



HAL
open science

Optimiser l'évaluation des médicaments en néonatalogie : l'exemple des médicaments anti-infectieux

Florentia Kaguelidou

► **To cite this version:**

Florentia Kaguelidou. Optimiser l'évaluation des médicaments en néonatalogie : l'exemple des médicaments anti-infectieux. Médecine humaine et pathologie. Université René Descartes - Paris V, 2012. Français. NNT : 2012PA05P605 . tel-00717477

HAL Id: tel-00717477

<https://theses.hal.science/tel-00717477>

Submitted on 13 Jul 2012

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

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

UNIVERSITE PARIS DESCARTES
FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES
SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

ECOLE DOCTORALE : 436

MEDICAMENT TOXICOLOGIE CHIMIE ENVIRONNEMENT

Année 2012

N°

DOCTEUR de l'UNIVERSITE PARIS DESCARTES

Florentia KAGUELIDOU

Titre :

OPTIMISER L'EVALUATION DES MEDICAMENTS EN
NEONATOLOGIE :
L'exemple des médicaments anti-infectieux

Thèse dirigée par Mme le Pr. Evelyne JACQZ-AIGRAIN

soutenue publiquement le 26/03/2012

Membres du Jury :

Mme le Pr. Evelyne JACQZ-AIGRAIN	Directrice de thèse
Mr le Pr. Yannick AUJARD	Rapporteur
Mme le Dr. Chantal Le GUELLEC	Rapporteur
Mr le Pr. Pierre-Henri JARREAU	Examineur
Mr le Pr. Gérard PONS	Examineur
Mme le Pr. Florence TUBACH	Examineur

REMERCIEMENTS

Au Professeur Yannick Aujard et au Docteur Chantal Le Guellec pour l'intérêt que vous avez bien voulu porter à ce travail de thèse en acceptant d'en être les rapporteurs et pour l'honneur que vous me faites en participant au jury.

Aux Professeurs Florence Tubach, Pierre-Henri Jarreau et Gérard Pons pour avoir accepté d'être examinateurs de ce travail de thèse. C'est un grand honneur de vous compter parmi les membres du jury de ma thèse.

A ma directrice de thèse, le Professeur Evelyne Jacqz-Aigrain pour m'avoir donné la chance de pénétrer le monde de la pharmacologie pédiatrique et pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser cette thèse en m'accueillant dans son service.

Aux Docteurs Chiara Pandolfini, Mark Turner, Paolo Manzoni, Maurizio Bonati et au Professeur Imti Choonara pour nos échanges scientifiques. Des personnes riches d'expériences et d'idées avec lesquelles j'ai pu interagir tout le long de ma thèse.

Au Docteur Florence Emmanuel qui m'a supporté au quotidien parce que nous partageons le même bureau et qui a gentiment relu l'intégralité de ma thèse. Tes commentaires m'ont permis d'améliorer ce manuscrit et de le rendre plus « lisible ».

A tous les membres du CIC 9202 de l'Hôpital Robert Debré qui ont supporté mes sautes d'humeur tout le long de la thèse. Merci pour votre patience, votre compréhension et votre soutien sans faille.

A ma famille, pour cette force qui me porte depuis tant d'années. Je ne vous serai jamais assez reconnaissante...

A mon mari Emanuele et à mon fils Stefano,

Titre de la thèse : Optimiser l'évaluation des médicaments en néonatalogie : l'exemple des médicaments anti-infectieux

Résumé : La population néonatale est la population pédiatrique la plus vulnérable car immature et celle ayant probablement les besoins en médicaments les plus importants, compte tenu de la spécificité des pathologies néonatales. Pour autant, un grand nombre de médicaments sont prescrits en dehors des conditions de leur AMM, ne permettant pas leur utilisation optimale. Cela est lié notamment aux difficultés de la recherche clinique chez le nouveau-né. L'objectif de cette thèse est d'analyser les **différentes étapes de l'évaluation** des médicaments chez le nouveau-né et de discuter les méthodes permettant de les optimiser, en centrant la réflexion sur la classe des **médicaments anti-infectieux**. En effet, ces médicaments sont parmi les plus prescrits hors AMM chez le nouveau-né, prématuré et à terme, bien qu'ils soient commercialisés depuis de nombreuses années. Nos travaux ont porté sur les différentes étapes de leur évaluation, illustrées chacune par un exemple. 1) **Analyse des spécificités** de la population néonatale et des **pratiques d'utilisation** des médicaments, illustrées par l'enquête Européenne sur l'utilisation de la ciprofloxacine et du fluconazole dans les unités de soins intensifs néonatales. Cette enquête a mis en évidence la grande variabilité des pratiques entre les pays mais aussi entre les centres d'un même pays, 2) **Recueil et analyse des données disponibles**, illustrés par la revue exhaustive de la littérature sur l'utilisation de la ciprofloxacine pour le traitement d'infections néonatales à germes Gram négatif, 3) **Détermination de la posologie adéquate**. L'implémentation d'outils de modélisation et de simulation de données est particulièrement préconisée chez le nouveau-né. La validation de ces modèles est importante, illustrée ici par une étude d'évaluation externe des modèles pharmacocinétiques de population de la vancomycine chez le nouveau-né. 4) **Conception et réalisation des essais cliniques** illustrées par l'exemple du développement clinique de la ciprofloxacine en néonatalogie. La revue de la littérature sur les **essais contrôlés randomisés** évaluant les antibiotiques chez le nouveau-né a montré que la qualité des résultats de ces essais était globalement faible. L'analyse des obstacles à leur réalisation a permis de discuter les alternatives méthodologiques afin de contourner les difficultés pratiques, cliniques et éthiques sous-jacentes.

Discipline: Pharmacologie

Mots clés: néonatalogie, pharmacologie, infection néonatale, médicament anti-infectieux, essai clinique, modélisation

Title of thesis: Optimising the evaluation of medicines in neonatology: the example of anti-infective agents.

Summary: Neonates represent the most vulnerable paediatric population and probably the one with the greatest needs in medicines with regard to the specificities of neonatal diseases. Nevertheless, the off-label prescribing of drugs with no marketing authorisation, consequently without information for their proper use, is widespread in neonatology. This situation is related to the difficulties of clinical research encountered in this population. The objective of this thesis is to analyse the different steps of drug development in neonates and to discuss the possible methods to optimize drug evaluation. To illustrate this development, we expose examples from the evaluation of anti-infective agents in neonatology. These drugs are very often concerned by a use outside their product licence in term and preterm neonates, despite the fact that they have been marketed for many years. This thesis includes studies concerning the different steps of their development illustrated by examples. 1) **Evaluation of the specificities of the neonatal population and of drug prescribing.** This was demonstrated by the results of a European survey on the use of ciprofloxacin and fluconazole in neonatal intensive care units. The surveys' results underline the considerable variability in drug prescribing observed between different countries but also between units in the same country. 2) **Analysis of available data,** illustrated by the systematic review of the literature on ciprofloxacin use for the treatment of Gram negative neonatal infections, 3) **Definition of optimal dosing.** Use of modelling and data simulation approaches should be particularly favoured in neonatal drug research. Correct validation of models should be performed as illustrated by the external validation of vancomycin population pharmacokinetic models. 4) **Design and implementation of clinical trials.** This step has been illustrated by the clinical development of ciprofloxacin in neonatology. The review of all randomised controlled trials evaluating the therapeutic and prophylactic use of antibiotics in neonates showed that these trials are poorly designed, conducted and reported. Different methods of evaluation should be considered and further developed to circumvent the difficulties in drug evaluation and ensure the efficient and safe use of antibiotics.

Discipline: Pharmacology

Key words: neonatology, pharmacology, neonatal infection, anti-infective agents, clinical trial, modelling

PUBLICATIONS ET TRAVAUX

Publications

1. **Ciprofloxacin use in Neonates: A Systematic review.** Kaguelidou F, Turner M.A, Choonara I, Jacqz-Aigrain E. *Pediatr Infect Dis J.* 2011; 30: e29-37.
2. **Safety of ciprofloxacin in neonates with sepsis.** Bonati M, Pandolfini C, Kaguelidou F, Jacqz-Aigrain E, Turner M, Choonara I. *Adverse Drug Reaction Bulletin* 2010; 265: 1019–1022.
3. **European survey on the use of prophylactic fluconazole in neonatal intensive care units.** Kaguelidou F, Pandolfini C, Manzoni P, Choonara I, Bonati M, Jacqz-Aigrain E. *Eur J Pediatr.* 2012; 171: 439-45
4. **Evaluation des antibiotiques en néonatalogie: il faut étudier leur relation PK/PD.** Langhendries J-P, Kaguelidou F, Jacqz-Aigrain E. *Lettre du Pharmacologue*, 2012
5. **Are randomised controlled trials evaluating antibiotics in neonates really informative? A systematic review.** Kaguelidou F, Turner M, Choonara I, van Anker J, Manzoni P, Alberti C, Langhendries J-P, Jacqz-Aigrain E. (*article soumis*)
6. **External Evaluation of Population Pharmacokinetic Models of Vancomycin in Neonates.** Zhao W, Kaguelidou F, Biran V, Zhang D, Holford N, Lo Y-L, Allegaert K, Peris J-E, Kimura T, Fakhoury M, Jacqz-Aigrain E. (*article soumis*)
7. **Survey on sepsis treatment and its rationales in European neonatal intensive care units.** Pandolfini C, Kaguelidou F, Sequi M, Jacqz-Aigrain E, Choonara I, Turner M, Manzoni P, Bonati M. (*article soumis*)

Communications orales

1. « **European survey on the use of prophylactic fluconazole in Neonatal Intensive Care Units** »

Florentia Kaguelidou, Chiara Pandolfini, Paolo Manzoni, Imti Choonara, Maurizio Bonati, Evelyne Jacqz-Aigrain

- 13th Biannual ESDP Congress (ESDPPP), 15-17 June 2011, Oslo, Norway

2. « **Ciprofloxacin use in neonates: a systematic review** »

F. Kaguelidou, M. Turner, I. Choonara, E. Jacqz-Aigrain

- European Society for Paediatric Infectious Diseases (ESPID), 4-8 Mai 2010, Nice, France

Communications affichées

1. « **European survey on the use of prophylactic fluconazole in Neonatal Intensive Care Units** »

F. Kaguelidou, C. Pandolfini, P. Manzoni, I. Choonara, M. Bonati, E. Jacqz-Aigrain

- European Society for Paediatric Infectious Diseases (ESPID), 7-11 Juin 2011, The Hague, The Netherlands

3. « **European survey on the use of antifungal prophylaxis in neonatal intensive care units** »

F. Kaguelidou, C. Pandolfini, P. Manzoni, I. Choonara, M. Bonati, E. Jacqz-Aigrain

- Congrès de Physiologie, de Pharmacologie et de Thérapeutique P2T, 22-24 mars 2011, Grenoble, France

TABLE DES MATIERES

I.	INTRODUCTION.....	16
A.	Développement des médicaments en pédiatrie	16
B.	Réglementation relative aux médicaments à usage pédiatrique	18
C.	Utilisation et développement des médicaments chez le nouveau-né.....	21
D.	Objectives du travail de la thèse de sciences.....	24
II.	COMPRENDRE LES SPÉCIFICITÉS DE LA POPULATION NÉONATALE	29
A.	Classification de la population néonatale.....	29
B.	Spécificités physiologiques de la population néonatale.....	33
C.	Spécificités des pathologies néonatales : exemple des infections néonatales.....	38
1.	Définition des infections néonatales	40
2.	Particularités des infections néonatales.....	40
3.	Epidémiologie des infections néonatales	43
4.	Particularités du choix et de la mise en route du traitement.....	45
III.	COMPRENDRE LES PRATIQUES D’UTILISATION DES MEDICAMENTS EN NEONATOLOGIE	48
A.	Pharmacologie de la ciprofloxacine	49
B.	Pharmacologie du fluconazole.....	51
C.	Enquête Européenne sur l’utilisation de la ciprofloxacine et du fluconazole dans les unités de soins intensifs en néonatalogie.....	54
1.	Contexte – Objectifs.....	54
2.	Méthodes	55
3.	Principaux Résultats.....	55
a)	Fluconazole dans la prophylaxie des infections fongiques	55
b)	Ciprofloxacine et fluconazole dans le traitement des infections néonatales.....	56
4.	Conclusions	57
IV.	RECUEILLIR ET ANALYSER LES DONNEES DISPONIBLES	59
A.	Données de la littérature sur la maladie : exemple des infections néonatales à Gram négatif.....	60

B.	Données de la littérature sur le médicament : exemple de la ciprofloxacine.....	62
1.	Données chez l'animal	62
2.	Données en pédiatrie	66
3.	Données chez l'adulte	73
4.	Données chez le nouveau-né	75
V.	PREDIRE ET EXTRAPOLER L'EFFICACITÉ ET LA TOLERANCE POTENTIELLE	77
A.	Modèles animaux de toxicité	77
1.	Généralités.....	77
2.	Etudes sur animaux juvéniles dans le cadre de l'évaluation de la ciprofloxacine chez le nouveau-né	81
B.	Analyse des données humaines de pharmacocinétique, efficacité et toxicité.....	83
VI.	DETERMINER LA DOSE ADEQUATE	87
A.	Etudes pharmacocinétiques/pharmacodynamiques et outils d'analyse.....	87
B.	Etudes pharmacocinétiques/pharmacodynamiques chez le nouveau-né	93
C.	Etudes pharmacocinétiques/pharmacodynamiques des agents anti-infectieux ...	94
D.	Implémentation des études pharmacocinétiques/pharmacodynamiques de population dans le développement des médicaments anti-infectieux en néonatalogie	97
E.	Etude pharmacocinétique/pharmacodynamique de population de la ciprofloxacine chez le nouveau-né à terme et prématuré	99
F.	Validation des modèles pharmacocinétiques	102
1.	Méthodes de validation des modèles pharmacocinétiques.....	102
2.	Validation externe des modèles pharmacocinétiques de population de la vancomycine chez le nouveau-né.....	107
VII.	CONCEVOIR ET REALISER LES ETUDES CLINIQUES D'EFFICACITE ET DE TOLERANCE NECESSAIRES EN NEONATOLOGIE	110
A.	Le développement des médicaments anti-infectieux en néonatalogie	112
1.	Méthodes de modélisation et de simulation	112
2.	Les essais comparatifs avec attribution du traitement par randomisation.....	116

3.	Etudes observationnelles optimisées	121
B.	Evaluation de l'efficacité et de la toxicité de la ciprofloxacine chez le nouveau-né	124
VIII.	OPTIMISER LE RECRUTEMENT	129
A.	Le recrutement dans la recherche clinique en néonatalogie	130
B.	Comment favoriser le recrutement dans la recherche clinique en néonatalogie ?	136
IX.	DISCUSSION	140
A.	Améliorer la conception et la planification des études néonatales.....	140
B.	Evaluer la possibilité d'extrapolation des données animales et humaines.....	141
C.	Intégrer les outils de modélisation et de simulation de données dans le développement médicamenteux néonatal.....	143
D.	Privilégier des méthodologies d'étude clinique innovantes et surtout pragmatiques	144
X.	CONCLUSION ET PERSPECTIVES	147
XI.	REFERENCES	150

LISTE DES ABBREVIATIONS

ADN: acide désoxyribonucléique

AG : age gestationnel

AGA: appropriate for gestational age

AMM : autorisation de mise sur le marché

APE: valeur absolue de l'erreur de prédiction

AUC : aire sous la courbe

CFU: colony forming unit = unité formant colonie

CL : clairance

Cmax : concentration plasmatique maximale

CRP : C réactive protéine

CV : variabilité interindividuelle

ECR : essai contrôlé randomisé

ELBW: extremely low birth weight

EMA : european medicines agency

FDA : food and drug administration

FP7 : 7th Framework Programme

GOF : goodness of fit

IC95% : intervalle de confiance à 95%

Ka : constante d'absorption

LBW: low birth weight

LCR: liquide céphalorachidien

LGA: large for gestational age

MAPE : moyenne de l'erreur absolue de prédiction

MIC : minimal inhibitory concentration = concentration minimale inhibitrice

Npde : normalized prediction distribution error

OR : odds-ratio

PB : physiologique

PD : pharmacodynamique

PDCO : paediatric committee

PE: erreur de prédiction

PIP : plan d'investigation pédiatrique

PK : pharmacocinétique
PN : poids de naissance
POP-PK : pharmacocinétique de population
PPC : posterior predictive check
PUMA : pediatric use marketing autorisation
Q1-Q3 : 1er – 3ème quartile
RCP : résumé des caractéristiques du produit
SA : semaines d'aménorrhée
SGA: small for gestational age
TINN : treat infections in neonates
V : volume de distribution
VLBW: very low birth weight
VPC : visual predictive check

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Introduction des Règlements Américain et Européen relatifs aux médicaments à usage pédiatrique	19
Figure 2. Catégories des nouveau-nés selon l'âge gestationnel à la naissance	30
Figure 3. Classification des nouveau-nés en fonction de l'AG et du PN : The « Original Nine »	31
Figure 4. Développement de facteurs physiologiques qui influencent la pharmacocinétique des médicaments chez le nouveau-né, le nourrisson, l'enfant et l'adolescent	34
Figure 5. Entrée des fluoroquinolones dans la bactérie via les porines transmembranaires ..	50
Figure 6. Résistance aux fluoroquinolones par mécanisme de rejet actif de la molécule (efflux)	50
Figure 7. Cible des médicaments imidazolés	53
Figure 8. Chiens juvéniles de race beagle	63
Figure 9. Tête humérale de chien juvénile de race beagle après traitement par ciprofloxacine 90mg/kg/jour pendant 2 semaines	64
Figure 10. Arbre décisionnel des études pédiatriques	84
Figure 11. Pharmacocinétique : courbes temps - concentration ; Pharmacodynamie : courbes concentrations - effets ; Pharmacocinétique/ Pharmacodynamique (PK/PD) : courbes temps - effets	88
Figure 12. Etudes pharmacocinétiques conventionnelles.....	90
Figure 13. Etudes pharmacocinétiques de population.....	91
Figure 14. Modèle physiologique/pharmacocinétique	92
Figure 15. Lien entre études pharmacodynamiques et pharmacocinétiques	95
Figure 16. Paramètres pharmacocinétique et pharmacodynamiques des antibiotiques sur une courbe temps – concentration	96
Figure 17. Représentation graphique du VPC	104
Figure 18. Illustrations graphiques du npde	106

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Paramètres pharmacocinétiques de la ciprofloxacine 74

Tableau 2. Deux schémas de la cinétique de prélèvement selon le poids des patients 101

INTRODUCTION

I. INTRODUCTION

A. Développement des médicaments en pédiatrie

Le terme « orphelins thérapeutiques » (« *therapeutic orphans* ») a été utilisé pour décrire la population pédiatrique mondiale pour la première fois en 1963 par un pédiatre américain, le Dr. Harry Shirkey [Shirkey H., 1963]. Depuis et malgré des importants progrès scientifiques dans le domaine de la pharmacologie clinique pédiatrique, l'accès à des médicaments ayant des présentations et des données d'évaluation appropriées chez l'enfant reste encore très limitée [Hoppu K., 2008]. Ainsi, seulement un tiers des médicaments utilisés en pédiatrie a été correctement étudié chez l'enfant et possède des recommandations d'utilisation fiables [Roberts R et al., 2003 ; Ceci A et al., 2006] alors que la majorité sont administrés en dehors de leur autorisation de mise sur le marché (AMM) [Conroy S et al., 2000 ; 't Jong GW et al., 2001 ; Pandolfini C et Bonati M, 2005]. Globalement, la prescription hors AMM désigne deux situations : la première est l'utilisation de médicaments n'ayant pas d'AMM chez l'enfant et/ou l'adulte (« *unlicensed drugs* »); la seconde concerne toute prescription non-conforme aux conditions de l'AMM, présentées dans le résumé des caractéristiques du produit (RCP) pour l'âge, la dose, l'indication, la voie d'administration ou la durée du traitement (« *off-label drugs* ») [Lindell-Osuagwu L et al., 2009 ; Neubert A et al., 2008 ; Conroy S et al., 1999]. Même si l'utilisation de ce type de médicaments semble plus importante pour les patients hospitalisés et surtout ceux avec des pathologies sévères [Shah S., 2007], une proportion non négligeable (11 à 56%) d'enfants suivis en ville en reçoivent aussi [Pandolfini C et Bonati M, 2005 ; Chalumeau M et al., 2000 ; Ekins-Daukes S et al., 2004 ; Gavrilov V et al., 2000 ; McIntyre J et al., 2000]. Les conséquences sont multiples mais difficiles à quantifier. D'abord, ces médicaments sont utilisés chez l'enfant en extrapolant les

données pharmacocinétiques et pharmacodynamiques observées chez l'adulte. Toutefois, l'enfant n'étant pas un « adulte en miniature », ces pratiques exposent la population pédiatrique aux risques de toxicité et/ou d'inefficacité thérapeutique liés respectivement à un surdosage et/ou sous-dosage médicamenteux [EMA, 2004a]. De plus, il existe probablement une sous-déclaration très importante aux centres de pharmacovigilance des effets indésirables des médicaments dans le cadre des prescriptions hors AMM. Enfin, l'absence de recommandations et de cadre légal pour d'utilisation de certains médicaments, insécurise les prescripteurs et peut ainsi priver les enfants des thérapeutiques innovantes et possiblement très efficaces [American Academy of Pediatrics Committee on Drugs, 1996].

En effet, le développement des médicaments chez l'enfant rencontre des difficultés uniques, bien spécifiques à cette catégorie de la population (0 - 18 ans). Un des déterminants majeurs est probablement le faible intérêt commercial des médicaments pédiatriques comparé aux coûts élevés de la recherche clinique dans cette population. A côté de l'aspect financier, il y a aussi de véritables contraintes méthodologiques dans la mise en place d'études d'évaluation essentiellement liées à l'hétérogénéité de la population pédiatrique, aux petits effectifs et aux contraintes éthiques en rapport avec leur vulnérabilité. Par ailleurs, le manque d'infrastructures appropriées, de personnel spécifiquement formé et de financements suffisants, prolongent de manière importante la mise en place et la réalisation des études cliniques en pédiatrie [Hoppu K., 2008 ; Choonara I., 2000 ; Rocchi F et Tomasi P, 2011 ; Steinbrook R, 2002]. La lenteur des études cliniques et des procédures d'autorisations réglementaires sont à l'origine d'un développement médicamenteux globalement plus long chez l'enfant par rapport à l'adulte [Caldwell P, 2004].

Du fait de toutes ces contraintes, les essais cliniques médicamenteux débutent en pédiatrie plusieurs années après les essais adultes et testent des présentations médicamenteuses et des schémas thérapeutiques définis par extrapolation des données adultes. A ce moment, les

médicaments testés sont souvent « hors brevet » et l'intérêt financier pour l'industrie pharmaceutique à développer une présentation pédiatrique devient très limité. De plus, au moment où les essais pédiatriques sont réalisés, une grande proportion des pédiatres prescrit déjà, et depuis plusieurs années le médicament en question de manière « non autorisée » et a déjà une grande expérience de son efficacité et de sa tolérance. Ainsi, ces pédiatres sont réticents à inclure des enfants dans un essai clinique évaluant un médicament qu'ils jugent cliniquement efficace et bien toléré. Un cercle vicieux s'installe qui aboutit à une recherche médicamenteuse insuffisante et de faible qualité chez l'enfant [Rocchi F et Tomasi P, 2011 ; Steinbrook R, 2002 ; Caldwell P, 2004].

B. Réglementation relative aux médicaments à usage pédiatrique

Alors qu'il existe toujours des préoccupations éthiques relatives à la recherche en pédiatrie, l'utilisation des médicaments non correctement évalués dans cette population est largement et depuis longtemps reconnue comme bien plus dangereuse et « moins éthique » que la participation des enfants à des essais bien conduits. Par conséquent et afin d'inciter l'industrie pharmaceutique à entreprendre des études pédiatriques, plusieurs initiatives ont été mises en place par les instances réglementaires mondiales. Les Etats-Unis ont été le premier pays à voter une législation pionnière en matière de médicament à usage pédiatrique en 1997 (FDA Modernisation Act, FDAMA). Selon cette loi, dès lors qu'un médicament en développement chez l'adulte a potentiellement des indications en pédiatrie, il doit être évalué par des études menées dans cette population. Depuis, cette législation a été complétée par des lois supplémentaires (**Figure 1**): « Pediatric Rule » (1998), « Best Pharmaceuticals for Children Act » (BPCA, 2002), « Pediatric Research Equity Act » (PREA, 2003), « Food and Drug Administration Amendments Act » (FDAAA, 2007). En parallèle, les autorités

réglementaires en Europe, aux Etats-Unis et au Japon ainsi que des experts représentant l'industrie pharmaceutique ont défini en 2000 des recommandations générales et éthiques pour le déroulement des essais cliniques en pédiatrie [ICH E11, 2009]. En Europe, le Règlement Européen relatif aux médicaments à usage pédiatrique est entré en vigueur en janvier 2007 [European Commission, 2006]. L'objectif principal de tous ces règlements est d'améliorer la santé des enfants en facilitant le développement et la disponibilité des médicaments autorisés, en stimulant la recherche clinique pédiatrique de qualité et en contribuant à la diffusion large des informations ainsi recueillies. Toutefois, ces missions doivent être accomplies sans soumettre les enfants à des études inutiles et sans retarder l'obtention des autorisations pour l'utilisation des produits dans la population adulte [Rocchi F et Tomasi P, 2011 ; Lehmann B, 2008].

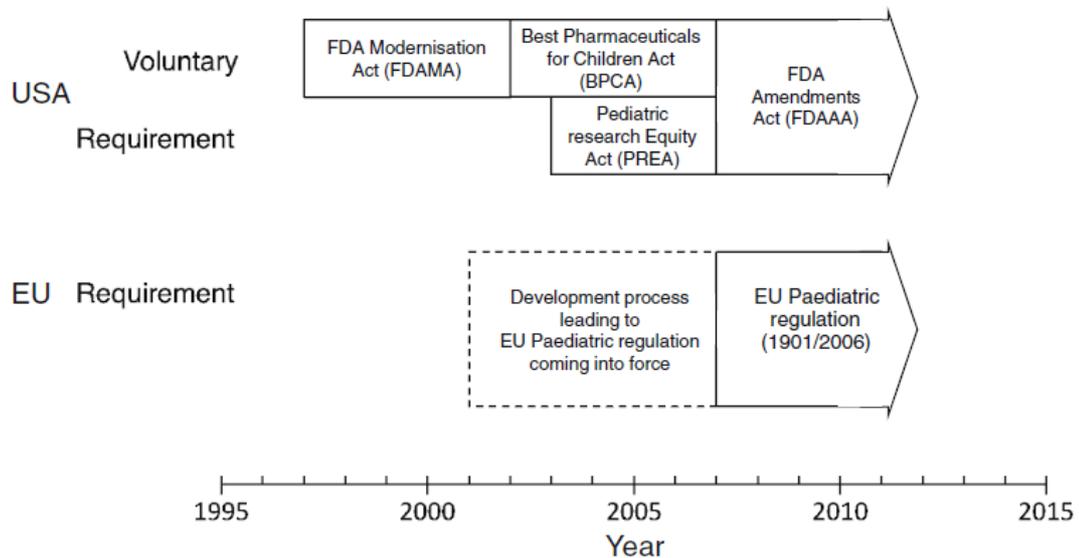


Figure 1. Introduction des Règlements Américain et Européen relatifs aux médicaments à usage pédiatrique.

Pour atteindre ces objectifs, tous les règlements prévoient un ensemble d'obligations et de récompenses destinées aux acteurs industriels du développement des produits médicamenteux. Les obligations incluent l'élaboration d'un Plan d'Investigation Pédiatrique (PIP) à soumettre précocement pour approbation à l'Agence Européenne du Médicament (EMA), dès la fin des essais de phase I ou II chez l'adulte, et la mise en place des études prévues dans ce PIP afin de soumettre les résultats pédiatriques en même temps que la demande d'AMM adulte. De plus, le Règlement Européen complète les initiatives américaines en rendant obligatoire le développement de formulations adaptées à la population pédiatrique. Quant aux récompenses, elles sont essentiellement sous forme d'extension du brevet de 6 mois pour toutes les indications de l'AMM du médicament et cela même dans le cas d'études pédiatriques négatives, ne validant pas une indication pédiatrique. Des dispositifs particuliers sont également prévus pour les médicaments destinés aux maladies « orphelines » ainsi que pour les médicaments qui ne sont plus couverts par un brevet. Toutefois, il est maintenant évident que les études qui concernent ces médicaments « anciens », qui ne sont plus protégés par un brevet seront, à terme, moins nombreuses que celles concernant des médicaments nouveaux, actuellement en cours de développement [Hoppu K, 2009]. Ainsi, l'EMA a préparé une liste d'anciens médicaments déjà largement prescrits en pédiatrie mais dont l'évaluation chez l'enfant est jugée urgente et encourage la mise en place des études nécessaires par un financement provenant de l'Union Européenne [Ceci A et al., 2006 ; EMA, 2011]. Toutefois, à ce jour et à notre connaissance, aucune AMM pour une utilisation pédiatrique d'« anciens » médicaments, n'a été enregistrée jusqu'à présent [Hoppu K et al., 2011].

Un des piliers du Règlement Européen est la création d'un comité pédiatrique (*Paediatric Committee*, PDCO) composé d'experts issus des pays membres. Ce comité est responsable de l'évaluation scientifique et de la validation du contenu des PIPs ainsi que, à la demande des instances réglementaires, de la préparation de recommandations sur les médicaments destinés

à l'enfant. Il assure également une fonction de conseil en matière de développement médicamenteux en pédiatrie, encourageant des méthodes innovantes d'évaluation et recensant les besoins actuels [EMA, Paediatric Committee].

C. Utilisation et développement des médicaments chez le nouveau-né

La population néonatale est probablement la sous-population pédiatrique où le développement médicamenteux présente le plus d'enjeux et de difficultés. Historiquement, c'est bien suite à deux tragédies sanitaires impliquant des nouveau-nés (apparition d'un « syndrome gris » après administration de chloramphénicol [Weiss C et al., 1960]) et des fœtus (phocomélie après usage de thalidomide par les mères [Lenz W, 1965]) qu'une première loi (amendement de Kefauver-Harris) a été votée en 1962 aux Etats-Unis, pour établir les exigences d'efficacité et de sécurité d'emploi pour tout nouveau médicament avant sa mise sur le marché. Par ailleurs, d'autres exemples de toxicité médicamenteuse comme la survenue d'ictère nucléaire après administration de sulfamides chez le nouveau-né, soulignent la vulnérabilité potentiellement plus importante de cette population vis-à-vis des médicaments [Choonara I et Conroy S, 2002].

Pour autant, les besoins en médicaments de la population néonatale sont importants et, pour certaines classes médicamenteuses, parfois plus élevés que ceux des enfants plus âgés [Neubert A et al., 2010 ; Sturkenboom M et al., 2008]. Globalement, l'enjeu de la prise en charge des nouveau-nés prématurés est d'assurer leur survie alors que les nouveau-nés à terme sont souvent hospitalisés à cause d'une maladie congénitale ou d'une complication périnatale. Dans les deux cas, l'immaturation organique caractéristique de cette classe d'âge, est à l'origine de nombreuses co-morbidités nécessitant une prise en charge médicale complexe. Par conséquent, les nouveau-nés et particulièrement les prématurés, sont souvent exposés à un

nombre important de médicaments [Kumar P et al., 2008]. En effet, les récents progrès en terme de survie des nouveau-nés prématurés (≤ 37 semaines d'aménorrhée) ou extrêmement prématurés (≤ 28 semaines d'aménorrhée) sont étroitement liées aux progrès des traitements pharmacologiques avec un nombre moyen de médicaments administrés par patient dans les unités de soins intensifs néonataux qui n'a pas cessé d'augmenter depuis 40 ans [Du W et al., 2006].

Evidemment, cette augmentation de la consommation médicamenteuse peut entraîner une augmentation du risque d'effets indésirables à court et à long-terme. Car malgré une expérience parfois importante pour l'utilisation de certaines molécules chez les adultes ou les enfants plus âgés, les nouveau-nés présentent des spécificités liées à leur taille et poids, leur constant développement physiologique, la maturation des voies métaboliques, leurs pathologies sévères et complexes qui influencent la pharmacocinétique et la pharmacodynamie des médicaments [Kearns G et al., 2003a ; Stepherson T, 2005]. Il est ainsi impératif d'évaluer correctement ces aspects spécifiquement dans la population néonatale afin d'optimiser la prescription de nombreuses molécules.

La néonatalogie est une des spécialités pédiatriques où les médecins prescrivent le plus de médicaments hors AMM [Manchetti F et al., 2007 ; Bajcetic M et al., 2005 ; 't Jong G et al., 2002]. En effet, la proportion de patients en néonatalogie qui reçoivent au moins un médicament hors AMM est de 80 à 100% ['t Jong G et al., 2001 ; Avenel S et al., 2000 ; Barr J et al., 2002 ; Conroy S et al., 1999 ; Dell'Aera M et al., 2007 ; Lopez Martinez R et al., 2005 ; O'Donnell C et al., 2002 ; Turner S et al., 1999 ; Lass J et al., 2011] bien plus élevée que celle observée dans les services de pédiatrie générale ou de chirurgie pédiatrique [Cuzzolin L et al., 2006]. La prescription de médicament sans AMM (« *unlicensed* »), estimée entre 10 et 62% de toutes les prescriptions, est souvent liée à la modification de la formulation initiale du produit autorisé ou à la fabrication d'une nouvelle formulation par la pharmacie

hospitalière, soulignant ainsi le besoin de formulations médicamenteuses adaptées pour l'administration néonatale. Mais, la plupart des médicaments en néonatalogie, 14 à 63% des prescriptions, sont administrés dans des conditions non prévues par l'AMM (« *off-label* ») souvent à cause de déviations sur la classe d'âge, les indications et la posologie (dose ou intervalle d'administration) recommandées plutôt que sur la voie d'administration ou le non respect des contre-indications. L'éventail très large des résultats issus des diverses publications est vraisemblablement lié à des différences concernant la définition de l'utilisation hors AMM, les procédures d'autorisation des médicaments dans les différents pays, les pratiques médicales locales et la disponibilité d'alternatives thérapeutiques. Il est également important de préciser que l'utilisation des médicaments hors AMM en néonatalogie n'est pas considérée comme incorrecte ou illégale. Il s'agit plutôt d'une utilisation acceptable, basée sur des recommandations faites par des experts, voire même nécessaire à cause de l'absence d'alternatives thérapeutiques [American Academy of Pediatrics Committee on Drugs, 2002 ; Hill P., 2005]. Néanmoins, l'absence de données pharmacocinétiques et pharmacodynamiques fiables chez le nouveau-né ainsi l'absence de données de sécurité d'emploi à long-terme pour de nombreux médicaments est une réalité qui entrave l'établissement de schémas thérapeutiques optimaux et l'appréciation du rapport bénéfice-risque pour le patient. Ceci peut aussi être vrai pour des médicaments qui ont l'AMM pour une utilisation néonatale. Par exemple, en France et aux Etats-Unis, le citrate de caféine a été autorisé pour traiter les apnées du nouveau-né prématuré en 1997 et 1999, respectivement. Les résultats des études évaluant les effets à long-terme de ce produit sur le développement cognitif des nouveau-nés exposés n'ont pu être publiés que dix ans plus tard et sont globalement rassurants [Schmidt, B et al., 2007 ; Schmidt, B et al., 2012].

Malgré les initiatives réglementaires des dernières années, cette situation pourrait ne pas changer dans un proche avenir. Selon des données récentes en Europe et aux Etats-Unis, les

patients les plus jeunes sont les moins susceptibles d'être inclus dans les études prévues par les PIP [Ceci A et al., 2006 ; Hoppu K et al., 2011 ; Olski T et al., 2011]. Sans surprise, le Comité Pédiatrique de l'EMA a demandé l'augmentation du nombre de PIPs incluant des nouveau-nés de 15 à 26% mais parmi les PIPs effectivement approuvés depuis la mise en place des nouvelles réglementations seulement une faible proportion prévoyait des études cliniques incluant des nouveau-nés. En 2003 aux Etats-Unis, seulement 7 produits (21%) parmi les 33 pour lesquels des études pédiatriques avaient été effectuées, ont inclus des nouvelles données néonatales dans leur AMM [Roberts R et al., 2003]. Au niveau Européen, 33.3% des 222 substances actives ayant reçu une AMM pendant la période 1995-2005 comportaient des informations permettant un usage pédiatrique dans leur RCP et seulement 9.4% avaient été autorisées pour une utilisation en néonatalogie [Ceci A et al., 2006]. Les nouveau-nés restent la sous-population pédiatrique la plus vulnérable et en même temps celle où les médicaments sont prescrits sans les données pharmacologiques habituellement exigées pour une utilisation optimale.

D. Objectives du travail de la thèse de sciences

La faible progression du nombre d'essais cliniques impliquant la population néonatale malgré les nouvelles législations en vigueur et les mesures incitatives, démontre que le développement du médicament en néonatalogie présente des particularités souvent difficiles à adresser. L'objectif des travaux inclus dans ma thèse de science est d'analyser les différentes étapes de l'évaluation des médicaments chez le nouveau-né et de discuter les méthodes permettant d'optimiser cette évaluation, en centrant la réflexion sur la classe des médicaments anti-infectieux. Ces médicaments sont parmi le plus fréquemment prescrits en pédiatrie et plus particulièrement chez le nouveau-né, prématuré et à terme. Ils font également partie des

médicaments le plus souvent prescrits hors AMM dans cette classe d'âge malgré le fait qu'ils soient commercialisés depuis plusieurs années et que pour la plupart, ils ne soient plus couverts par un brevet [Neubert A et al., 2010 ; Porta A et al., 2010 ; Clark R et al., 2006 ; Dessi A et al., 2010].

Sept chapitres constituent l'ensemble du présent manuscrit. Dans chaque chapitre, une étape du développement médicamenteux en néonatalogie est abordée, en exposant la problématique et en discutant les éventuels moyens d'optimiser ce développement. Les exemples abordés dans chaque chapitre concernent l'évaluation des médicaments anti-infectieux en néonatalogie.

Tout particulièrement, ces exemples sont issus de mes premiers travaux réalisés dans le cadre du projet Européen FP7 TINN (« *Treat Infections iN Neonates* ») [<http://www.tinn-project.org>] dont le résumé est présenté ci-dessous.

Ce réseau a été établi et financé par la Commission Européenne en 2007. Son objectif est d'évaluer l'utilisation de deux médicaments anti-infectieux non protégés par un brevet et faisant partie de la liste des médicaments à évaluer en priorité en Europe, la *ciprofloxacin*e et le *fluconazole*. L'étude simultanée de ces deux molécules, au sein d'un projet collaboratif, a été décidée car ces deux médicaments sont prescrits hors AMM dans le cadre de pathologies néonatales rares, concernant surtout des nouveau-nés à risque infectieux élevé. De plus, leur étude requiert un niveau élevé d'expertise dans divers domaines de recherche médicamenteuse en pédiatrie (cliniciens-néonatalogistes, pharmacologues, biostatisticiens, pharmaciens, méthodologiques...). Les informations ainsi recueillies seront éventuellement incluses dans le dossier de demande d'autorisation de mise sur le marché pour une indication pédiatrique (« *Pediatric Use Marketing Authorisation* », PUMA) auprès de l'EMA. Ce projet collaboratif est sous la coordination de la France (Pr. Evelyne Jacqz-Aigrain, INSERM) et du

Royaume-Uni (Pr. Imti Choonara, University of Nottingham) et regroupe des experts en néonatalogie provenant de 7 pays membres.

Enfin, les travaux sur la vancomycine ont été réalisés dans le cadre d'une collaboration PREMUP (Fondation de Coopération Scientifique sur le Grossesse et la Prématurité).

