale [ng/ml]	Conc. calculée [ng/ml]	Erreur absolue [ng/ml]	Erreur relative (%)	Recouvrement (%)
10	9.98	-0.02	-0.2	99.8
25	25.1	0.1	0.41	100.4
50	49.88	-0.12	-0.24	99.76
200	200.2	0.15	0.08	100.1

La limite de détection

La limite de détection de la méthode de dosage du salbutamol in vitro est estimée sur la base des moyennes de l'ordonnée à l'origine du modèle de calibration et de la variance résiduelle de la régression. Elle est de :

$$\text{LOD (ng/ml)} = 1.229$$

Les limites de quantification et l'intervalle de dosage

La limite de quantification de la procédure est obtenue en calculant la plus petite et la plus grande concentration au-dessous et au-dessus desquelles l'exactitude (justesse et fidélité) et le risque fixé à 5% sont au-delà des limites acceptables. Elles sont de :

LOQ inférieure (ng/ml) : 22.24
LOQ supérieure (ng/ml) : 200.0

Ainsi l'intervalle de dosage de la méthode de dosage du salbutamol in vitro employée s'étend de 22.24 à 200.0 ng/ml.

ANNEXE 7 : Résultats dosage du salbutamol dans les différentes parties du modèle in vitro

Tableau 1 : Masse de salbutamol récupérée pour le nébuliseur Aeroneb® Pro

	Masse de salbutamol [ng]				
	filtres d ₁ + g ₁	nébuliseur	coude	total	masse p.a. initiale
AP 1	1416233	101398	305262	1822893	2044968
AP 2	1542450	43394	332574	1918418	2058247
AP 3	1281549	82659	350837	1715045	2057736
AP 4	2095550	73070	276618	2445238	2078987
AP 5	1775032	70178	147184	1992394	2066930
moyenne	1503816	74407	283964	1862188	2056970
écart type	209860.4	24333.1	93090.1	120153.6	9045.4
cv	14.0%	32.7%	32.8%	6.5%	0.4%
int de conf	333935	38719	148127	148127	14393

Pour le traitement des résultats de l'aeroneb Pro, la nébulisation n°4 a été éliminée de la série de nébulisation (n = 4) en raison d'un taux de recouvrement en salbutamol de 120.9 ± 2.2 %. Ce taux de recouvrement trop élevé pourrait être expliqué par une contamination de l'échantillon et/ou par un problème lors des dilutions successives nécessaires aux dosages HPLC

Tableau 2 : Masse de salbutamol récupérée pour le nébuliseur Aeroneb® Solo

	Masse de salbutamol [ng]				
	filtres d ₁ + g ₁	nébuliseur	coude	total	masse initiale de p.a.
AS 1	1659468	30397	174883	1864748	2053651
AS 2	1444495	48075	181976	1674545	2061822
AS 3	1611663	44181	168191	1824035	2062844
AS 4	1430414	55072	375648	1861134	2043947
AS 5	1514755	43794	289771	1848319	2060290
moyenne	1532159	44304	238094	1814556	2056511
écart type	101079.8	8997.9	91682.6	79877.5	7884.1
cv	6.6%	20.3%	38.5%	4.4%	0.4%
int de conf	125507	11172	113839	99181	9789

Tableau 3 : Masse de salbutamol récupérée pour le nébuliseur Multisonic®

	Masse de salbutamol [ng]				
	filtres d ₁ + g ₁	nébuliseur	coude	total	masse p.a. initiale
MS 1	1130867	590330	249501	1970697	2073569
MS 2	799339	834149	226817	1860305	2058247
MS 3	1033165	654736	245163	1933063	2058247
MS 4	967375	612113	342517	1922004	2063355
MS 5	926347	587503	277140	1790990	2058247
moyenne	971419	655766	268227	1895412	2062333
écart type	123385.0	103282.3	45265.4	70585.3	6659.1
cv	12.7%	15.7%	16.9%	3.7%	0.3%
int de conf	153203	128242	56204	87643	8268.4