Résumé du projet Européen TINN

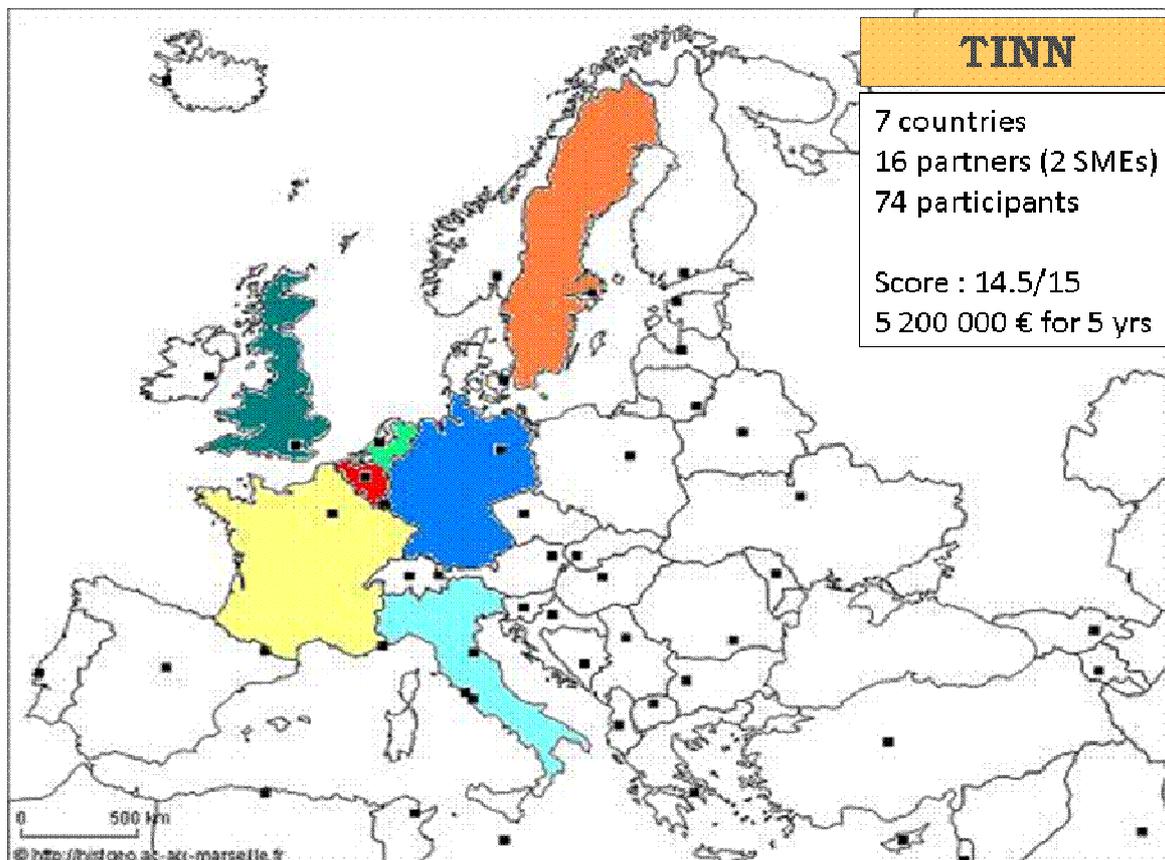
TINN (acronyme de *Treat Infections iN Neonates*) est un projet financé par la Commission Européenne (7^{ième} PCRD). Ses objectifs sont d'évaluer l'efficacité et la tolérance à court et long terme de la ciprofloxacine et du fluconazole chez le nouveau-né. Ces deux médicaments sont inclus dans la « *Priority list* » (liste des priorités) des thérapeutiques nécessitant une évaluation dans la population des nouveau-nés à terme et prématurés établie par l'EMA. En effet, ces médicaments sont prescrits dans cette population à risque, en dehors de toute autorisation de mise sur le marché pour le traitement d'infections majeures responsables de complications à court et long terme.

Pour évaluer ces médicaments chez le nouveau-né, un projet européen s'imposait en raison de la rareté des prescriptions dans les différents services et de différences d'indications et de modalités d'utilisation de ces médicaments. TINN réunit des partenaires de diverses spécialités (néonatalogie, pharmacologie pédiatrique, méthodologie) de sept pays européens. Pour les deux molécules, le projet inclut des expérimentations *in silico* et des études animales, et aura à évaluer des formulations galéniques adaptées. Les deux essais thérapeutiques seront optimisés par l'utilisation de méthodologies adaptées au nouveau-né telles que des études pharmacocinétiques de population et des études pharmacogénétiques.

Les études projetées permettront la validation d'un *Plan Evaluation Pédiatrique (PIP)* par l'Agence Européenne du Médicament. Les essais seront conduits en collaboration avec des

néonatalogistes de centres européens, suivant les guides de Bonnes Pratiques en recherche clinique. Tous les aspects éthiques seront analysés et en particulier, la prise en charge de la douleur, le volume et le nombre des prélèvements sanguins et le consentement éclairé des parents. TINN prévoit des études de sécurité à court et long terme. Les différents partenaires auront à établir des relations avec les autorités réglementaires et éthiques.

Les résultats pourront permettre d'obtenir une autorisation de mise sur le marché (*PUMA*) et pourront améliorer la prise en charge des nouveau-nés recevant l'une ou l'autre de ces molécules. Pour atteindre ces objectifs, TINN souhaite participer à la mise en place d'un réseau européen de Néonatalogie avec les centres investigateurs et accroître ainsi l'utilisation de médicaments évalués en néonatalogie, pour le bénéfice direct des enfants, de leurs familles et des professionnels de santé.



COMPRENDRE LES SPECIFICITES DE LA
POPULATION NEONATALE

II. COMPRENDRE LES SPECIFICITES DE LA POPULATION NEONATALE

Avant de conduire des études cliniques chez le nouveau-né, il est important de considérer les particularités de la population néonatale et surtout le fait qu'il s'agit d'une population d'étude particulièrement hétérogène en termes de maturation organique. La physiologie néonatale, hautement variable selon le sous-groupe de nouveau-nés concernés (à terme, prématurés...), présente des particularités uniques à cette population. Par ailleurs, l'histoire naturelle et l'évolution, surtout en termes de séquelles, des nombreuses pathologies présentent aussi des particularités bien spécifiques au nouveau-né. Toutes ces particularités peuvent modifier considérablement le devenir et l'action des médicaments.

A. Classification de la population néonatale

Les nouveau-nés sont le sous-groupe de la population pédiatrique défini de la naissance jusqu'à 27 jours inclus [EMA, 2009a]. Ce groupe est constitué des nouveau-nés à terme et des nouveau-nés prématurés pour lesquels la période néonatale est définie de la naissance à un âge post-menstruel (âge gestationnel + âge chronologique) de 40 semaines d'aménorrhée et 27 jours de vie [EMA, 2009a ; American Academy of Pediatrics Committee on Fetus and Newborn, 2004].

La population néonatale n'est pas un groupe homogène en termes de maturation organique, de développement et de risque de mortalité et de morbidité. Bien que la définition de la prématurité (= toute naissance survenue avant la fin de la 37^{ème} semaine d'aménorrhée) ait été adoptée par les instances pédiatriques dans la plupart des pays industrialisés, les critères utilisés pour qualifier les différentes catégories de prématurité font encore l'objet de

discussions. Plusieurs classifications ont été proposées pour les nouveau-nés dont les deux principales se basent sur l'âge gestationnel (AG) et le poids de naissance (PN). Ainsi, les nouveau-nés se répartissent en 5 catégories selon la durée de gestation en SA révolues : prématurité extrême (« *extremely preterm neonate* », naissance avant 28 SA), grande prématurité (« *very preterm neonate* », naissance avant 32 SA), prématurité modérée (« *moderately preterm neonate* », naissance entre 32 et 37 SA), terme (« *term* », naissance après 37 SA) et post-terme (« *post-term* », naissance après 41 SA) (**Figure 2**). L'AG étant une mesure imprécise, peu fiable et difficile à obtenir même dans les pays développés, d'autres répartissent les nouveau-nés selon leur PN dans 3 catégories : petit poids de naissance (« *low birth weight* », LBW ; PN<2500g), très petit poids de naissance (« *very low birth weight* », VLBW ; PN<1500g) et petit poids de naissance extrême (« *extremely low birth weight* », ELBW ; PN<1000g) [Tucker J et McGuire W, 2004]. Cette classification ne définit pas explicitement la classe des nouveau-nés avec un poids normal.

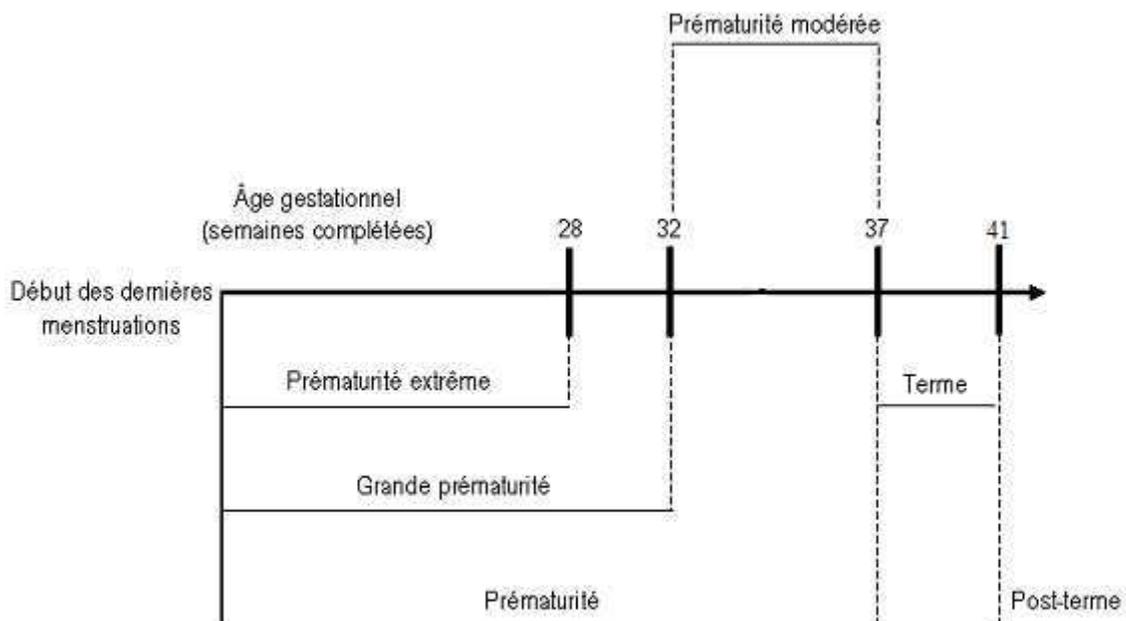


Figure 2. Catégories des nouveau-nés selon l'âge gestationnel à la naissance

Ces deux classifications sont les plus fréquentes mais aucune n'est acceptée unanimement et toutes les deux présentent des limitations [Engle WA, 2006]. Afin d'éviter toute classification erronée de certains nouveau-nés, une stratification basée sur l'AG et le PN a été proposée [Battaglia F et Lubchenco L, 1967]. Cette classification repose sur la concordance entre le PN et l'AG en terme de percentiles et définit neuf classes distinctes. Chaque nouveau-né est initialement classé en 3 catégories : prématuré, à terme et post-terme qui sont ensuite subdivisées chacune en 3 sous-catégories : PN adéquat selon l'AG (« *appropriate for gestational age* », AGA ; PN entre le 10^{ème} et le 90^{ème} percentile pour l'AG), PN faible pour l'AG (« *small for gestational age* », SGA ; PN inférieur au 10^{ème} percentile pour l'AG) et PN grand selon l'AG (« *large for gestational age* », LGA ; PN supérieur au 90^{ème} percentile pour l'AG) (Figure 3).

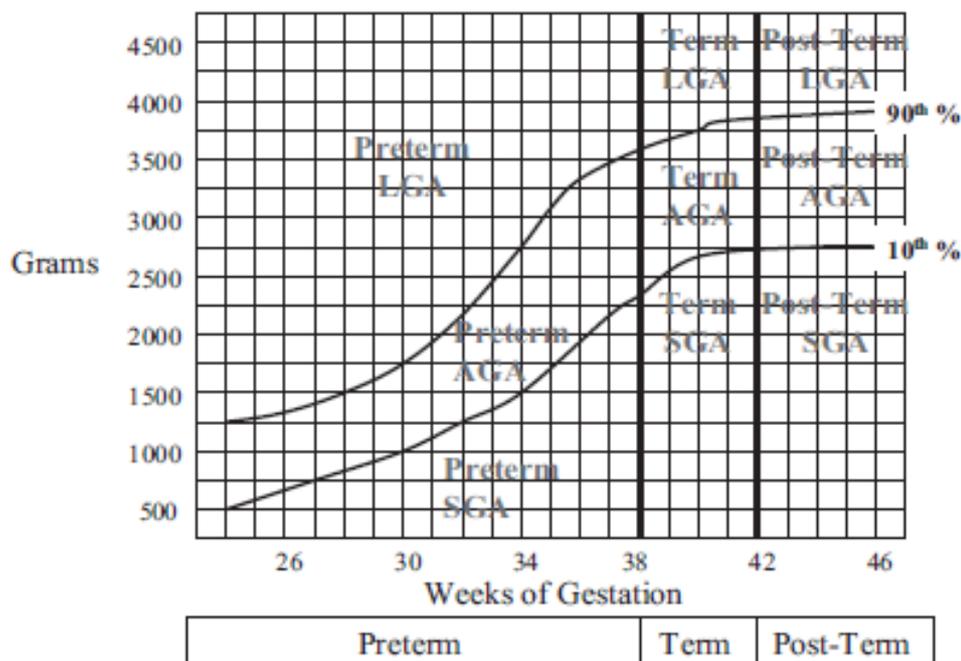


Figure 3. Classification des nouveau-nés en fonction de l'AG et du PN : The « Original Nine » [Battaglia F et Lubchenco L, 1967].

La catégorisation des nouveau-nés facilite la prise en charge et le suivi des patients. Il est aussi très important de considérer les différentes catégories des nouveau-nés au cours des essais cliniques médicamenteux. Cela permet d'évaluer l'influence des différents stades de la maturation physiologique sur les effets du médicament. Car, bien que la plupart des fonctions organiques soient globalement immatures pendant la période néonatale, cette immaturité est encore plus importante en cas de prématurité mais aussi d'hypotrophie, de retard de croissance intra-utérin ou d'état pathologique. Tous ces facteurs sont susceptibles de modifier les propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques d'un médicament et de ce fait influencer son efficacité et sa toxicité potentielles. De plus, les mécanismes d'adaptation à la vie extra-utérine et les changements de maturation organique sont des processus extrêmement rapides et sont à l'origine de la grande variabilité intra- et interindividuelle observée sur les effets médicamenteux. Par ailleurs, l'évolution clinique et le pronostic vital et fonctionnel sont très différents selon les classes d'AG et de PN [Benjamin D et al., 2006 ; Stoll B et al., 2002a ; Wood N et al., 2000 ; Larroque B et al., 2008 ; Zeitlin J et al., 2010]. Or, le choix et la quantification des critères de jugement dans les essais cliniques néonataux sont directement influencés par le risque accru de mortalité et morbidité de cette population.

Par conséquent, selon le type du médicament en évaluation et la pathologie concernée, une stratification des essais cliniques doit être considérée. Malheureusement, aucune stratification ne fait actuellement l'unanimité. Les strates des nouveau-nés à prendre en compte doivent être les plus pertinentes cliniquement et physiologiquement selon l'objectif de l'étude, même si l'effet de l'âge et du poids sont toujours évalués. Par exemple, la néphrogenèse n'est complète qu'après 34 SA. De ce fait, les grands prématurés ont un débit de filtration glomérulaire, et donc une clairance rénale, très faible à la naissance et qui augmente plus lentement dans les premiers jours de vie que celui des nouveau-nés de plus de 34 SA. Ainsi, pour évaluer les propriétés pharmacocinétiques et/ou pharmacodynamiques d'un médicament à élimination

rénale, il convient de stratifier la population d'étude en deux groupes : ceux nés avant ou après 34 SA [EMA, 2008]. Si la clairance du médicament est principalement hépatique, les mêmes considérations s'appliquent aux systèmes métaboliques, néanmoins l'ontogenèse des enzymes hépatiques est moins bien décrite dans la littérature scientifique.

Par ailleurs, des facteurs environnementaux et maternels peuvent aussi participer à la variabilité observée dans les effets des médicaments et dans le pronostic des nouveau-nés.

Cependant, les catégories des nouveau-nés à considérer doivent être les plus pertinentes possible sans pour autant diviser la population en de multiples groupes. Ce qui risquerait de compliquer considérablement la méthodologie et l'analyse statistique d'une étude clinique qui porte déjà sur une population dont le nombre est restreint.

B. Spécificités physiologiques de la population néonatale

Les modifications physiologiques associées à la croissance et la maturation de l'organisme sont profondes, expliquant les importantes différences pharmacocinétiques et pharmacodynamiques entre le nouveau-né et l'enfant plus âgé ou l'adulte [Kearns G et al., 2003a ; Stronlin Benedetti M et Baltés E, 2003] (**Figure 4**).

En général, chez le nouveau-né, l'*absorption* des médicaments est diminuée par voie orale et par voie intramusculaire, peu modifiée par voie rectale, et augmentée par voie cutanée. L'absorption orale dépend des paramètres physiologiques gastro-intestinaux. A la naissance, le pH gastrique est neutre puis acide pendant quelques jours, ces modifications rapides ne se produisent pas chez le prématuré. Le pH reste neutre pendant les premiers dix jours de vie puis décroît progressivement pour atteindre des valeurs adultes vers l'âge de deux ans [Boyle J, 2003 ; Hyman P et al., 1985]. La vitesse de vidange gastrique et le temps de transit intestinal sont prolongés jusqu'à environ l'âge de 6 mois, aussi bien chez le nouveau-né à

terme que le prématuré. Les autres facteurs ayant un impact sur l'absorption néonatale des médicaments incluent l'immatunité du mucus intestinal, des fonctions biliaires, du métabolisme et du transport intestinal.

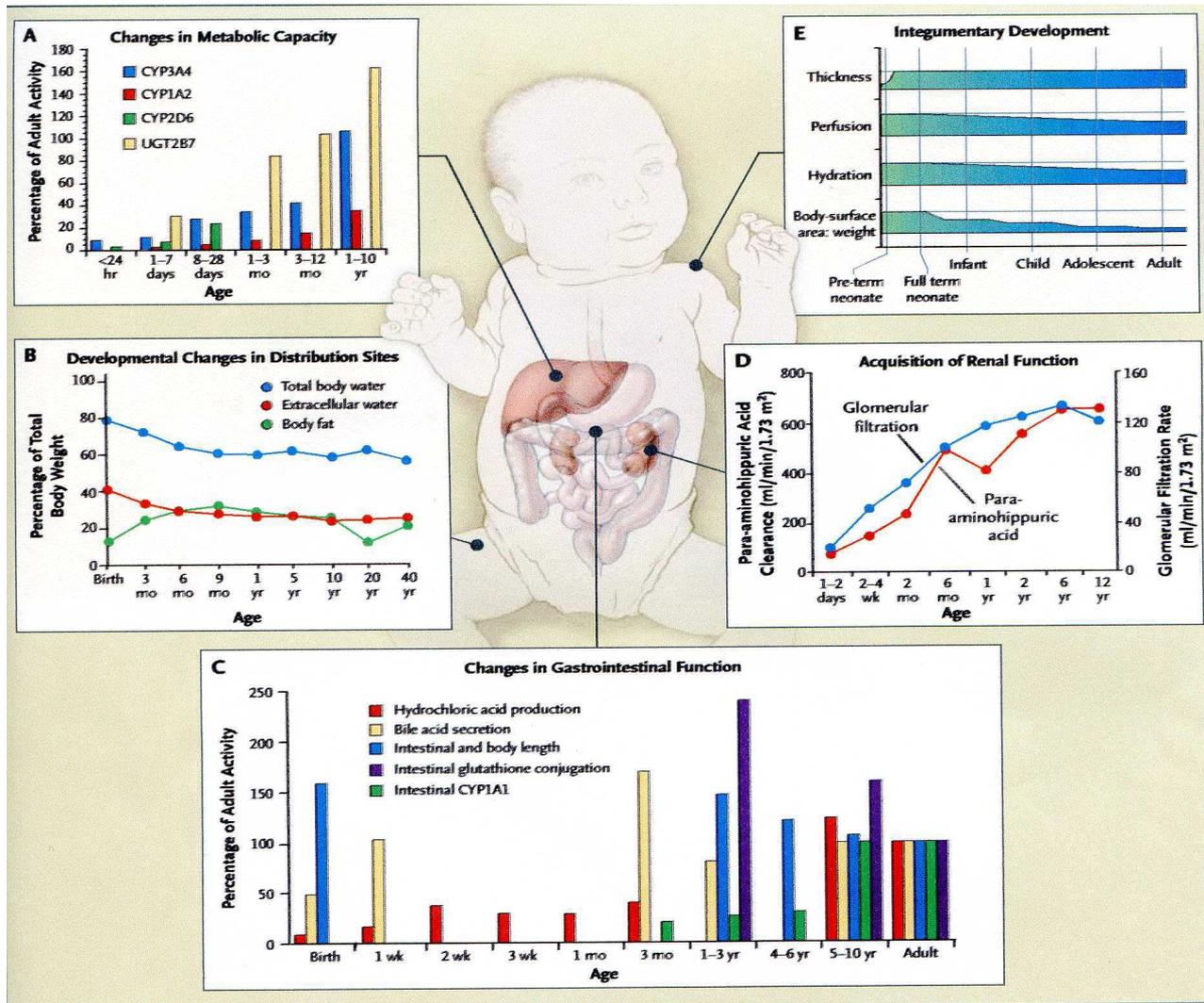


Figure 4. Développement de facteurs physiologiques qui influencent la pharmacocinétique des médicaments chez le nouveau-né, le nourrisson, l'enfant et l'adolescent [Kearns G et al., 2003a].

Les modifications du pH influent sur la stabilité et le degré d'ionisation et ainsi sur l'absorption : la biodisponibilité des médicaments acides tels que la pénicilline et l'érythromycine est habituellement plus importante chez le nouveau-né que chez l'enfant plus grand. L'absorption des médicaments acides faibles tels que le phénobarbital ou la phénytoïne est à l'inverse réduite [Hyman P et al., 1985]. Chez les enfants de moins de 6 mois, la vidange gastrique plus lente résulte en un délai plus important pour atteindre la concentration maximum (Tmax), comme observé avec le cisapride chez le nouveau-né prématuré [Kearns G et al., 2003b]. Il en résulte pour la plupart des médicaments une biodisponibilité réduite chez le nouveau-né. La plupart de ces variables physiologiques atteignent les valeurs adultes entre 5 et 10 ans.

L'absorption percutanée est liée au degré d'hydratation de la peau, à la surface d'absorption cutanée, et inversement liée à l'épaisseur de la couche cornée. Elle est augmentée chez le nouveau-né et peut être 100 fois plus importante chez le nouveau-né prématuré d'âge gestationnel inférieur à 30 semaines que chez le nouveau-né à terme [Ginsberg G et al., 2004]. Ceci est lié, au moins partiellement, à un stratum corneum plus fin, à une perfusion et une hydratation de l'épiderme plus importante. Certains effets toxiques par exemple avec pentachlorophénol, l'hydrocortisone ou l'aspirine, témoignent d'une absorption en excès, conséquence de cette immaturité cutanée [Armstrong R et al., 1969 ; Feinblatt B et al., 1966].

L'absorption par voie rectale est augmentée pour les composés fortement métabolisés. L'absorption par voie intramusculaire dépend de facteurs tels que le flux sanguin musculaire squelettique et les contractions musculaires qui, plus faibles chez le nouveau-né, ralentissent la vitesse d'absorption.

La *distribution* des médicaments dépend principalement des capacités de liaisons protéiques sanguines et tissulaires, du gradient de pH circulant et tissulaire, des transporteurs

transmembranaires (P-gP) et de la vascularisation des différents organes [Ehrnebo M et al., 1971]. Chez le nouveau-né et le nourrisson, la distribution est modifiée par des différences dans la composition corporelle. L'eau corporelle totale (40% chez le nouveau-né et 20% chez l'adulte) et le compartiment extracellulaire (70 à 75% chez le nouveau-né et 50 à 55% chez l'adulte), sont plus importants alors que le tissu graisseux (15% chez le nourrisson et 20% chez l'adulte) est moins important. Ceci affecte principalement les médicaments distribués dans l'eau totale et de façon moindre les médicaments liposolubles, d'autant plus que le rapport eau/lipides du tissu graisseux est plus élevé chez le nouveau-né que chez l'adulte. De plus, l'équilibre entre formes liées plasmatiques et formes liées tissulaires est fréquemment modifié car la quantité et l'affinité des protéines plasmatiques sont plus faibles chez le nouveau-né affectant principalement les médicaments fortement liés. L'étude pharmacocinétique du tramadol illustre ces différences [Allegaert K et al., 2011] : chez le nouveau-né, ce médicament très hydrophile a un volume de distribution central (correspondant à l'eau extracellulaire) augmenté et un volume de distribution périphérique (correspondant au volume tissulaire) non affecté par l'âge.

Le *métabolisme* permet la biotransformation de molécules endogènes ou exogènes en composés plus hydrophiles, ce qui facilite leur élimination rénale. Ce métabolisme classiquement divisé en réactions de phases I (oxydation, réduction, hydrolyse) et II (glucuronconjugaison, conjugaison au glutathion, acétylation, méthylation), a lieu principalement au niveau du foie mais aussi de l'intestin, des poumons.

Chez le nouveau-né, le métabolisme est classiquement « immature ». Ainsi, les activités dépendants du système des cytochromes P450 (phase I) et des enzymes de conjugaison (phase II) sont nettement réduites et augmentent de manière indépendante les unes des autres. Des données sont maintenant disponibles sur l'ontogénèse des différentes activités cytochromes P450 et des enzymes de conjugaison. Trois profils d'ontogénèse ont été récemment décrits

[Hines RN, 2008 ; Koukouritaki S et al., 2004 ; Treluyer JM et al., 1991] : 1) enzymes qui sont exprimés durant la vie fœtale puis disparaissent progressivement au cours des deux premières années de vie : CYP3A7 et flavine monooxygénase (FMO1), 2) enzymes exprimés de manière relativement constante chez le fœtus puis cette expression augmente après la naissance CYP2D6, 2E1 et 3) enzymes dont l'expression débute en fin de grossesse puis augmente principalement dans les deux premières années de vie (CYP2C9, 2C19, 1A2..)

[Lacroix D et al., 1997 ; Vieira I et al., 1996 ; Treluyer JM et al., 1991 ; Sonnier M et Cresteil T, 1998 ; de Wildt S et al., 1999]. Des profils de métabolisme différents sont aussi possibles entre nouveau-né et grand enfant ou adulte comme dans le cas du paracétamol.

Ainsi, la famille CYP3A, qui représente à elle seule la majorité des cytochromes hépatiques et permet le métabolisme de plus de la moitié des médicaments, comprend trois membres CYP3A4, 3A5 et 3A7 (et CYP3A34). La forme enzymatique « fœtale » CYP3A7 reste présente après la naissance jusqu'à environ 6 mois de vie alors que la forme 3A4 apparaît après la naissance [Lacroix D et al., 1997]. Ce passage de la forme 3A7 à la forme 3A4 peut être illustré par de nombreux exemples, comme le cisapride ou le midazolam [Kearns G et al., 2003b ; de Wildt S et al., 2001].

Par ailleurs, les mécanismes de glucuronoconjugaison du foie sont particulièrement immatures à la naissance et atteignent des niveaux adultes qu'après quelques années de vie [McCarver D et Hines R, 2002]. D'autre part, l'ontogenèse normale des voies métaboliques peut être modifiée par l'utilisation maternelle pré- ou périnatale et/ou néonatale de certains médicaments mais elle peut également présenter des profils différents selon certains polymorphismes génétiques. Enfin, certaines voies du métabolisme hépatiques des médicaments sont totalement absentes ou au contraire sont spécifiques au nouveau-né en comparaison avec les organismes plus matures [Lacroix D et al., 1997].

Le rein est le principal organe responsable de l'*excrétion* des médicaments et de leurs métabolites. Le développement et la maturation rénale débutent précocement au cours de la vie fœtale et se terminent à 34 semaines d'aménorrhée. Les modifications du flux sanguin rénal et de la filtration glomérulaire, la maturation des tubules rénaux et des capacités de sécrétion et réabsorption, sont importantes au cours des premières semaines de vie puis plus progressives [van den Anker J et al., 1995a ; Cleary G et al., 1996]. L'élimination rénale des médicaments atteint ainsi des valeurs adultes entre 6 et 12 mois d'âge post-natal [Arant BS Jr., 1978 ; van den Anker J et al., 1995b]. Toutefois, des différences très importantes sont observées entre les nouveau-nés à terme et ceux prématurés [Robillard J et al., 1999]. Ces derniers présentent un débit significativement moins élevé à la naissance et une augmentation moins rapide de celui-ci en rapport avec la néphrogenèse qui est encore incomplète pour les nouveau-nés ayant un âge gestationnel de 26 à 34 SA. L'utilisation de la créatininémie pour quantifier la filtration glomérulaire est difficile en période néonatale car de nombreux facteurs impactent sa détermination : inférences avec la créatinine maternelle dans les premiers jours de vie, méthode de dosage (Jaffé ou enzymatique, co-médications...). Le recours à d'autres marqueurs est cependant difficile.

C. Spécificités des pathologies néonatales : exemple des infections néonatales

Les pathologies néonatales présentent de nombreuses particularités tant dans leur présentation clinique que dans leur évolution. Ainsi, même lorsqu'ils existent des équivalents pathologiques dans d'autres classes d'âge, il faut toujours transposer avec beaucoup de prudence les résultats sur les effets d'un médicament obtenus dans une autre classe d'âge pédiatrique ou chez l'adulte, au nouveau-né. Par ailleurs, il existe des pathologies qui sont propres aux nouveau-nés comme la maladie des membranes hyalines chez les prématurés ou

la persistance du canal artériel. L'efficacité d'un médicament dans le contexte d'une pathologie spécifiquement néonatale ne peut être évaluée que dans cette classe d'âge. Il faut également souligner que les nouveau-nés hospitalisés dans des unités comme la réanimation néonatale présentent souvent de multiples états pathologiques concomitants. Cela nécessite l'association thérapeutique de plusieurs interventions médicales avec un risque important d'interactions médicamenteuses ce qui complique considérablement la quantification de l'effet d'un médicament en particulier.

De plus, la maturation de certains organes, et principalement le développement du système nerveux central, est progressive durant les premières années de vie. De ce fait, les nouveau-nés et surtout ceux nés prématurément, sont des organismes particulièrement vulnérables. Chaque état pathologique, mais aussi toute intervention médicale, peut perturber la maturation organique en cours et provoquer des séquelles parfois irréversibles, à court- ou long terme ou même le décès. Il existe des interactions complexes entre les pathologies néonatales et les effets pharmacologiques des médicaments pouvant rendre compte de complications (effets indésirables médicamenteux) spécifiques à cette population, en particulier chez le nouveau-né prématuré comme la survenue d'une entérocolite ulcéronécrosante, d'une rétinopathie, d'hémorragies intra-ventriculaires...Par conséquent, l'étude de la sécurité d'emploi d'une nouvelle molécule dans un contexte pathologique spécifique est un enjeu majeur du développement des médicaments en néonatalogie.

Cette problématique sera abordée dans la suite de ce chapitre en s'appuyant sur l'exemple des infections néonatales.

1. Définition des infections néonatales

Malgré les progrès significatifs dans les soins intensifs néonataux qui ont amélioré considérablement la survie des grands prématurés et ceux avec un faible poids de naissance, les infections constituent toujours une cause significative de mortalité et de morbidité dans les pays développés et ceux en voie de développement [Kaufman D et Fairchild K, 2004 ; Lawn J et al., 2005 ; Lawn J et al, 2006]. Les infections sont classées en deux types : les infections néonatales précoces et tardives. Les infections néonatales précoces surviennent dans les premières 72 heures (48 heures à 1 semaine suivant les publications) de vie et sont considérées d'origine materno-fœtale. Les bactéries impliquées sont habituellement le *Streptocoque hémolytique du groupe B* et des bacilles Gram négatif comme l'*Escherichia coli K1* et la *Listeria monocytogenes*. Les infections néonatales tardives surviennent après les premières 72 heures (48 heures à 1 semaine) de vie jusqu'à la fin de la période néonatale (27 jours de vie) et sont considérées comme des infections acquises, d'origine nosocomiale ou communautaire et moins souvent d'origine materno-fœtale. Le spectre de ces infections inclut les infections à bactéries Gram positif comme le *Staphylocoque coagulase négative* et Gram négatif comme les *Klebsielle* et le *Pseudomonas aeruginosa* mais aussi les infections fongiques essentiellement à *Candida*, qui sont néanmoins plus rares [Zaidi A et al., 2009 ; Kaufman D., 2010a].

2. Particularités des infections néonatales

Les infections néonatales diffèrent des infections observées chez l'adulte ou l'enfant plus grand sur plusieurs points. Les facteurs liés à l'hôte et le nombre important de pathogènes potentiels posent de véritables challenges diagnostiques et thérapeutiques chez le nouveau-né.

Les nouveau-nés présentent un déficit de l'immunité humorale et cellulaire avec une production plus faible d'immunoglobulines que les enfants plus âgés et les adultes. Les fonctions du complément et des lymphocytes T sont également moins efficaces, rendant les mécanismes de défense contre les bactéries insuffisants [Pong A et Bradley J, 1999 ; Wilson CB, 1986]. Cette immaturité des réponses immunitaires ainsi que celle des barrières physiques comme la peau et les muqueuses, sont à l'origine de la grande fragilité des nouveau-nés vis-à-vis des infections bactériennes et fongiques y compris les espèces avec une faible virulence [Ohman L et al., 1995]. Les nouveau-nés de petit poids de naissance (prématuré et PN faible pour l'âge gestationnel) ont une immunité encore plus immature fonctionnellement et sont ainsi particulièrement exposés au risque d'infection [Marodi L, 2006].

La *présentation clinique des infections néonatales est non spécifique et le processus infectieux a souvent une progression fulminante*. Ceci résulte, au moins en partie, de l'immaturité immunologique néonatale [Levy O, 2007]. Très certainement liées à d'autres facteurs intrinsèques (anatomie, vascularisation des tissus, perméabilité des membranes...), les infections néonatales impliquent rapidement plusieurs organes et sont souvent associées à une atteinte méningée. Par conséquent, les taux de mortalité globale et de séquelles neuro-développementales liés à l'infection sont plus élevés que ceux observés chez les enfants plus âgés ou chez les adultes [Pong A et Bradley J, 1999 ; Stoll B et al, 2004].

De plus, les particularités immunologiques des nouveau-nés sont aussi à l'origine des *difficultés à interpréter les résultats des analyses biologiques* comme le dosage de certains biomarqueurs de l'infection et de l'inflammation. Egalement, la mise en culture des échantillons biologiques reste le « gold standard » du diagnostic des infections mais sa sensibilité peut être diminuée chez le nouveau-né [Edmond K et Zaidi A, 2010]. La première raison à cela est l'utilisation précoce des antibiotiques en période prénatale ou périnatale qui

peut rendre négatifs les résultats d'une culture bactérienne. Accessoirement, l'incapacité à obtenir un échantillon adéquat pour la mise en culture, particulièrement chez les nouveau-nés malades avec un très petit poids de naissance, compromet davantage le diagnostic d'une infection. Au moins 0.5 ml de sang sont requis pour la mise en culture mais un volume plus important, de l'ordre de 1 à 2 ml, peut être nécessaire pour mettre en évidence une bactériémie avec un nombre faible de colonies (< 4 CFU/ml) [Kellogg J et al., 1997 ; Schelonka R et al., 1996]. Ainsi, seulement 50% des nouveau-nés ayant un diagnostic clinique d'infection ont effectivement des hémocultures positives. Par conséquent, l'identification de l'agent causal et la détermination de sa sensibilité aux différents antibiotiques ne sont pas toujours possibles. Le diagnostic et la prise en charge thérapeutique sont alors essentiellement guidés par la présentation et l'examen clinique du nouveau-né. Toutefois, les signes cliniques d'infection sont généralement non spécifiques, ce qui retarde le diagnostic et la mise en route du traitement.

Enfin, des *germes différents de ceux habituellement retrouvés chez l'adulte ou l'enfant plus âgé peuvent être en cause*. En effet, bien que le même spectre de germes que celui retrouvé chez les adultes ou les enfants plus âgés puisse être en cause, des pathogènes supplémentaires sont également à l'origine de ces infections surtout des germes opportunistes d'origine nosocomiale. Leur fréquence d'apparition est plus élevée chez le nouveau-né, surtout chez le grand prématuré, à cause de la durée prolongée d'hospitalisation et l'accroissement de procédures invasives (pose de cathéters intra-vasculaires, sondes d'intubation...).

3. Épidémiologie des infections néonatales

Globalement, l'incidence des infections néonatales, surtout celle des infections tardives, est inversement proportionnelle à l'âge gestationnel et au poids de naissance. Dix pour cent des nouveau-nés hospitalisés dans une unité de soins intensifs néonataux sont atteints d'une infection néonatale tardive alors que parmi les nouveau-nés avec un faible poids de naissance ce pourcentage s'élève à 25% [Stoll B et al., 2002a ; Stoll B et al., 2005 ; Beck-Sague C et al., 1994]. Ces nouveau-nés sont également plus susceptibles de présenter des épisodes infectieux multiples. Le risque d'infection augmente aussi avec l'existence d'une anoxie périnatale et chez les nouveau-nés de sexe masculin.

Concernant les *infections bactériennes*, des facteurs de risque maternels ont été identifiés comme l'existence d'une infection ou des signes infectieux au moment de l'accouchement, des infections urinaires à répétition, une menace d'accouchement prématuré, une rupture ou une fissuration prématurée de la poche des eaux, une chorioamniotite et un portage génital ou urinaire de germes potentiellement pathogènes. Les complications de la prématurité associées à un plus grand risque d'infection néonatale tardive sont les suivantes : persistance du canal artériel, ventilation artificielle prolongée, accès intra-vasculaire prolongé, dysplasie broncho-pulmonaire et entérocolite ulcéronécrosante. Par ailleurs, le risque infectieux augmente avec l'augmentation de la durée du séjour hospitalier.

Le taux global de mortalité est élevé surtout chez les nouveau-nés avec un très petit poids de naissance : environ 25% pour une infection précoce et 18% pour une infection tardive [Stoll B et al., 2002a ; Stoll B et al., 2002b]. Dans les pays en voie de développement, les infections sont à l'origine de 30% à 40% des décès néonataux. Actuellement, parmi les nouveau-nés soumis à un traitement par antibiotique, la mortalité est estimée entre 5% et 60%. Les taux les plus élevés sont observés dans les pays en voie de développement [Thaver D et

Zaidi A, 2009]. Le développement, en particulier neurologique, du nouveau-né peut ainsi être perturbé par les pathologies survenant pendant cette période, notamment les infections. La présence d'une entérococolite ou d'une méningite associée à l'infection augmente le risque de séquelles neurologiques surtout chez les nouveau-nés avec un très petit poids de naissance. Le risque de séquelles, retard de développement et retard intellectuel et des acquisitions, est dans ce contexte important [Stoll B et al., 2004].

Concernant les *infections fongiques*, leur incidence a significativement augmenté dans les unités de soins intensifs néonataux entre 1980 et 1990, parallèlement aux progrès médicaux qui ont permis la survie des nouveau-nés grands prématurés et avec un petit poids de naissance extrême. Leur incidence s'est ensuite stabilisée. Actuellement, l'incidence est très variable, de 3% à 23% selon les études [Kaufman D., 2010a ; Fridkin S et al., 2006 ; Aujard Y et al., 2003]. En cas d'incidence élevée, l'utilisation de mesures de prévention dont l'utilisation d'agents antifongiques en prophylaxie a permis une diminution des cas observés chez les prématurés de moins de 1000g. Les infections néonatales fongiques sont des infections extrêmement sévères et invasives, principalement provoquées par des champignons du genre *Candida*. Elles partagent les mêmes facteurs de risque que les infections néonatales bactériennes tardives mais sont aussi plus fréquentes chez les nouveau-nés exposés à des médicaments favorisant la prolifération des *Candida* (inhibiteurs de la pompe à protons, glucocorticoïdes, antibiotiques à large spectre...) et chez ceux présentant une maladie gastro-intestinale (entérococolite ulcéronécrosante, perforation intestinale focale...).

Les candidoses invasives sont associées à des taux très élevés de séquelles neuro-développementales et de mortalité [Stoll B et al., 2004 ; Friedman S et al., 2000 ; Lee B et al., 1998]. Chez les nouveau-nés de très faible poids de naissance, le taux de mortalité est estimé de 10% à 32% et peut atteindre 50% chez les bébés nés à moins de 26 SA et ayant un poids de naissance inférieur à 1000g [Benjamin D et al., 2004]. Enfin, la fréquence et la gravité réelle

de ces infections sont probablement sous-estimées à cause des nombreuses limitations diagnostiques liées à la subtilité des signes cliniques, l'identification difficile des germes au laboratoire et l'absence de consensus pour la définition des infections fongiques invasives [Kaufman D, 2010a].

4. Particularités du choix et de la mise en route du traitement

Actuellement, il n'existe aucun consensus officiel concernant le traitement des infections néonatales [Gordon A et Jeffery H, 2005 ; Mtitimila E et Cooke R, 2004]. Lorsqu'un nouveau-né présente des signes cliniques et biologiques faisant suspecter une infection et compte tenu de la gravité de ces pathologies et de leur évolution rapide, un traitement empirique est débuté très rapidement et sans attendre l'identification éventuelle du germe. Du fait de la prédominance des infections bactériennes, et sans arguments faisant suspecter une infection fongique, une antibiothérapie empirique est débutée visant à être efficace sur les bactéries Gram positive et Gram négative. Pour la majorité des infections néonatales, l'association d'un aminoside avec une bêta-lactamine administrés par voie parentérale est le traitement de choix dans la plupart des unités de soins intensifs néonataux [Chirico G et al., 2009]. Toutefois, une variabilité dans le choix des antibiotiques prescrits est observée surtout dans le cas des infections tardives. Cette variabilité s'explique par l'adaptation des traitements à l'épidémiologie bactérienne et fongique locale, l'incidence globale des infections, les ressources thérapeutiques, les pratiques médicales (pratiques alimentaires, pose d'accès vasculaire, moyens disponibles pour la détection de la colonisation par des germes multi-résistants...) et le taux local de mortalité. Certaines revues historiques ont démontré que la nature des pathogènes responsables d'infection néonatale évolue dans le temps [Stoll B et al., 1996a ; Stoll B et al., 1996b].

La durée du traitement est aussi variable selon les pratiques et la symptomatologie clinique. Néanmoins, il est important d'établir des schémas thérapeutiques et des posologies adéquates pour optimiser l'efficacité et la tolérance de ces traitements mais aussi pour limiter l'émergence de souches résistantes. En effet, l'utilisation de certains antibiotiques peut être limitée par la présence de souches résistantes comme par exemple les *Escherichia coli* résistantes à l'ampicilline, la gentamicine et certaines céphalosporines de troisième génération. La présence de résistance dans une unité de soins complique considérablement le choix de la stratégie thérapeutique et suscite une préoccupation croissante [Zaidi A et al., 2005].

En cas de suspicion d'une infection fongique à *Candida*, les traitements de première intention sont aussi variables. L'amphotéricine B est efficace contre approximativement tous les *Candida* à l'origine des infections néonatales dont 95% à 97% sont également sensibles au fluconazole. Ces deux médicaments sont les meilleurs choix en attendant l'identification de l'agent pathogène. D'autres mesures non médicamenteuses sont souvent nécessaires comme le retrait des cathéters centraux ou l'arrêt d'une alimentation parentérale. Au vu de la gravité de ces infections, certaines unités de soins intensifs néonataux utilisent le fluconazole ou d'autres agents en prophylaxie surtout chez les nouveau-nés à haut risque comme les grands prématurés et ceux avec un petit poids de naissance extrême. Cette pratique reste controversée, en particulier dans les centres dans lesquels l'incidence des infections fongiques est faible. Enfin, il est également recommandé d'utiliser un médicament antifongique différent de celui utilisé pour la prophylaxie en cas d'infection fongique avérée [Kaufman D, 2010a ; Kaufman D, 2010b].

COMPRENDRE LES PRATIQUES
D'UTILISATION DES MEDICAMENTS EN
NEONATOLOGIE

III. COMPRENDRE LES PRATIQUES D'UTILISATION DES MEDICAMENTS EN NEONATOLOGIE

En l'absence d'évaluation spécifique chez le nouveau-né, les néonatalogistes ont longtemps prescrits les médicaments en utilisant des données adultes et ont jugés leur efficacité et tolérance à partir de leur propre expérience. Actuellement, ces pratiques sont limitées car les praticiens reconnaissent leur dangerosité. Cependant, l'absence d'AMM pour l'utilisation de nombreux médicaments en néonatalogie est à l'origine de grandes divergences dans leur prescription même s'il existe des guides de prescription pour ceux couramment prescrits [Thomson Reuters ; BMJ Group, 2009 ; Young T et Magnum B, 2009]. Ainsi, une grande variabilité de schémas posologiques, de doses et d'intervalles d'administration, persiste en absence d'études pharmacocinétiques conduites de manière adéquate chez le nouveau-né.

En conséquence, une étape importante dans le développement d'un médicament en néonatalogie est d'explorer son utilisation courante, à savoir ses indications et posologies. En cas de différences majeures dans les pratiques, il est également intéressant d'explorer les raisons de ces divergences. Ces enquêtes permettent d'identifier les questions cliniques que soulève l'utilisation d'un médicament. Les résultats de ces enquêtes guident la méthodologie des études cliniques qui seront nécessaires pour y répondre.

En néonatalogie, la mise en place de ce type d'enquêtes est souvent limitée par l'absence de définition commune des niveaux de soins néonataux. Des différences importantes existent entre les pays en termes de politiques de santé et de caractéristiques des maternités et des unités de soins néonataux. Des recommandations concernant la définition de trois niveaux de soins néonataux (niveaux I, II, III) ont été publiées aux Etats-Unis par l'Académie Américaine de Pédiatrie [Stark AR, 2004] mais la plupart des pays Européens suivent des

recommandations de définition nationales et parfois même régionales. Dans certains pays, il y a même une absence totale de définition officielle des niveaux de soins néonataux [Van Reempts P et al., 2007 ; Zeitlin J et al., 2004].

Cette réalité complique considérablement la mise en place des enquêtes sur l'usage d'un médicament. En effet, l'utilisation courante d'un médicament et l'évaluation de ses effets sont incontestablement influencées par le type de la population néonatale (nouveau-nés à terme, prématurés, grands prématurés, hypotrophes...) accueillie dans chaque unité et les moyens médicaux mis à disposition pour leur prise en charge. Ces informations déterminent le niveau de soins de l'unité. En absence de niveau défini ou en cas de différences notables dans sa définition, la sélection des centres invités à participer aux enquêtes sur l'utilisation d'un médicament est difficile. Lorsque cette sélection n'a pas lieu, la non participation de certaines unités est potentiellement expliquée par l'absence de prescription courante du médicament plutôt que par l'absence d'intérêt pour le sujet de l'enquête.

Le présent chapitre est dédié à l'étude des pratiques d'utilisation de deux médicaments anti-infectieux en néonatalogie : la ciprofloxacine et le fluconazole.

A. Pharmacologie de la ciprofloxacine

La ciprofloxacine est un antibiotique de synthèse qui appartient à la famille des quinolones de deuxième génération ou fluoroquinolones. La ciprofloxacine est un antibiotique à large spectre, habituellement efficace sur les bactéries Gram positif, Gram négatif, les germes atypiques (intracellulaires) et certains genres anaérobies. Elle inhibe l'ADN gyrase bactérienne, une enzyme de la famille des topoisomérases, nécessaire à la réplication de l'ADN de la bactérie. La pénétration de la molécule se fait essentiellement de façon passive via les pores hydrophiles de la membrane bactérienne (**Figure 5**). C'est à ce niveau surtout

que peut se développer un mécanisme de résistance avec un rejet actif de la molécule (**Figure 6**). La ciprofloxacine est disponible en formulations pour administration orale et parentérale.

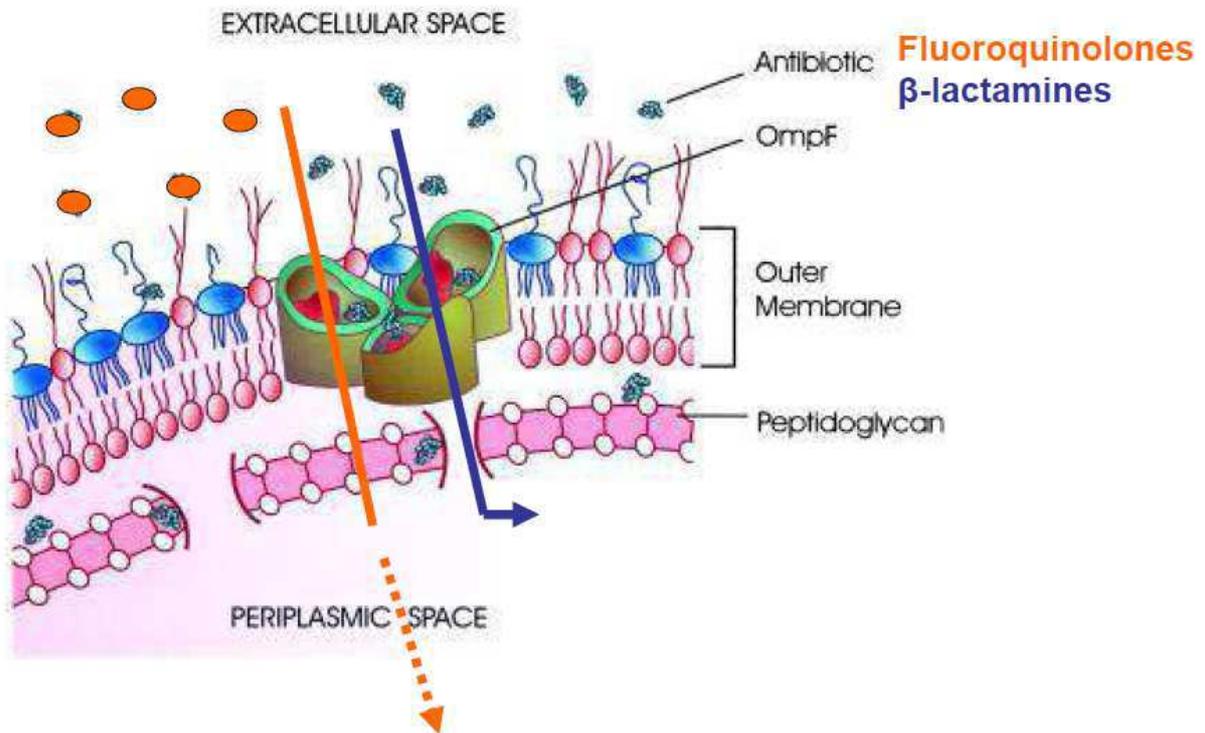


Figure 5. Entrée des fluoroquinolones dans la bactérie via les porines transmembranaires

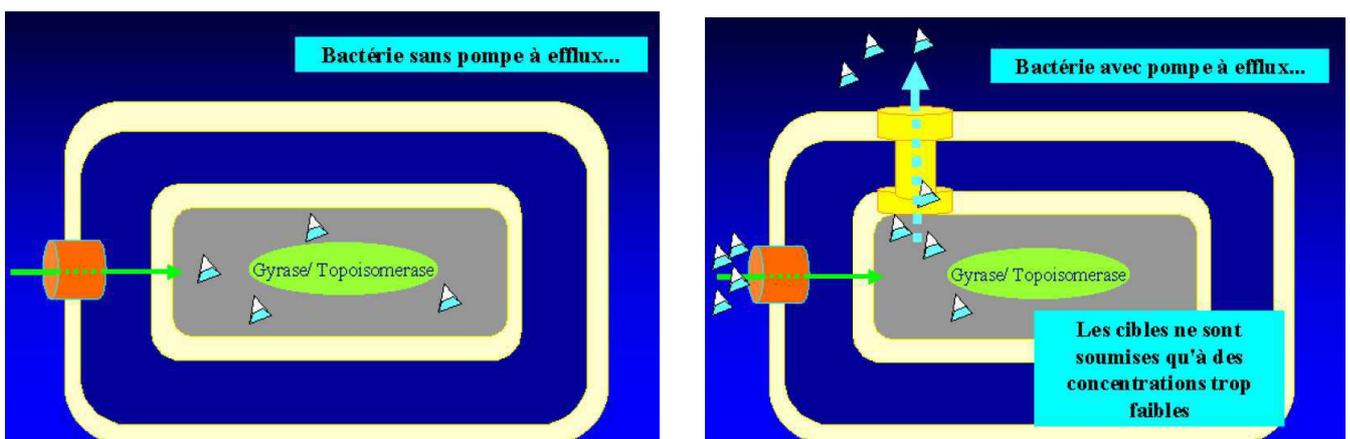


Figure 6. Resistance aux fluoroquinolones par mécanisme de rejet actif de la molécule (efflux).

Les fluoroquinolones sont des antibiotiques largement prescrits chez les adultes à cause de leur excellente pénétration dans les tissus ainsi que dans le liquide céphalorachidien (LCR) [Owens R et Ambrose P., 2000]. Les indications de la ciprofloxacine chez l'adulte incluent toutes les infections compliquées ou non, causées par des bactéries sensibles. Même si certaines études ont rapporté l'émergence des souches résistantes aux fluoroquinolones, ces antibiotiques restent efficaces contre approximativement 90% des organismes Gram négatif communautaires [Gendrel D et al., 2003]. L'utilisation de la ciprofloxacine chez l'enfant est limitée par le risque potentiel de toxicité au niveau du cartilage de croissance décrite chez des animaux juvéniles et aussi par le risque d'émergence de souches résistantes. Malgré ces préoccupations, la ciprofloxacine a souvent été utilisée en pédiatrie en prescription hors AMM (« *off-label use* ») et elle est la seule fluoroquinolone incluse dans la liste de l'Organisation Mondiale de la Santé concernant les médicaments essentiels chez l'enfant [WHO, 2009]. En néonatalogie son utilisation, bien que rare, est recommandée en cas d'infections mettant en jeu le pronostic vital, provoquées par des germes, principalement Gram négatif, multi-résistants mais sensibles à la ciprofloxacine.

B. Pharmacologie du fluconazole

Le fluconazole est un médicament antifongique de synthèse, apparenté à la famille des imidazolés. Son action antifongique s'exerce en inhibant une enzyme appartenant à la super-famille du cytochrome P-450 (14-déméthylase) entraînant la diminution de la synthèse de l'ergostérol, composant de la membrane cellulaire du champignon, indispensable à sa croissance (**Figure 7**). Trois mécanismes de résistance aux agents azolés ont été décrits : 1) diminution de l'affinité de l'enzyme cible aux agents azolés, 2) surproduction de l'enzyme cible et 3) modification de flux cellulaire du médicament [Rex J et al., 1995 ; Maebashi K et

al., 2001]. Le fluconazole a une très bonne biodisponibilité et une bonne pénétration tissulaire. Il est disponible en formulations pour administration orale et parentérale.

Chez les patients adultes, son utilisation pour le traitement des candidoses invasives a été limitée au profit de molécules azolées de deuxième génération comme le voriconazole, à cause de l'existence de souches de *Candida* résistantes [Pappas P et al., 2003]. En effet, certaines espèces de *Candida* comme les *C glabrata*, la deuxième souche la plus fréquente dans les infections adultes, sont constitutionnellement résistants au fluconazole. Chez le nouveau-né, les principales souches de *Candida* isolées sont les *C albicans* et *parapsilosis* et pour cette raison, le fluconazole est encore utilisé dans le traitement des infections fongiques [Aujard Y et al., 2003]. Toutefois, de plus en plus de souches résistantes au fluconazole ont été rapportées dernièrement dans des populations pédiatriques et néonatales [Odds F et al., 2004 ; Zaoutis T et al., 2005] et cela risque de modifier les choix du traitement.

Le fluconazole est utilisé en néonatalogie pour le traitement des infections fongiques suspectées ou confirmées, même si en cas d'infection confirmée, l'amphotéricine B reste pour certains, le traitement de première intention [Kaufman D, 2010a]. Cependant, l'indication principale du fluconazole est la prophylaxie des infections fongiques chez les nouveau-nés à haut risque. Cette pratique n'est pas suivie par tous les services de néonatalogie, car l'incidence de ces infections est très variable d'un centre à l'autre et la prophylaxie ne peut se discuter que dans les centres ayant des incidences élevées. Par ailleurs, aucune apparition significative de souches résistantes n'a été observée à ce jour suite à l'utilisation du fluconazole en prophylaxie [Kaufman D., 2010a ; Manzoni P et al., 2008]. Néanmoins, une étude a suggéré que l'utilisation large du fluconazole et la prescription de doses fortes de ce médicament, sont des facteurs favorisant l'apparition de souches résistantes dans les unités de réanimation néonatales [Sarvikivi E et al., 2005].

Azoles

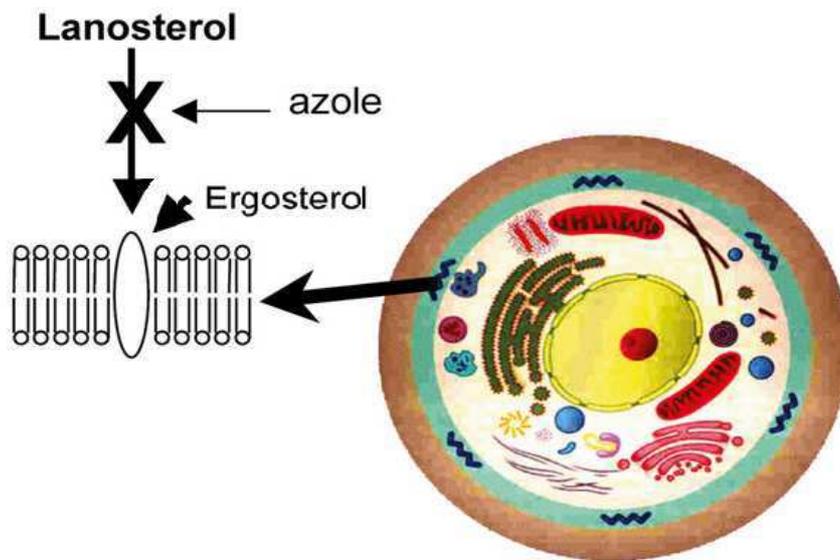


Figure 7. Cible des médicaments imidazolés. [Wiley JM., 2010]

C. Enquête Européenne sur l'utilisation de la ciprofloxacine et du fluconazole dans les unités de soins intensifs en néonatalogie.

“European survey on the use of prophylactic fluconazole in neonatal intensive care units” (article publié)

Kaguelidou F., Pandolfini C., Manzoni P., Choonara I., Bonati M., Jacqz-Aigrain E.

“Survey on sepsis treatment and its rationales in European neonatal intensive care units” (article soumis)

Pandolfini C., Kaguelidou F., Sequi M., Jacqz-Aigrain E., Choonara I., Turner M., Manzoni P., Bonati M.

1. Contexte – Objectifs

La ciprofloxacine et le fluconazole sont deux molécules prescrites hors AMM dans le cadre des infections néonatales. Le projet Européen TINN a pour objectif de mettre en place les études cliniques permettant de recueillir les données manquantes sur leur pharmacocinétique, leur efficacité et leur tolérance chez le nouveau-né à terme et prématuré, et de constituer un dossier de demande d'autorisation de mise sur le marché pour une indication pédiatrique (« PUMA »). Afin d'optimiser la méthodologie et la réalisation des études cliniques, une enquête Européenne auprès des unités de réanimation néonatale a été effectuée. Elle a permis d'évaluer l'utilisation actuelle de ces deux molécules et de préciser les facteurs qui l'influencent.

2. Méthodes

L'enquête a été réalisée auprès des médecins référents des différentes unités de soins intensifs néonataux en Europe. En absence de liste exhaustive, les unités ont été identifiées par l'intermédiaire des réseaux Européens et des sociétés nationales de pédiatrie ainsi que par les néonatalogistes experts collaborant dans le cadre du projet TINN. Les médecins référents ont été invité à participer par message électronique. L'enquête a été réalisée par le biais de questionnaires complétés en ligne. Outre les caractéristiques des unités et les modalités de prescription de la ciprofloxacine et du fluconazole, les néonatalogistes ont été interrogés sur les raisons qui déterminent l'utilisation ou non de ces deux molécules dans leur pratique.

3. Principaux Résultats

a) Fluconazole dans la prophylaxie des infections fongiques

Approximativement la moitié des néonatalogistes qui ont participé à l'enquête ont rapporté l'utilisation courante du fluconazole en prophylaxie dans leurs unités, particulièrement pour les nouveau-nés grands prématurés et ceux avec un petit poids de naissance extrême. Toutefois les modalités de prescription étaient très variables entre les différentes unités. La majorité des participants ont exprimé le besoin persistant de conduire des études cliniques permettant d'évaluer l'efficacité du fluconazole en prophylaxie et cela malgré cinq essais contrôlés randomisés versus placebo bien conduits ayant inclus un total de 656 nouveau-nés (2001-2007). Nos résultats montrent que les néonatalogistes qui ne prescrivent pas le fluconazole en prophylaxie, sont plus susceptibles d'être influencés dans leur pratique par 1) l'incidence des candidoses dans leur unité, 2) le risque d'émergence de souches résistantes au

fluconazole et 3) l'absence de recommandations par les sociétés pédiatriques internationales en faveur de cette prescription. Les futures études qui aborderont ces points vont certainement contribuer à l'utilisation optimale de la prophylaxie des infections fongiques néonatales.

b) Ciprofloxacine et fluconazole dans le traitement des infections néonatales

L'utilisation de la ciprofloxacine dans les unités de réanimation néonatale reste rare avec seulement 25% de prescripteurs parmi les participants. Les modalités de prescription sont hautement variables entre les unités. Les néonatalogistes qui utilisent la ciprofloxacine sont surtout influencés par sa bonne pénétration dans le LCR dans le cas d'atteintes neuro-méningées associées. Ceux qui ne prescrivent pas la ciprofloxacine, considèrent qu'il n'y a toujours pas de données fiables concernant sa pharmacocinétique et surtout sa tolérance chez le nouveau-né.

Par contre, le fluconazole est largement prescrit en cas de suspicion d'une infection fongique (70% des participants) même si les schémas posologiques varient considérablement entre les unités des pays différents ou d'un même pays. Des efforts d'harmonisation des modalités d'administration de ce médicament doivent être effectués.

Globalement, les participants ont reconnu le besoin d'études sur la tolérance de la ciprofloxacine et l'efficacité et la tolérance des agents antifongiques en général. Ils ont, pour la majorité d'entre eux, exprimé la volonté de participer à de telles études.

4. Conclusions

Cette enquête présente un certain nombre de limitations méthodologiques. Toutefois, elle a permis dans le cadre du projet TINN de :

- Documenter les différences dans les indications et les schémas d'administration de deux médicaments anti-infectieux
- Identifier certains facteurs pouvant expliquer ces différences
- Identifier des partenaires pour la conduite d'essais évaluant ces deux médicaments.

La construction d'une liste exhaustive des unités de soins intensifs néonataux en Europe se poursuit avec la collaboration des différentes sociétés savantes européennes de néonatalogie, dans l'objectif d'établir un réseau européen destiné à l'évaluation des pratiques et la conduite d'essais thérapeutiques.

RECUEILLIR ET ANALYSER LES
DONNEES DISPONIBLES

IV. RECUEILLIR ET ANALYSER LES DONNEES DISPONIBLES

Un des objectifs des législations en vigueur concernant le médicament pédiatrique est d'éviter la réalisation d'essais cliniques inutiles chez l'enfant. De ce fait, il est primordial de bien recueillir tous les informations disponibles sur l'usage d'un médicament dans une indication particulière avant de concevoir les études pédiatriques, surtout dans les populations les plus vulnérables comme les nouveau-nés. Cette démarche est importante car malgré un usage sans ou hors AMM, de nombreux médicaments disposeraient déjà des données pédiatriques adéquates. Réunir ces informations peut éventuellement permettre d'éviter des études cliniques inutiles [Tafari G et al., 2009].

A cause des importants changements physiologiques tout au long de l'enfance, plusieurs aspects majeurs du développement médicamenteux doivent être analysés pendant l'évaluation des données disponibles: 1) les données précliniques, 2) les pathologies étudiées, 3) les populations d'étude en précisant les groupes d'âge, 4) les critères de choix des doses, 5) le choix des critères de jugement de l'effet du médicament et 6) les données de tolérance et de sécurité [de Wildt S et Knibbe C, 2009]. Si les données disponibles sont insuffisantes ou inadéquates, il convient de définir précisément les étapes du développement du médicament dans la tranche d'âge d'intérêt, voire prévoir un développement complet, ce qui est fréquemment le cas pour les nouveau-nés.

Toutefois, même si les connaissances scientifiques antérieures sont jugées insuffisantes, elles apportent toujours des données importantes pour la compréhension des mécanismes d'action du médicament. Ces données antérieures, combinées à l'expérience clinique et aux nouvelles méthodes de pharmacologie clinique comme les méthodes de modélisation, permettent d'optimiser la planification et la réalisation des études pédiatriques et

éventuellement raccourcir les étapes du développement du médicament même en néonatalogie [Hoppu K., 2009 ; Hill S et al., 2008].

Plusieurs sources de données doivent être explorées afin de regrouper le plus d'informations disponibles sur les propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques du médicament : les données de la littérature scientifique publiée, les bases de données de l'industrie pharmaceutique et si possible les résultats d'études cliniques réalisées mais non publiées. Toutes les indications du médicament sont concernées, autorisées ou hors AMM, ainsi que toutes les tranches d'âge, adulte et pédiatriques.

Les travaux présentés ci-dessous réalisés dans le cadre du projet Européen TINN, illustrent la démarche à suivre lors de l'évaluation d'un médicament en néonatalogie. Ils concernent la revue des données existantes sur l'utilisation de la ciprofloxacine dans le cadre d'infections néonatales à germes Gram négatif. La même démarche a été adoptée pour recueillir les informations disponibles concernant l'utilisation du fluconazole dans le traitement et la prévention des infections néonatales fongiques.

A. Données de la littérature sur la maladie : exemple des infections néonatales à Gram négatif

Les infections néonatales à Gram négatif sont des infections graves en particulier pour la population des nouveau-nés de très petit poids de naissance [Shah S et al., 1999 ; Venkatesh M et Garcia-Prats J, 2008]. Dans les pays développés, ces bactéries sont à l'origine d'environ 50% des infections néonatales précoces [Stoll B et al., 2002b] et d'un tiers des infections tardives alors que dans les pays en voie de développement, elles constituent la principale cause d'infection néonatale [Zaidi A et al., 2009 ; Ahmed A et al., 2002 ; Joshi S et al., 2000]. Il existe également de plus en plus de données indiquant que les infections nosocomiales à

germes Gram négatif sont en forte augmentation [Gordon A et Isaacs D., 2004 ; Nambiar S et Singh N, 2002]. Actuellement, les germes Gram négatif les plus fréquemment isolés dans le contexte des infections néonatales sont l'*Escherichia coli*, et les germes du genre *Klebsiella* et *Pseudomonas* [Joshi S et al., 2000 ; Gordon A et Isaacs D., 2004].

Une infection néonatale tardive fulminante, soit létale en 48 heures, est dans la plupart des cas provoquée par un germe Gram négatif [Karlowicz M et al., 2000]. Le risque de séquelles neuro-développementales à long terme parmi les survivants est significativement plus élevé dans ce type d'infections surtout si l'infection est compliquée par une atteinte méningée [Pong A et Bradley J, 1999 ; Gaschignard J et al., 2011]. Par ailleurs, la mortalité de ces infections est significativement plus élevée que celle des infections dues à des germes Gram positif qu'elles soient précoces ou tardives [Stoll B et al., 2005 ; Karlowicz M et al., 2000 ; Gordon A et Isaacs D, 2006]. La mortalité globale des infections néonatales à Gram négatif est de 19% à 52% en fonction de l'organisme en cause (les infections à *Pseudomonas aeruginosa* sont généralement plus létales) et des facteurs liés à l'hôte (âge gestationnel et poids de naissance) [Benjamin D et al., 2004; Gordon A et Isaacs D, 2006].

Plusieurs études ont rapporté l'apparition croissante de résistances aux antibiotiques parmi les organismes Gram négatif et cela constitue une préoccupation clinique majeure [Joshi S et al., 2000 ; Aurangzeb B et Hameed A, 2003 ; Bizarro M et Gallanher P, 2007 ; Leibovitz E et al., 1997 ; Rahman S et al., 2002]. La prescription inappropriée et en aveugle d'antibiotiques à large spectre aux mamans hospitalisées dans des unités de grossesses à haut risque a augmenté le portage et la colonisation des nouveau-nés par des germes multi-résistants. Aussi, l'utilisation étendue et inappropriée des antibiotiques dans les unités de soins intensifs néonataux ont conduit à des taux importants de résistance à certains antibiotiques comme la pénicilline et les céphalosporines qui ont un rôle central dans la gestion des infections. Devant l'apparition croissante de germes Gram négatif multi-résistants,

il est impératif d'évaluer d'autres antibiotiques disponibles pour traiter ces infections néonatales particulièrement sévères.

B. Données de la littérature sur le médicament : exemple de la ciprofloxacine

1. Données chez l'animal

Les données existantes chez l'animal concernent principalement la tolérance aux fluoroquinolones, dont fait partie la ciprofloxacine.

Toxicité articulaire

Toutes les molécules de cette classe d'antibiotiques, des plus anciens aux dérivés les plus récents, ont induit des modifications sur le cartilage immature des articulations portantes. L'acide nalidixique est la quinolone ayant l'effet le plus marqué au niveau des articulations [Gough A et al., 1992]. Cependant, les effets articulaires des fluoroquinolones varient selon l'espèce animale en question. Par exemple, les chiens représentent l'espèce la plus sensible avec une dose de ciprofloxacine responsable de lésions au niveau du cartilage de seulement 30 mg/kg/jour alors qu'au moins 500 mg/kg/jour sont nécessaires pour obtenir le même effet chez le rat. Par ailleurs, cette toxicité cartilagineuse est totalement inexistante chez une espèce non précisée de singe même à des doses supérieures à 500 mg/kg/jour [Machida M et al., 1990]. En effet, la grande variabilité d'apparition de cet effet entre les espèces animales et les différences organiques observées entre les animaux et les humains peuvent expliquer le fait qu'il y a peu de cas de toxicité articulaire liée aux fluoroquinolones décrite chez l'enfant. Les principaux résultats des études animales sont les suivants :

- Chez des chiens juvéniles de race beagle (n=3) (**Figure 8**), la délivrance de 30 mg/kg/jour et 60mg/kg/jour en intraveineux de ciprofloxacine a provoqué des lésions au niveau du

cartilage articulaire chez tous les chiens. L'administration per os de 50mg/kg pendant sept jours de trois fluoroquinolones a provoquée des lésions plus significatives dans le groupe ayant reçu de la ciprofloxacine par rapport au groupe norfloxacin et garenoxacin [Nagai A et al., 2002].

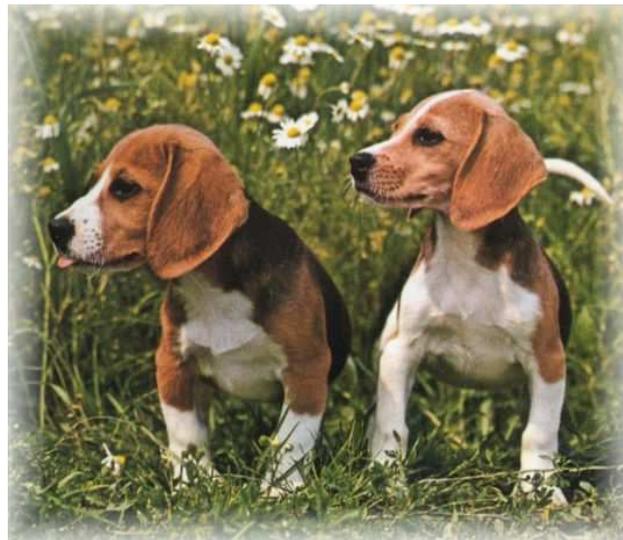


Figure 8. Chiens juvéniles de race beagle

- Quarante-huit chiens juvéniles de race beagle ont été traités pendant 2 semaines par la ciprofloxacine per os à des doses allant de 0 à 90mg/kg/jour. Les animaux ont été ensuite sacrifiés soit immédiatement après la fin du traitement soit 5 mois plus tard. Les doses de 30mg/kg/jour et de 90mg/kg/jour ont induit des lésions cartilagineuses de type ampoules et érosions (**Figure 9**) qui ont persisté tandis que les animaux grandissaient. Cette étude a aussi démontré que des doses de 10mg/kg /jour de ciprofloxacine n'ont pas provoqué des lésions au niveau du cartilage après un court traitement ni d'arthropathie lorsque les chiens étaient plus âgés [von Keutz E et al., 2004].

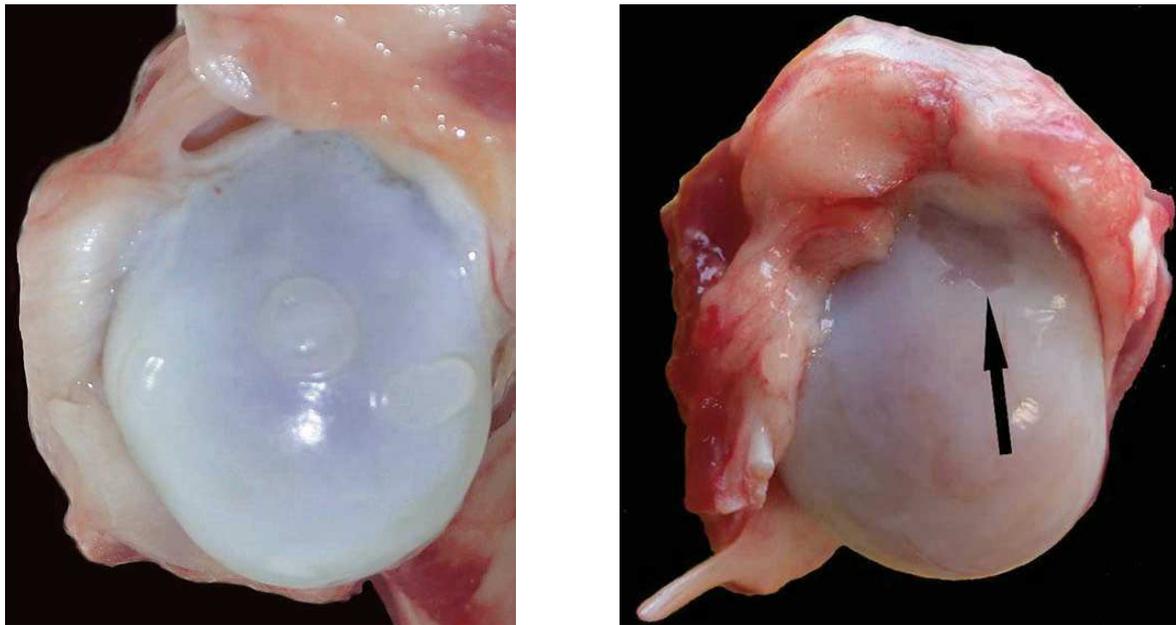


Figure 9. Tête humérale de chien juvénile de race beagle après traitement par ciprofloxacine 90mg/kg/jour pendant 2 semaines. Image de gauche : lésions du cartilage type ampoules observées immédiatement après la fin du traitement. Image de droite : lésions du cartilage type érosions observées 5 mois après la fin du traitement [von Keutz et al., 2004]

- Des souris juvéniles (âgées de 7 jours) ont reçu de la ciprofloxacine en sous-cutané, à une dose de 50 ou 200 mg/kg/jour pendant 7 ou 14 jours. L'examen histopathologique a montré des lésions variées avec perte de chondrocytes, dégénérescence de la matrice et érosions du cartilage articulaire chez les souris traitées par la ciprofloxacine à 200 mg/kg/jour [Linseman D et al., 1995].
- Des rats juvéniles (âgés de 4 semaines de vie) ont été traités par la ciprofloxacine à des doses de 400, 800 et 1200 mg/kg/jour pendant 7 jours. Le cartilage a été sévèrement atteint après traitement avec 800 ou 1200mg/kg/jour avec un œdème de la matrice et une

perte de chondrocytes. De plus, l'épaisseur du cartilage a été significativement réduite [Li P et al., 2004].

- La supplémentation diététique des rats juvénile Wistar avec du magnésium et de la vitamine E a été associée à une réduction de lésions cartilagineuses induites par les quinolones [Pfister K et al., 2007].

Toxicité tendineuse

L'existence d'une toxicité au niveau du tendon d'Achille a été comparée entre des groupes de rats juvéniles traités par différentes fluoroquinolones. La ciprofloxacine, la norfloxacine et la tosufloxacine n'ont présenté aucun effet toxique, même pour des doses aussi élevées que 900 mg/kg, contrairement à d'autres quinolones comme la perfloxacine et la fleroxacinine [Kashida Y et Kato M, 1997].

Toxicité du Système Nerveux Central

Les cultures d'astrocytes de rat en présence de concentrations croissantes de ciprofloxacine ont suggéré que des lésions au niveau de l'ADN cellulaire ont été provoquées par un mécanisme de stress oxydatif [Gurbay A et al., 2006]. D'autres études sur des cultures de cellules gliales de rats ont suggéré que la ciprofloxacine a une cytotoxicité probablement provoquée par un stress oxydatif [Gurbay A et al., 2007].

Photosensibilité

Des tests in vitro (destruction de l'histidine, destruction de macrophages péritonéaux de souris, inhibition de la synthèse d'ADN stimulée par la PHA (phytohémagglutinine) dans des lymphocytes humains) ont démontré que la ciprofloxacine a un potentiel de photosensibilisation [Ferguson J et al., 1990]. Sur des souris Swiss albino, toutes les fluoroquinolones y compris la ciprofloxacine avaient la capacité de renforcer la phototumorigénèse des rayons UVA [Klecak G et al., 1997].

Hépatotoxicité

Des rats femelles enceintes et albino de type *Wistar* ont été traitées pendant 10 jours par la ciprofloxacine par voie intra-péritonéale. Des modifications dégénératives au niveau du foie fœtal ont été observées, comparativement à des animaux contrôles ayant reçu un placebo [Channa M et Janjua M, 2003].

2. Données en pédiatrie

Indications - Efficacité

La ciprofloxacine est la seule fluoroquinolone actuellement autorisée chez l'enfant dans les indications suivantes: traitement des exacerbations pulmonaires dues au *Pseudomonas aeruginosa* chez les enfants âgés de 5 à 18 ans atteints de mucoviscidose, traitement en cas d'exposition au *Bacillus anthracis* pour réduire l'incidence ou la progression de la maladie (anthrax) et traitement de 2^{ème} ou 3^{ème} intention dans les infections urinaires et les pyélonéphrites compliquées dues à l'*Escherichia coli* (enfants de 1 à 18 ans). De plus, son utilisation est également autorisée dans certains pays Européens (Danemark, Suède et Finlande) pour la prophylaxie des infections à méningocoque.

Chez les patients atteints de mucoviscidose, plusieurs études ont démontré que la ciprofloxacine administrée par voie orale est au moins aussi efficace que des combinaisons standards d'antibiotiques administrés en intraveineux et que l'administration orale améliorerait nettement la qualité de vie des patients [Church D et al., 1997 ; Richard D et al., 1997 ; Rubio T., 1990 ; Rubio T et al., 1997]. Des essais cliniques sur l'utilisation de la ciprofloxacine dans les infections urinaires/pyélonéphrites compliquées et dans l'éradication du portage nasopharyngé de *Neisseria meningitidis* chez des enfants sont arrivés aux mêmes conclusions [Chysky V et al., 1991 ; Cuevas L et al., 1995 ; Koyle M et al., 2003].

La ciprofloxacine a également de nombreux avantages dans le traitement des infections gastro-intestinales. En effet, son absorption et sa concentration fécale ne sont pas modifiées en cas de diarrhée et ses concentrations biliaires sont élevées après administration orale, fait important dans le cas de portage de germes type *Salmonella* [Schaad U, 2005]. Des essais contrôlés randomisés et des études de cohortes qui ont inclut des nourrissons de 8 mois, ont montré que le traitement de la fièvre typhoïde par une cure brève de ciprofloxacine orale, particulièrement dans les infections à *Salmonella typhi* multi-résistantes, a une efficacité clinique plus élevée que celle d'un traitement par céphalosporines de troisième génération [Arora R et al., 1992 ; Bavdekar A et al., 1991 ; Dutta P. et al., 1993 ; Sen S et al., 1991 ; Wallace M et al., 1993 ; Cheesbrough J et al., 1991]. Les données d'efficacité et de tolérance générées par ces études sont jugées comme étant suffisantes pour l'indication des fluoroquinolones comme traitement de première intention de la fièvre typhoïde [Parry C et al., 2002]. De même, la ciprofloxacine a été extensivement évaluée dans le traitement des infections à *Shigella*, des diarrhées invasives aiguës et du cholera. Ces études (essentiellement des essais contrôlés randomisés) ont démontré l'efficacité de la ciprofloxacine et sa supériorité par rapport aux traitements antibiotiques standards chez des jeunes enfants âgés de un an [Leibovitz E et al., 2000 ; Saha D et al., 2005 ; Salam M et al., 1998 ; Ghosh G et al., 1995].

Enfin, l'utilisation de la ciprofloxacine a été étudiée dans le traitement ambulatoire des syndromes fébriles chez les enfants ayant un cancer [Paganini H et al., 2001 ; Mullen C et al., 1999 ; Paganini H et al., 2003 ; Petrilli A et al., 2000]. Bien que les résultats de ces études, pour la plupart des essais contrôlés randomisés, aient pu montrer un rapport bénéfice-risque positif même parmi les patients les plus jeunes (1-2 ans d'âge), l'utilisation de la ciprofloxacine orale dans cette indication reste controversée. Les préoccupations incluent la sensibilité moindre de la ciprofloxacine pour les germes Gram positif, première cause

d'infections dans ce groupe d'enfants, et le risque d'émergence de souches résistantes à cause d'une utilisation extensive de cet antibiotique [Aquino V et al., 2000 ; Mullen C, 2003].

Sécurité d'emploi

La fréquence exacte des effets indésirables de la ciprofloxacine chez l'enfant est difficile à estimer à cause du faible nombre d'études comparatives prospectives malgré le fait que cette molécule est la plus utilisée en pédiatrie de toute la classe des fluoroquinolones.

Effets indésirables musculo-articulaires

L'arthralgie et l'arthropathie sont des préoccupations majeures pour la sécurité d'emploi de la ciprofloxacine chez l'enfant. La toxicité cartilagineuse observée chez des animaux immatures a été la base de l'absence d'autorisation des fluoroquinolones chez l'enfant. Aussi, des arthralgies et des tendinopathies ont été observées chez les humains, enfants et adultes, après administration de fluoroquinolones [Leone F et al., 2003 ; Warren R.W., 1997]. Toutefois, une incertitude persiste sur la relation entre la toxicité cartilagineuse observée chez les animaux et les troubles tendineux observés chez les humains.

Des épisodes de tendinite et de rupture tendineuse ont été déjà décrits comme effets indésirables chez l'adulte surtout après utilisation de perfloxacine et d'ofloxacine [Hayem G et al., 1995 ; Chalumeau M et al., 2004]. Toutefois, la majorité des cas ont été observées chez des patients de plus de 60 ans et un traitement concomitant par corticostéroïdes a été considéré comme un facteur de risque. L'incidence de tels effets dans la population générale est très bas, en particulier chez l'enfant [van der Linden P et al., 1999 ; van der Linden P et al., 2002 ; Yee C et al., 2002 ; Khaliq Y et al., 2003].