Tableau 4 : Masse de salbutamol récupérée pour le nébuliseur Sidstream®

	masse de salbutamol [ng]				
	filtres d ₁ + g ₁	nébuliseur	coude	total	masse p.a. initiale
S1	456820	1252688	107128	1816636	2056204
S2	683230	1078312	141897	1903440	2052118
S3	497445	1250542	113192	1861178	2058247
S4	547035	1225520	194202	1966757	2050076
S5	651271	1114445	136583	1902298	2063865
moyenne	567160	1184301	138600	1890061	2056102.1
écart type	97451.1	81971.2	34433.4	55759.5	5409.9
cv	17.2%	6.9%	24.8%	3.0%	0.3%
int de conf	121002	101781	42755	69234	6717.3

Tableau 5 : Aeroneb® Pro : masse de salbutamol [ng]

	Filtre droit 1	Filtre gauche 1
AP 1	663469	752764
AP 2	577034	965416
AP 3	769929	511620
AP 4	849196	1246354
AP 5	1013204	761829
moyenne	755909	747907
écart type	188801.9	185615.2
cv	25.0%	24.8%
int de conf	300426	295355

Tableau 6 : Aeroneb® Solo : masse de salbutamol [ng]

	Filtre droit 1	Filtre gauche 1
AS 1	845112	814356
AS 2	612915	831580
AS 3	867495	744168
AS 4	731164	699250
AS 5	791980	722775
moyenne	769733	762426
écart type	102242.1	52873.5
cv	13.3%	6.8%
int de conf	141935	80276

Tableau 7 : Multisonic® : masse de salbutamol [ng]

	Filtre droit 1	Filtre gauche 1
MS 1	563251	567616
MS 2	301896	497444
MS 3	513365	519800
MS 4	568181	399194
MS 5	392772	533575
moyenne	467893	503526
écart type	116637.1	63634.7
cv	24.9%	12.6%
int de conf	144824	79013

Tableau 8 : Sidestream® : Masse de salbutamol [ng]

	Filtre droit 1	Filtre gauche 1
S 1	247970	208851
S 2	301398	381833
S 3	250839	246607
S 4	263996	283038
S 5	324950	326321
moyenne	277830	289330
écart type	33864.6	67577.4
cv	12.2%	23.4%
int de conf	42048	83908