Par ailleurs, la véritable incidence des complications articulaires est très difficile à estimer à cause de l'hétérogénéité des groupes de patients et des variations dans le potentiel de toxicité articulaire entre les différents antibiotiques de la même classe. Toutes les

fluoroquinolones sont considérées comme étant potentiellement arthrotoxiques mais la ciprofloxacine induit le moins de complications de ce type [Lipsky B et Baker C, 1999]. Plusieurs études rétrospectives sans groupe contrôle ont été réalisées sur données provenant de différents centres pédiatriques [Black A et al., 1990 ; Pertuiset E et al., 1989, Cheesbrough J et al., 1991 ; Rubio TT, 1990 ; Pariente-Khayat A et al., 1998] ou sur les données de l'industrie Bayer Pharma [Chysky V et al., 1991 ; Hampel B et al., 1997]. Ces études ne concernaient pas uniquement la ciprofloxacine. Les patients étaient atteints de mucoviscidose ou d'autres affections et seulement les études industrielles ont inclus de jeunes patients partir d'un an de vie. La médiane du taux d'événements indésirables articulaires décrits était de 2.5% (extrêmes : 1-9%). Ces événements concernaient principalement des adolescentes. L'atteinte était typiquement une arthralgie et un épanchement des genoux. L'évolution était toujours favorable.

Deux études ont été réalisées sur des grandes bases de données pour évaluer la tolérance des fluoroquinolones en pédiatrie. La première a porté sur 1565 patients de moins de 17 ans (seulement 5% atteint de mucoviscidose) ayant eu une prescription de ciprofloxacine par leur médecin de ville [Jick S, 1997]. Aucun des patients n'a été hospitalisé pour une atteinte articulaire dans les 45 jours ayant suivi le traitement. La deuxième étude [Yee C et al., 2002], a été réalisée sur 7897 enfants ayant reçu de la ciprofloxacine, de l'ofloxacine et de la levofloxacine. L'incidence des événements indésirables articulaires était de 2.1%. Cette incidence n'était pas statistiquement différente de celle observée dans le groupe témoins recevant de l'azithromycine.

Par ailleurs, une étude contrôlée, non randomisée a été réalisée : il s'agit d'une étude multicentrique hospitalière française [Chalumeau M et al., 2003]. Elle comparait les événements indésirables observés pendant et dans les 15 jours suivant un traitement par fluoroquinolones à ceux observés sous une autre antibiothérapie. Parmi les 276 patients

exposés aux fluoroquinolones, 20% ont présenté au moins un événement indésirable potentiel. Les événements indésirables musculo-squelettiques étaient significativement plus nombreux dans le groupe traité par fluoroquinolones par rapport au groupe témoin (3.8% vs 0.4%). Tous les événements indésirables musculo-squelettiques ont régressé sans séquelles. Cette étude a également permis de mettre en évidence des facteurs de risque significatifs de survenue d'événements indésirables lors d'un traitement par fluoroquinolones chez l'enfant : sexe féminin et âge supérieur à six ans. Enfin, l'incidence des événements indésirables articulaires étaient moins importante chez les patients atteints de mucoviscidose et chez ceux traités par ciprofloxacine par rapport à la perfloxacine.

Des anomalies articulaires ont été également rapportées dans une enquête basée sur questionnaire auprès de 3341 enfants qui avaient reçu de la ciprofloxacine pour une fièvre typhoïde entre 1990 et 1994 [Karande S et Kshirsagar N.A., 1996]. L'existence d'une arthropathie (arthralgies, restriction des mouvements articulaires et œdème articulaire) a été rapportée chez 20 enfants (âgés de 2 à 12 ans) et tous les épisodes ont été totalement réversibles. Cependant, l'apparition d'une arthropathie est possible chez 7 à 10% des patients atteints de mucoviscidose [Dixey J et al., 1988] et une arthrite réactionnelle à l'infection bactérienne peut survenir chez 7,3% des patients porteurs d'une salmonellose [Inham, R et al., 1988]. Ainsi, l'analyse des effets indésirables de la ciprofloxacine dans des populations spécifiques de malades paraît difficile car il n'est pas toujours facile de différencier les arthropathies liées à certaines pathologies de celles dues à une toxicité médicamenteuse.

Les résultats d'essais contrôlés randomisés sont tout aussi intéressants. Dans un essai en double insu comparant l'efficacité de la ceftriaxone par voie intramusculaire avec la ciprofloxacine par voie orale dans le traitement de diarrhées invasives chez 201 enfants âgés de 6 mois à 10 ans, les effets indésirables ont été plus nombreux dans le groupe traité par ciprofloxacine (OR : 3.2, IC95% :1-11) mais un seul épisode d'arthralgie a été rapporté dans

le groupe ciprofloxacine contre aucun dans le groupe ceftriaxone [Leibovitz E et al., 2000]. Dans un autre essai contrôlé randomisé chez des enfants présentant une aplasie fébrile, aucun épisode d'arthralgie n'a été rapporté ni dans le groupe ceftriaxone, ni dans le groupe ciprofloxacine [Petrili A et al., 2000]. De même, les résultats des essais effectués par des industriels chez des enfants âgés de 1 à 17 ans qui avaient reçu de la ciprofloxacine ou un antibiotique contrôle pour le traitement des infections urinaires compliquées ou de pyélonéphrite à *Escherichia coli*, ont démontré que le taux d'effets indésirables musculo-articulaires dans les 6 semaines suivant le traitement était de 9.3% (31/335) chez les patients du groupe ciprofloxacine et de 6% (21/349) chez les patients contrôles [EMA, 2006].

A ce jour, la majorité des effets indésirables musculo-articulaires associés à l'utilisation de la ciprofloxacine sont d'intensité modérée et sont transitoires. Des signes d'arthropathie, essentiellement des arthralgies, ont été essentiellement observés chez des patients atteints de mucoviscidose. De plus, la plupart des données recueillies sur l'arthrotoxicité des fluoroquinolones sont basées sur des plaintes de patients ou l'examen clinique articulaire. Il est ainsi difficile de faire la distinction entre des troubles articulaires coïncidents et une arthropathie induite par les fluoroquinolones. Peu d'études ont rapporté une évaluation à court ou long terme en utilisant des courbes de croissance, des échographies articulaires et/ou de l'imagerie par résonance magnétique. Par ailleurs, ces études manquent souvent de groupe contrôle.

Autres effets indésirables

Les effets indésirables les plus fréquemment rapportés suite à une utilisation de ciprofloxacine chez plus de 2000 patients pédiatriques dans des indications variées sont des effets gastro-intestinaux (4.9% ; nausées, vomissements, diarrhées), cutanés (3.3% ; rash cutané, prurit, urticaire) et neurologiques (2.2% ; vertiges, céphalées, anxiété, convulsions)

[Alghasham A.A. et Nahata M.C., 2000 ; Meropol S et al., 2008 ; Pariente-Khayat A et al., 1998 ; Aujard Y et Gendrel D, 1994]. Tous ces effets ont une intensité minime ou modérée et sont toujours réversibles. D'autres effets indésirables incluent une augmentation des transaminases hépatiques (1.7%) et une photosensibilité (0.4%) [Chysky V et al., 1991 ; Kubin R., 1993].

Globalement, le profil de toxicité de la ciprofloxacine chez les enfants est similaire à celui observé chez les patients adultes sauf en ce qui concerne les événements indésirables musculo-articulaires [Chysky V et al., 1991 ; Kubin R., 1993 ; Ball P et Tillotson G., 1995]. La surincidence de ces événements chez l'enfant doit faire recommander l'usage des fluroquinolones essentiellement en deuxième intention [Gendrel D et al., 2003 ; Chalumeau M et al., 2004].

Pharmacocinétique

Les paramètres pharmacocinétiques de la ciprofloxacine ont été déterminés chez des enfants atteints de mucoviscidose [Schaefer H et al., 1996]. La biodisponibilité est estimée à 61.6% et la clairance rénale à 11.4 L/h. La fixation aux protéines plasmatiques est de 34%, ce qui est proche des valeurs observées chez l'adulte. Selon les résultats de cette étude, un dosage de 20 à 28 mg/kg par voie orale en deux prises journalières est préconisé pour les enfants pesant entre 14 et 28 kg alors que pour ceux ayant un poids entre 28 et 42 kg, une dose de 15 à 20 mg/kg administrée par voie orale en deux prises journalières semble suffisante.

Les paramètres pharmacocinétiques de la ciprofloxacine après une administration orale unique ou à l'état d'équilibre ont également été évalués chez des enfants non atteints de mucoviscidose [Peltola H et al., 1998]. Dans un essai en ouvert, 16 enfants (âgés de 4 mois à 7.1 ans) ayant reçu de la ciprofloxacine (10 mg/kg) par voie orale trois fois par jour après

échec de leur antibiothérapie conventionnelle initiale, ont été inclus. Le pic des concentrations plasmatiques était atteint après 1 heure, les concentrations moyennes variaient entre 1.7 et 3.6 mg/L et étaient comparables à celles obtenues suite à une administration unique ou à l'état d'équilibre. La clairance moyenne était plus faible chez les enfants de moins de six ans par rapport aux enfants de plus de six ans. Les demi-vies d'élimination, avec une variance minimale (4.2 à 5.1 heure), suggéraient que les recommandations posologiques basées sur le poids étaient pertinentes et acceptables. Aucune arthropathie n'a été observée pendant cet essai.

Enfin, deux études ont évalué les paramètres pharmacocinétiques de population de la ciprofloxacine chez l'enfant [Payen S et al., 2003 ; Rajagopalan P et Gastonguay M, 2003]. Ces études ont montré que la variabilité interindividuelle de la clairance était partiellement expliquée par l'âge, le poids et l'état clinique des patients. Par ailleurs, une relation significative a été mise en évidence entre le poids des enfants et le volume initial de distribution.

3. Données chez l'adulte

La ciprofloxacine est utilisée dans des indications nombreuses et variées chez l'adulte. Il y a des données suffisantes et appropriées pour appuyer son efficacité dans le traitement d'infections sévères [Daly J et al., 1989 ; Bouza E et al., 1989 ; Gibert C et al., 1990]. Les données de tolérance chez l'adulte constituent une population de référence pour identifier un excès d'événements indésirables chez l'enfant. Toutes les informations disponibles proviennent d'essais de phase II, III et IV effectués par l'industrie pharmaceutique (Bayer Pharma) et ayant inclus plusieurs milliers de patients [Ball P et Tillotson G., 1995 ; Rahm V et Schacht P., 1989 ; Schacht P et al., 1989]. Ces essais indiquent que les taux d'effets

indésirables chez les enfants et chez les adultes sont similaires. De plus, leur distribution anatomique est également similaire à l'exception des effets indésirables musculo-squelettiques, tendineux et articulaires. La fréquence des effets articulaire varie selon l'antibiotique prescrit mais surtout avec l'âge ; tous les essais ont rapportés des taux de 0.1% pour les adultes et de 2-3% chez les enfants.

Par ailleurs, les paramètres pharmacocinétiques de la ciprofloxacine chez les patients adultes ont été extensivement étudiés. Le profil pharmacocinétique de la ciprofloxacine est résumé dans le **Tableau 1**.

Pharmacokinetic Parameter	Value
Elimination half-life (h)	4.16
Oral bioavailability	70-80%
Maximum drug concentration in plasma (mg/L)	0.56
Area under the curve ($\mu\text{g h/mL}$)	2.56
Primary route of excretion	Renal
Time to peak (h)	1.1
Plasma protein binding (%)	20-40%
Renal clearance (L/h)	21.4
Disposition (% of dose)	
Renal	40-60
Fecal/biliary	15
Metabolized	10-15

Tableau 1. Paramètres pharmacocinétiques de la ciprofloxacine [Sharma P et al., 2010].

4. Données chez le nouveau-né

“Ciprofloxacin Use in Neonates: a Systematic Review of the Literature” (article publié)

Kaguelidou F., Turner M., Choonara I., Jacqz-Aigrain E.

“Safety of ciprofloxacin in neonates with sepsis” (article publié)

Bonati M, Pandolfini C, Kaguelidou F, Jacqz-Aigrain E, Turner M, Choonara I.

Les données disponibles dans la littérature actuelle, bien que informatives, sont insuffisantes pour appuyer la prescription optimale de la ciprofloxacin dans le cadre des infections néonatales. Aucun essai contrôlé randomisé n’a été identifié par notre revue exhaustive et la plupart des études disponibles étaient de faible qualité avec un niveau de preuve bas. Des études pharmacocinétiques (PK) et pharmacocinétiques/pharmacodynamiques (PK/PD) supplémentaires et bien conduites restent nécessaires afin d’établir des recommandations posologiques appropriées. Même si les données d’efficacité peuvent être extrapolées par l’utilisation de cet antibiotique chez des enfants plus âgés et chez l’adulte, des données de tolérance à court et long terme restent indispensables. Ces études doivent se concentrer sur la tolérance articulaire et la toxicité neuro-développementale en utilisant des critères de jugement validés. Malheureusement, il n’existe actuellement aucun critère validé pour l’évaluation de l’état ostéo-articulaire chez le nouveau-né. L’identification des critères de jugement d’efficacité et de tolérance appropriés et la détermination de la manière dont ceux-ci devront être évalués, demeurent nécessaires.

PREDIRE ET EXTRAPOLER
L'EFFICACITE ET LA TOLERANCE
POTENTIELLE

V. PREDIRE ET EXTRAPOLER L'EFFICACITE ET LA TOLERANCE POTENTIELLE

Plusieurs facteurs physiologiques, métaboliques, pharmacocinétiques et comportementaux peuvent rendre les enfants plus ou moins sensibles que les adultes aux effets des médicaments. Les systèmes organiques qui présentent un développement significatif en période postnatale sont particulièrement exposés au risque de toxicité médicamenteuse comme le système nerveux central par exemple [Rice D et Barone S, 2000]. Certains de ces effets âge-dépendants peuvent être prédits par les connaissances existantes sur les changements que subissent les voies du métabolisme des médicaments durant l'enfance, alors que d'autres sont imprévisibles. Par exemple, l'administration d'acide acétylsalicylique n'est pas recommandée chez les enfants présentant une varicelle ou une fièvre due à un virus grippal car elle peut favoriser la survenue d'un syndrome de Reye, complication qui n'est pas connue chez l'adulte [Belay E et al., 1999]. Depuis la mise en place des nouvelles législations concernant les médicaments à usage pédiatrique en Europe et aux Etats-Unis, un intérêt croissant est porté sur l'apport potentiel des études d'animaux juvéniles comme modèles de développement médicamenteux pédiatrique.

A. Modèles animaux de toxicité

1. Généralités

L'objectif des essais menés chez l'animal est de démontrer l'activité biologique du médicament sur la maladie cible, de fournir des données de toxicologie et de tolérance ainsi que des données pharmacocinétiques (PK) et pharmacodynamiques (PD) utiles pour définir

l'intervalle des doses à tester chez l'homme. Puisque les animaux juvéniles présentent généralement des caractéristiques de développement organique et métabolique similaires à celles des enfants, ils peuvent être considérés comme des modèles appropriés pour évaluer l'action et la pharmacocinétique des médicaments dans cette population.

Ces études permettent potentiellement l'identification des signaux toxicologiques qui n'ont pas été préalablement décrits chez des animaux ou des humains adultes, mais aussi celle de nouveaux biomarqueurs qui pourraient être utilisés pour l'évaluation clinique. Elles peuvent aussi aider à mettre en évidence des toxicités médicamenteuses spécifiques d'un système organique immature en plein développement postnatal ainsi que des éventuelles différences de toxicité selon le stade de cette maturation et donc l'âge de l'enfant. L'identification des effets indésirables irréversibles est particulièrement importante ainsi que celle des facteurs de risque ou de prévention de la survenue de ces événements. Comme la maturation de la plupart des espèces animales est chronologiquement plus rapide que celle de l'homme, les études animales peuvent également apprécier la présence à l'âge adulte d'éventuelles conséquences liées à une administration médicamenteuse durant l'enfance [De Schaepdrijver L et al., 2008]. Enfin, les études de toxicité sur animaux juvéniles ont également un rôle important dans la définition du risque de toxicité pour les patients pédiatriques lorsque ce risque ne peut pas être correctement quantifié chez l'humain pour des raisons de sécurité, d'éthique ou encore des raisons pratiques [Capon G et al., 2009].

Contrairement aux études animales standards sur la reproduction qui doivent être incluses dans tous les dossiers de demande d'autorisation des médicaments et réalisées selon des schémas d'étude bien définis, l'utilité et la conception des études de toxicité sur animaux juvéniles sont encore en cours de définition. Ce processus exige une interaction et une collaboration entre les différents acteurs de la recherche pédiatrique pour établir quand, pourquoi et comment ces études doivent être effectuées [Silva-Lima B et al., 2010]. Selon les

recommandations réglementaires actuelles [ICH, 2008 ; EMA, 2008 ; FDA, 2006], ces études sur animaux juvéniles doivent être considérées lorsque les études antérieures chez l'animal et chez l'humain adulte sont jugées insuffisantes pour autoriser la réalisation d'études pédiatriques avec une sécurité suffisante. Egalement, si une exposition prolongée à un médicament est prévue chez l'enfant, les études chez les animaux juvéniles sont recommandées afin d'anticiper une éventuelle toxicité à long terme. Enfin, lorsque l'utilisation d'un médicament chez l'adulte a révélé une toxicité spécifique d'organe ou de tissu qui subissent une maturation postnatale significative, ou lorsque des effets indésirables ont été rapportés pendant l'utilisation hors AMM d'un médicament en pédiatrie, ces études animales doivent être discutées et conduites avant la réalisation des études cliniques pédiatriques.

Actuellement, l'utilité, le calendrier et les modalités de réalisation des études sur animaux juvéniles sont déterminés au cas par cas. Plusieurs éléments doivent être pris en considération : 1) l'usage prévu ou probable du médicament chez l'enfant ; 2) le moment (« *timing* ») prévu d'exposition au médicament par rapport aux stades de croissance et de développement de la population pédiatrique et des animaux juvéniles ; 3) les éventuelles différences de profils pharmacologiques et toxicologiques entre les systèmes organiques matures et immatures ; 4) les différences temporelles établies entre la maturation des animaux juvéniles et celle de la population pédiatrique [FDA, 2006]. Enfin, si une utilisation du médicament est prévue chez les nouveau-nés et les nourrissons, ces études animales sont fortement recommandées car l'extrapolation à ces populations des effets du médicament observés sur un organisme mature (animaux et humains) semble rarement appropriée. Cependant, la méthodologie de ces études sur animaux juvéniles présente plusieurs challenges, portant notamment sur le choix des modèles animaux, la taille de l'échantillon d'étude, les voies d'administrations, les posologies à évaluer et les critères de jugement pertinents.

A l'inverse, il existe des situations où la mise en place de ces études sera peu informative et pourra même prolonger inutilement le développement du médicament chez l'enfant. Par exemple, les études sur animaux juvéniles ne sont pas nécessaires lorsqu'il existe des données cliniques adéquates qui n'ont pas mis en évidence un risque particulier de toxicité et si aucune toxicité spécifique d'un organe n'est à prévoir car cet organe a déjà une fonction mature dans la population pédiatrique cible.

Parmi les 226 médicaments ayant obtenu une AMM de l'Agence Européenne du Médicament (EMA) pendant la période 1995-2005, 72 (31.9%) ont inclus une information concernant la population pédiatrique dans leur RCP, soit une indication soit une recommandation d'utilisation dans cette population [Duarte D et Silva-Lima B, 2011]. Vingt-deux (9.7%) des 72 produits avaient été préalablement explorés au cours d'études sur animaux juvéniles. Dans la majorité des cas, seulement une étude avait été réalisée (64%), l'espèce choisie était le rat (58%) et les produits avaient été autorisés pour une utilisation chez l'enfant de plus de deux ans (68.2%). Parmi les huit produits pour lesquels plus d'une étude sur animaux juvéniles avait été réalisée, 50% (4/8) étaient évalués sur une deuxième espèce animale, la combinaison d'espèces le plus souvent décrite étant le rat et le chien.

Cependant, le nombre d'études sur animaux juvéniles prévu dans le développement des médicaments en pédiatrie est en train d'augmenter. Pendant la période 2007-2009, parmi les 205 PIPs validés par l'EMA, 50 (24.3%) prévoyaient la réalisation d'études sur animaux juvéniles dont 54% (27/50) prévoyaient plus d'une étude de ce type. L'espèce la plus souvent sélectionnée reste le rat juvénile mais un nombre non négligeable de PIPs (12.6%) ne donne pas d'information concernant le(s) espèce(s) choisie(s). Toutefois, malgré l'augmentation du nombre total d'études sur animaux juvéniles, peu de PIPs prévoient des études sur plus d'une espèce animale (8%). Globalement, les études sur animaux juvéniles sont plus fréquemment incluses dans le plan de développement des médicaments à usage pédiatrique et elles sont

probablement mieux planifiées et encadrées qu'auparavant [Silva-Lima B et al., 2010 ; Duarte D et Silva-Lima B, 2011].

2. Etudes sur animaux juvéniles dans le cadre de l'évaluation de la ciprofloxacine chez le nouveau-né

Selon les résultats de la revue de la littérature, les données concernant l'utilisation de la ciprofloxacine et surtout sa sécurité d'emploi chez le nouveau-né sont limitées. Par conséquent, le PIP qui a été proposé à l'Agence Européenne du Médicament (EMA) dans le cadre du projet TINN, incluait aussi des études sur animaux juvéniles visant à étudier la tolérance de la ciprofloxacine sur des organismes immatures.

Les études animales ont été réalisées chez des souriceaux de type *Swiss* par le laboratoire *Phenopups*, spécialisé dans les études précliniques sur animaux juvéniles [<http://www.phenopups.com>].

Dans un premier temps, 230 souriceaux ont été inclus dans une étude de pharmacocinétique de la ciprofloxacine dans le but de vérifier l'exposition (taux plasmatiques) des animaux au médicament. La ciprofloxacine a été administrée à la dose de 10 ou 100 mg/kg/jour par une injection unique sous-cutanée pendant 10 jours (du 2^{ème} jour au 12^{ème} jour de vie). Six temps de prélèvements ont été définis : 30 min et 23 heures après l'administration à J1, 23 heures après les administrations à J5 et J10, et 30 min et 23 heures après l'administration à J11. A chaque temps, cinq échantillons étaient effectués nécessitant chacun le sacrifice de trois à cinq souriceaux pour obtenir un volume de sang suffisant pour le dosage plasmatique de médicament. L'analyse des résultats a permis de définir l'exposition des animaux à la ciprofloxacine et d'étudier les concentrations maximale et minimale après administration ainsi que l'aire sous la courbe (AUC).

Dans un deuxième temps et en tenant compte de la toxicité de la ciprofloxacine chez les animaux adultes et les humains, trois effets indésirables potentiels ont été évalués chez les animaux juvéniles : la neurotoxicité, la toxicité ostéo-cartilagineuse et l'hépatotoxicité. La neurotoxicité potentielle a été étudiée en employant des méthodes reconnues d'évaluation des fonctions cognitives, vitales et du développement psychomoteur des souriceaux, complétées par une analyse histologique cérébrale. L'appréciation de la toxicité ostéo-cartilagineuse a nécessité le recueil du cartilage de plusieurs articulations (genou, coude, pieds). Ces prélèvements complexes d'os et de cartilage ont permis la réalisation de radiographies et l'analyse histologique fine des cartilages de croissance. L'hépatotoxicité a été appréciée par des dosages plasmatiques des biomarqueurs hépatiques (bilirubine, transaminases, phosphatase alcaline et gamma-glutamyl transpeptidase) ainsi que par l'analyse histologique des biopsies hépatiques. La possibilité d'une tumorigenèse au niveau de la peau après exposition aux UVA liée à l'administration de la ciprofloxacine, n'a pas été explorée car les lampes utilisées pour la photothérapie des nouveau-nés ictériques sont toutes équipées de filtre UV ou LED et leur pic d'émission est beaucoup plus élevé que celui des rayons UVA.

Un total de 360 souriceaux a été inclus pour l'appréciation des potentiels effets indésirables. Chaque groupe de 30 animaux était assigné à une dose de ciprofloxacine (0, 10, 30 et 100 mg/kg/jour) pendant 10 jours (du 2^{ème} jour au 12^{ème} jour de vie) et à une catégorie de test (physiologique, psychomoteur, cognitive). Les tests ont été conduits à 4, 9 et 14 jours de vie. Le poids et l'état général de santé des souriceaux était suivi tous les jours de la naissance jusqu'à 14 jours de vie. Le prélèvement du cerveau et des cartilages des animaux était réalisé à 14 jours (15 animaux/dose) et 60 jours de vie (15 animaux/dose). Les prélèvements sanguins ainsi que ceux du tissu hépatique étaient effectués à 14 jours de vie (15 animaux/dose). Les évaluations à 14 et 60 jours de vie permettaient de mettre en évidence une

éventuelle toxicité de la ciprofloxacine à la fin du traitement ainsi que l'existence de séquelles à l'âge adulte.

Les résultats des études de pharmacocinétique et de toxicité, sur animaux juvéniles, sont actuellement en cours d'analyse et d'interprétation.

B. Analyse des données humaines de pharmacocinétique, efficacité et toxicité

Un des principaux objectifs des réglementations internationales concernant le développement du médicament à usage pédiatrique est d'éviter la réalisation d'essais pédiatriques inutiles. Pour la plupart des médicaments déjà sur le marché, il existe de nombreuses données concernant leur usage chez l'adulte et parfois chez l'enfant dans les groupes les plus âgés : paramètres pharmacocinétiques et pharmacodynamiques, efficacité et sécurité d'emploi. Il convient ainsi de réfléchir au cas par cas sur la possibilité d'extrapolation d'une partie de ces données au nouveau-né.

Dans l'objectif d'analyser les données disponibles, un arbre décisionnel a été élaboré par la FDA [FDA, 2003] et validé par l'EMA [EMA, 2004b] permettant de définir les études nécessaires chez l'enfant pour valider l'utilisation pédiatrique. Cet arbre décisionnel considère l'histoire naturelle et l'évolution de la pathologie chez l'enfant et l'adulte ainsi que les caractéristiques pharmacologiques du médicament en question (**Figure 10**).

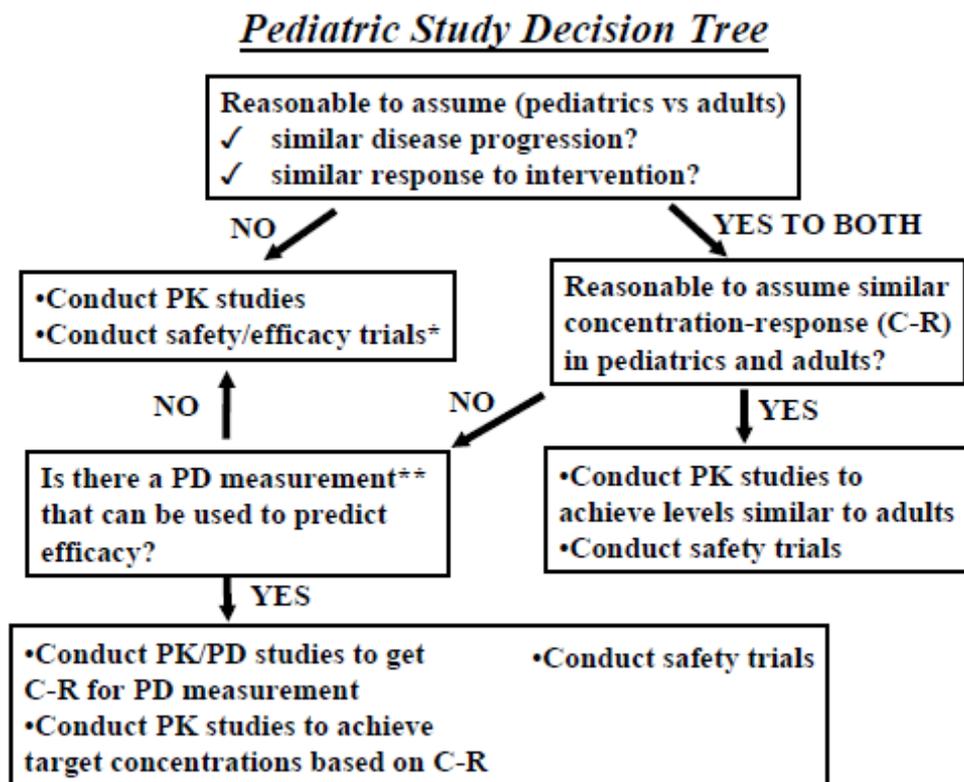


Figure 10. Arbre décisionnel des études pédiatriques [FDA, 2003]

Ce processus décisionnel s’articule autour de la définition d’une progression similaire de la maladie (« *similar disease progression* ») entre enfant et adulte et celle d’une relation concentration-réponse similaire (« *similar concentration-response* »). Pour la majorité des pathologies et des médicaments, cette décision est souvent une question de consensus entre experts.

Généralement, à cause des différences pharmacocinétiques liées à la croissance et à la variabilité de la maturation organique observées durant l’enfance, des études pharmacocinétiques ainsi que des études de toxicité dans les différents groupes d’âge pédiatrique d’intérêt doivent toujours être réalisées. De plus, si une pathologie est spécifiquement pédiatrique ou lorsque des différences importantes sont à prévoir entre les

adultes et les enfants quant à son évolution et la réponse au traitement, des essais cliniques évaluant l'efficacité du médicament sont également nécessaires chez l'enfant. En revanche, si le médicament est déjà utilisé chez les adultes ou des enfants plus âgés dans les mêmes indications et si l'évolution de la maladie et la réponse au traitement sont supposées être similaires, l'efficacité du médicament peut être extrapolée à partir des données adultes ou pédiatriques disponibles. Toutefois, une approche d'évaluation basée uniquement sur des études pharmacocinétiques est jugée insuffisante pour les médicaments pour lesquels la relation concentration-réponse n'est pas correctement établie ou si celle-ci risque d'être différente entre les enfants et les adultes. Dans ce cas, il est possible de mesurer un paramètre pharmacodynamique corrélé à l'efficacité clinique afin d'établir les doses et les concentrations nécessaires pour obtenir l'effet pharmacodynamique souhaité (études pharmacocinétiques/pharmacodynamiques). En absence d'un tel paramètre, il convient d'effectuer des essais cliniques d'efficacité propre à la classe d'âge concernée par la future utilisation.

Cet arbre décisionnel a déjà été utilisé dans l'évaluation de certains médicaments en pédiatrie. L'expérience a montré que les nouveau-nés et les nourrissons appartiennent à des groupes pédiatriques où l'extrapolation de l'efficacité démontrée chez l'adulte ou chez l'enfant plus âgé est souvent difficile à justifier. Cela est principalement lié aux changements rapides dans le développement et la maturation organique observés dans ces groupes d'âge. De même, l'extrapolation des effets des médicaments agissant sur le système immunitaire et le système nerveux central en développement doit être particulièrement prudente.

DETERMINER LA DOSE ADEQUATE

VI. DETERMINER LA DOSE ADEQUATE

Les paramètres pharmacocinétiques sont déterminés très tôt au cours du développement des médicaments car ils permettent de définir leurs modalités d'administration, notamment les voies d'administration et les posologies. Les difficultés liées aux prélèvements de sang, principalement chez le petit enfant, ainsi que l'application de la loi portant sur la protection des personnes (en particulier le recueil du consentement des deux parents) compliquent la mise en place des études pharmacocinétiques (PK), qui sont le plus souvent sans bénéfice individuel direct. Dans le cadre de ces protocoles, toutes les mesures doivent être prises pour réduire le caractère douloureux, le nombre et le volume de prélèvements.

Pour des raisons éthiques, ces études sont réalisées en pédiatrie uniquement chez des patients ayant une pathologie justifiant l'administration du médicament et jamais chez des volontaires sains. Ceci peut conduire à une plus grande variabilité interindividuelle mais en général elle reflète mieux l'utilisation clinique courante du médicament. Par ailleurs, les études de bioéquivalence de formulations destinées à l'enfant sont faites généralement chez l'adulte.

A. Etudes pharmacocinétiques/pharmacodynamiques et outils d'analyse

Les études pharmacocinétiques décrivent les quatre phases « ADME » du devenir des médicaments dans l'organisme : Absorption, Distribution, Métabolisme, Excrétion. Elles permettent d'établir une relation mathématique entre les posologies administrées, les concentrations (le plus souvent veineuses) en médicament obtenues et leur variation dans le temps. Les études pharmacodynamiques ont pour objet l'étude de l'action exercée par le médicament sur l'organisme et permettent de relier les concentrations à la réponse

pharmacologique (**Figure 11**). La réponse pharmacologique peut être un critère intermédiaire (ex. la normalisation de la température corporelle) ou final d'efficacité (ex. la mortalité) ou de toxicité (ex. toxicité rénale tubulaire).

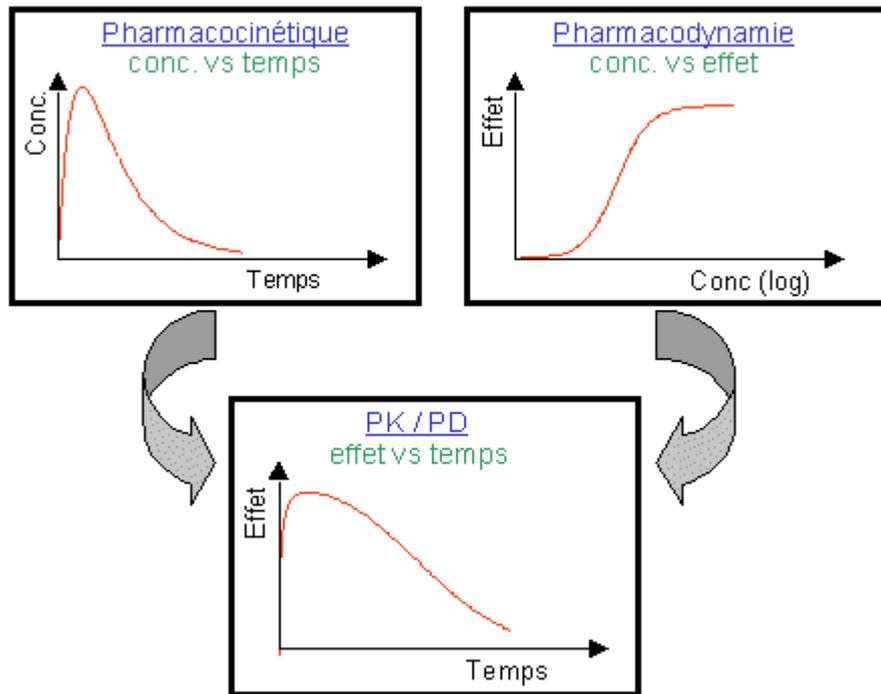


Figure 11. Pharmacocinétique : courbes concentrations-temps ; Pharmacodynamie : courbes concentrations - effets ; Pharmacocinétique/ Pharmacodynamique (PK/PD) : courbes effets-temps.

Les études de modélisation pharmacocinétiques/pharmacodynamiques (PK/PD) permettent le couplage d'un modèle pharmacocinétique (PK) à un modèle pharmacodynamique (PD) pour prédire l'évolution des effets en fonction des doses et du temps [Holford N et Sheiner L, 1981]. En général, les études PK/PD sont réalisées dans le but de : 1) déterminer les paramètres pharmacocinétiques dans les différentes classes d'âge, 2)

établir les recommandations posologiques, 3) étudier la relation concentration-réponse lorsqu'elle peut différer de celle de l'adulte.

Les études pharmacocinétiques sont de deux types [Belissant E et al., 1998] : les études pharmacocinétiques conventionnelles (dites « riches ») et les études pharmacocinétiques de population [Le Guellec C et al., 2001].

Les *études pharmacocinétiques conventionnelles* sont réalisées sur un petit nombre de sujets (6 à 12) qui forment habituellement un groupe d'étude homogène. Après administration du médicament, plusieurs prélèvements sanguins sont nécessaires (8 à 12 chez l'adulte) pour obtenir une description de l'évolution des concentrations dans le temps. Ces études permettent l'estimation des paramètres pharmacocinétiques individuels standards (aire sous la courbe [AUC], clairance [CL], volume de distribution [V] et constante d'absorption [Ka]) qui sont ainsi valables seulement pour le groupe d'individus étudié (**Figure 12**). Ces paramètres sont habituellement exprimés en moyenne et déviation standard. Du fait du nombre de prélèvements nécessaires, ces études sont souvent difficiles à mener en pédiatrie et sont quasiment impossibles à réaliser en période néonatale car trop invasives.

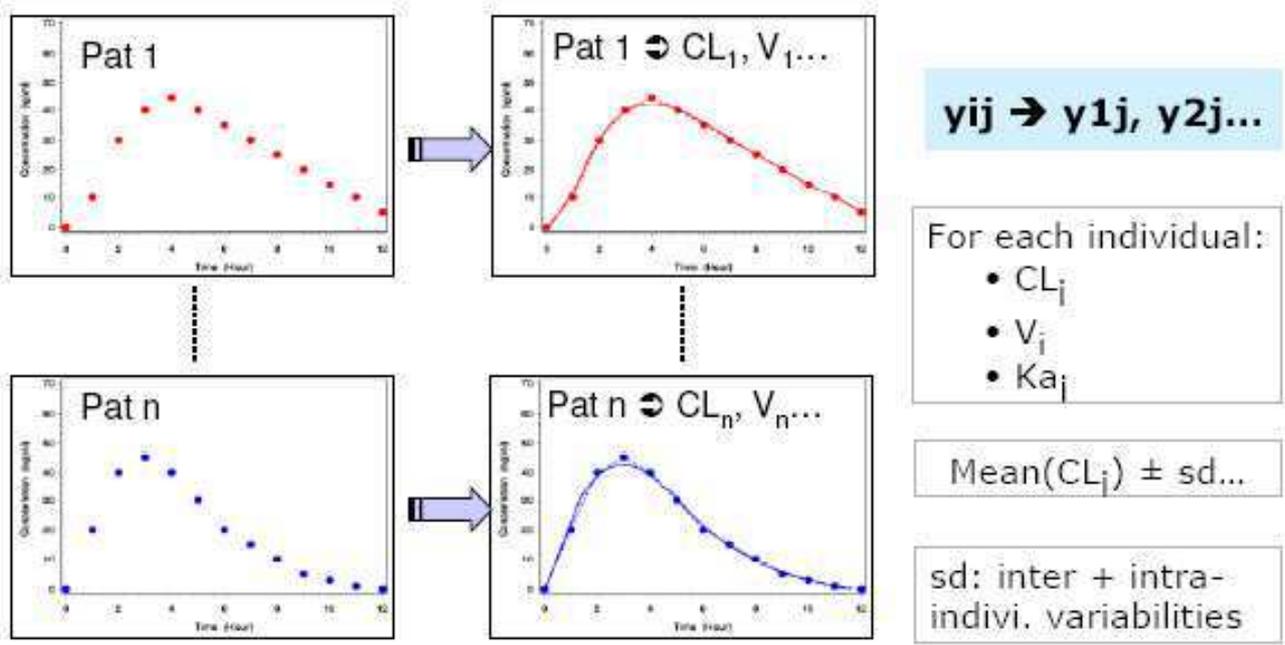


Figure 12. Etudes pharmacocinétiques conventionnelles : courbes concentration-temps permettant la détermination des paramètres PK individuels.

Y_{ij} : mesure de la concentration du sujet i au temps j ; CL_i = clairance de l'individu i ; V_i = volume de distribution de l'individu i ; Ka_i = constante d'absorption de l'individu i ; $\text{Mean}(CL_i)$ = moyenne des clairances individuelles du médicament ; sd = déviation standard [Cours Dr. Le Guellec C, Master Recherche Pharmacologie Pédiatrique, année 2007-2008].

Les *études pharmacocinétiques de population* (POP-PK) utilisent des techniques statistiques d'analyse de données par modélisation. Elles rendent possible l'étude d'un groupe hétérogène de patients et nécessitent l'obtention d'une ou de seulement quelques mesures de concentration par sujet. Ces mesures ne doivent pas obligatoirement être effectuées au même moment pour tous les patients. Toutefois, un nombre de patients plus important (>20 sujets) que celui des études conventionnelles est souvent nécessaire. Les études POP-PK estiment les paramètres pharmacocinétiques typiques d'un ensemble d'individus. De plus, elles étudient la variabilité interindividuelle de ces paramètres PK du médicament ainsi que les facteurs

(covariables) pouvant en partie l'expliquer comme par exemple l'âge, le poids, la fonction rénale.... [Anderson B et al., 2006a ; Anderson B et al., 2006b] (**Figure 13**).

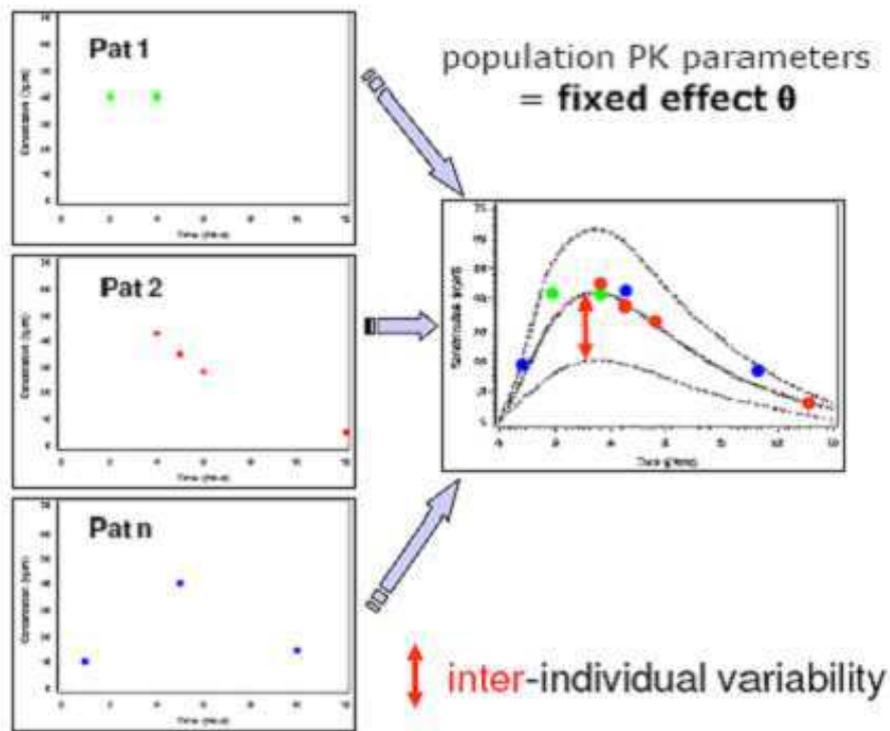


Figure 13. Etudes pharmacocinétiques de population : courbe concentration-temps permettant l'estimation des paramètres PK de la population et de leur variabilité, obtenue à partir des données de n sujets (Pat1, Pat2..., Patn) [Cours Dr. Le Guellec C, Master Recherche Pharmacologie Pédiatrique, année 2007-2008].

A côté de ces modèles pharmacocinétiques qui nécessitent des prélèvements sanguins pour le dosage des concentrations plasmatiques du médicament, d'autres modèles se sont développés pour prédire ces concentrations en dehors d'un essai clinique. Il s'agit des *modèles dits physiologiques/pharmacocinétiques* (PBPK, « *physiologically based*

pharmacokinetic models ») ou physiologiques/pharmacocinétiques-pharmacodynamiques (PBPK-PD) qui permettent de décrire mathématiquement la pharmacocinétique ou la pharmacodynamie des médicaments en utilisant des paramètres physiologiques déterminés *in vitro* comme la taille des tissus, leur perméabilité vasculaire, la liaison aux protéines plasmatiques, les processus d'élimination hépatique et rénale... (**Figure 14**) [Johnson T, 2005].

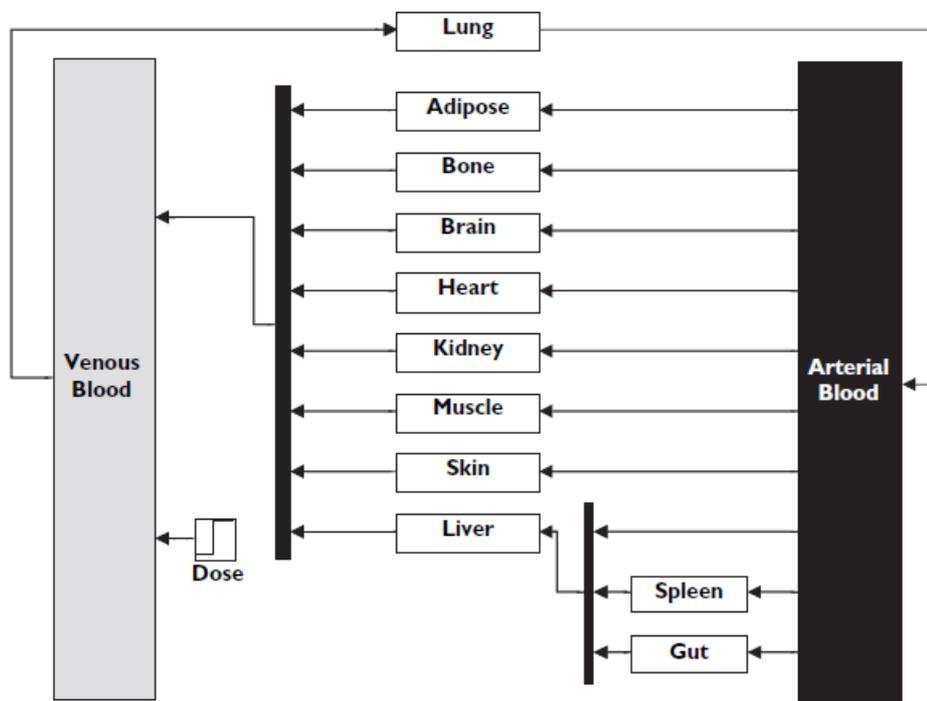


Figure 14. Modèle physiologique/pharmacocinétique intégrant les paramètres physiologiques de l'organisme entier pour estimer la concentration plasmatique du médicament en fonction de la dose administrée [Jonhson T, 2005].

B. Etudes pharmacocinétiques/pharmacodynamiques chez le nouveau-né

Les études pharmacocinétiques sont indispensables chez l'enfant en raison des transformations physiologiques rapides liées à la maturation qui modifient significativement la pharmacocinétique des médicaments au cours du temps [Kearns G et al., 2003a]. Par conséquent, la dose et le schéma d'administration doivent être adaptés à la période néonatale pour utiliser des médicaments efficacement et éviter les effets toxiques ou à l'inverse, l'inefficacité thérapeutique.

La population néonatale est probablement la population pédiatrique où l'importance des études PK de médicaments est la plus marquée mais aussi celle où la réalisation de telles études est la plus difficile. Non seulement les processus de maturation extra-utérine sont très rapides chez les nouveau-nés à terme mais des variations importantes de cette maturation sont observées dans le groupe des nouveau-nés prématurés selon le stade de la prématurité.

Compte tenu de la variabilité interindividuelle des paramètres PK entre les différents groupes de nouveau-nés mais aussi pour des raisons pratiques et éthiques, la pharmacocinétique des médicaments est étudiée préférentiellement par une approche de population [Johnson T, 2005 ; De Cock R et al., 2011]. En effet, celle-ci permet d'exploiter peu de prélèvements par sujet qui peuvent être recueillis à l'occasion des bilans biologiques nécessaires pour la surveillance. Cela minimise la douleur et l'inconfort liés aux procédures invasives. Egalement, cette approche permet d'identifier les facteurs (âge gestationnel, âge postnatal, poids, polymorphismes génétiques...) à l'origine de la variabilité interindividuelle des paramètres PK d'un médicament. Ainsi, quand les concentrations thérapeutiques cibles d'un médicament sont connues, la connaissance des paramètres PK et des covariables qui leur sont liées, permet : 1) d'évaluer différentes posologies afin de savoir si les concentrations prédites se situeraient dans l'intervalle thérapeutique souhaité, et 2) de déduire des

recommandations posologiques générales en fonction de toutes les valeurs possibles des covariables (tables d'adaptation de la posologie en fonction de l'âge gestationnel à la naissance ou postnatal, la fonction rénale...) [Le Guellec et al., 2001 ; Cella M et al., 2010].

Des modèles physiologiques/pharmacocinétiques (PBPK) et/ou pharmacodynamiques (PBPK-PD) peuvent également être utilisés chez le nouveau-né et sont actuellement en cours de développement à cause de l'absence d'information concernant divers paramètres physiologiques dans cette population [Tod M et al., 2008 ; Manolis E et Pons G, 2009].

Enfin, mise à part la détermination de la posologie efficace, un autre aspect important de la prescription chez le nouveau-né est la présentation adéquate du médicament (excipients, dosage, forme galénique, voie d'administration). Certains excipients comme l'alcool sont totalement contre-indiqué chez le nouveau-né car ils peuvent être à l'origine de nombreux effets indésirables. De plus, une forme galénique à concentration très élevée du médicament peut nécessiter plusieurs dilutions avant d'être administrée chez le nouveau-né, ce qui l'expose aux risques d'erreur d'administration et de surcharge volumique.

C. Etudes pharmacocinétiques/pharmacodynamiques des agents anti-infectieux

Les agents anti-infectieux représentent une classe médicamenteuse qui présente la particularité d'avoir pour cible thérapeutique le microorganisme pathogène responsable de l'infection mais qui ne fait pas partie stricto sensu de l'organisme, même malade. De ce fait, l'efficacité clinique d'une antibiothérapie ne peut être évaluée qu'au travers de critères intermédiaires dont les principaux sont cliniques (évolution de l'état clinique du malade), bactériologiques (négativation des prélèvements), biologiques (normalisation des marqueurs de l'infection et de l'inflammation) ou pharmacologiques (atteinte des concentrations plasmatiques dite cibles en terme d'efficacité et de non toxicité) [EMA, 2000].

Le succès d'une thérapie anti-infectieuse est déterminé par des interactions complexes entre le médicament administré, les caractéristiques de l'hôte et l'agent pathogène. En clinique, la complexité de ces interactions est traduite souvent par une variabilité importante dans la relation dose-effet pharmacologique. Il est ainsi important de pouvoir quantifier et minimiser, si possible, cette variabilité en particulier lorsque les traitements risquent d'être toxiques ou au contraire inefficaces. Pour cela, il convient d'intégrer les caractéristiques du médicament, de l'hôte et de l'agent pathogène afin de sélectionner l'antibiotique le mieux adapté et la posologie adéquate pour éradiquer le germe en question et au même temps éviter l'émergence de germes résistants.

Cela est possible par l'intermédiaire d'études de modélisation PK/PD (**Figure 15**) qui ont pour objectif de décrire, estimer et contrôler la variabilité des thérapeutiques médicamenteuses, entre individus de la même population et de proposer des schémas d'administration optimisée des médicaments.

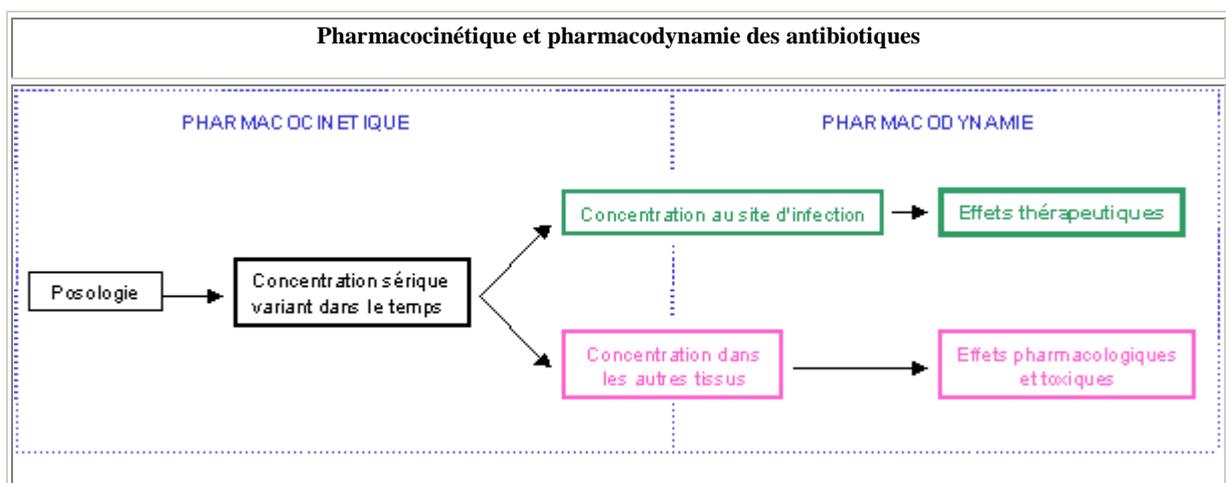


Figure 15. Lien entre études pharmacodynamiques et pharmacocinétiques [cours Université Catholique de Louvain, <http://www.antiinfectieux.org/antiinfectieux/PLG/PLG-PK-PD.html>].

Dans les approches PK/PD pour l'évaluation des anti-infectieux, le paramètre pharmacocinétique le plus fréquemment utilisé est la concentration plasmatique de l'agent et le paramètre pharmacodynamique est la concentration minimale inhibitrice, appelée MIC (« *minimal inhibitory concentration* »). La MIC correspond à la plus faible concentration d'antibiotique capable de provoquer une inhibition complète de la croissance d'une bactérie donnée, appréciable à l'œil nu, après une période d'incubation donnée (souvent après 18 à 24 heures de contact à 37 °). Les indices PK/PD les plus couramment utilisés et qui ont été décrits comme prédictifs de l'efficacité clinique des antibiotiques sont les suivants : 1) le temps ou pourcentage de temps pendant lequel les concentrations plasmatiques sont supérieures à la MIC ($T > MIC$) soit pour une période de 24 heures soit pour l'intervalle entre les doses, 2) le rapport de la concentration plasmatique maximale sur la MIC ou Quotient Inhibiteur (C_{max}/MIC) et 3) l'aire sous la courbe des concentrations plasmatiques en antibiotiques, dite AUC (« *area under the curve* »), rapportée à la MIC (AUC/MIC) [Mouton J et al., 2005] (**Figure 16**). Ces indices reflètent l'exposition globale à l'antibiotique.

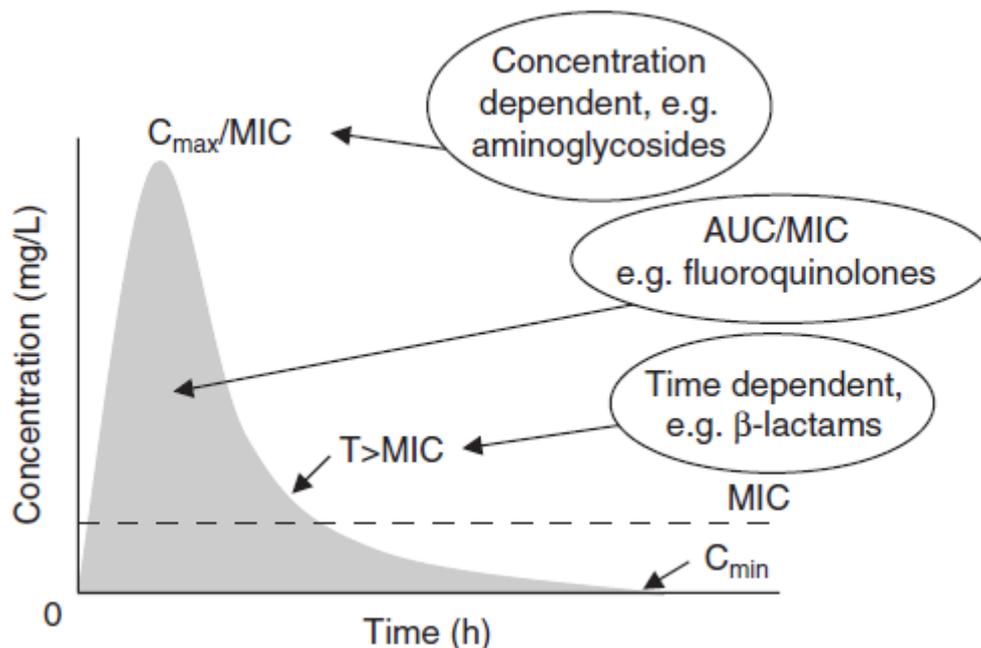


Figure 16. Paramètres pharmacocinétiques et pharmacodynamiques des antibiotiques sur une courbe temps – concentration [Roberts J et Lipman J, 2006].

Selon cette approche utilisant la MIC des germes, les antibiotiques sont le plus souvent divisés en deux principales catégories : ceux qui présentent un effet bactéricide temps-dépendant et des effets persistants minimes ou modérés (par exemple les beta-lactamines) et ceux avec une activité bactéricide concentration-dépendante et des effets persistants prolongés (effet post-antibiotique) (par exemple les fluoroquinolones). L'indice le plus étroitement corrélé à l'efficacité des antibiotiques temps-dépendants est le temps pendant lequel les concentrations plasmatiques sont supérieures à la MIC ($T > MIC$). En revanche, pour les antibiotiques concentration-dépendants, il s'agit du Quotient Inhibiteur (C_{max}/MIC) et de l'aire sous la courbe rapportée à la MIC (AUC/MIC) [Drusano GL, 2007 ; Mueller M et al., 2004].

Il faut noter que l'utilisation de ces indices PK/PD peut présenter certains inconvénients liés surtout à la valeur fixe de la MIC déterminée in vitro alors qu'en pratique l'effet pharmacologique des antibiotiques est le résultat d'un phénomène dynamique d'interaction entre l'exposition de l'agent pathogène et la fraction libre de l'antibiotique sur un site anatomique donné. Par conséquent, de nouveaux modèles PK/PD ont été développés en se basant sur des courbes de bactéricidie (« *kill curves* »), plutôt que sur la MIC [Mueller M et al., 2004].

D. Implémentation des études pharmacocinétiques/pharmacodynamiques de population dans le développement des médicaments anti-infectieux en néonatalogie

De part la nature et le mécanisme d'action des agents anti-infectieux, il est possible de considérer que la progression microbiologique de l'infection et la réponse à l'intervention médicale sont similaires entre les adultes et les enfants et même entre les animaux et les humains. De plus, dans le cas des antibiotiques, une relation concentration-réponse similaire

peut éventuellement être présumée [Johnson T, 2005]. Pour les anti-infectieux ainsi que pour de nombreuses autres molécules, les différences inter-espèces concernent probablement plus la relation entre doses et concentrations (principalement en raison de différences métaboliques) que la relation entre concentrations et effets [Bellissant, 2002].

En conséquence, les modèles pharmacocinétiques/pharmacodynamiques de population (POP-PK/PD) ont potentiellement de nombreuses applications dans le développement des médicaments anti-infectieux en néonatalogie et tout particulièrement dans l'évaluation de leurs effets chez le nouveau-né en utilisant des données provenant des études adultes/grand enfant, voire même animales.

En effet, certains indices PK/PD spécifiques à chaque classe d'anti-infectieux, par exemple le rapport AUC/MIC pour les fluoroquinolones, ont déjà été identifiés comme étant corrélés à l'efficacité (clinique/microbiologique) et à la tolérance (par exemple absence d'apparition des souches résistantes) des ces médicaments chez l'adulte. Sachant que les MIC des germes pathogènes ne sont pas susceptibles de varier avec l'âge des patients, il est possible de déterminer les posologies nécessaires chez le nouveau-né pour obtenir les mêmes niveaux d'exposition efficaces que chez les patients adultes. L'impact de certains paramètres physiologiques néonataux (âge gestationnel, âge post-natal, constantes biologiques...), pathologiques (détresse respiratoire, persistance du canal artériel...) et thérapeutique (association médicamenteuse, assistance ventilatoire...) sur la PK de la molécule peut aussi être déterminé en identifiant les covariables affectant le modèle pharmacocinétique. Enfin, les modèles POP-PK/PD peuvent être utilisés pour simuler le pourcentage des patients ayant atteints un niveau d'exposition efficace en faisant varier les schémas posologiques ou les MICs pour une posologie donnée [Bellissant E et al., 1998]. Ils permettent ainsi d'optimiser l'utilisation du médicament et si nécessaire, le design et les plans expérimentaux des études cliniques à venir [Drusano GL, 2007].

Toutefois, les différences observées entre les nouveau-nés et les adultes peuvent affecter la pharmacocinétique mais aussi la pharmacodynamie des médicaments anti-infectieux. Des différences pharmacocinétiques, par exemple dans la maturation des transporteurs et la pénétration dans le système nerveux central, peuvent être responsables de différences dans la distribution de la molécule et donc dans son efficacité. De plus, des différences pharmacodynamiques sont possibles, liées à l'immaturation du système immunitaire et donc des défenses naturelles de l'organisme en développement.

En conséquence, la première étape essentielle est de définir le schéma posologique qui permet d'obtenir une exposition systémique totale identique entre le nouveau-né et l'adulte et un profil pharmacocinétique ($T > MIC$ ou C_{max}/MIC) en accord avec les propriétés PK/PD de l'antibiotique. Puis, la deuxième étape essentielle est de vérifier la bonne corrélation entre les indices PK/PD utilisés pour déterminer les doses adéquates et l'efficacité clinique observée chez les nouveau-nés traités [Tod M et al., 2008].

E. Etude pharmacocinétique/pharmacodynamique de population de la ciprofloxacine chez le nouveau-né à terme et prématuré

Dans le cadre du projet TINN et du PIP de la ciprofloxacine, la première étude clinique prévue chez le nouveau-né est une étude pilote de pharmacocinétique/ pharmacodynamique de population et d'évaluation de l'efficacité et de la tolérance à court-terme de cette molécule. Cette étude est actuellement en cours de réalisation dans deux centres hospitaliers de Liverpool au Royaume Uni (*Liverpool Women's NHS FT* et *Alder Hey Children's NHS FT*) et dans six centres français.

Cette première étude clinique est indispensable en l'absence de données pharmacocinétiques fiables pour l'utilisation de la ciprofloxacine chez le nouveau-né et le

nourrisson de moins de trois mois. En effet, les données existantes sont extrêmement éparpillées et aucune étude n'a déterminé les MIC des germes pathogènes pour quantifier des rapports AUC/MIC corrélés à l'efficacité clinique. Par conséquent, l'objectif principal de cette étude est de déterminer les paramètres pharmacocinétiques de population de la ciprofloxacine chez les nouveau-nés et les nourrissons de 24 à 52 semaines d'âge post-menstruel ayant une infection suspectée ou confirmée à germes Gram négatif. L'extension de cette étude aux nourrissons de trois mois a été demandée par les instances réglementaires devant l'absence de données fiables dans cette population pédiatrique. Les objectifs secondaires incluent la description de la tolérance à court-terme (effets indésirables) et de l'évolution des nouveau-nés (évolution clinique et bactériologique) sous ciprofloxacine.

Au total, l'inclusion d'environ 50 nouveau-nés et nourrissons est prévue (au moins 10 ayant un âge post-menstruel inférieur à 32 semaines ; 20 ayant un âge post-menstruel supérieur à 36 semaines et 10 ayant un âge post-menstruel supérieur à 44 semaines). La posologie de la ciprofloxacine, choisie selon les données de la littérature, est de 10 mg/kg/12 heures par des perfusions intraveineuses de 30 à 60 minutes pour une durée d'au moins cinq jours. Le nombre de prélèvements est limité à trois par jour et par sujet (deux prélèvements pour les participants dont le poids est inférieur à 1000 g) et deux schémas définissant les temps de prélèvement sont évalués. Une première cinétique est réalisée le premier jour de l'administration de la ciprofloxacine puis une deuxième entre le 5^{ème} et le 7^{ème} jour. Les temps de prélèvement sont calculés à partir du début de la première perfusion de ciprofloxacine (T 1 heure, T 3 heures, T 8 heures...). Les patients sont randomisés dans un des deux schémas de prélèvement résumés dans la **Tableau 2**.

Groupe	Poids	Sous - groupes	Temps de prélèvements jour 1 et jour 5 - 7 ou dernier jour de traitement par la ciprofloxacine						Volume sanguin maximum cumulé
			T1		T3		T8		
A	> 1000g		T1		T3		T8		1.2 ml
	< 1000g	Ai	T1		T3				0.8 ml
		Aii	T1				T8		
		Aiii			T3		T8		
B	> 1000g			T2		T6		T12	1.2 ml
	< 1000g	Bi		T2		T6			0.8 ml
		Bii		T2				T12	
		Biii					T6	T12	

Tableau 2. Deux schémas de la cinétique de prélèvement selon le poids des patients. Les temps T sont exprimés en heures.

Les critères de jugement principaux sont les concentrations plasmatiques de ciprofloxacine et les paramètres PK de population (pic de concentration, clairance, volume de distribution et aire sous la courbe), leur variabilité interindividuelle (CV%) et l'identification des covariables pouvant expliquer la variabilité observée. Les covariables qui seront étudiées sont les caractéristiques démographiques des patients (l'âge post-menstruel, l'âge gestationnel, l'âge chronologique, le poids, sexe...), les paramètres biologiques (taux de créatinine plasmatique, enzymes hépatiques...), les co-médications et les traitements associés (ventilation artificielle, transfusion...). Par ailleurs, l'évolution clinique des patients sera déterminée et leur guérison clinique sera définie par un dosage de C- réactive-protéine (CRP) <10 mg/L trois jours après l'arrêt du traitement par ciprofloxacine. Enfin, des prélèvements microbiologiques seront effectués afin de déterminer la nature et la MIC du pathogène en cause. De plus, des prélèvements de selles seront réalisés au début du traitement pour évaluer

l'existence d'une possible colonisation bactérienne mais également à la fin et à 4 à 6 semaines après la fin du traitement par ciprofloxacine pour évaluer l'éventuelle émergence de souches Gram négatif résistantes à la ciprofloxacine.

L'analyse pharmacocinétique sera effectuée par une approche de population. Les paramètres PK ainsi déterminés, l'estimation de leur variabilité et une relation PK/PD ($AUC/MIC > 125$) précédemment validée chez les adultes [Forrest A et al., 1993], seront intégrés dans le modèle PK/PD pour définir les schémas posologiques optimaux à recommander chez le nouveau-né et le nourrisson. Ce modèle servira à simuler plusieurs schémas posologiques, en fonction du type de patients (selon les covariables), afin qu'ils conduisent à l'obtention d'un rapport $AUC/MIC > 125$ pour les pathogènes les plus fréquemment rencontrés dans ces infections. Le schéma posologique optimal déterminé par cette analyse sera validé dans d'autres études PK qui feront l'objet de futures études cliniques chez le nouveau-né et le nourrisson.

F. Validation des modèles pharmacocinétiques

1. Méthodes de validation des modèles pharmacocinétiques

La modélisation POP-PK/PD des médicaments est de plus en plus utilisée en pédiatrie pour décrire les relations dose-concentration-effets et identifier les différences pharmacocinétiques, d'efficacité et de toxicité médicamenteuse à travers les groupes d'âges. Ces modèles sont également utilisés pour prédire les concentrations et/ou les effets attendus par l'administration du médicament selon différents schémas posologiques aux futurs patients (simulation). Toutefois, l'implémentation et l'analyse de tels modèles s'appuient sur une méthodologie statistique complexe. Ainsi, l'évaluation d'un modèle POP-PK et/ou PD et sa

validation exhaustive sont primordiales avant de l'intégrer dans le développement des médicaments chez l'enfant et de l'utiliser pour la simulation de données cliniques [De Cock R., 2011; Ince I et al., 2009].

En général, deux approches sont possibles : l'*évaluation interne* et l'*évaluation externe*. La première correspond à la capacité du modèle à décrire correctement et sans biais les données PK et/ou PD des patients dans l'étude (« *learning dataset* ») alors que la deuxième nécessite une nouvelle base de données provenant d'une étude externe. L'évaluation externe consiste alors à la comparaison entre les données de nouveaux patients, indépendants de ceux ayant permis de développer le modèle (« *validation dataset* »), et les prédictions obtenues par application du modèle préalablement construit sur la première base 'd'apprentissage' (« *learning dataset* »).

Différentes techniques graphiques ou statistiques peuvent être appliquées pour la validation d'un modèle [Karlsson M et Savic R, 2007].

Premièrement, l'évaluation interne du modèle requiert l'application des méthodes dites 'basiques' ou avancées [Brendel K. et al., 2007]. Les méthodes basiques incluent :

1) les graphes « goodness-of-fit » (GOF) qui sont des représentations graphiques des prédictions individuelles ou de population du modèle en fonction des observations (PRED vs OBS,...) [Ette E., 1998];

2) l'appréciation de la précision des paramètres estimés déterminée par la valeur des erreurs types (« *standard errors* », SEs) ou par les intervalles de confiance à 95% pour les effets aléatoires et les effets fixes du modèle ;

3) les analyses de sensibilité pour évaluer l'impact des valeurs extrêmes dans l'estimation des paramètres du modèle.

Les méthodes avancées les plus fréquemment appliquées sont les suivantes :

1) partition des données (« *data splitting* » et « *cross-validation* ») qui consiste à répartir les données disponibles en deux parties, une qui servira pour la construction du modèle (« *learning dataset* ») et une deuxième qui servira à sa validation (« *validation dataset* ») ;

2) techniques de ré-échantillonnage aléatoire (bootstrapping, jack-knife techniques...) [Yafune A et al., 1999 ; Lindbom L et al., 2005] ;

3) en cas de simulations (Monte Carlo), estimation des graphes VPC (« *Visual Predictive Check* ») (**Figure 17**) ou des valeurs PPC (« *Posterior Predictive Check* ») pour comparer, graphiquement ou à l'aide d'un calcul statistique, les concentrations observées et simulées [Post T et al., 2008; Yano Y et al., 2001].

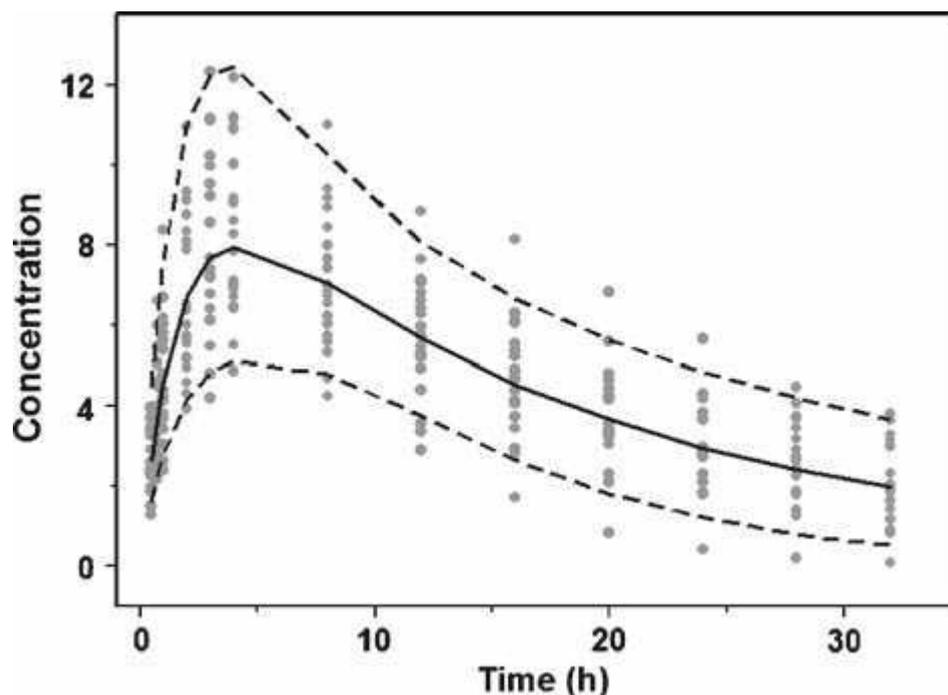


Figure 17. Représentation graphique du VPC. Les points gris représentent les observations, la ligne noire en gras illustre les valeurs médianes prédites par le modèle et les lignes noires en pointillés les 5^{ème} et 95^{ème} percentiles [Post T et al., 2008].

Deuxièmement, des données de patients n'ayant pas servies à la construction du modèle PK ou PK/PD peuvent être utilisées pour évaluer, de manière externe, les propriétés prédictives d'un modèle. L'évaluation externe utilise les méthodes graphiques mentionnées préalablement pour l'évaluation interne mais aussi des paramètres statistiques permettant la comparaison entre les valeurs observées et les prédictions du modèle: le PPC, l'erreur de prédiction ($PE = OBS - PRED$), la moyenne de l'erreur de prédiction (MPE), l'erreur absolue de prédiction ($APE = \text{valeur absolue du PE}$), la moyenne de l'erreur absolue de prédiction (MAPE)...Un nouveau paramètre statistique est plus récemment utilisé, le npde (« *Normalized Prediction Distribution Error* »), calculé à partir des données de simulations. Le npde est calculé pour l'évaluation externe des modèles mais il peut également servir pour leur évaluation interne, et il permet d'estimer la précision du modèle à prédire la valeur médiane et la variabilité des observations (**Figure 18**) [Comets E et al., 2008].

Aucun consensus n'existe sur l'approche la plus adéquate pour valider les modèles POP-PK et/ou PD. Toutefois, il a été suggéré que pour les modèles à finalité uniquement descriptive, au minimum une évaluation interne basique doit être effectuée alors que pour les modèles à finalité prédictive, une évaluation interne par des méthodes avancées et une évaluation externe sont recommandées [Brendel K et al., 2007]. Actuellement, parmi les études publiées, une validation des modèles POP-PK et/ou PD n'est effectuée que dans 17% des études pédiatriques [Tod M. et al., 2008] et 28% des études adultes [Brendel K. et al., 2007].

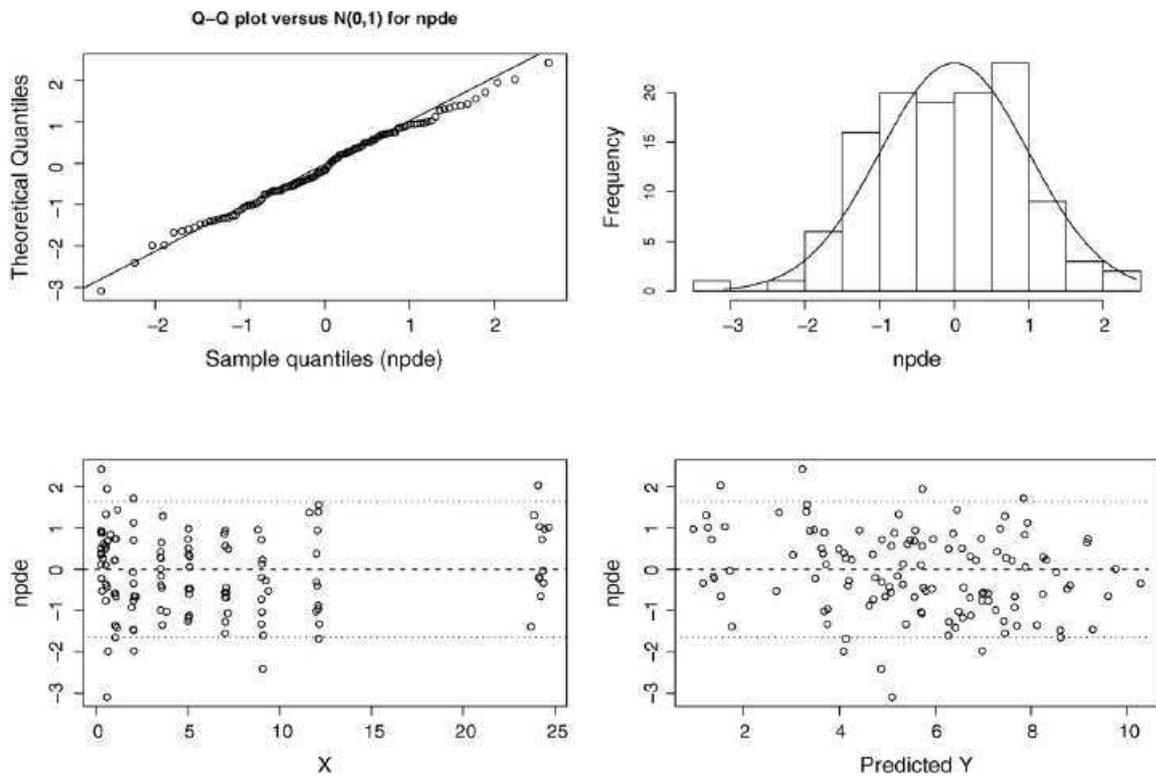


Figure 18. Illustrations graphiques du npde. Le graphique en haut, à gauche est un quantile-quantile plot (traçage des quantiles d'une distribution versus les quantiles d'une autre distribution) comparant la distribution du npde à une distribution $N(0,1)$ théorique ; le graphique en haut, à droite est un histogramme du npde superposé à la densité $N(0,1)$; les deux graphiques montrent que l'hypothèse de normalité du npde n'est pas rejetée. Dans les deux graphiques du bas, les npde calculés sont illustrés en fonction du temps (*variable X*) et des concentrations prédites (*predicted Y*). Dans cet exemple, le modèle décrit correctement les données (« *validation dataset* ») [Comets E et al., 2008].

2. Validation externe des modèles pharmacocinétiques de population de la vancomycine chez le nouveau-né

“External Evaluation of Population Pharmacokinetic Models of Vancomycin in Neonates” (article soumis)

Zhao W., Kaguelidou F., Biran V., Zhang D., Holford N., Lo Y-L., Allegaert K., Peris J-E., Kimura T., Fakhoury M., Jacqz-Aigrain E.

La vancomycine est un antibiotique de la famille des glycopeptides qui est largement utilisée en néonatalogie et qui présente une variabilité pharmacocinétique interindividuelle considérable et une faible marge thérapeutique. Ainsi, la surveillance de ses concentrations plasmatiques est particulièrement recommandée. Elle est également un des antibiotiques les plus évalués chez le nouveau-né par des moyens de modélisation pharmacocinétique et pharmacodynamique de population. Toutefois, il n'existe toujours pas de consensus sur un schéma posologique optimal chez le nouveau-né. L'objectif de cette étude a été d'effectuer une évaluation externe de tous les modèles pharmacocinétiques de population (POP-PK) récemment publiés chez le nouveau-né afin de déterminer leurs capacités prédictives et d'identifier les caractéristiques du protocole qui limitent leur généralisation aux différents contextes cliniques.

La revue de la littérature a permis d'identifier cinq modèles POP-PK publiés entre 2002 et 2010. L'évaluation externe des modèles a été possible en appliquant chacun d'entre eux sur un échantillon indépendant de 78 nouveau-nés hospitalisés dans le service de néonatalogie de l'hôpital Robert Debré pour lesquels 112 concentrations de vancomycine avaient été obtenues

durant le suivi thérapeutique. Les techniques d'évaluation utilisées étaient de type graphique (VPC) et statistique (NPDE).

Globalement, les modèles avaient tous une capacité prédictive différente des observations de l'échantillon externe, mais qui ne variait pas avec l'âge post-menstruel ou le poids des nouveau-nés. Les divergences observées peuvent être expliquées par des différences entre les études, comme les différences de méthodes de dosage de la vancomycine et de la créatinine plasmatique.

Le taux de créatinine plasmatique est un déterminant essentiel de la pharmacocinétique de la vancomycine et l'utilisation de différentes méthodes pour son dosage influence l'évaluation et l'applicabilité des modèles POP-PK de la vancomycine. Il est également important de déterminer l'impact d'autres facteurs liés au protocole de l'étude ou aux caractéristiques des patients inclus, comme leur origine ethnique par exemple.

CONCEVOIR ET REALISER LES ETUDES
CLINIQUES D'EFFICACITE ET DE
TOLERANCE NECESSAIRES EN
NEONATOLOGIE

VII. CONCEVOIR ET REALISER LES ETUDES CLINIQUES D'EFFICACITE ET DE TOLERANCE NECESSAIRES EN NEONATOLOGIE

Les différentes phases du développement des médicaments n'ont pas les mêmes objectifs. En effet, les études cliniques de Phase I et II visent à définir la relation dose-réponse (effet clinique bénéfique ou toxique) d'un nouveau médicament et les caractéristiques des patients qui potentiellement influencent cette relation. En revanche, l'objectif principal des études de phase III est de confirmer que le médicament à la posologie définie grâce aux études précédentes, est efficace et bien toléré dans l'indication clinique de sa future autorisation. Ainsi, les plans expérimentaux et les techniques d'analyse appropriées diffèrent entre les premières phases dites 'd'apprentissage' et la dernière phase dite de confirmation.

Les instances réglementaires exigent que l'efficacité d'un médicament dans une nouvelle indication soit démontrée par deux essais cliniques de confirmation positifs qui doivent être exclusivement des essais contrôlés randomisés (ECR). Dans sa forme la plus simple, chaque essai compare l'efficacité et la toxicité observée entre deux groupes de malades (future indication d'utilisation du médicament). Le premier groupe reçoit un traitement qui inclut le médicament à tester et le deuxième, dit de contrôle, reçoit soit un placebo soit un traitement de référence. L'attribution des patients dans les deux groupes se fait de manière aléatoire, par randomisation. La différence moyenne entre des effets bénéfiques des deux groupes est considérée comme un estimateur de la vraie différence entre les deux traitements et elle est attribuée au médicament en évaluation. La randomisation des participants éligibles permet d'obtenir deux groupes comparables et en moyenne homogènes qui ne diffèrent que par le traitement appliqué.

Même chez l'adulte, le dogme des deux ECR de confirmation pour obtenir une AMM a été remis en question. En effet, nombreux sont ceux qui considèrent qu'une approche

associant un essai randomisé de phase II pour correctement quantifier l'action pharmacologique du médicament, suivi d'un seul essai de confirmation de phase III, serait suffisante pour recueillir les informations nécessaires à la commercialisation du médicament [Peck C et al., 2003 ; Lee H et al., 2005].

Chez l'enfant, l'évaluation des médicaments doit être, autant que faire se peut, basée sur l'extrapolation d'un maximum d'informations sur l'efficacité et la sécurité du médicament par le développement fait chez l'adulte (**arbre décisionnel, Figure 5**). Selon la physiopathologie de la maladie, le mécanisme d'action du médicament et le(s) groupe(s) d'âge pédiatrique concerné(s), les études PK et/ou PK/PD sont alors un outil essentiel pour le développement pédiatrique. Toutefois, il est fréquent et notamment chez le nouveau-né, que les données adultes soient jugées insuffisantes ou inappropriées pour une extrapolation à l'enfant. Cela concerne bien sûr les pathologies pédiatriques sans équivalent chez l'adulte ou des données concernant la sécurité d'emploi d'un médicament, domaine dans lequel des différences importantes peuvent être observées [EMA, 2004b]. L'étude complète de la pharmacocinétique, de l'efficacité et de la tolérance du médicament est alors à prévoir chez l'enfant. Les études bien conçues et conduites de phase II, type PK/PD (études dose-réponse), sont susceptibles de générer de manière adéquate des données essentielles concernant les effets (bénéfiques et toxiques) du médicament chez l'enfant. De plus, les résultats de ces études servent à optimiser la conception de(s) l'étude(s) de confirmation de phase III.