ANNEXE 8 : Photographies des zones d'insertion de la sonde de température

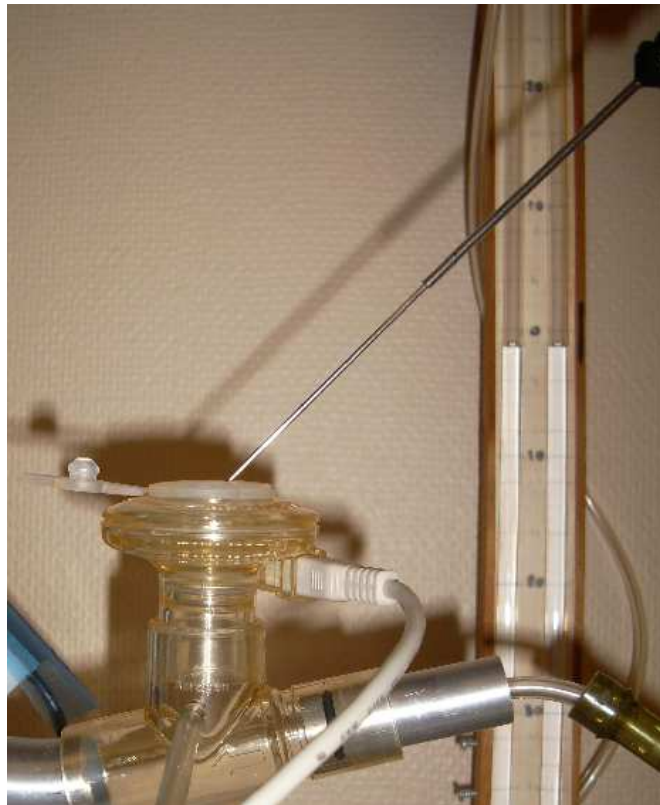


Figure 1 : Sonde de température Aeroneb Pro



Figure 2 : Sonde de température Aeroneb Solo



**Figure 3 : Sonde de température Multisonic
Infra Control**

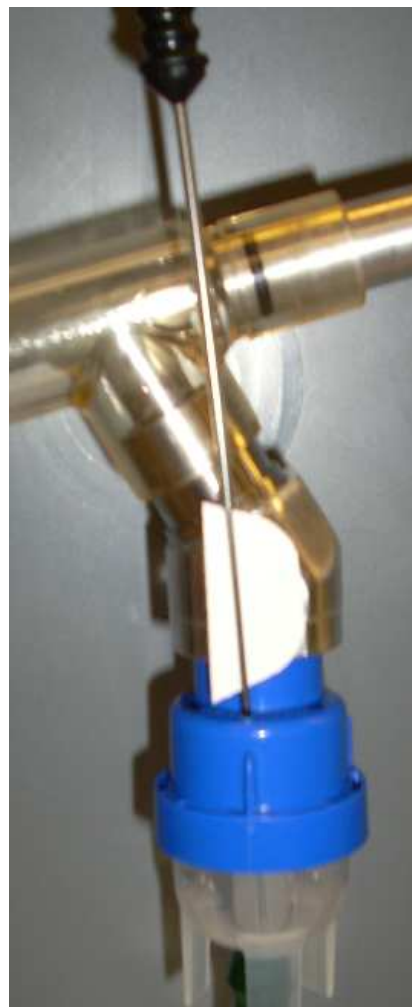


Figure 4 : Sonde de température Sidestream

ANNEXE 9 : Protocoles de manipulations : Osmolalité

Principe de la méthode :

Après des nébulisations de durée déterminée une fraction de la solution à nébuliser (aussi grande que possible) est prélevée de la cupule du nébuliseur afin de réaliser les analyses suivantes :

- Détermination de l'osmolalité à l'aide d'un cryo-osmomètre
- Détermination de la concentration de la solution par HPLC couplé à un fluorimètre
- Détermination de la concentration en Na^+ et Cl^-

La nébulisation est interrompue avant chaque prélèvement et une fois que le volume résiduel de la solution à nébuliser est récupéré (tube en polypropylène) le système est remis en état pour une nouvelle nébulisation. Chaque prélèvement est issu d'une nouvelle nébulisation.

Pour chaque type de nébuliseur, trois séries de nébulisation sont effectuées. Pour les nébuliseurs Sidestream et Aeroneb® Pro et Solo, les différentes nébulisations sont effectuées de manière successive sur le même nébuliseur. Pour le nébuliseur Multisonic, un temps de latence de 45 minutes est fixé entre chaque mesure afin que, pour chaque nébulisation, la température de l'appareil soit équivalente à la température ambiante.

Méthodes :

Tableau 1 : Plan de prélèvement

Nébuliseur	Prélèvements [min]
A. P.	0 ; 1.5 ; 3.0 ; 4.5 ; 6.0 ; 7.5 ; 9.0
A. S.	0 ; 1.5 ; 3.0 ; 4.5 ; 6.0 ; 7.5 ; 9.0
Ms.	0 ; 1 ; 2 ; 3 ; 4 ; 5 ; 6
S.	0 ; 1,5 ; 3 ; 4.5 ; 6.0 ; 7.5 ; 10 ; 15

L'osmolalité de la solution à nébuliser est mesurée à l'aide d'un cryo-osmomètre sur un échantillon de 200 μl

La concentration en salbutamol de la solution à nébuliser est déterminée sur un échantillon de 100 μl dilué 10000 fois. La méthode employée est la même que celle employée lors de la détermination de la masse de salbutamol retenue par les filtres Respigard.

Pour la détermination de la concentration en Na^+ et Cl^- des échantillons de 200 μl sont envoyés au LCC.

ANNEXE 10 : Automate Modular[®] vs IL-943[®] et chloridométrie

Tableau 1 : Concentration [Na⁺] et [Cl⁻]

	Automat Modular		IL-943	Chloridométrie
Prélèvement	[Na ⁺]	[Cl ⁻]	[Na ⁺]	[Cl ⁻]
1.5	164.1	150.2	162.1	160
3	167.0	153.2	-	-
4.5	171.2	157.6	-	-
6	178.6	165.2	171.8	168
7.5	184.8	172.0	-	-
10	203.6	190.6	199.0	196
15	234.3	213.9	-	-

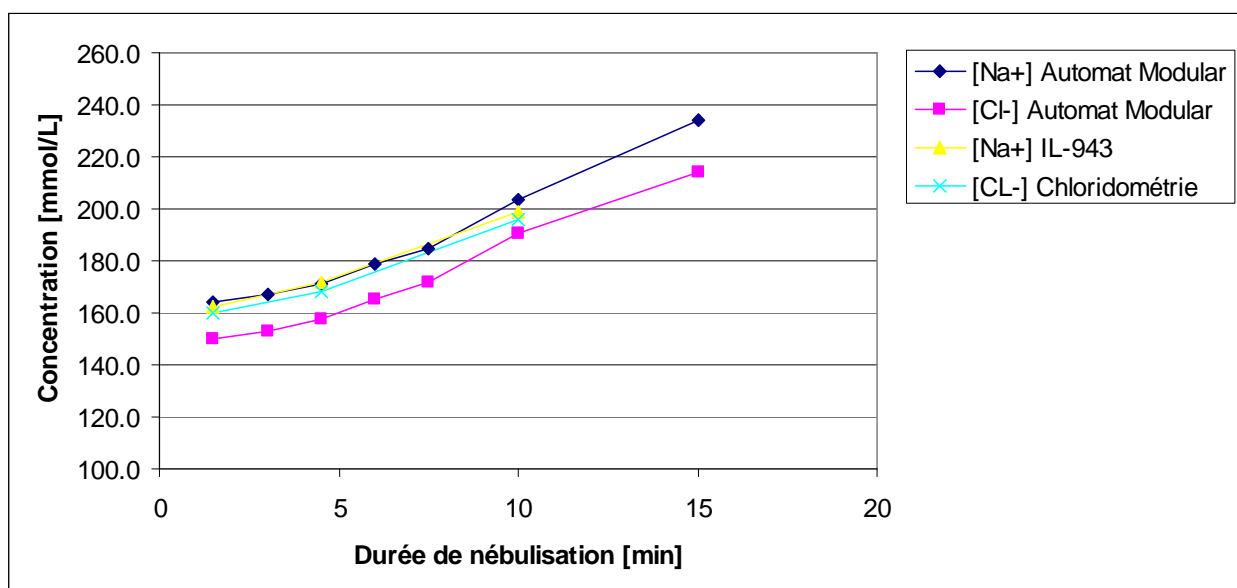


Figure 1: Evolution des concentrations de sodium et chlorure au cours de la nébulisation

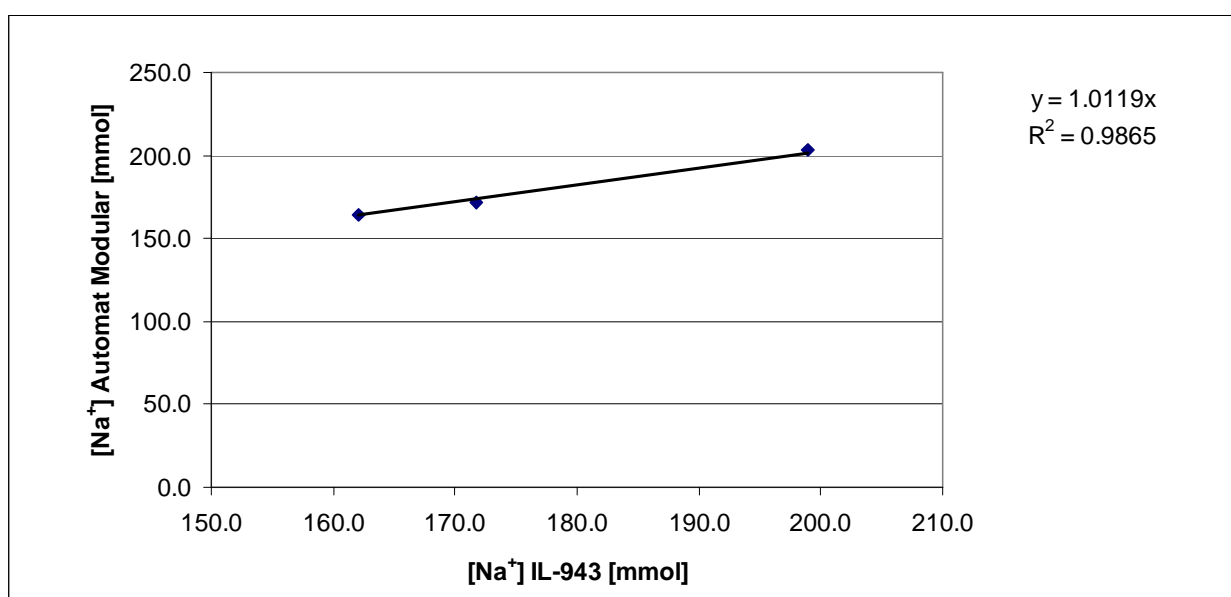


Figure 2 : Corrélation entre les concentrations de [Na⁺] déterminées par Modular et IL-943