Enfin, et en raison des difficultés déjà mentionnées, une réflexion approfondie est nécessaire pour définir la place d'études cliniques qui n'incluent pas une étape de randomisation, dans le développement médicamenteux pédiatrique. Ces études sont moins facilement acceptées par les instances réglementaires car leur méthodologie est considérée comme moins puissante que les ECRs pour générer des preuves de haut niveau. Toutefois, réduire la qualité méthodologique d'une étude à la présence ou non d'une étape de

randomisation est une réflexion trop restrictive, qui a souvent été critiquée et qui peut conduire à de véritables impasses scientifiques [Glasziou P et al., 2004]. En effet, l'attribution aléatoire des traitements peut être impossible en pratique clinique voire même inutile lorsque l'objectif de l'étude est l'évaluation de l'efficacité des médicaments dans les conditions réelles d'utilisation (utilité, « *effectiveness* ») ou l'évaluation de leur sécurité d'emploi [Vandenbroucke J., 2004]. Dans ces cas, il paraît indispensable de considérer d'autres méthodes d'évaluation que l'essai randomisé. Certaines peuvent générer des données tout aussi adéquates et ont l'avantage d'être plus faciles à implémenter en pratique courante.

La place des différents types d'études dans le développement des médicaments anti-infectieux en néonatalogie est abordée dans les prochaines sections de ce chapitre, avec l'exemple pratique du développement qui a été proposé pour l'évaluation de la ciprofloxacine dans le cadre du projet Européen TINN.

A. Le développement des médicaments anti-infectieux en néonatalogie

1. Méthodes de modélisation et de simulation

Ces méthodes sont des outils précieux pour établir le lien entre les données pédiatriques et les données adultes et/ou animales. Plusieurs types de modèles peuvent ainsi être employés, certains le sont déjà de manière courante alors que d'autres sont en voie d'exploration.

Tout d'abord, en préclinique des études PK/PD conventionnelles ou de population chez des animaux juvéniles sont à prévoir afin d'obtenir des données pharmacocinétiques mais aussi pharmacodynamiques en termes d'éradication du germe, d'efficacité et de tolérance clinique, de potentiel d'émergence de germes résistants chez des organismes immatures. Ces

données sont ensuite utilisées pour mieux définir l'intervalle des doses à évaluer mais aussi le profil des effets indésirables à surveiller durant les essais cliniques chez les nouveau-nés.

Comme mentionné auparavant, les anti-infectieux sont une classe médicamenteuse particulière du fait de leur mécanisme d'action qui repose essentiellement sur l'interaction avec l'agent pathogène. Pour la plupart, la relation concentration-réponse est souvent bien décrite et des indices PK/PD corrélés à l'efficacité clinique ont été identifiés chez l'adulte et/ou l'animal. Etant donné que ces relations ne risquent pas de changer selon l'hôte infecté, il convient d'intégrer ces indices dans un modèle PK/PD pour extrapoler l'efficacité et ainsi déterminer les posologies nécessaires chez l'enfant pour obtenir ces niveaux d'exposition. Cette démarche a été validée et acceptée par les instances réglementaires pour l'extrapolation de l'efficacité des traitements anti-HIV des adultes à l'enfant [EMA, 2009b; Manolis E et al., 2011], et cela semble être le cas de nombreux antibiotiques [EMA, 2004c ; Guillot E et al., 2010].

Les modèles PK/PD chez le nouveau-né, quasi exclusivement des modèles de population, vont être construits au cours d'études cliniques qui comportent souvent une étape de randomisation des participants dans des groupes ayant des temps de prélèvement sanguins différents. Cette randomisation peut-être stratifiée selon le degré de prématurité et/ou le poids des nouveau-nés. Des paramètres pharmacodynamiques cliniques d'efficacité et de toxicité peuvent également être recueillis au cours de ces études afin de valider la corrélation entre l'indice PK/PD utilisé pour extrapoler l'efficacité et l'évolution clinique ou l'apparition des effets indésirables spécifiques aux nouveau-nés. Ces modèles peuvent être utilisés ultérieurement pour simuler les réponses cliniques et toxiques en faisant varier les posologies administrées et les caractéristiques des patients (âge gestationnel, âge postnatal, poids, insuffisance rénale, insuffisance hépatiques, interactions médicamenteuses...) ou de l'infection (germes différents avec des MIC différents).

Enfin, des modèles physiologiques/pharmacocinétiques (PBPK, « *physiologically based pharmacokinetic models* ») et/ou pharmacodynamiques (PBPK-PD) peuvent aussi être utilisés pour l'évaluation des médicaments anti-infectieux mais, comme mentionnée préalablement, ces modèles sont en cours de développement en pharmacologie néonatale.

“Evaluation des antibiotiques en néonatalogie: il faut étudier leur relation PK/PD”

(article accepté pour publication)

Langhendries J-P., Kaguelidou F., Jacqz-Aigrain E.

Ainsi, dès la fin des années 80, plusieurs travaux ont mis en évidence que la pharmacodynamie d'un antibiotique dépend largement de sa pharmacocinétique. La relation PK/PD d'un antibiotique est donc un paramètre essentiel et elle varie d'un agent anti-infectieux à l'autre en fonction de la classe à laquelle l'antibiotique appartient. La détermination de ces relations PK/PD chez les adultes ont permis d'améliorer l'administration des antibiotiques aux patients pour obtenir une meilleure efficacité tout en réduisant le risque d'émergence des souches multi-résistantes.

Si les schémas d'administration des traitements antibiotiques sont en partie validés chez l'adulte, ceux recommandés chez le nouveau-né sont pour la plupart anciens, basés sur des concepts antérieurs à ces travaux. Or, l'immaturation physiologique du nouveau-né justifie la réalisation des études pharmacocinétiques spécifiques à cette population. L'adaptation des doses et de l'intervalle entre les administrations des anti-infectieux en fonction de ces nouvelles données PK/PD provenant d'études adultes, doivent être appliquées en néonatalogie, en tenant compte des particularités pharmacocinétiques du nouveau-né.

2. Les essais comparatifs avec attribution du traitement par randomisation

Cependant, malgré le fait que l'efficacité microbiologique d'un anti-infectieux soit étroitement corrélée à son efficacité clinique, il est important de considérer que la réponse au traitement peut parfois différer entre les nouveau-nés et les adultes ou les enfants plus âgés. En effet, les particularités anatomiques, l'immaturité immunitaire, l'existence fréquente de comorbidités et la polymédication caractéristiques de ce groupe d'âge et en particulier le groupe des grands prématurés, sont des facteurs qui peuvent influencer la réponse au traitement et surtout sa toxicité.

Pour définir correctement la place d'un anti-infectieux, nouveau ou déjà utilisé, dans l'arsenal thérapeutique en néonatalogie, il paraît aussi important de pouvoir le comparer à d'autres traitements disponibles et couramment prescrits. Faire suivre les études PK/PD par des études cliniques comparatives semble nécessaire chez le nouveau-né. Reste alors à préciser la méthodologie de ces essais cliniques.

Comme mentionné auparavant, le 'design' recommandé pour l'évaluation de l'efficacité et de la sécurité d'emploi des médicaments, y compris les anti-infectieux, reste l'essai contrôlé randomisé en double insu [EMA, 2004c]. Cet essai doit être planifié pour démontrer la supériorité de l'anti-infectieux contre placebo. Toutefois, à part les infections avec un taux élevé de guérison spontanée ou l'utilisation des anti-infectieux dans la prophylaxie de certaines infections, la majorité des essais cliniques dans ce domaine sont planifiés pour démontrer la non-infériorité du nouvel anti-infectieux par rapport à un traitement de référence. Également, des études non comparatives sont éventuellement acceptées par les instances réglementaires dans le cadre d'infections rares, dus à des germes rarement rencontrés et difficiles à traiter comme les infections à germes multi-résistants.

Compte-tenu des exigences réglementaires et méthodologiques, nous avons effectués une recherche systématique dans la littérature médicale entre janvier 1995 et mars 2010 pour identifier tous les ECR ayant permis l'étude des effets des antibiotiques chez le nouveau-né. L'objectif était d'évaluer le nombre, les caractéristiques et la qualité méthodologique des ces ECRs. Finalement peu d'ECRs ont été identifiés dans ce domaine avec un nombre restreint d'antibiotiques évalués et quasiment tous avaient une qualité méthodologique médiocre aussi bien pour l'évaluation des effets thérapeutiques que prophylactiques des antibiotiques.

Cette difficulté à mettre en place et à réaliser des ECRs évaluant les effets des antibiotiques en néonatalogie peut être expliquée par de nombreux facteurs parmi lesquels:

- Le faible nombre des patients concernés. Malgré la fréquence élevée des infections néonatales précoces ou tardives suspectées et la prescription étendue des traitements antibiotiques en néonatalogie, la confirmation microbiologique de ces infections est rare.
- L'hétérogénéité des patients inclus. Devant l'urgence médicale que constituent les infections néonatales et les délais longs du diagnostic précis, un traitement anti-infectieux parentéral est souvent débuté suite à la seule suspicion d'infection. En conséquence, un grand nombre de nouveau-nés sont exposés à des agents anti-infectieux, même si le traitement s'avère inutile pour une proportion non négligeable d'entre eux [Edmond K et Zaidi A, 2010].
- L'impossibilité de réaliser des essais contre placebo et l'absence de comparateur adéquat pour réaliser des essais de non-infériorité. Certains antibiotiques ont intégré, parfois depuis longtemps, l'arsenal thérapeutique des infections néonatales car leur efficacité a été prouvée chez les adultes ou les enfants plus âgés. De nombreux néonatalogistes, forts de leur expérience personnelle, les prescrivent convaincus de leur efficacité et de leur bonne tolérance malgré l'absence d'évaluation spécifique chez le nouveau-né et par conséquent de données néonatales.

- Les difficultés de standardisation du traitement antibiotique dans les études multicentriques, ce qui est souvent le cas des études néonatales. En effet, le choix du traitement antibiotique est souvent dicté par l'écologie propre à chaque service et le contexte clinique, facteurs hautement variables d'une unité à l'autre.
- Le non respect de la clause d'ambivalence, nécessaire pour attribuer un traitement de manière aléatoire, par randomisation. Les antibiotiques sont des traitements qui peuvent être difficilement attribuables sur une base aléatoire car leur prescription est motivée par le contexte clinique et la sensibilité des germes suspectés. Il est ainsi contre éthique de randomiser un patient avec la probabilité qu'il reçoive un traitement potentiellement inefficace.

A ces facteurs limitants qui sont spécifiques des médicaments antibiotiques s'ajoutent d'autres qui représentent des contraintes générales pour l'implémentation des ECRs en néonatalogie comme les difficultés pratiques des essais multicentriques, les particularités méthodologiques et d'analyse des données dans des populations restreintes de patients et les difficultés éthiques spécifiques à cette population et aux situations d'urgence.

“Are randomised controlled trials evaluating antibiotics in neonates really informative?

A systematic review” (article soumis)

Kaguelidou F., Turner M., Choonara I., van Anker J., Manzoni P., Alberti C.,

Langhendries J-P., Jacqz-Aigrain E.

Les antibiotiques sont parmi les médicaments le plus prescrits en néonatalogie mais leur évaluation s'avère particulièrement difficile. Nous avons réalisé une revue systématique de la littérature afin de décrire les caractéristiques et la qualité méthodologique des essais contrôlés randomisés évaluant les effets des antibiotiques dans le cadre des infections néonatales. Nous avons effectué une recherche dans les bases électroniques PubMed, Embase et Cochrane Library de janvier 1995 à mars 2010 ainsi que dans les bibliographies de tous les articles pertinents. Nous avons analysé tous les essais contrôlés randomisés qui ont inclus des nouveau-nés présentant une infection néonatale. Un total de 35 essais contrôlés randomisés a été évalué. La majorité était des essais conduits dans une seule institution hospitalière et sans financement public ou privé. La médiane du nombre des participants était de 63 (Q1: 34- Q3 :103). L'antibiotique le plus fréquemment étudié était la gentamycine. Respectivement 18 (51%) et 17 (49%) essais ont évalué l'utilisation thérapeutique ou prophylactique d'un antibiotique dans le contexte d'une infection néonatale. La qualité méthodologique des essais était faible et aucune amélioration n'a été observée au fil des années. Des éléments clés de la méthodologie d'essais cliniques n'ont pas été implémentés ou rapportés dans la majorité des essais. Devant les difficultés à concevoir, conduire et rapporter des essais contrôlés randomisés dans ce domaine, il est important de se questionner sur la nécessité de les mettre

en place lorsque l'efficacité d'un antibiotique a déjà été confirmée dans d'autres groupes d'âge et une attention particulière doit être portée sur d'autres méthodologies alternatives.

3. Etudes observationnelles optimisées

Il est essentiel de toujours considérer la possibilité d'un essai contrôlé randomisé en double insu pour l'évaluation des anti-infectieux en néonatalogie. Cependant, et compte-tenu des limitations mentionnées précédemment, il existe des situations cliniques où la réalisation d'un tel essai est impossible voir même inutile. Afin d'apporter les données nécessaires pour la prescription d'un anti-infectieux en néonatalogie, il convient de considérer d'autres alternatives méthodologiques.

En effet, les effets bénéfiques ou toxiques des médicaments peuvent être explorés par des études comparatives non-randomisées, observationnelles avec des résultats qui ne diffèrent pas forcément de ceux des ECRs [Benson K et Hartz A, 2000 ; Concato J et al., 2000]. Ce type d'études est souvent jugé inadéquat pour établir un lien de causalité entre les effets cliniques observés chez les malades et l'administration d'un traitement car ces études sont sujettes à des biais. Parmi tous les biais, le plus important est le **biais d'indication** qui implique que l'exposition à un traitement spécifique est en pratique liée à certains facteurs pronostiques de la maladie. Ainsi, les groupes de patients à comparer diffèrent non seulement par rapport au traitement reçus mais aussi par rapport au pronostic de leur maladie. Toutefois, dans l'évaluation des anti-infectieux en néonatalogie, ce types d'études peuvent apporter des informations pertinentes pour appuyer leur utilisation efficace et sans risque. Tout d'abord, les études observationnelles permettent de quantifier les effets des anti-infectieux dans le contexte de leur utilisation réelle (« *effectiveness* ») alors que les ECRs explorent ces effets dans un cadre 'idéal' d'infection (« *efficacy* ») qui ne reflète pas toujours la réalité de la pratique clinique [Horwitz R et al., 1990]. Lorsque cette dernière a été suffisamment et extensivement documentée chez les adultes et/ou les enfants plus âgés, une évaluation de

l'efficacité réelle peut être effectuée chez les nouveau-nés par des études observationnelles (études de cohortes ou cas-témoins).

Ensuite, pour éviter les estimations biaisées des effets des traitements et imiter le plus possible les conditions créées par la randomisation des patients, plusieurs techniques statistiques sont disponibles [D'Agostino R Jr. et D'Agostino R Sr., 2007]. La première est l'approche classique d'analyse de données par des **modèles statistiques multivariés** qui ajustent les résultats concernant l'effet du traitement sur de possibles facteurs de confusion. La deuxième approche est basée sur la création d'un **score de propension** qui correspond à la probabilité d'être traité par un antibiotique spécifique en tenant compte de certains facteurs pronostiques [D'Agostino R Jr., 1998 ; Wang J. et Donnan P., 2001]. Ce score est calculé pour chaque individu par rapport à ses caractéristiques avant l'initiation du traitement. Les patients qui ont le même score ont également la même probabilité de recevoir le traitement et sont alors comparables par rapport à leur pronostic. Ce score peut être utilisé soit pour définir des groupes de comparaison appropriés (stratification ou ajustement individuel sur ce score) soit comme variable d'ajustement de l'analyse statistique finale dans un modèle multivarié.

Enfin, il existe une troisième approche dite '**approche écologique**' (« *ecologic approach* ») basée sur l'utilisation d'une variable instrumentale (« *instrumental variable* ») ou variable de traitement groupé (« *grouped treatment variable* ») [Schmoor C et al., 2008 ; Johnston S et al., 2002]. Cette variable est hautement corrélée à l'attribution d'un traitement et peut être définie comme la probabilité de recevoir le traitement évalué à un niveau d'agrégation spécifique comme l'hôpital ou une unité d'hospitalisation. La définition de cette variable nécessite que cette dernière ne soit pas liée à des facteurs pronostique connus et inconnus et par conséquent au devenir des malades. Plutôt que comparer des groupes de malades par rapport au traitement qu'ils ont reçus effectivement, cette technique permet de comparer des groupes de malades qui diffèrent par rapport à leur probabilité de recevoir le

traitement évalué. Cette approche a été développée pour essayer de diminuer les biais potentiels liés à des facteurs de confusion non identifiés. Elle permettrait de confirmer que les unités de néonatalogie qui utilisent un traitement anti-infectieux plus efficace ont de meilleurs résultats en termes de guérison de leurs malades que les unités qui ne l'utilisent pas. Toutefois, il est important de souligner que malgré le fait que l'utilisation de ces techniques n'élimine pas complètement le risque de biais dans les études observationnelles, elle permet de le réduire considérablement afin de rendre les résultats sur les effets du médicament les plus fiables possibles.

Les études observationnelles sont aussi reconnues comme étant plus adéquates que les ECRs pour apporter des réponses aux questions concernant la sécurité d'emploi des médicaments, ce qui est d'une importance majeure chez les nouveau-nés. En effet, la majeure partie des informations disponibles sur la tolérance des médicaments provient d'études observationnelles même dans la population adulte. Les ECRs sont souvent trop limités en nombre de patients inclus et en durée pour détecter des effets indésirables rares ou survenant plusieurs années après l'exposition au médicament. Ainsi, la quantification de tels effets indésirables requiert des études de type cas-témoins ou de larges cohortes suivies pendant une longue période de temps [Vandenbroucke J., 2004].

Comme mentionné auparavant, les études observationnelles sont sujettes à des biais qui doivent être pris en considération. Le biais d'indication n'est pas une préoccupation dans les études de tolérance car dans ce cas, la prescription n'est pas liée au pronostic. En d'autres termes, les cliniciens ne peuvent pas prévoir le risque (pronostic) de développer des effets indésirables de leurs patients au moment de l'attribution du traitement, ce qui constitue l'équivalent d'une attribution de traitement par randomisation. Cependant, d'autres facteurs de confusion peuvent influencer les résultats observés comme la présence de co-médications et de comorbidités fréquentes chez le nouveau-né surtout prématuré. Pour cette raison, des

études observationnelles comparatives mettant en œuvre une des trois approches d'analyse statistique développées ci-dessus semblent plus appropriées pour évaluer la tolérance d'un traitement. La seule réelle limitation à ce type d'étude est la nécessité d'un suivi souvent très long des patients. En particulier, pour les nouveau-nés inclus comme témoins, un suivi long représente des contraintes supplémentaires pour les familles et alourdit considérablement le déroulement de l'étude. Par conséquent, les recommandations réglementaires précisent que des études comparatives observationnelles doivent être réalisées pour évaluer la sécurité d'emploi du médicament à court-terme (jusqu'à 1 ou 2 ans de vie) alors que pour la sécurité à long terme (6-7 ans de vie), des études de cohortes incluant uniquement les nouveau-nés exposés semblent plus adéquates [EMA, 2009a].

B. Evaluation de l'efficacité et de la toxicité de la ciprofloxacine chez le nouveau-né

Un PIP (Plan d'Investigation Pédiatrique) soit un plan de développement clinique de la ciprofloxacine chez le nouveau-né a été proposé à l'EMA dans le cadre du projet TINN, en tenant compte de l'arbre décisionnel défini par les instances réglementaires (**Figure 5**) et des données existantes sur l'utilisation de la ciprofloxacine.

D'abord, cette molécule est efficacement utilisée et elle a été largement évaluée chez les adultes et les enfants plus âgés. Concernant la progression de la maladie et la réponse au traitement chez le nouveau-né, notre revue de la littérature a démontré qu'une proportion élevée de nouveau-nés traités par la ciprofloxacine pour des infections à Gram négatif a répondu positivement à ce traitement. Par ailleurs, la cible de cette antibiothérapie étant bactérienne, il n'y a pas de raison de penser que la nature de l'interaction antibiotique-bactérie variera avec l'âge des patients. Enfin, la relation concentration-réponse de la ciprofloxacine chez les nouveau-nés, les enfants plus grands et les adultes est vraisemblablement similaire

car la pénétration tissulaire de cet antibiotique est excellente et les concentrations intrabactériennes obtenues ne varient pas avec l'âge gestationnel des patients. En résumé, des différences importantes entre les classes d'âge sont à prévoir pour la pharmacocinétique et, éventuellement, la sécurité d'emploi de la ciprofloxacine mais moindres concernant la pharmacodynamie de cette molécule.

Ainsi, les objectifs du développement clinique de la ciprofloxacine ont été les suivants :

- Définir les paramètres pharmacocinétiques et le schéma posologique de la ciprofloxacine adapté au nouveau-né à terme et prématuré
- Etablir le profil de la sécurité d'emploi de cette molécule chez le nouveau-né (à court et long terme)
- Etablir son utilité thérapeutique (« *effectiveness* ») dans la pratique clinique courante.

Pour répondre à ces objectifs, deux types d'étude clinique ont été proposées. D'abord, **l'étude pilote de pharmacocinétique** détaillée précédemment dans le chapitre 5 pour définir le schéma posologique optimal de la ciprofloxacine dans les infections néonatales à germes Gram négatif et décrire l'efficacité et tolérance à court terme de ce traitement. Ensuite, une **étude clinique exposés-non exposés** (cohorte) pour apprécier la tolérance et l'efficacité de ce traitement à court et long-terme (18 mois) et valider la dose choisie dans la première étude pharmacocinétique (modélisation PK/PD sur critère pharmacodynamique clinique). Durant cette étude, nécessairement multicentrique, les nouveau-nés et nourrissons (jusqu'à trois mois d'âge chronologique) présentant une infection suspectée ou confirmée à bactéries Gram négatif sont divisés en deux groupes : ceux mis sous ciprofloxacine (exposés) ou ceux mis sous un autre traitement antibiotique (non-exposés) selon les habitudes thérapeutiques en tenant compte de l'écologie bactérienne de chaque centre.

En effet, la réalisation d'un essai contrôlé randomisé en double insu ne pouvait pas être envisagée pour les raisons suivantes :

- La ciprofloxacine est souvent utilisée dans les cas d'infections dues à des germes multi-résistants. Dans ce contexte, le choix de l'antibiotique est dicté par le profil de sensibilité de la bactérie en question mais aussi le profil des résistances observées dans l'unité. Une alternative thérapeutique est alors difficilement envisageable.
- L'administration de la ciprofloxacine dans des unités où elle n'est pas habituellement prescrite pourrait introduire un risque de sélection de souches bactériennes résistantes.
- Un essai contrôlé randomisé devait être construit autour d'une hypothèse de non-infériorité de la ciprofloxacine par rapport à un autre traitement antibiotique. Outre les difficultés à identifier un comparateur adéquat (ayant des données d'efficacité fiables chez le nouveau-né, étant accepté par toutes les unités de néonatalogie...), ces essais requièrent l'inclusion d'un grand nombre de patients, bien plus important que celui des essais de supériorité. Dans le contexte d'une utilisation marginale de la ciprofloxacine (indications limitées, utilisation en deuxième intention...) et d'une infection rare comme les infections néonatales tardives à bactéries Gram négatif, cet essai devra être extrêmement prolongé pour pouvoir espérer inclure le nombre de patients requis.

Pour pallier les risques de biais des études comparatives observationnelles, des techniques statistiques adéquates sont prévues dans l'étude de cohorte, comme la création d'un score de propension pour stratifier les patients à l'inclusion. L'objectif primaire de l'étude observationnelle sera l'évaluation de la tolérance de la ciprofloxacine par la comparaison, entre les groupes, du nombre des effets indésirables à court et long-terme. Particulièrement, l'appréciation du développement psychomoteur des nourrissons à 18 mois de vie par le score de Bayley est prévu. De même, l'état musculo-squelettique des patients sera apprécié en utilisant outre l'observation clinique, des échographies articulaires et de l'imagerie par résonance nucléaire à 18 mois.

Concernant l'évaluation de l'utilité thérapeutique de la ciprofloxacine, objectif secondaire de cet essai, elle sera appréciée sur des critères cliniques et si possible, microbiologiques à dix jours (« *test-of-cure* ») et à quatre semaines (« *post-therapy follow-up visit* ») du début du traitement par ciprofloxacine (traitement prévu de sept jours).

Finalement, cette proposition de développement clinique a été étudiée par le comité pédiatrique de l'EMA mais n'a pas été acceptée à cause de l'absence d'une évaluation formelle de l'efficacité de la ciprofloxacine par un essai contrôlé randomisé en double insu chez le nouveau-né.

Actuellement, des discussions sont en cours au sein du consortium pour définir la future stratégie à adopter : dépôt d'un nouveau PIP incluant une argumentation plus précise du schéma de développement proposé ou abandon du PIP et du PUMA mais mise à disposition de la communauté médicale des données scientifiques générées par le consortium TINN.

OPTIMISER LE RECRUTEMENT

VIII. OPTIMISER LE RECRUTEMENT

Un des défis majeurs de la recherche clinique est le recrutement des participants éligibles. Récemment, une revue de la Cochrane Collaboration a montré qu'une grande majorité d'essais cliniques incluant des patients adultes ne réussissait pas à recruter le nombre nécessaire de participants dans les délais initialement spécifiés [Mapstone J et al., 2007]. Certaines études ont suggéré que la sensibilisation des participants à la maladie étudiée, l'impact potentiellement positif sur leur santé ou des incitations monétaires augmenteraient les taux de recrutement mais aucune stratégie n'a été validée à ce jour [Caldwell, P et al., 2010].

Ces difficultés de recrutement compliquent le déroulement des essais cliniques car ils allongent significativement leurs délais de réalisation et par conséquent leurs coûts globaux. Par ailleurs, si de tels essais ne sont pas terminés, ils n'ont plus la puissance nécessaire pour détecter des différences cliniquement significatives sur les critères de jugement importants ce qui diminue considérablement la précision des résultats [Carter R, 2004]. Les difficultés de recrutement peuvent également être à l'origine de nombreux biais, notamment de sélection, ce qui limite la validité et l'extrapolation des résultats et conclusions d'un essai. Enfin, lorsque la durée de la période d'inclusion est prolongée afin de permettre le recrutement du nombre de sujets nécessaire à la vérification de l'hypothèse testée, il est possible que les pratiques cliniques aient changé avant la diffusion des résultats de l'essai, ce qui invalide son intérêt scientifique et clinique [Gillan M et al., 2000].

A. Le recrutement dans la recherche clinique en néonatalogie

Le recrutement dans la recherche clinique est généralement considéré plus difficile en pédiatrie qu'en médecine adulte à l'exception des essais cliniques en oncologie pédiatrique [Caldwell P et al., 2004 ; Bleyer W, 1996 ; Chessels J et al., 1995 ; Collet J et al., 1991]. Les raisons principales incluent le faible nombre d'enfants atteints dans certaines pathologies, la complexité de l'encadrement éthique de ces essais (notamment l'obtention du consentement éclairé des deux parents) et l'absence d'investigateurs compétents en recherche pédiatrique [Smyth R et Weindling A, 1999]. De récentes études ont suggéré que la réticence de certains pédiatres-investigateurs à solliciter la participation de leurs patients dans les essais cliniques pouvait également être un facteur déterminant [Amiel P et al., 2007 ; Caldwell P et al., 2002]. L'attitude des pédiatres vis-à-vis du recrutement de leurs patients peut être influencée par leur perception personnelle de la recherche clinique, leurs préoccupations concernant d'éventuels préjudices pour le bien-être des patients et leur relation médecin-malade, ainsi que des contraintes financières et de temps [Rendel J et al., 2007]. Cette réticence des investigateurs peut en effet être un obstacle important pour le recrutement dans la recherche, d'autant plus que la majorité des familles et enfants approchés reconnaissent être influencées dans leur décision par les recommandations de leur médecin traitant [Singhal N et al., 2002 ; Tait A et al., 2003 ; Wendler D et Jenkins T, 2008].

Cependant, le recrutement des participants dans les essais cliniques en néonatalogie présente probablement des obstacles supplémentaires et souvent spécifiques à cette population pédiatrique. Les difficultés de recrutement des nouveau-nés sont souvent multifactorielles et sont liées au personnel soignant impliqué dans la recherche (médecins, infirmières), aux parents, aux nouveau-nés et aux caractéristiques de l'essai clinique.

Facteurs liés aux soignants

Alors que les professionnels de la santé néonatale soutiennent la recherche clinique chez le nouveau-né, il y a très peu d'études qui se sont spécifiquement intéressées à leur perception de la recherche et à leur implication réelle [Mason S et Allmark P, 2000 ; Singhal N et al., 2004 ; Walterspiel J, 1990]. Une étude a rapporté qu'environ 30% de néonatalogistes et d'infirmières en néonatalogie consentiraient à la participation de leur propre bébé dans un essai comportant un risque modéré et pas de bénéfice direct [Singhal N et al., 2004]. En effet, certains néonatalogistes ont déjà exprimé leur inconfort avec la procédure du consentement éclairé et avec l'information qu'ils doivent préalablement délivrer aux parents concernant le protocole et les risques inhérents [Mason S et Allmark P, 2000 ; Shilling V et al., 2010]. Ils sont souvent préoccupés par les effets néfastes que cette information pourrait avoir sur leur relation avec les familles. Certains craignent également que la participation dans la recherche ait des conséquences négatives sur le bien-être de leurs patients qui sont pour la plupart déjà très fragiles physiquement. Toutefois, il a été démontré que le devenir des nouveau-nés participants à un essai contrôlé randomisé même dans le bras placebo, est bien meilleur que celui des nouveau-nés éligibles mais qui ne participent pas [Schmidt B et al., 1999 ; Lantos J, 1999]. Par ailleurs, certains médecins pensent que le recueil du consentement éclairé dans les situations d'urgence, fréquentes en soins intensifs néonataux, submerge les parents car il survient à des moments de stress et de grande difficulté émotionnelle [Walterspiel J, 1990 ; Nicklin S et Spencer S, 2004]. Certains pensent même que la plupart des parents n'ont pas la formation nécessaire pour comprendre entièrement les enjeux cliniques et scientifiques de la recherche médicale et ainsi ils remettent en question l'utilité même de ce consentement éclairé [Mason S, 1997 ; Truog R et al., 1999 ; Modi N, 1994]. Les caractéristiques sociodémographiques des parents influencent aussi la décision des médecins de solliciter la participation de leurs enfants. Ces derniers approchent plus volontiers les familles avec

lesquelles ils ont une meilleure communication et qu'ils jugent plus susceptibles de consentir à participer [Amiel P et al., 2007 ; Caldwell P et al., 2002].

Un obstacle supplémentaire demeure la perception négative de la recherche voire l'incompréhension de la méthodologie d'un essai clinique par les professionnels, comme par exemple la nécessité de randomiser les patients éligibles. Beaucoup de professionnels et plus volontiers d'infirmières, qui ont aussi un rôle important dans la participation des familles, reconnaissent ne pas avoir la formation, ni l'expérience nécessaire, pour discuter avec les familles de la recherche clinique [Mason S et Allmark P, 2000 ; Singhal N et al., 2004 ; Caldwell P et al., 2005]. Par ailleurs, les cliniciens peuvent ne pas juger l'objectif et le rationnel d'un essai comme étant importants car ils ne sont souvent pas informés de l'absence de preuve pour l'utilisation adéquate d'un médicament et ainsi ne ressentent pas d'incertitude vis-à-vis de sa prescription courante [Gates S et al., 2004]. Cela est souvent le cas des médicaments non correctement évalués mais qui sont déjà largement et depuis très longtemps prescrits en pratique courante, soit quasiment tous les médicaments en néonatalogie. Bien souvent, il existe aussi un moment opportun pour mettre en place un essai et au-delà duquel l'évaluation du médicament est impossible car son utilisation est déjà intégrée dans la pratique clinique courante. Par exemple, un essai destiné à déterminer la meilleure manière d'accoucher les nouveau-nés de très faible poids de naissance a échoué car avant de débiter l'essai les pratiques s'étaient orientées vers un accouchement par césarienne [Lumley J et al., 1985]. En conséquence, les cliniciens ne voulaient plus randomiser les patientes même s'il n'y avait aucune preuve fiable apportée par un essai contrôlé randomisé en faveur de cette pratique.

Tout comme bien d'autres pédiatres, les néonatalogistes expriment un manque de temps dédié à la recherche. En effet, l'activité de soins intensifs qui est généralement dense avec beaucoup de situations urgentes ainsi que le manque de personnel disponible peuvent

décourager l'implication des professionnels [Mason S et Allmark P, 2000 ; Caldwell P et al., 2005 ; Dalen J et al., 2010]. De plus, les essais cliniques en néonatalogie étant souvent multicentriques, faute de patients suffisamment nombreux sur un seul site, cela ajoute des contraintes administratives qui peuvent consommer beaucoup de temps et d'énergie. Enfin, de nombreux cliniciens manquent possiblement de motivation pour participer à des essais collaboratifs multicentriques du fait de l'absence supposée ou réelle de récompense pour eux et leur service [Gates S et al., 2004].

Facteurs liés aux parents

Le consentement des deux parents est exigé pour la participation d'un nouveau-né à un essai clinique. Une étude a montré que environ 10% des parents refuseraient de faire participer leur bébé à un essai clinique, quelque soit le type de recherche [Morley C et al., 2005]. De même, un quart de ceux qui consentent se déclarent inquiets en raison de la participation de leur nouveau-né à un essai [Morley C et al., 2005 ; Stenson B et al., 2004]. Un des facteurs les plus influents sur la volonté des parents à consentir est le rapport entre les bénéfices perçus et les risques encourus ainsi que l'importance et la nature du sujet de recherche [Caldwell P et al., 2004]. Les bénéfices perçus incluent la possibilité pour leur enfant de bénéficier de nouveaux traitements et globalement des meilleurs soins médicaux mais aussi la satisfaction d'aider d'autres enfants se trouvant dans la même situation dans l'avenir [Caldwell P et al., 2005 ; Zupancic J et al., 1997 ; Hoehn K et al., 2004]. Bien sûr, plus les risques liés à l'essai sont perçus comme importants, moins les parents consentent à la participation de leur bébé. Ces risques impliquent tous les effets indésirables connus et inconnus d'un médicament, la possibilité que leur bébé reçoive un traitement inefficace après randomisation [Snowdon C et al., 1997] et tout inconvénient lié à la conduite de la recherche,

comme des procédures douloureuses, des examens supplémentaires et une prolongation de la durée de l'hospitalisation [Mason S et Allmark P, 2000].

Les parents sont certainement aussi influencés par leur avis personnel et leurs connaissances sur la recherche en général. Les parents qui acceptent la participation de leur enfant ont globalement un avis positif sur la recherche [Zupancic J et al., 1997]. L'image véhiculée par les médias de la recherche médicamenteuse et surtout celle chez les enfants n'est pas toujours positive, cela peut inciter à la méfiance et entraver sérieusement le recrutement [Bartlett C et al., 2002]. Enfin, des études ont démontré que les parents qui consentent à la participation de leur enfant ont un niveau d'éducation plus faible, un niveau socio-économique plus bas et ont un recours plus fréquent aux services de soins que les parents qui refusent la participation de leur enfant [Harth S et al., 1992]. Toutefois, des études en néonatalogie n'ont pas retrouvé l'influence de ces facteurs dans la décision des parents [Singhal N et al., 2002 ; Zupancic J et al., 1997].

Facteurs liés aux nouveau-nés

La gravité de l'état de santé des nouveau-nés hospitalisés influence certainement la décision de leurs parents de consentir ou non à la recherche mais aussi la décision de leur médecin traitant de proposer ou non une éventuelle participation. La majorité des pédiatres pensent ainsi que les parents des enfants gravement atteints seront moins susceptibles de vouloir participer à un essai clinique [Caldwell P et al., 2002 ; Walterspiel J, 1990]. Cependant, l'inverse a aussi été démontré. En effet, la proportion de parents ayant consenti à la participation de leur bébé dans un essai nécessitant une inclusion rapide en situation d'urgence a été plus importante que celle dans une étude avec inclusion tardive (71% versus 43%) [Levene M et al., 1996]. Ces différences reflétant probablement la réponse des parents

vis-à-vis de la nécessité d'une prise en charge urgente du fait de la pathologie aigüe et sévère de leur nouveau-né.

Il est probablement plus difficile pour les parents de donner leur consentement pour la participation de leur nouveau-né malade à la recherche qu'il le serait pour leur propre participation [Singhal N et al., 2002]. Moralement, certains parents considèrent qu'ils n'ont pas le droit d'accepter le même niveau de risque pour eux que pour leur bébé. Cela est aussi le cas de certains comités d'éthique qui acceptent l'inclusion des patients adultes dans des protocoles de recherche comprenant des risques et sans bénéfices directs alors qu'ils sont complètement défavorables pour la conduite de telles études chez le nouveau-né [Shaddy R et Denne S, 2010].

Facteurs liés au protocole de recherche

En général, il existe une méconnaissance et une mauvaise compréhension des essais contrôlés randomisés par les parents [Singhal N et al., 2002 ; Snowdon C et al., 1999]. Le rationnel de l'attribution aléatoire des traitements par randomisation ou l'utilisation d'un bras placebo est souvent mal compris par les parents mais aussi par les professionnels de santé, médecins et infirmières [Singhal N et al., 2004 ; Snowdon C et al., 1997 ; Burgess E et al., 2003]. A cause de cette confusion, la présence d'un bras placebo peut être un obstacle au recrutement et elle est même jugée comme étant contre l'éthique dans le cas des pathologies graves mettant en jeu le pronostic vital, situation des plus fréquentes en soins intensifs néonataux [Caldwell P et al., 2002 ; Caldwell P et al., 2003]. Clairement, la plupart des pédiatres et des parents préfèrent les essais de non-infériorité ou de supériorité incluant un bras contrôle bénéficiant d'un traitement actif [Caldwell P et al., 2004]. Par ailleurs, les protocoles des essais contrôlés randomisés sont souvent jugés comme étant trop restrictifs et

mal conçus pour être appliqués dans la pratique clinique courante, ce qui diminue les motivations des pédiatres à participer et à inclure des malades [Caldwell P et al., 2005].

Enfin, la mauvaise compréhension de la procédure du consentement est également fréquemment rapportée [Mason S et Allmark P, 2000 ; Nicklin S et Spencer S, 2004 ; Ballard H et al., 2004]. La proportion des consentements jugés défaillants par les parents et les professionnels (en termes de compréhension, de compétence, de qualité d'information et de volonté de participer) est plus importante dans le cadre de protocoles de recherche qui se déroulent en situations d'urgence ou qui impliquent plus de risque et d'inconfort pour les nouveau-nés [Mason S et Allmark P, 2000]. De même, certains parents ont du mal à comprendre le formulaire de consentement, parfois pour des simples raisons de lisibilité, et ils le jugent souvent trop long comprenant des formulations parfois effrayantes voir incompréhensibles car trop techniques [Tait A et al., 2003 ; Shilling V et al., 2010].

B. Comment favoriser le recrutement dans la recherche clinique en néonatalogie ?

Les facteurs qui influencent la participation des nouveau-nés dans la recherche clinique ont pu être identifiés même si les études correspondantes sont peu nombreuses. Par contre, aucune stratégie visant à optimiser le recrutement dans les essais en néonatalogie n'a été validée et aucune étude n'a comparé des stratégies différentes en termes de taux de recrutement à ce jour. Il existe ainsi un vaste champ de recherche autour du recrutement en néonatalogie même si plusieurs hypothèses ont été émises sur les mesures à prendre. De même, aucune étude n'a évalué l'impact des croyances et des attitudes des différents groupes ethniques sur la participation des nouveau-nés à la recherche clinique [Ward Platt M, 2005].

Toutefois, la sensibilisation de la communauté médicale et du grand public autour du rationnel et des bénéfices des essais cliniques ainsi que des risques encourus par l'utilisation

des médicaments non correctement évalués demeure nécessaire pour améliorer le recrutement. La formation appropriée des professionnels de la santé néonatale aux questions et méthodes de la recherche pourrait améliorer significativement leur motivation et leur participation aux essais. Des efforts supplémentaires doivent être entrepris afin que les médecins et les infirmières puissent considérer la recherche comme étant une partie intégrante de leur activité professionnelle quotidienne et qu'ils puissent disposer du temps et des ressources nécessaires pour s'y consacrer.

Une formation des investigateurs sur la procédure de recueil du consentement parental pourrait aussi être très utile. Certes, l'information éclairée autour d'un protocole peut être difficilement transmise et comprise en situation d'urgence et certains parents expriment l'envie de déléguer la décision de la participation à leur néonatalogiste référent [Zupancic J et al., 1997]. Toutefois, il est impératif de s'efforcer de recueillir correctement le consentement des parents et dans de bonnes conditions. Cela limite la probabilité d'une mauvaise interprétation par les parents des risques et des bénéfices liés à la recherche et par conséquent, leur possible coercition et influence par l'opinion des investigateurs [Singhal N et al., 2002 ; Ballard H et al., 2004]. Certains parents ont aussi suggéré que l'information doit être donnée le plus tôt possible, voir avant l'accouchement, pour avoir le plus de temps possible pour réfléchir [Burgess E et al., 2003]. Ils ont suggéré qu'une information plus claire leur soit délivrée sur les raisons médicales et scientifiques qui ont conduit à la mise en place de l'essai et que les médecins puissent prendre le temps nécessaire pour en discuter avec eux. Ceci est également vrai pour l'information concernant la validation de l'étude par un comité d'éthique que la plupart des parents semblent ignorer [Mason S et Allmark P, 2000].