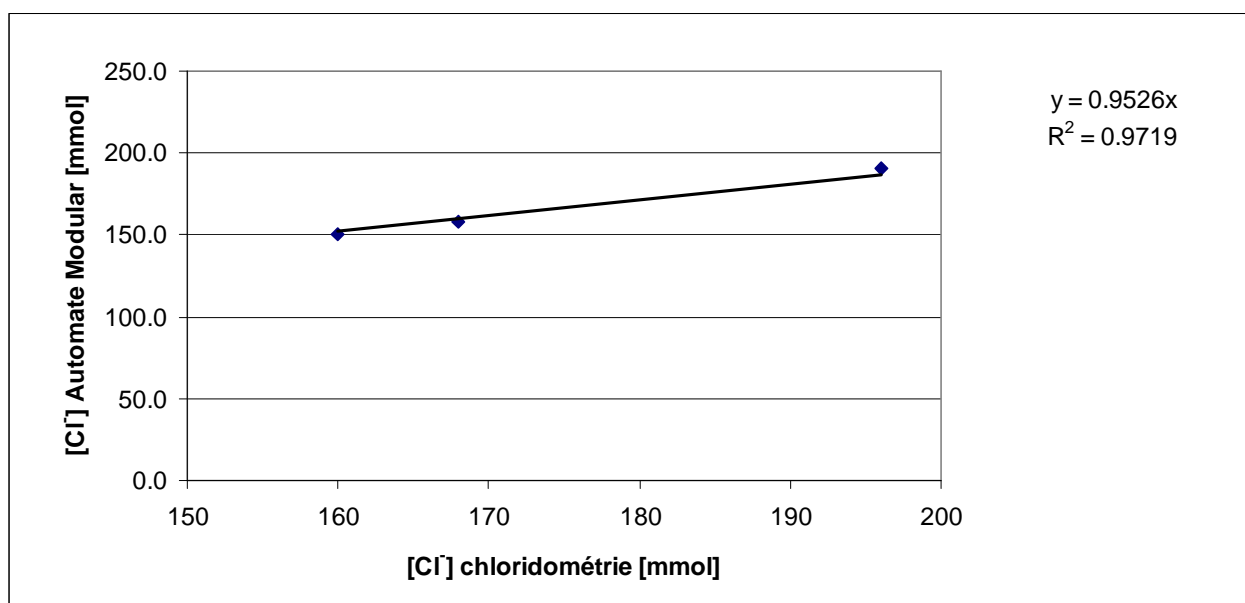


Figure 22 : Corrélation entre les concentrations de [Cl⁻] déterminées par Modular et IL-943

ANNEXE 11 : Dosage mono-dose de Ventolin[®] 0.05%

Tableau 30 : Dosage des monodoses de Ventolin[®] 0.05%

Dosage	Concentration [ng/ml]	Facteur de dilu- tion	Concentration [mg/ml]
Monodose 1	55.33	10000	0.553
Monodose 1	53.5176	10000	0.535
Monodose 2	25.703	20000	0.514
Monodose 2	28.1716	20000	0.563
Monodose 3	98.9391	5000	0.495
Monodose 3	101.7605	5000	0.509
			moyenne
			0.528
			écart type
			0.027
			cv
			5.1%
			int de conf
			0.028
			t student
			2.571

La concentration moyenne en salbutamol des mono-doses de Ventolin[®] 0.05% est de 0.528 ± 0.028 mg/ml.