Enfin, plusieurs aspects du design des essais cliniques en néonatalogie doivent être réévalués afin de faciliter leur mise en place et leur acceptation par les professionnels de santé et les parents. La minimisation des risques et des inconvénients liés à la recherche comme

l'éviction des prises de sang inutiles, des examens complémentaires invasifs et la prolongation de l'hospitalisation favoriseront sans doute la participation. Mais, il est aussi important de continuer à employer des méthodologies innovantes comme les méthodes d'analyse séquentielles fréquentistes ou bayésiennes qui sont moins exigeantes en nombre de patients à inclure et qui sont tout aussi puissantes que les méthodologies standards. Le développement récent d'essais pragmatiques ayant pour objectif d'évaluer l'efficacité (« *effectiveness* ») réelle des médicaments dans la pratique clinique courante plutôt que leur efficacité (« *efficacy* ») dans un cadre d'utilisation « idéal » et trop restrictif, doit être renforcé. Il permettrait certainement une meilleure acceptation et réalisation des protocoles de recherche médicamenteuse en néonatalogie.

DISCUSSION

IX. DISCUSSION

Ce travail de thèse a porté sur l'analyse des différentes étapes permettant la réalisation d'études cliniques médicamenteuses chez le nouveau-né en présentant des exemples du développement des médicaments anti-infectieux.

La population néonatale est probablement la population pédiatrique la plus vulnérable et celle dont les besoins en médicaments sont les plus importants, proportionnellement à sa taille. Au même temps, elle représente la population pédiatrique pour laquelle le plus grand nombre de médicaments est prescrit en dehors des termes d'une AMM, par conséquent sans les données pharmacologiques habituellement exigées pour une utilisation optimale. Ce fait est étroitement lié aux difficultés de la recherche clinique chez le nouveau-né. Mais comment optimiser la conception et la réalisation d'études cliniques médicamenteuses chez le nouveau-né afin de récupérer des données de prescription fiables ?

La réponse à cette question repose sur un développement médicamenteux efficace, articulé autour de quatre axes principaux :

A. Améliorer la conception et la planification des études néonatales

Pour cela, il est important de bien comprendre les particularités de la population néonatale et surtout le fait qu'il s'agit d'une population d'étude particulièrement hétérogène en termes de maturation organique. Selon l'âge gestationnel à la naissance mais aussi le poids de naissance, les paramètres pharmacocinétiques et pharmacodynamiques d'un même médicament seront bien différents. Le choix des sous-groupes de nouveau-nés à évaluer doit

être justifié par des éléments basés sur la physiologie humaine et le mécanisme d'action du médicament en question et doit être défini rapidement pour adapter la méthodologie de l'essai s'y rapportant. Au même temps, une bonne connaissance de la pathologie en question, permet de préciser la taille de la population concernée et les critères de jugement pertinents. Les éventuels événements cliniques et séquelles liés à l'évolution de la pathologie néonatale doivent être pris en compte dans l'analyse des effets bénéfiques et surtout indésirables attribués à l'action du médicament étudié.

A part les nouveaux médicaments dont le développement est désormais défini par les récentes recommandations des instances réglementaires, une grande partie des médicaments utilisés en néonatalogie sont des « vieux » médicaments qui ne sont plus protégés par un brevet. L'étude de ces molécules, largement incitée et soutenue par les autorités, nécessite au préalable une évaluation de leur utilisation courante en néonatalogie. Les praticiens forts de leur expérience personnelle, parfois très longue, prescrivent ces médicaments dans des indications et avec des schémas posologiques en dehors de toute recommandation consensuelle. Il en résulte ainsi une grande variabilité des modalités d'administration, qu'il faut appréhender à la conception et avant la mise en place des essais.

Ces enquêtes constituent de véritables études de « faisabilité » de certains essais et apportent des informations majeures à prendre en considération dans le « design » des essais afin de favoriser la participation des médecins.

B. Evaluer la possibilité d'extrapolation des données animales et humaines

Le fait que plusieurs médicaments utilisés en néonatalogie possèdent déjà des données d'évaluation chez l'animal et l'humain (adulte, enfants plus âgés et même parfois dans la population néonatale), souligne l'importance d'un recueil exhaustif de la littérature médicale

existante. Cette démarche est fortement recommandée par les experts afin de juger de la possibilité d'une extrapolation de ces informations, au moins en partie, au nouveau-né. L'arbre décisionnel construit par les instances réglementaires détaille les principes du processus d'extrapolation des données, mais les éléments déterminants de cette décision sont souvent issus de consensus entre experts pédiatres.

Pour le développement des médicaments anti-infectieux, exemple extensivement abordé au cours de cette thèse, la réponse microbiologique au traitement ainsi que la relation concentration-réponse peuvent aisément être considérées comme étant similaires entre les différentes classes d'âge. Reste alors à définir les paramètres pharmacocinétiques et ainsi les schémas posologiques appropriés pour atteindre les niveaux d'exposition efficaces préalablement définis chez l'adulte. Cependant, l'interaction du médicament avec le pathogène est certes la principale composante de l'action des anti-infectieux mais elle n'est pas la seule. Les effets thérapeutiques sont également déterminés par l'interaction du médicament avec l'hôte. L'étude de l'efficacité clinique des anti-infectieux, spécifiquement dans la population néonatale, demeure alors nécessaire car elle est difficilement extrapolable des données provenant des études adultes ou chez des enfants plus âgés.

Un des outils les plus prometteurs d'exploration des effets médicamenteux chez le nouveau-né est l'étude préclinique chez l'animal juvénile. Ces modèles animaux permettent l'évaluation des effets médicamenteux chez des organismes immatures, très proches de la physiologie néonatale humaine. Actuellement, les études chez des animaux juvéniles sont en pleine croissance. Toutefois, ces études peuvent impliquer des contraintes pratiques et financières qui alourdissent le développement médicamenteux. Par conséquent, l'objectif, la conception et les modalités de réalisation de telles études doivent être soigneusement évalués au préalable. Cela nécessite une collaboration étroite entre néonatalogistes et experts des

l'expérimentation animale qu'il faut privilégier pour d'obtenir des informations pertinentes et fiables.

C. Intégrer les outils de modélisation et de simulation de données dans le développement médicamenteux néonatal

Les études pharmacocinétiques sont une étape incontournable du développement médicamenteux chez le nouveau-né. Alors que la pharmacodynamie peut parfois être considérée comme similaire entre les classes d'âge, comme dans l'exemple des médicaments anti-infectieux, des différences sont toujours à prévoir concernant la pharmacocinétique de la majorité des médicaments étudiés. Ces études constituent également un lien indiscutable entre les données existantes, animales et humaines, et celles indispensables pour la prescription néonatale.

Différentes méthodes de modélisation de données ont été développées ces dernières années ou sont en cours de développement. Certaines comme la technique de modélisation de population, sont rapidement devenues les outils de référence pour les études pharmacocinétiques chez le nouveau-né à cause de leurs nombreux avantages d'ordre pratique et éthique. Toutefois, les paramètres pharmacocinétiques néonataux ne sont pas les seules informations obtenues par une analyse de ce type. L'utilisation des modèles pharmacocinétiques en association à des techniques de simulation de données, permettent une meilleure appréhension des posologies efficaces et du 'design' des essais cliniques.

L'implémentation des techniques de modélisation et de simulation de données nécessite certes une expertise statistique et technique de pointe mais aussi l'apport des cliniciens pour la sélection et l'exploration de l'impact de paramètres cliniques et biologiques pertinents chez le nouveau-né. Dans le cas particulier des médicaments anti-infectieux, la collaboration étroite

avec les médecins spécialistes de maladies infectieuses se révèle particulièrement utile afin d'aborder les questions d'efficacité microbiologique et du potentiel d'émergence de souches résistantes. Cette collaboration contribuera au meilleur choix des critères de jugement de l'étude et des modalités de surveillance des nouveau-nés.

D. Privilégier des méthodologies d'étude clinique innovantes et surtout pragmatiques

Les nouveau-nés ont le même droit d'accès à des médicaments nouveaux, efficaces et inoffensifs, par conséquent correctement évalués, que les adultes ou les enfants plus âgés. Les essais comparatifs randomisés demeurent la méthodologie de référence pour l'exploration des effets médicamenteux. Des progrès importants ont été notés dans l'implémentation de méthodes d'analyse statistique plus économes en termes de nombre de sujets nécessaires (par exemple des méthodes bayésiennes). Cependant, bien que la réalisation des essais doive toujours être considérée et privilégiée dans la recherche clinique, l'application inflexible du principe de randomisation peut conduire à des impasses scientifiques dans certaines situations cliniques comme les infections bactériennes néonatales. Par ailleurs, une recherche clinique de mauvaise qualité, même si elle comporte une étape d'allocation du traitement par randomisation, est une recherche contre éthique.

Nous avons traité extensivement l'exemple de l'évaluation des médicaments anti-infectieux. Cette évaluation est actuellement faible et de mauvaise qualité, même si elle comporte une étape de randomisation des traitements. Nous avons abordé les raisons pour expliquer ce phénomène en détaillant les difficultés de la mise en place de tels essais pour l'évaluation des antibiotiques. Toutefois, malgré les efforts pour contourner ces difficultés, il existe des situations en infectiologie néonatale où l'attribution aléatoire des traitements peut

être infaisable pour des raisons éthiques et cliniques voire même inutile quand l'objectif principal est l'évaluation de l'utilité du médicament en pratique clinique courante.

Elaborer et implémenter des méthodologies alternatives n'est pas synonyme d'accepter des niveaux de preuves plus faibles ou une recherche de moindre qualité pour les nouveau-nés que ceux exigés pour les adultes ou les enfants plus âgés. Il s'agit simplement d'aborder les problématiques cliniques d'une manière plus pragmatique en réalisant des essais médicamenteux qui apporteront des réponses solides aux questions de la recherche tout en étant plus proche de la pratique médicale et de ce fait, seront mieux acceptés par les médecins et les familles. C'est dans ce contexte que la réalisation d'un colloque thématique sur les enjeux, dogmes et alternatives de l'évaluation du bénéfice/risque des médicaments en pédiatrie est actuellement en discussion à l'initiative de l'unité d'Epidémiologie Clinique de l'Hôpital Robert Debré (projet PED-RANDO, équipes impliquées : Pr Corinne Alberti, responsable du projet, INSERM CIE5, Hôpital Robert Debré; Pr Florence Tubach, INSERM CIE 801, Hôpital Bichat ; Dr. Philippe Amiel, Unité de recherche en sciences humaines et sociales, Institut Gustave Roussy ; Pr Evelyne Jacqz-Aigrain, CIC 9202, Hôpital Robert Debré).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

X. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La population néonatale est probablement la population pédiatrique la plus vulnérable et celle exposée à un plus grand nombre de médicaments prescrits en dehors des termes d'une AMM, sans les données pharmacologiques habituellement exigées pour une utilisation optimale. Pour autant, les besoins en médicaments de la population néonatale sont importants et pour certaines classes médicamenteuses parfois plus élevés que ceux des enfants plus âgés. Malgré les initiatives réglementaires des dernières années favorisant la recherche clinique médicamenteuse chez l'enfant, cette situation pourrait ne pas changer dans un proche avenir. Car le développement médicamenteux présente de nombreux enjeux et difficultés spécifiques à la population pédiatrique mais aussi à chaque classe thérapeutique.

En exposant les étapes de ce développement chez le nouveau-né, nous avons illustré les contraintes et les leviers possibles en s'appuyant sur l'exemple de l'évaluation des médicaments anti-infectieux. Les particularités de la physiologie néonatale ainsi que celles des infections néonatales influencent la pharmacocinétique et la pharmacodynamie de ces médicaments. La détermination de l'objectif des essais cliniques à réaliser chez le nouveau-né nécessite une collaboration étroite entre pharmacologues, biostatisticiens, méthodologistes, néonatalogistes et experts en maladies infectieuses. Cette recherche est facilitée par l'implémentation de méthodes de modélisation et de simulation qui doivent davantage être considérées car elles permettent de relier les données adultes et néonatales. De même, il est impératif de renforcer l'élaboration de plans expérimentaux plus pragmatiques, susceptibles d'apporter des réponses solides aux questions de la recherche tout en étant plus proche des pratiques médicales usuelles et donc mieux acceptés par les médecins et les familles. Ces collaborations doivent être consolidées par la création de groupes de travail réunissant tous les acteurs cités plus haut, ainsi qu'à travers de réseaux de recherche clinique pédiatrique comme

le réseau pédiatrique des Centres d'Investigation Clinique (<http://www.cic-pediatriques.fr/>).

La mise en place de colloques thématiques et la création des plateformes d'études translationnelles en pédiatrie favoriserait également les échanges entre experts et la promotion d'une recherche clinique pédiatrique de qualité.

REFERENCES

XI. REFERENCES

- Ahmed, A.S., Chowdhury, M.A., Hoque, M. and Darmstadt, G.L. Clinical and bacteriological profile of neonatal septicemia in a tertiary level pediatric hospital in Bangladesh. *Indian Pediatr*, 2002. 39(11): 1034-9.
- Alghasham, A.A. and Nahata, M.C. Clinical use of fluoroquinolones in children. *Ann Pharmacother*, 2000. 34(3): 347-59; quiz 413-4.
- Allegaert, K., Rochette, A. and Veyckemans, F. Developmental pharmacology of tramadol during infancy: ontogeny, pharmacogenetics and elimination clearance. *Paediatr Anaesth*, 2011. 21(3): 266-73.
- American Academy of Pediatrics Committee on Drugs (1996). Unapproved uses of approved drugs: the physician, the package insert, and the Food and Drug Administration: subject review. . *Pediatrics*. 98(1): 143-5.
- American Academy of Pediatrics Committee on Drugs (2002). Uses of drugs not described in the package insert (off-label uses). *Pediatrics*. 110(1 Pt 1): 181-3.
- American Academy of Pediatrics Committee on Fetus and Newborn (2004). Age terminology during the Perinatal Period. *Pediatrics*. 114(5): 1362-1364.
- Amiel, P., Moreau, D., Vincent-Genod, C., Alberti, C., Hankard, R., Ravaud, P., Gottot, S. and Gaultier, C. Noninvitation of eligible individuals to participate in pediatric studies: a qualitative study. *Arch Pediatr Adolesc Med*, 2007. 161(5): 446-50.
- Anderson, B.J., Allegaert, K. and Holford, N.H. Population clinical pharmacology of children: general principles. *Eur J Pediatr*, 2006a. 165(11): 741-6.
- Anderson, B.J., Allegaert, K. and Holford, N.H. Population clinical pharmacology of children: modelling covariate effects. *Eur J Pediatr*, 2006b. 165(12): 819-29.
- Aquino, V.M., Herrera, L., Sandler, E.S. and Buchanan, G.R. Feasibility of oral ciprofloxacin for the outpatient management of febrile neutropenia in selected children with cancer. *Cancer*, 2000. 88(7): 1710-4.
- Arant, B.S., Jr. Developmental patterns of renal functional maturation compared in the human neonate. *J Pediatr*, 1978. 92(5): 705-12.

- Armstrong, R.W., Eichner, E.R., Klein, D.E., Barthel, W.F., Bennett, J.V., Jonsson, V., Bruce, H. and Loveless, L.E. Pentachlorophenol poisoning in a nursery for newborn infants. II. Epidemiologic and toxicologic studies. *J Pediatr*, 1969. 75(2): 317-25.
- Arora, R.K., Gupta, A., Joshi, N.M., Kataria, V.K., Lall, P. and Anand, A.C. Multidrug resistant typhoid fever: study of an outbreak in Calcutta. *Indian Pediatr*, 1992. 29(1): 61-6.
- Aujard, Y., Farnoux, C., Lefevre, S., Maury, L., Delezoide, A.L. and Mariani-Kurkdjian, P. [Candida infections in newborns]. *Arch Pediatr*, 2003. 10 Suppl 5: 569s-574s.
- Aujard, Y. and Gendrel, D. *Les quinolones en pédiatrie*. 1994, Flammarion: Paris.
- Aurangzeb, B. and Hameed, A. Neonatal sepsis in hospital-born babies: bacterial isolates and antibiotic susceptibility patterns. *J Coll Physicians Surg Pak*, 2003. 13(11): 629-32.
- Avenel, S., Bomkratz, A., Dassieu, G., Janaud, J.C. and Danan, C. [The incidence of prescriptions without marketing product license in a neonatal intensive care unit]. *Arch Pediatr*, 2000. 7(2): 143-7.
- Bajcetic, M., Jelisavcic, M., Mitrovic, J., Divac, N., Simeunovic, S., Samardzic, R. and Gorodischer, R. Off label and unlicensed drugs use in paediatric cardiology. *Eur J Clin Pharmacol*, 2005. 61(10): 775-9.
- Ball, P. and Tillotson, G. Tolerability of fluoroquinolone antibiotics. Past, present and future. *Drug Saf*, 1995. 13(6): 343-58.
- Ballard, H.O., Shook, L.A., Desai, N.S. and Anand, K.J. Neonatal research and the validity of informed consent obtained in the perinatal period. *J Perinatol*, 2004. 24(7): 409-15.
- Barr, J., Brenner-Zada, G., Heiman, E., Pareth, G., Bulkowstein, M., Greenberg, R. and Berkovitch, M. Unlicensed and off-label medication use in a neonatal intensive care unit: a prospective study. *Am J Perinatol*, 2002. 19(2): 67-72.
- Bartlett, C., Sterne, J. and Egger, M. What is newsworthy? Longitudinal study of the reporting of medical research in two British newspapers. *Bmj*, 2002. 325(7355): 81-4.
- Battaglia, F.C. and Lubchenco, L.O. A practical classification of newborn infants by weight and gestational age. *J Pediatr*, 1967. 71(2): 159-63.
- Bavdekar, A., Chaudhari, M., Bhawe, S. and Pandit, A. Ciprofloxacin in typhoid fever. *Indian J Pediatr*, 1991. 58(3): 335-9.

- Beck-Sague, C.M., Azimi, P., Fonseca, S.N., Baltimore, R.S., Powell, D.A., Bland, L.A., Arduino, M.J., McAllister, S.K., Huberman, R.S., Sinkowitz, R.L. and et al. Bloodstream infections in neonatal intensive care unit patients: results of a multicenter study. *Pediatr Infect Dis J*, 1994. 13(12): 1110-6.
- Belay, E.D., Bresee, J.S., Holman, R.C., Khan, A.S., Shahriari, A. and Schonberger, L.B. Reye's syndrome in the United States from 1981 through 1997. *N Engl J Med*, 1999. 340(18): 1377-82.
- Bellissant, E., Courcier-Duplantier, S. and Blin, O. [Role of pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships in drug development]. *Therapie*, 2002. 57(4): 347-57.
- Bellissant, E., Sebille, V. and Paintaud, G. Methodological issues in pharmacokinetic-pharmacodynamic modelling. *Clin Pharmacokinet*, 1998. 35(2): 151-66.
- Benjamin, D.K., DeLong, E., Cotten, C.M., Garges, H.P., Steinbach, W.J. and Clark, R.H. Mortality following blood culture in premature infants: increased with Gram-negative bacteremia and candidemia, but not Gram-positive bacteremia. *J Perinatol*, 2004. 24(3): 175-80.
- Benjamin, D.K., Jr., Stoll, B.J., Fanaroff, A.A., McDonald, S.A., Oh, W., Higgins, R.D., Duara, S., Poole, K., Laptook, A. and Goldberg, R. Neonatal candidiasis among extremely low birth weight infants: risk factors, mortality rates, and neurodevelopmental outcomes at 18 to 22 months. *Pediatrics*, 2006. 117(1): 84-92.
- Benson, K. and Hartz, A.J. A comparison of observational studies and randomized, controlled trials. *N Engl J Med*, 2000. 342(25): 1878-86.
- Bizzarro, M.J. and Gallagher, P.G. Antibiotic-resistant organisms in the neonatal intensive care unit. *Semin Perinatol*, 2007. 31(1): 26-32.
- Black, A., Redmond, A.O., Steen, H.J. and Oborska, I.T. Tolerance and safety of ciprofloxacin in paediatric patients. *J Antimicrob Chemother*, 1990. 26 Suppl F: 25-9.
- Bleyer, W.A. Re: recruiting minorities into clinical trials: toward a participant-friendly system. *J Natl Cancer Inst*, 1996. 88(6): 377.
- BMJ Group. *British National Formulary For Children 2009*. RPS Publishing, London.

- Bouza, E., Diaz-Lopez, M.D., Bernaldo de Quiros, J.C. and Rodriguez-Creixems, M. Ciprofloxacin in patients with bacteremic infections. The Spanish Group for the Study of Ciprofloxacin. *Am J Med*, 1989. 87(5A): 228S-231S.
- Boyle, J.T. Acid secretion from birth to adulthood. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2003. 37 Suppl 1: S12-6.
- Brendel, K., Dartois, C., Comets, E., Lemenuel-Diot, A., Laveille, C., Tranchand, B., Girard, P., Laffont, C.M. and Mentre, F. Are population pharmacokinetic and/or pharmacodynamic models adequately evaluated? A survey of the literature from 2002 to 2004. *Clin Pharmacokinet*, 2007. 46(3): 221-34.
- Burgess, E., Singhal, N., Amin, H., McMillan, D.D. and Devrome, H. Consent for clinical research in the neonatal intensive care unit: a retrospective survey and a prospective study. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 2003. 88(4): F280-5; discussion F285-6.
- Caldwell, P.H., Butow, P.N. and Craig, J.C. Pediatricians' attitudes toward randomized controlled trials involving children. *J Pediatr*, 2002. 141(6): 798-803.
- Caldwell, P.H., Butow, P.N. and Craig, J.C. Parents' attitudes to children's participation in randomized controlled trials. *J Pediatr*, 2003. 142(5): 554-9.
- Caldwell, P.H., Craig, J.C. and Butow, P.N. Barriers to Australian physicians' and paediatricians' involvement in randomised controlled trials. *Med J Aust*, 2005. 182(2): 59-65.
- Caldwell, P.H., Hamilton, S., Tan, A. and Craig, J.C. Strategies for increasing recruitment to randomised controlled trials: systematic review. *PLoS Med*, 2010. 7(11): e1000368.
- Caldwell, P.H., Murphy, S.B., Butow, P.N. and Craig, J.C. Clinical trials in children. *Lancet*, 2004. 364(9436): 803-11.
- Cappon, G.D., Bailey, G.P., Buschmann, J., Feuston, M.H., Fisher, J.E., Hew, K.W., Hoberman, A.M., Ooshima, Y., Stump, D.G. and Hurtt, M.E. Juvenile animal toxicity study designs to support pediatric drug development. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*, 2009. 86(6): 463-9.
- Carter, R.E. Application of stochastic processes to participant recruitment in clinical trials. *Control Clin Trials*, 2004. 25(5): 429-36.

- Ceci, A., Felisi, M., Baiardi, P., Bonifazi, F., Catapano, M., Giaquinto, C., Nicolosi, A., Sturkenboom, M., Neubert, A. and Wong, I. Medicines for children licensed by the European Medicines Agency (EMA): the balance after 10 years. *Eur J Clin Pharmacol*, 2006. 62(11): 947-52.
- Cella, M., Gorter de Vries, F., Burger, D., Danhof, M. and Della Pasqua, O. A model-based approach to dose selection in early pediatric development. *Clin Pharmacol Ther*, 2010. 87(3): 294-302.
- Chalumeau, M., Gendrel, D., Breart, G. and Pons, G. [An example of hospital-based pharmacoepidemiology in paediatrics: tolerance to fluoroquinolones]. *Arch Pediatr*, 2004. 11(6): 500-2.
- Chalumeau, M., Tonnelier, S., D'Athis, P., Treluyer, J.M., Gendrel, D., Breart, G. and Pons, G. Fluoroquinolone safety in pediatric patients: a prospective, multicenter, comparative cohort study in France. *Pediatrics*, 2003. 111(6 Pt 1): e714-9.
- Chalumeau, M., Treluyer, J.M., Salanave, B., Assathiany, R., Cheron, G., Crocheton, N., Rougeron, C., Mares, M., Breart, G. and Pons, G. Off label and unlicensed drug use among French office based paediatricians. *Arch Dis Child*, 2000. 83(6): 502-5.
- Channa, M.A. and Janjua, M.Z. Effects of ciprofloxacin on foetal hepatocytes. *J Pak Med Assoc*, 2003. 53(10): 448-50.
- Cheesbrough, J.S., Mwema, F.I., Green, S.D. and Tillotson, G.S. Quinolones in children with invasive salmonellosis. *Lancet*, 1991. 338(8759): 127.
- Chessells, J.M., Bailey, C. and Richards, S.M. Intensification of treatment and survival in all children with lymphoblastic leukaemia: results of UK Medical Research Council trial UKALL X. Medical Research Council Working Party on Childhood Leukaemia. *Lancet*, 1995. 345(8943): 143-8.
- Chirico, G., Barbieri, F. and Chirico, C. Antibiotics for the newborn. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2009. 22 Suppl 3: 46-9.
- Choonara, I. Clinical trials of medicines in children. *Bmj*, 2000. 321(7269): 1093-4.
- Choonara, I. and Conroy, S. Unlicensed and off-label drug use in children: implications for safety. *Drug Saf*, 2002. 25(1): 1-5.

- Church, D.A., Kanga, J.F., Kuhn, R.J., Rubio, T.T., Spohn, W.A., Stevens, J.C., Painter, B.G., Thurberg, B.E., Haverstock, D.C., Perroncel, R.Y. and Echols, R.M. Sequential ciprofloxacin therapy in pediatric cystic fibrosis: comparative study vs. ceftazidime/tobramycin in the treatment of acute pulmonary exacerbations. The Cystic Fibrosis Study Group. *Pediatr Infect Dis J*, 1997. 16(1): 97-105; discussion 123-6.
- Chysky, V., Kapila, K., Hullmann, R., Arcieri, G., Schacht, P. and Echols, R. Safety of ciprofloxacin in children: worldwide clinical experience based on compassionate use. Emphasis on joint evaluation. *Infection*, 1991. 19(4): 289-96.
- Clark, R.H., Bloom, B.T., Spitzer, A.R. and Gerstmann, D.R. Reported medication use in the neonatal intensive care unit: data from a large national data set. *Pediatrics*, 2006. 117(6): 1979-87.
- Cleary, G.M., Higgins, S.T., Merton, D.A., Cullen, J.A., Gottlieb, R.P. and Baumgart, S. Developmental changes in renal artery blood flow velocity during the first three weeks of life in preterm neonates. *J Pediatr*, 1996. 129(2): 251-7.
- Collet, J.P., Floret, D., Cochat, P., Gillet, J., Cogan-Collet, J., David, L., Dauvergne, B. and Boissel, J.P. [Group meetings for patient recruitment in clinical trial in pediatrics]. *Therapie*, 1991. 46(2): 139-42.
- Comets, E., Brendel, K. and Mentre, F. Computing normalised prediction distribution errors to evaluate nonlinear mixed-effect models: the npde add-on package for R. *Comput Methods Programs Biomed*, 2008. 90(2): 154-66.
- Concato, J., Shah, N. and Horwitz, R.I. Randomized, controlled trials, observational studies, and the hierarchy of research designs. *N Engl J Med*, 2000. 342(25): 1887-92.
- Conroy, S., Choonara, I., Impicciatore, P., Mohn, A., Arnell, H., Rane, A., Knoepfel, C., Seyberth, H., Pandolfini, C., Raffaelli, M.P., Rocchi, F., Bonati, M., Jong, G., de Hoog, M. and van den Anker, J. Survey of unlicensed and off label drug use in paediatric wards in European countries. European Network for Drug Investigation in Children. *Bmj*, 2000. 320(7227): 79-82.
- Conroy, S., McIntyre, J. and Choonara, I. Unlicensed and off label drug use in neonates. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 1999. 80(2): F142-4; discussion F144-5.

- Cuevas, L.E., Kazembe, P., Mughogho, G.K., Tillotson, G.S. and Hart, C.A. Eradication of nasopharyngeal carriage of *Neisseria meningitidis* in children and adults in rural Africa: a comparison of ciprofloxacin and rifampicin. *J Infect Dis*, 1995. 171(3): 728-31.
- Cuzzolin, L., Atzei, A. and Fanos, V. Off-label and unlicensed prescribing for newborns and children in different settings: a review of the literature and a consideration about drug safety. *Expert Opin Drug Saf*, 2006. 5(5): 703-18.
- D'Agostino, R.B., Jr. Propensity score methods for bias reduction in the comparison of a treatment to a non-randomized control group. *Stat Med*, 1998. 17(19): 2265-81.
- D'Agostino, R.B., Jr. and D'Agostino, R.B., Sr. Estimating treatment effects using observational data. *Jama*, 2007. 297(3): 314-6.
- Dalen, J., Annette, RD., Brody, JL., Perryman, ML. Influences upon pediatricians' willingness to refer patients to clinical research. *Open Access Journal of Clinical Trials*, 2010. 2: 23-28.
- Daly, J.S., Worthington, M.G., Razvi, S.A. and Robillard, R. Intravenous and sequential intravenous and oral ciprofloxacin in the treatment of severe infections. *Am J Med*, 1989. 87(5A): 232S-234S.
- De Cock, R.F., Piana, C., Krekels, E.H., Danhof, M., Allegaert, K. and Knibbe, C.A. The role of population PK-PD modelling in paediatric clinical research. *Eur J Clin Pharmacol*, 2011. 67 Suppl 1: 5-16.
- De Schaepdrijver, L., Rouan, M.C., Raoof, A., Bailey, G.P., De Zwart, L., Monbaliu, J., Coogan, T.P., Lammens, L. and Coussement, W. Real life juvenile toxicity case studies: the good, the bad and the ugly. *Reprod Toxicol*, 2008. 26(1): 54-5.
- de Wildt, S.N., Kearns, G.L., Hop, W.C., Murry, D.J., Abdel-Rahman, S.M. and van den Anker, J.N. Pharmacokinetics and metabolism of intravenous midazolam in preterm infants. *Clin Pharmacol Ther*, 2001. 70(6): 525-31.
- de Wildt, S.N., Kearns, G.L., Leeder, J.S. and van den Anker, J.N. Cytochrome P450 3A: ontogeny and drug disposition. *Clin Pharmacokinet*, 1999. 37(6): 485-505.
- de Wildt, S.N. and Knibbe, C.A. Knowledge of developmental pharmacology and modeling approaches should be used to avoid useless trials in children. *Eur J Clin Pharmacol*, 2009. 65(8): 849-50; author reply 851-2.

- Dell'Aera, M., Gasbarro, A.R., Padovano, M., Laforgia, N., Capodiferro, D., Solarino, B., Quaranta, R. and Dell'Erba, A.S. Unlicensed and off-label use of medicines at a neonatology clinic in Italy. *Pharm World Sci*, 2007. 29(4): 361-7.
- Dessi, A., Salemi, C., Fanos, V. and Cuzzolin, L. Drug treatments in a neonatal setting: focus on the off-label use in the first month of life. *Pharm World Sci*, 2010. 32(2): 120-4.
- Dixey, J., Redington, A.N., Butler, R.C., Smith, M.J., Batchelor, J.R., Woodrow, D.F., Hodson, M.E., Batten, J.C. and Brewerton, D.A. The arthropathy of cystic fibrosis. *Ann Rheum Dis*, 1988. 47(3): 218-23.
- Drusano, G.L. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of antimicrobials. *Clin Infect Dis*, 2007. 45 Suppl 1: S89-95.
- Du, W., Warriar, I., Tutag Lehr, V., Salari, V., Ostrea, E. and Aranda, J.V. Changing patterns of drug utilization in a neonatal intensive care population. *Am J Perinatol*, 2006. 23(5): 279-85.
- Duarte, D.M. and Silva-Lima, B. Juvenile animal studies in the development of pediatric medicines: experience from European medicines and pediatric investigation plans. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*, 2011.
- Dutta, P., Rasaily, R., Saha, M.R., Mitra, U., Bhattacharya, S.K., Bhattacharya, M.K. and Lahiri, M. Ciprofloxacin for treatment of severe typhoid fever in children. *Antimicrob Agents Chemother*, 1993. 37(5): 1197-9.
- Edmond, K. and Zaidi, A. New approaches to preventing, diagnosing, and treating neonatal sepsis. *PLoS Med*, 2010. 7(3): e1000213.
- Ehrnebo, M., Agurell, S., Jalling, B. and Boreus, L.O. Age differences in drug binding by plasma proteins: studies on human fetuses, neonates and adults. *Eur J Clin Pharmacol*, 1971. 3(4): 189-93.
- Ekins-Daukes, S., Helms, P.J., Simpson, C.R., Taylor, M.W. and McLay, J.S. Off-label prescribing to children in primary care: retrospective observational study. *Eur J Clin Pharmacol*, 2004. 60(5): 349-53.
- Engle, W.A. A recommendation for the definition of "late preterm" (near-term) and the birth weight-gestational age classification system. *Semin Perinatol*, 2006. 30(1): 2-7.

- Ette, E.I. Statistical graphics in pharmacokinetics and pharmacodynamics: a tutorial. *Ann Pharmacother*, 1998. 32(7-8): 818-28.
- Feinblatt, B.I., Aceto, T., Jr., Beckhorn, G. and Bruck, E. Percutaneous absorption of hydrocortisone in children. *Am J Dis Child*, 1966. 112(3): 218-24.
- Ferguson, J. and Johnson, B.E. Ciprofloxacin-induced photosensitivity: in vitro and in vivo studies. *Br J Dermatol*, 1990. 123(1): 9-20.
- Forrest, A., Nix, D.E., Ballow, C.H., Goss, T.F., Birmingham, M.C. and Schentag, J.J. Pharmacodynamics of intravenous ciprofloxacin in seriously ill patients. *Antimicrob Agents Chemother*, 1993. 37(5): 1073-81.
- Fridkin, S.K., Kaufman, D., Edwards, J.R., Shetty, S. and Horan, T. Changing incidence of Candida bloodstream infections among NICU patients in the United States: 1995-2004. *Pediatrics*, 2006. 117(5): 1680-7.
- Friedman, S., Richardson, S.E., Jacobs, S.E. and O'Brien, K. Systemic Candida infection in extremely low birth weight infants: short term morbidity and long term neurodevelopmental outcome. *Pediatr Infect Dis J*, 2000. 19(6): 499-504.
- Gaschignard, J., Levy, C., Romain, O., Cohen, R., Bingen, E., Aujard, Y. and Boileau, P. Neonatal Bacterial Meningitis: 444 Cases in 7 Years. *Pediatr Infect Dis J*, 2011. 30(3): 212-7.
- Gates, S., Brocklehurst, P., Campbell, M. and Elbourne, D. Recruitment to multicentre trials. *Bjog*, 2004. 111(1): 3-5.
- Gavrilov, V., Lifshitz, M., Levy, J. and Gorodischer, R. Unlicensed and off-label medication use in a general pediatrics ambulatory hospital unit in Israel. *Isr Med Assoc J*, 2000. 2(8): 595-7.
- Gendrel, D., Chalumeau, M., Moulin, F. and Raymond, J. Fluoroquinolones in paediatrics: a risk for the patient or for the community? *Lancet Infect Dis*, 2003. 3(9): 537-46.
- Ghosh, G., Chakraborty, S., Ray, J. and Mukherjee, S.K. Parenteral ciprofloxacin in persistent diarrhoea in children. *J Indian Med Assoc*, 1995. 93(10): 382, 384.
- Gibert, C.L., Seiler, M., Joe, L., Smith, M.A. and Gordin, F. Intravenous and oral ciprofloxacin in the therapy of serious infections. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 1990. 13(2): 173-6.

- Gillan, M.G., Ross, S., Gilbert, F.J., Grant, A.M. and O'Dwyer, P.J. Recruitment to multicentre trials: the impact of external influences. *Health Bull (Edinb)*, 2000. 58(3): 229-34.
- Ginsberg, G., Hattis, D., Miller, R. and Sonawane, B. Pediatric pharmacokinetic data: implications for environmental risk assessment for children. *Pediatrics*, 2004. 113(4 Suppl): 973-83.
- Glasziou, P., Vandembroucke, J.P. and Chalmers, I. Assessing the quality of research. *Bmj*, 2004. 328(7430): 39-41.
- Gordon, A. and Isaacs, D. Late-onset infection and the role of antibiotic prescribing policies. *Curr Opin Infect Dis*, 2004. 17(3): 231-6.
- Gordon, A. and Isaacs, D. Late onset neonatal Gram-negative bacillary infection in Australia and New Zealand: 1992-2002. *Pediatr Infect Dis J*, 2006. 25(1): 25-9.
- Gordon, A. and Jeffery, H.E. Antibiotic regimens for suspected late onset sepsis in newborn infants. *Cochrane Database Syst Rev*, 2005(3): CD004501.
- Gough, A.W., Kasali, O.B., Sigler, R.E. and Baragi, V. Quinolone arthropathy--acute toxicity to immature articular cartilage. *Toxicol Pathol*, 1992. 20(3 Pt 1): 436-49; discussion 449-50.
- Guillot, E., Sermet, I., Ferroni, A., Chhun, S., Pons, G., Zahar, J.R. and Jullien, V. Suboptimal ciprofloxacin dosing as a potential cause of decreased *Pseudomonas aeruginosa* susceptibility in children with cystic fibrosis. *Pharmacotherapy*, 2001. 30(12): 1252-8.
- Gurbay, A., Gonthier, B., Barret, L., Favier, A. and Hincal, F. Cytotoxic effect of ciprofloxacin in primary culture of rat astrocytes and protection by Vitamin E. *Toxicology*, 2007. 229(1-2): 54-61.
- Gurbay, A., Gonthier, B., Signorini-Allibe, N., Barret, L., Favier, A. and Hincal, F. Ciprofloxacin-induced DNA damage in primary culture of rat astrocytes and protection by Vitamin E. *Neurotoxicology*, 2006. 27(1): 6-10.
- Hampel, B., Hullmann, R. and Schmidt, H. Ciprofloxacin in pediatrics: worldwide clinical experience based on compassionate use--safety report. *Pediatr Infect Dis J*, 1997. 16(1): 127-9; discussion 160-2.

- Harth, S.C., Johnstone, R.R. and Thong, Y.H. The psychological profile of parents who volunteer their children for clinical research: a controlled study. *J Med Ethics*, 1992. 18(2): 86-93.
- Hayem, G. and Carbon, C. A reappraisal of quinolone tolerability. The experience of their musculoskeletal adverse effects. *Drug Saf*, 1995. 13(6): 338-42.
- Hill, P. Off licence and off label prescribing in children: litigation fears for physicians. American Academy of Pediatrics Committee on Drugs. *Arch Dis Child*, 2005. 90 Suppl 1: i17-8.
- Hill, S., Regondi, I., Grzemska, M. and Matiru, R. Children and tuberculosis medicines: bridging the research gap. *Bull World Health Organ*, 2008. 86(9): 658.
- Hines, R.N. The ontogeny of drug metabolism enzymes and implications for adverse drug events. *Pharmacol Ther*, 2008. 118(2): 250-67.
- Hoehn, K.S., Wernovsky, G., Rychik, J., Tian, Z.Y., Donaghue, D., Alderfer, M.A., Gaynor, J.W., Kazak, A.E., Spray, T.L. and Nelson, R.M. Parental decision-making in congenital heart disease. *Cardiol Young*, 2004. 14(3): 309-14.
- Holford, N.H. and Sheiner, L.B. Understanding the dose-effect relationship: clinical application of pharmacokinetic-pharmacodynamic models. *Clin Pharmacokinet*, 1981. 6(6): 429-53.
- Hoppu, K. Paediatric clinical pharmacology: at the beginning of a new era. *Eur J Clin Pharmacol*, 2008. 64(2): 201-5.
- Hoppu, K. Can we get the necessary clinical trials in children and avoid the unnecessary ones? *Eur J Clin Pharmacol*, 2009. 65(8): 747-8.
- Hoppu, K., Anabwani, G., Garcia-Bournissen, F., Gazarian, M., Kearns, G.L., Nakamura, H., Peterson, R.G., Sri Ranganathan, S. and de Wildt, S.N. The status of paediatric medicines initiatives around the world-what has happened and what has not? *Eur J Clin Pharmacol*, 2011.
- Horwitz, R.I., Viscoli, C.M., Clemens, J.D. and Sadock, R.T. Developing improved observational methods for evaluating therapeutic effectiveness. *Am J Med*, 1990. 89(5): 630-8.