ANNEXE 12 : Durée de la nébulisation et débit d'aérosol

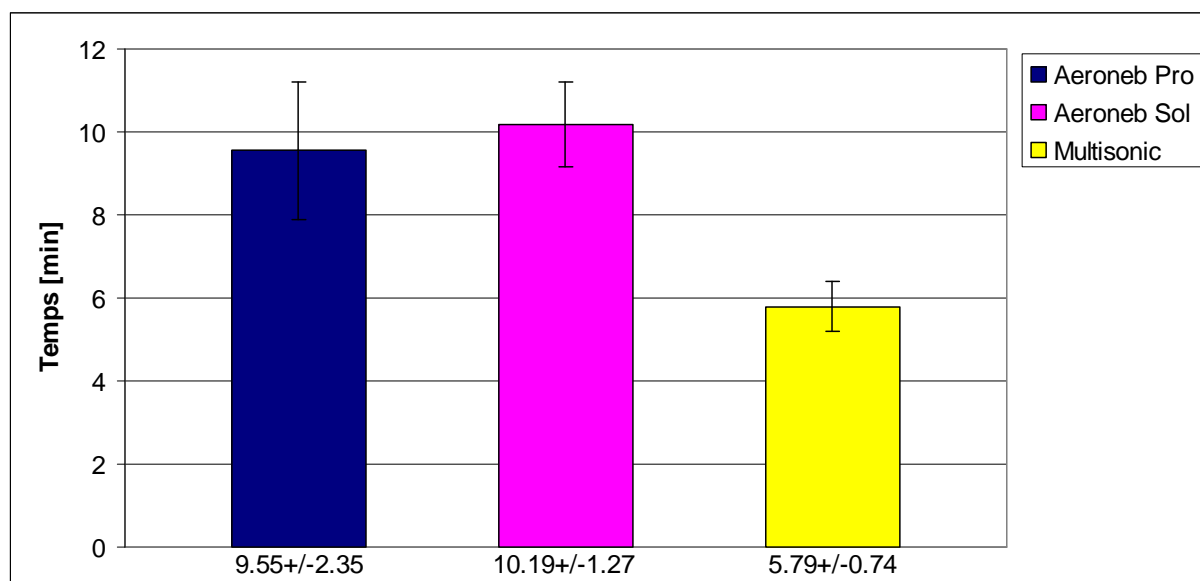


Figure 1: Durée de nébulisation: 4.0ml de Ventolin® 0.05%

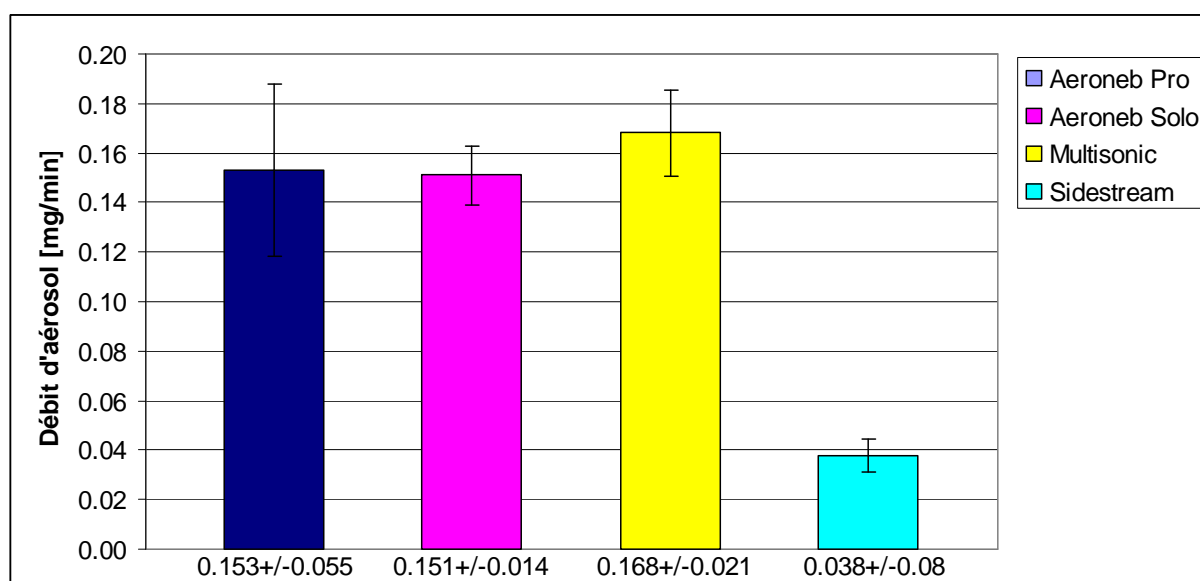


Figure 2 : Débit d'aérosol

NOTES :