- Hyman, P.E., Clarke, D.D., Everett, S.L., Sonne, B., Stewart, D., Harada, T., Walsh, J.H. and Taylor, I.L. Gastric acid secretory function in preterm infants. *J Pediatr*, 1985. 106(3): 467-71.
- Ince, I., de Wildt, S.N., Tibboel, D., Danhof, M. and Knibbe, C.A. Tailor-made drug treatment for children: creation of an infrastructure for data-sharing and population PK-PD modeling. *Drug Discov Today*, 2009. 14(5-6): 316-20.
- Inman, R.D., Johnston, M.E., Hodge, M., Falk, J. and Helewa, A. Postdysenteric reactive arthritis. A clinical and immunogenetic study following an outbreak of salmonellosis. *Arthritis Rheum*, 1988. 31(11): 1377-83.
- Jick, S. Ciprofloxacin safety in a pediatric population. *Pediatr Infect Dis J*, 1997. 16(1): 130-3; discussion 133-4, 160-2.
- Johnson, T.N. Modelling approaches to dose estimation in children. *Br J Clin Pharmacol*, 2005. 59(6): 663-9.
- Johnston, S.C., Henneman, T., McCulloch, C.E. and van der Laan, M. Modeling treatment effects on binary outcomes with grouped-treatment variables and individual covariates. *Am J Epidemiol*, 2002. 156(8): 753-60.
- Joshi, S.G., Ghole, V.S. and Niphadkar, K.B. Neonatal gram-negative bacteremia. *Indian J Pediatr*, 2000. 67(1): 27-32.
- Karande, S. and Kshirsagar, N.A. Ciprofloxacin use: acute arthropathy and long-term follow up. *Indian Pediatr*, 1996. 33(11): 910-6.
- Karłowicz, M.G., Buescher, E.S. and Surka, A.E. Fulminant late-onset sepsis in a neonatal intensive care unit, 1988-1997, and the impact of avoiding empiric vancomycin therapy. *Pediatrics*, 2000. 106(6): 1387-90.
- Karlsson, M.O. and Savic, R.M. Diagnosing model diagnostics. *Clin Pharmacol Ther*, 2007. 82(1): 17-20.
- Kashida, Y. and Kato, M. Characterization of fluoroquinolone-induced Achilles tendon toxicity in rats: comparison of toxicities of 10 fluoroquinolones and effects of anti-inflammatory compounds. *Antimicrob Agents Chemother*, 1997. 41(11): 2389-93.
- Kaufman, D. Neonatal candidiasis: clinical manifestations, management, and prevention strategies. *J Pediatr*, 2010a. 156: S47-52.

- Kaufman, D. and Fairchild, K.D. Clinical microbiology of bacterial and fungal sepsis in very-low-birth-weight infants. *Clin Microbiol Rev*, 2004. 17(3): 638-80, table of contents.
- Kaufman, D.A. Challenging issues in neonatal candidiasis. *Curr Med Res Opin*, 2010b. 26(7): 1769-78.
- Kearns, G.L., Abdel-Rahman, S.M., Alander, S.W., Blowey, D.L., Leeder, J.S. and Kauffman, R.E. Developmental pharmacology--drug disposition, action, and therapy in infants and children. *N Engl J Med*, 2003a. 349(12): 1157-67.
- Kearns, G.L., Robinson, P.K., Wilson, J.T., Wilson-Costello, D., Knight, G.R., Ward, R.M. and van den Anker, J.N. Cisapride disposition in neonates and infants: in vivo reflection of cytochrome P450 3A4 ontogeny. *Clin Pharmacol Ther*, 2003b. 74(4): 312-25.
- Kellogg, J.A., Ferrentino, F.L., Goodstein, M.H., Liss, J., Shapiro, S.L. and Bankert, D.A. Frequency of low level bacteremia in infants from birth to two months of age. *Pediatr Infect Dis J*, 1997. 16(4): 381-5.
- Khalik, Y. and Zhanel, G.G. Fluoroquinolone-associated tendinopathy: a critical review of the literature. *Clin Infect Dis*, 2003. 36(11): 1404-10.
- Klecak, G., Urbach, F. and Urwyler, H. Fluoroquinolone antibacterials enhance UVA-induced skin tumors. *J Photochem Photobiol B*, 1997. 37(3): 174-81.
- Koukouritaki, S.B., Manro, J.R., Marsh, S.A., Stevens, J.C., Rettie, A.E., McCarver, D.G. and Hines, R.N. Developmental expression of human hepatic CYP2C9 and CYP2C19. *J Pharmacol Exp Ther*, 2004. 308(3): 965-74.
- Koyle, M.A., Barqawi, A., Wild, J., Passamaneck, M. and Furness, P.D., 3rd. Pediatric urinary tract infections: the role of fluoroquinolones. *Pediatr Infect Dis J*, 2003. 22(12): 1133-7.
- Kubin, R. Safety and efficacy of ciprofloxacin in paediatric patients--review. *Infection*, 1993. 21(6): 413-21.
- Kumar, P., Walker, J.K., Hurt, K.M., Bennett, K.M., Grosshans, N. and Fotis, M.A. Medication use in the neonatal intensive care unit: current patterns and off-label use of parenteral medications. *J Pediatr*, 2008. 152(3): 412-5.

- Lacroix, D., Sonnier, M., Moncion, A., Cheron, G. and Cresteil, T. Expression of CYP3A in the human liver--evidence that the shift between CYP3A7 and CYP3A4 occurs immediately after birth. *Eur J Biochem*, 1997. 247(2): 625-34.
- Lantos, J.D. The "inclusion benefit" in clinical trials. *J Pediatr*, 1999. 134(2): 130-1.
- Larroque, B., Ancel, P.Y., Marret, S., Marchand, L., Andre, M., Arnaud, C., Pierrat, V., Roze, J.C., Messer, J., Thiriez, G., Burguet, A., Picaud, J.C., Breart, G. and Kaminski, M. Neurodevelopmental disabilities and special care of 5-year-old children born before 33 weeks of gestation (the EPIPAGE study): a longitudinal cohort study. *Lancet*, 2008. 371(9615): 813-20.
- Lass, J., Kaar, R., Jogi, K., Varendi, H., Metsvaht, T. and Lutsar, I. Drug utilisation pattern and off-label use of medicines in Estonian neonatal units. *Eur J Clin Pharmacol*, 2011.
- Lawn, J.E., Cousens, S. and Zupan, J. 4 million neonatal deaths: when? Where? Why? *Lancet*, 2005. 365(9462): 891-900.
- Lawn, J.E., Wilczynska-Ketende, K. and Cousens, S.N. Estimating the causes of 4 million neonatal deaths in the year 2000. *Int J Epidemiol*, 2006. 35(3): 706-18.
- Le Guellec, C., Autret-Leca, E., Odoul, F., Jonville Bera, A.P. and Paintaud, G. [Pharmacokinetic studies in neonatology: regulatory and methodologic problems]. *Therapie*, 2001. 56(6): 663-8.
- Lee, B.E., Cheung, P.Y., Robinson, J.L., Evanochko, C. and Robertson, C.M. Comparative study of mortality and morbidity in premature infants (birth weight, < 1,250 g) with candidemia or candidal meningitis. *Clin Infect Dis*, 1998. 27(3): 559-65.
- Lee, H., Yim, D.S., Zhou, H. and Peck, C.C. Evidence of effectiveness: how much can we extrapolate from existing studies? *Aaps J*, 2005. 7(2): E467-74.
- Lehmann, B. Regulation (EC) No 1901/2006 on medicinal products for paediatric use & clinical research in vulnerable populations. *Child Adolesc Psychiatry Ment Health*, 2008. 2(1): 37.
- Leibovitz, E., Flidel-Rimon, O., Juster-Reicher, A., Amitay, M., Miskin, A., Barak, Y. and Mogilner, B. Sepsis at a neonatal intensive care unit: a four-year retrospective study (1989-1992). *Isr J Med Sci*, 1997. 33(11): 734-8.

- Leibovitz, E., Janco, J., Piglansky, L., Press, J., Yagupsky, P., Reinhart, H., Yaniv, I. and Dagan, R. Oral ciprofloxacin vs. intramuscular ceftriaxone as empiric treatment of acute invasive diarrhea in children. *Pediatr Infect Dis J*, 2000. 19(11): 1060-7.
- Lenz, W. Epidemiology of Congenital Malformations. *Ann N Y Acad Sci*, 1965. 123: 228-36.
- Leone, R., Venegoni, M., Motola, D., Moretti, U., Piazzetta, V., Cocci, A., Resi, D., Mozzo, F., Velo, G., Burzillieri, L., Montanaro, N. and Conforti, A. Adverse drug reactions related to the use of fluoroquinolone antimicrobials: an analysis of spontaneous reports and fluoroquinolone consumption data from three Italian regions. *Drug Saf*, 2003. 26(2): 109-20.
- Levene, M., Wright, I. and Griffiths, G. Is informed consent in neonatal randomised controlled trials ritual? *Lancet*, 1996. 347(8999): 475.
- Levy, O. Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates. *Nat Rev Immunol*, 2007. 7(5): 379-90.
- Li, P., Cheng, N.N., Chen, B.Y. and Wang, Y.M. In vivo and in vitro chondrotoxicity of ciprofloxacin in juvenile rats. *Acta Pharmacol Sin*, 2004. 25(10): 1262-6.
- Lindbom, L., Pihlgren, P. and Jonsson, E.N. PsN-Toolkit--a collection of computer intensive statistical methods for non-linear mixed effect modeling using NONMEM. *Comput Methods Programs Biomed*, 2005. 79(3): 241-57.
- Lindell-Osuagwu, L., Korhonen, M.J., Saano, S., Helin-Tanninen, M., Naaranlahti, T. and Kokki, H. Off-label and unlicensed drug prescribing in three paediatric wards in Finland and review of the international literature. *J Clin Pharm Ther*, 2009. 34(3): 277-87.
- Linseman, D.A., Hampton, L.A. and Branstetter, D.G. Quinolone-induced arthropathy in the neonatal mouse. Morphological analysis of articular lesions produced by piperidic acid and ciprofloxacin. *Fundam Appl Toxicol*, 1995. 28(1): 59-64.
- Lipsky, B.A. and Baker, C.A. Fluoroquinolone toxicity profiles: a review focusing on newer agents. *Clin Infect Dis*, 1999. 28(2): 352-64.
- Lopez Martinez, R., Cabanas Poy, M.J., Oliveras Arenas, M. and Clemente Bautista, S. [Drug use in a neonatal ICU: a prospective study]. *Farm Hosp*, 2005. 29(1): 26-9.
- Lumley, J., Lester, A., Renou, P. and Wood, C. A failed RCT to determine the best method of delivery for very low birth weight infants. *Control Clin Trials*, 1985. 6(2): 120-7.

- Machida, M., Kusajima, H., Aijima, H., Maeda, A., Ishida, R. and Uchida, H. Toxicokinetic study of norfloxacin-induced arthropathy in juvenile animals. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1990. 105(3): 403-12.
- Maebashi, K., Niimi, M., Kudoh, M., Fischer, F.J., Makimura, K., Niimi, K., Piper, R.J., Uchida, K., Arisawa, M., Cannon, R.D. and Yamaguchi, H. Mechanisms of fluconazole resistance in *Candida albicans* isolates from Japanese AIDS patients. *J Antimicrob Chemother*, 2001. 47(5): 527-36.
- Manolis, E., Osman, T.E., Herold, R., Koenig, F., Tomasi, P., Vamvakas, S. and Saint Raymond, A. Role of modeling and simulation in pediatric investigation plans. *Paediatr Anaesth*, 2011. 21(3): 214-21.
- Manolis, E. and Pons, G. Proposals for model-based paediatric medicinal development within the current European Union regulatory framework. *Br J Clin Pharmacol*, 2009. 68(4): 493-501.
- Manzoni, P., Leonessa, M., Galletto, P., Latino, M.A., Arisio, R., Maule, M., Agriesti, G., Gastaldo, L., Gallo, E., Mostert, M. and Farina, D. Routine use of fluconazole prophylaxis in a neonatal intensive care unit does not select natively fluconazole-resistant *Candida* subspecies. *Pediatr Infect Dis J*, 2008. 27(8): 731-7.
- Mapstone, J., Elbourne, D. and Roberts, I. Strategies to improve recruitment to research studies. *Cochrane Database Syst Rev*, 2007(2): MR000013.
- Marchetti, F., Bua, J., Ventura, A., Notarangelo, L.D., Di Maio, S., Migliore, G. and Bonati, M. The awareness among paediatricians of off-label prescribing in children: a survey of Italian hospitals. *Eur J Clin Pharmacol*, 2007. 63(1): 81-5.
- Marodi, L. Neonatal innate immunity to infectious agents. *Infect Immun*, 2006. 74(4): 1999-2006.
- Mason, S. Obtaining informed consent for neonatal randomised controlled trials--an "elaborate ritual"? *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 1997. 76(3): F143-5.
- Mason, S.A. and Allmark, P.J. Obtaining informed consent to neonatal randomised controlled trials: interviews with parents and clinicians in the Euricon study. *Lancet*, 2000. 356(9247): 2045-51.

- McCarver, D.G. and Hines, R.N. The ontogeny of human drug-metabolizing enzymes: phase II conjugation enzymes and regulatory mechanisms. *J Pharmacol Exp Ther*, 2002. 300(2): 361-6.
- McIntyre, J., Conroy, S., Avery, A., Corns, H. and Choonara, I. Unlicensed and off label prescribing of drugs in general practice. *Arch Dis Child*, 2000. 83(6): 498-501.
- Meropol, S.B., Chan, K.A., Chen, Z., Finkelstein, J.A., Hennessy, S., Lautenbach, E., Platt, R., Schech, S.D., Shatin, D. and Metlay, J.P. Adverse events associated with prolonged antibiotic use. *Pharmacoepidemiol Drug Saf*, 2008. 17(5): 523-32.
- Modi, N. Clinical trials and neonatal intensive care. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 1994. 70(3): F231-2.
- Morley, C.J., Lau, R., Davis, P.G. and Morse, C. What do parents think about enrolling their premature babies in several research studies? *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 2005. 90(3): F225-8.
- Mouton, J.W., Dudley, M.N., Cars, O., Derendorf, H. and Drusano, G.L. Standardization of pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) terminology for anti-infective drugs: an update. *J Antimicrob Chemother*, 2005. 55(5): 601-7.
- Mtitimila, E.I. and Cooke, R.W. Antibiotic regimens for suspected early neonatal sepsis. *Cochrane Database Syst Rev*, 2004(4): CD004495.
- Mueller, M., de la Pena, A. and Derendorf, H. Issues in pharmacokinetics and pharmacodynamics of anti-infective agents: kill curves versus MIC. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004. 48(2): 369-77.
- Mullen, C.A. Ciprofloxacin in treatment of fever and neutropenia in pediatric cancer patients. *Pediatr Infect Dis J*, 2003. 22(12): 1138-42.
- Mullen, C.A., Petropoulos, D., Roberts, W.M., Rytting, M., Zipf, T., Chan, K.W., Culbert, S.J., Danielson, M., Jeha, S.S., Kuttlesch, J.F. and Rolston, K.V. Outpatient treatment of fever and neutropenia for low risk pediatric cancer patients. *Cancer*, 1999. 86(1): 126-34.
- Nagai, A., Miyazaki, M., Morita, T., Furubo, S., Kizawa, K., Fukumoto, H., Sanzen, T., Hayakawa, H. and Kawamura, Y. Comparative articular toxicity of garenoxacin, a novel quinolone antimicrobial agent, in juvenile beagle dogs. *J Toxicol Sci*, 2002. 27(3): 219-28.

- Nambiar, S. and Singh, N. Change in epidemiology of health care-associated infections in a neonatal intensive care unit. *Pediatr Infect Dis J*, 2002. 21(9): 839-42.
- Neubert, A., Lukas, K., Leis, T., Dormann, H., Brune, K. and Rascher, W. Drug utilisation on a preterm and neonatal intensive care unit in Germany: a prospective, cohort-based analysis. *Eur J Clin Pharmacol*, 2010. 66(1): 87-95.
- Neubert, A., Wong, I.C., Bonifazi, A., Catapano, M., Felisi, M., Baiardi, P., Giaquinto, C., Knibbe, C.A., Sturkenboom, M.C., Ghaleb, M.A. and Ceci, A. Defining off-label and unlicensed use of medicines for children: results of a Delphi survey. *Pharmacol Res*, 2008. 58(5-6): 316-22.
- Nicklin, S. and Spencer, S.A. Recruitment failure in early neonatal research. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 2004. 89(3): F281.
- Odds, F.C., Motyl, M., Andrade, R., Bille, J., Canton, E., Cuenca-Estrella, M., Davidson, A., Durussel, C., Ellis, D., Foraker, E., Fothergill, A.W., Ghannoum, M.A., Giacobbe, R.A., Gobernado, M., Handke, R., Laverdiere, M., Lee-Yang, W., Merz, W.G., Ostrosky-Zeichner, L., Peman, J., Perea, S., Perfect, J.R., Pfaller, M.A., Proia, L., Rex, J.H., Rinaldi, M.G., Rodriguez-Tudela, J.L., Schell, W.A., Shields, C., Sutton, D.A., Verweij, P.E. and Warnock, D.W. Interlaboratory comparison of results of susceptibility testing with caspofungin against *Candida* and *Aspergillus* species. *J Clin Microbiol*, 2004. 42(8): 3475-82.
- O'Donnell, C.P., Stone, R.J. and Morley, C.J. Unlicensed and off-label drug use in an Australian neonatal intensive care unit. *Pediatrics*, 2002. 110(5): e52.
- Ohman, L., Tullus, K., Katouli, M., Burman, L.G. and Stendahl, O. Correlation between susceptibility of infants to infections and interaction with neutrophils of *Escherichia coli* strains causing neonatal and infantile septicemia. *J Infect Dis*, 1995. 171(1): 128-33.
- Olski, T.M., Lampus, S.F., Gherarducci, G. and Saint Raymond, A. Three years of paediatric regulation in the European Union. *Eur J Clin Pharmacol*, 2011. 67(3): 245-52.
- Owens, R.C., Jr. and Ambrose, P.G. Clinical use of the fluoroquinolones. *Med Clin North Am*, 2000. 84(6): 1447-69.
- Paganini, H., Gomez, S., Ruvinsky, S., Zubizarreta, P., Latella, A., Fraquelli, L., Iturres, A.S., Casimir, L. and Debbag, R. Outpatient, sequential, parenteral-oral antibiotic therapy for

- lower risk febrile neutropenia in children with malignant disease: a single-center, randomized, controlled trial in Argentina. *Cancer*, 2003. 97(7): 1775-80.
- Paganini, H., Rodriguez-Brieschcke, T., Zubizarreta, P., Latella, A., Firpo, V., Casimir, L., Armada, A., Fernandez, C., Caceres, E. and Debbag, R. Oral ciprofloxacin in the management of children with cancer with lower risk febrile neutropenia. *Cancer*, 2001. 91(8): 1563-7.
- Pandolfini, C. and Bonati, M. A literature review on off-label drug use in children. *Eur J Pediatr*, 2005. 164(9): 552-8.
- Pappas, P.G., Rex, J.H., Lee, J., Hamill, R.J., Larsen, R.A., Powderly, W., Kauffman, C.A., Hyslop, N., Mangino, J.E., Chapman, S., Horowitz, H.W., Edwards, J.E. and Dismukes, W.E. A prospective observational study of candidemia: epidemiology, therapy, and influences on mortality in hospitalized adult and pediatric patients. *Clin Infect Dis*, 2003. 37(5): 634-43.
- Pariente-Khayat, A., Vauzelle-Kervroedan, F., d'Athis, P., Breart, G., Gendrel, D., Aujard, Y., Olive, G. and Pons, G. [Retrospective survey of fluoroquinolone use in children]. *Arch Pediatr*, 1998. 5(5): 484-8.
- Parry, C.M., Hien, T.T., Dougan, G., White, N.J. and Farrar, J.J. Typhoid fever. *N Engl J Med*, 2002. 347(22): 1770-82.
- Payen, S., Serreau, R., Munck, A., Aujard, Y., Aigrain, Y., Bressolle, F. and Jacqz-Aigrain, E. Population pharmacokinetics of ciprofloxacin in pediatric and adolescent patients with acute infections. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003. 47(10): 3170-8.
- Peck, C.C., Rubin, D.B. and Sheiner, L.B. Hypothesis: a single clinical trial plus causal evidence of effectiveness is sufficient for drug approval. *Clin Pharmacol Ther*, 2003. 73(6): 481-90.
- Peltola, H., Ukkonen, P., Saxen, H. and Stass, H. Single-dose and steady-state pharmacokinetics of a new oral suspension of ciprofloxacin in children. *Pediatrics*, 1998. 101(4 Pt 1): 658-62.
- Pertuiset, E., Lenoir, G., Jehanne, M., Douchain, F., Guillot, M. and Menkes, C.J. [Joint tolerance of pefloxacin and ofloxacin in children and adolescents with cystic fibrosis]. *Rev Rhum Mal Osteoartic*, 1989. 56(11): 735-40.

- Petrilli, A.S., Dantas, L.S., Campos, M.C., Tanaka, C., Ginani, V.C. and Seber, A. Oral ciprofloxacin vs. intravenous ceftriaxone administered in an outpatient setting for fever and neutropenia in low-risk pediatric oncology patients: randomized prospective trial. *Med Pediatr Oncol*, 2000. 34(2): 87-91.
- Pfister, K., Mazur, D., Vormann, J. and Stahlmann, R. Diminished ciprofloxacin-induced chondrotoxicity by supplementation with magnesium and vitamin E in immature rats. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007. 51(3): 1022-7.
- Pong, A. and Bradley, J.S. Bacterial meningitis and the newborn infant. *Infect Dis Clin North Am*, 1999. 13(3): 711-33, viii.
- Porta, A., Esposito, S., Menson, E., Spyridis, N., Tsolia, M., Sharland, M. and Principi, N. Off-label antibiotic use in children in three European countries. *Eur J Clin Pharmacol*, 2010. 66(9): 919-27.
- Post, T.M., Freijer, J.I., Ploeger, B.A. and Danhof, M. Extensions to the visual predictive check to facilitate model performance evaluation. *J Pharmacokinet Pharmacodyn*, 2008. 35(2): 185-202.
- Rahm, V. and Schacht, P. Safety of ciprofloxacin. A review. *Scand J Infect Dis Suppl*, 1989. 60: 120-8.
- Rahman, S., Hameed, A., Roghani, M.T. and Ullah, Z. Multidrug resistant neonatal sepsis in Peshawar, Pakistan. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 2002. 87(1): F52-4.
- Rajagopalan, P. and Gastonguay, M.R. Population pharmacokinetics of ciprofloxacin in pediatric patients. *J Clin Pharmacol*, 2003. 43(7): 698-710.
- Rendell, J.M., Merritt, R.D. and Geddes, J.R. Incentives and disincentives to participation by clinicians in randomised controlled trials. *Cochrane Database Syst Rev*, 2007(2): MR000021.
- Rex, J.H., Rinaldi, M.G. and Pfaller, M.A. Resistance of *Candida* species to fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother*, 1995. 39(1): 1-8.
- Rice, D. and Barone, S., Jr. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Environ Health Perspect*, 2000. 108 Suppl 3: 511-33.

- Richard, D.A., Nousia-Arvanitakis, S., Sollich, V., Hampel, B.J., Sommerauer, B. and Schaad, U.B. Oral ciprofloxacin vs. intravenous ceftazidime plus tobramycin in pediatric cystic fibrosis patients: comparison of antipseudomonas efficacy and assessment of safety with ultrasonography and magnetic resonance imaging. Cystic Fibrosis Study Group. *Pediatr Infect Dis J*, 1997. 16(6): 572-8.
- Roberts, J.A. and Lipman, J. Antibacterial dosing in intensive care: pharmacokinetics, degree of disease and pharmacodynamics of sepsis. *Clin Pharmacokinet*, 2006. 45(8): 755-73.
- Roberts, R., Rodriguez, W., Murphy, D. and Crescenzi, T. Pediatric drug labeling: improving the safety and efficacy of pediatric therapies. *Jama*, 2003. 290(7): 905-11.
- Robillard, J., Guillery, E. and Petershack, J., Renal function during fetal life. TM Barratt, ED Avner, WE Harmon ed. *Pediatric nephrology 4th 1999*, Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins
- Rocchi, F. and Tomasi, P. The development of medicines for children. Part of a series on *Pediatric Pharmacology*, guest edited by Gianvincenzo Zuccotti, Emilio Clementi, and Massimo Molteni. *Pharmacol Res*, 2011. 64(3): 169-75.
- Rubio, T.T. Ciprofloxacin in the treatment of Pseudomonas infection in children with cystic fibrosis. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 1990. 13(2): 153-5.
- Rubio, T.T., Miles, M.V., Lettieri, J.T., Kuhn, R.J., Echols, R.M. and Church, D.A. Pharmacokinetic disposition of sequential intravenous/oral ciprofloxacin in pediatric cystic fibrosis patients with acute pulmonary exacerbation. *Pediatr Infect Dis J*, 1997. 16(1): 112-7; discussion 123-6.
- Saha, D., Khan, W.A., Karim, M.M., Chowdhury, H.R., Salam, M.A. and Bennish, M.L. Single-dose ciprofloxacin versus 12-dose erythromycin for childhood cholera: a randomised controlled trial. *Lancet*, 2005. 366(9491): 1085-93.
- Salam, M.A., Dhar, U., Khan, W.A. and Bennish, M.L. Randomised comparison of ciprofloxacin suspension and pivmecillinam for childhood shigellosis. *Lancet*, 1998. 352(9127): 522-7.
- Sarvikivi, E., Lyytikainen, O., Soll, D.R., Pujol, C., Pfaller, M.A., Richardson, M., Koukila-Kahkola, P., Luukkainen, P. and Saxen, H. Emergence of fluconazole resistance in a *Candida parapsilosis* strain that caused infections in a neonatal intensive care unit. *J Clin Microbiol*, 2005. 43(6): 2729-35.

- Schaad, U.B. Fluoroquinolone antibiotics in infants and children. *Infect Dis Clin North Am*, 2005. 19(3): 617-28.
- Schacht, P., Arcieri, G. and Hullmann, R. Safety of oral ciprofloxacin. An update based on clinical trial results. *Am J Med*, 1989. 87(5A): 98S-102S.
- Schaefer, H.G., Stass, H., Wedgwood, J., Hampel, B., Fischer, C., Kuhlmann, J. and Schaad, U.B. Pharmacokinetics of ciprofloxacin in pediatric cystic fibrosis patients. *Antimicrob Agents Chemother*, 1996. 40(1): 29-34.
- Schelonka, R.L., Chai, M.K., Yoder, B.A., Hensley, D., Brockett, R.M. and Ascher, D.P. Volume of blood required to detect common neonatal pathogens. *J Pediatr*, 1996. 129(2): 275-8.
- Schmidt, B., Gillie, P., Caco, C., Roberts, J. and Roberts, R. Do sick newborn infants benefit from participation in a randomized clinical trial? *J Pediatr*, 1999. 134(2): 151-5.
- Schmidt, B., Roberts, R.S., Davis, P., Doyle, L.W., Barrington, K.J., Ohlsson, A., Solimano, A., and Tin, W., Long-term effects of caffeine therapy for apnea of prematurity. *N Engl J Med*, 2007. 357(19): 1893-902.
- Schmidt, B., Anderson, P.J., Doyle, L.W., Dewey, D., Grunau, R.E., Asztalos, E.V., Davis, P.G., Tin, W., Moddemann, D., Solimano, A., Ohlsson, A., Barrington, K.J., and Roberts, R.S., Survival without disability to age 5 years after neonatal caffeine therapy for apnea of prematurity. *JAMA*, 2012. 307(3): 275-82.
- Schmoor, C., Caputo, A. and Schumacher, M. Evidence from nonrandomized studies: a case study on the estimation of causal effects. *Am J Epidemiol*, 2008. 167(9): 1120-9.
- Sen, S., Goyal, R.S. and Dev, R. Ciprofloxacin in the management of multiple drug resistant typhoid fever. *Indian Pediatr*, 1991. 28(4): 417-9.
- Shaddy, R.E. and Denne, S.C. Clinical report--guidelines for the ethical conduct of studies to evaluate drugs in pediatric populations. *Pediatrics*, 2010. 125(4): 850-60.
- Shah, S.S., Ehrenkranz, R.A. and Gallagher, P.G. Increasing incidence of gram-negative rod bacteremia in a newborn intensive care unit. *Pediatr Infect Dis J*, 1999. 18(7): 591-5.
- Shah, S.S., Hall, M., Goodman, D.M., Feuer, P., Sharma, V., Fargason, C., Jr., Hyman, D., Jenkins, K., White, M.L., Levy, F.H., Levin, J.E., Bertoch, D. and Slonim, A.D. Off-

- label drug use in hospitalized children. *Arch Pediatr Adolesc Med*, 2007. 161(3): 282-90.
- Sharma, P.C., Jain, A., Jain, S., Pahwa, R. and Yar, M.S. Ciprofloxacin: review on developments in synthetic, analytical, and medicinal aspects. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2010. 25(4): 577-89.
- Shilling, V., Williamson, P.R., Hickey, H., Sowden, E., Beresford, M.W., Smyth, R.L. and Young, B. Communication about children's clinical trials as observed and experienced: qualitative study of parents and practitioners. *PLoS One*, 2010. 6(7): e21604.
- Shirkey, H., in Conference of Professional and Scientific Societies, Chicago. Commission on Drug Safety (sponsor). 1963: Chicago, IL.
- Silva-Lima, B., Due Theilade-Thomsen, M., Carleer, J., Vidal, J.M., Tomasi, P. and Saint-Raymond, A. Juvenile animal studies for the development of paediatric medicines: a description and conclusions from a European Medicines Agency workshop on juvenile animal testing for nonclinical assessors. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*, 2010. 89(6): 467-73.
- Singhal, N., Oberle, K., Burgess, E. and Huber-Okraïneç, J. Parents' perceptions of research with newborns. *J Perinatol*, 2002. 22(1): 57-63.
- Singhal, N., Oberle, K., Darwish, A. and Burgess, E. Attitudes of health-care providers towards research with newborn babies. *J Perinatol*, 2004. 24(12): 775-82.
- Smyth, R.L. and Weindling, A.M. Research in children: ethical and scientific aspects. *Lancet*, 1999. 354 Suppl 2: SII21-4.
- Snowdon, C., Elbourne, D. and Garcia, J. Zelen randomization: attitudes of parents participating in a neonatal clinical trial. *Control Clin Trials*, 1999. 20(2): 149-71.
- Snowdon, C., Garcia, J. and Elbourne, D. Making sense of randomization; responses of parents of critically ill babies to random allocation of treatment in a clinical trial. *Soc Sci Med*, 1997. 45(9): 1337-55.
- Sonnier, M. and Cresteil, T. Delayed ontogenesis of CYP1A2 in the human liver. *Eur J Biochem*, 1998. 251(3): 893-8.
- Stark, A.R. Levels of neonatal care. *Pediatrics*, 2004. 114(5): 1341-7.
- Steinbrook, R. Testing medications in children. *N Engl J Med*, 2002. 347(18): 1462-70.

- Stenson, B.J., Becher, J.C. and McIntosh, N. Neonatal research: the parental perspective. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 2004. 89(4): F321-3.
- Stephenson, T. How children's responses to drugs differ from adults. *Br J Clin Pharmacol*, 2005. 59(6): 670-3.
- Stoll, B.J., Gordon, T., Korones, S.B., Shankaran, S., Tyson, J.E., Bauer, C.R., Fanaroff, A.A., Lemons, J.A., Donovan, E.F., Oh, W., Stevenson, D.K., Ehrenkranz, R.A., Papile, L.A., Verter, J. and Wright, L.L. Early-onset sepsis in very low birth weight neonates: a report from the National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network. *J Pediatr*, 1996a. 129(1): 72-80.
- Stoll, B.J., Gordon, T., Korones, S.B., Shankaran, S., Tyson, J.E., Bauer, C.R., Fanaroff, A.A., Lemons, J.A., Donovan, E.F., Oh, W., Stevenson, D.K., Ehrenkranz, R.A., Papile, L.A., Verter, J. and Wright, L.L. Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: a report from the National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network. *J Pediatr*, 1996b. 129(1): 63-71.
- Stoll, B.J., Hansen, N., Fanaroff, A.A., Wright, L.L., Carlo, W.A., Ehrenkranz, R.A., Lemons, J.A., Donovan, E.F., Stark, A.R., Tyson, J.E., Oh, W., Bauer, C.R., Korones, S.B., Shankaran, S., Laptook, A.R., Stevenson, D.K., Papile, L.A. and Poole, W.K. Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: the experience of the NICHD Neonatal Research Network. *Pediatrics*, 2002a. 110(2 Pt 1): 285-91.
- Stoll, B.J., Hansen, N., Fanaroff, A.A., Wright, L.L., Carlo, W.A., Ehrenkranz, R.A., Lemons, J.A., Donovan, E.F., Stark, A.R., Tyson, J.E., Oh, W., Bauer, C.R., Korones, S.B., Shankaran, S., Laptook, A.R., Stevenson, D.K., Papile, L.A. and Poole, W.K. Changes in pathogens causing early-onset sepsis in very-low-birth-weight infants. *N Engl J Med*, 2002b. 347(4): 240-7.
- Stoll, B.J., Hansen, N.I., Adams-Chapman, I., Fanaroff, A.A., Hintz, S.R., Vohr, B. and Higgins, R.D. Neurodevelopmental and growth impairment among extremely low-birth-weight infants with neonatal infection. *Jama*, 2004. 292(19): 2357-65.
- Stoll, B.J., Hansen, N.I., Higgins, R.D., Fanaroff, A.A., Duara, S., Goldberg, R., Laptook, A., Walsh, M., Oh, W. and Hale, E. Very low birth weight preterm infants with early onset neonatal sepsis: the predominance of gram-negative infections continues in the National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network, 2002-2003. *Pediatr Infect Dis J*, 2005. 24(7): 635-9.

- Strolin Benedetti, M. and Baltes, E.L. Drug metabolism and disposition in children. *Fundam Clin Pharmacol*, 2003. 17(3): 281-99.
- Sturkenboom, M.C., Verhamme, K.M., Nicolosi, A., Murray, M.L., Neubert, A., Caudri, D., Picelli, G., Sen, E.F., Giaquinto, C., Cantarutti, L., Baiardi, P., Felisi, M.G., Ceci, A. and Wong, I.C. Drug use in children: cohort study in three European countries. *Bmj*, 2008. 337: a2245.
- t Jong, G.W., van der Linden, P.D., Bakker, E.M., van der Lely, N., Eland, I.A., Stricker, B.H. and van den Anker, J.N. Unlicensed and off-label drug use in a paediatric ward of a general hospital in the Netherlands. *Eur J Clin Pharmacol*, 2002. 58(4): 293-7.
- t Jong, G.W., Vulto, A.G., de Hoog, M., Schimmel, K.J., Tibboel, D. and van den Anker, J.N. A survey of the use of off-label and unlicensed drugs in a Dutch children's hospital. *Pediatrics*, 2001. 108(5): 1089-93.
- Tafari, G., Trotta, F., Leufkens, H.G., Martini, N., Sagliocca, L. and Traversa, G. Off-label use of medicines in children: can available evidence avoid useless paediatric trials? The case of proton pump inhibitors for the treatment of gastroesophageal reflux disease. *Eur J Clin Pharmacol*, 2009. 65(2): 209-16.
- Tait, A.R., Voepel-Lewis, T. and Malviya, S. Participation of children in clinical research: factors that influence a parent's decision to consent. *Anesthesiology*, 2003. 99(4): 819-25.
- Thaver, D. and Zaidi, A.K. Burden of neonatal infections in developing countries: a review of evidence from community-based studies. *Pediatr Infect Dis J*, 2009. 28(1 Suppl): S3-9.
- Thomson Reuters. Thomson Micromedex database. (<http://www.thomsonhc.com/micromedex2/librarian/>).
- Tod, M., Jullien, V. and Pons, G. Facilitation of drug evaluation in children by population methods and modelling. *Clin Pharmacokinet*, 2008. 47(4): 231-43.
- Treluyer, J.M., Jacqz-Aigrain, E., Alvarez, F. and Cresteil, T. Expression of CYP2D6 in developing human liver. *Eur J Biochem*, 1991. 202(2): 583-8.
- Truog, R.D., Robinson, W., Randolph, A. and Morris, A. Is informed consent always necessary for randomized, controlled trials? *N Engl J Med*, 1999. 340(10): 804-7.
- Tucker, J. and McGuire, W. Epidemiology of preterm birth. *Bmj*, 2004. 329(7467): 675-8.

- Turner, S., Nunn, A.J., Fielding, K. and Choonara, I. Adverse drug reactions to unlicensed and off-label drugs on paediatric wards: a prospective study. *Acta Paediatr*, 1999. 88(9): 965-8.
- van den Anker, J.N., de Groot, R., Broerse, H.M., Sauer, P.J., van der Heijden, B.J., Hop, W.C. and Lindemans, J. Assessment of glomerular filtration rate in preterm infants by serum creatinine: comparison with inulin clearance. *Pediatrics*, 1995a. 96(6): 1156-8.
- van den Anker, J.N., Schoemaker, R.C., Hop, W.C., van der Heijden, B.J., Weber, A., Sauer, P.J., Neijens, H.J. and de Groot, R. Ceftazidime pharmacokinetics in preterm infants: effects of renal function and gestational age. *Clin Pharmacol Ther*, 1995b. 58(6): 650-9.
- van der Linden, P.D., Sturkenboom, M.C., Herings, R.M., Leufkens, H.G. and Stricker, B.H. Fluoroquinolones and risk of Achilles tendon disorders: case-control study. *Bmj*, 2002. 324(7349): 1306-7.
- van der Linden, P.D., van de Lei, J., Nab, H.W., Knol, A. and Stricker, B.H. Achilles tendinitis associated with fluoroquinolones. *Br J Clin Pharmacol*, 1999. 48(3): 433-7.
- Van Reempts, P., Gortner, L., Milligan, D., Cuttini, M., Petrou, S., Agostino, R., Field, D., den Ouden, L., Borch, K., Mazela, J., Carrapato, M. and Zeitlin, J. Characteristics of neonatal units that care for very preterm infants in Europe: results from the MOSAIC study. *Pediatrics*, 2007. 120(4): e815-25.
- Vandenbroucke, J.P. When are observational studies as credible as randomised trials? *Lancet*, 2004. 363(9422): 1728-31.
- Venkatesh, M.P. and Garcia-Prats, J.A. Management of neonatal sepsis by Gram-negative pathogens. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2008. 6(6): 929-38.
- Vieira, I., Sonnier, M. and Cresteil, T. Developmental expression of CYP2E1 in the human liver. Hypermethylation control of gene expression during the neonatal period. *Eur J Biochem*, 1996. 238(2): 476-83.
- von Keutz, E., Ruhl-Fehlert, C., Drommer, W. and Rosenbruch, M. Effects of ciprofloxacin on joint cartilage in immature dogs immediately after dosing and after a 5-month treatment-free period. *Arch Toxicol*, 2004. 78(7): 418-24.
- Wallace, M.R., Yousif, A.A., Mahroos, G.A., Mapes, T., Threlfall, E.J., Rowe, B. and Hyams, K.C. Ciprofloxacin versus ceftriaxone in the treatment of multiresistant typhoid fever. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 1993. 12(12): 907-10.

- Walterspiel, J.N. Informed consent: influence on patient selection among critically ill premature infants. *Pediatrics*, 1990. 85(1): 119-21.
- Wang, J. and Donnan, P.T. Propensity score methods in drug safety studies: practice, strengths and limitations. *Pharmacoepidemiol Drug Saf*, 2001. 10(4): 341-4.
- Ward Platt, M. Participation in multiple neonatal research studies. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 2005. 90(3): F191.
- Warren, R.W. Rheumatologic aspects of pediatric cystic fibrosis patients treated with fluoroquinolones. *Pediatr Infect Dis J*, 1997. 16(1): 118-22; discussion 123-6.
- Weiss, C.F., Glazko, A.J. and Weston, J.K. Chloramphenicol in the newborn infant. A physiologic explanation of its toxicity when given in excessive doses. *N Engl J Med*, 1960. 262: 787-94.
- Wendler, D. and Jenkins, T. Children's and their parents' views on facing research risks for the benefit of others. *Arch Pediatr Adolesc Med*, 2008. 162(1): 9-14.
- Wiley, J.M. Fungal Infections in Pediatric Immunocompromised Patients: Epidemiology, Principles of Treatment, and Promising Antifungal Agents. *J Pediatr*, 2010. 156: S74 - S82.
- Wilson, C.B. Immunologic basis for increased susceptibility of the neonate to infection. *J Pediatr*, 1986. 108(1): 1-12.
- Wood, N.S., Marlow, N., Costeloe, K., Gibson, A.T. and Wilkinson, A.R. Neurologic and developmental disability after extremely preterm birth. EPICure Study Group. *N Engl J Med*, 2000. 343(6): 378-84.
- Yafune, A. and Ishiguro, M. Bootstrap approach for constructing confidence intervals for population pharmacokinetic parameters. II: A bootstrap modification of standard two-stage (STS) method for phase I trial. *Stat Med*, 1999. 18(5): 601-12.
- Yano, Y., Beal, S.L. and Sheiner, L.B. Evaluating pharmacokinetic/pharmacodynamic models using the posterior predictive check. *J Pharmacokinet Pharmacodyn*, 2001. 28(2): 171-92.
- Yee, C.L., Duffy, C., Gerbino, P.G., Stryker, S. and Noel, G.J. Tendon or joint disorders in children after treatment with fluoroquinolones or azithromycin. *Pediatr Infect Dis J*, 2002. 21(6): 525-9.

- Young, T. and Magnum, B. Neofax 2009, 22nd edition. Thomson Reuters, New York. 2009.
- Zaidi, A.K., Huskins, W.C., Thaver, D., Bhutta, Z.A., Abbas, Z. and Goldmann, D.A. Hospital-acquired neonatal infections in developing countries. *Lancet*, 2005. 365(9465): 1175-88.
- Zaidi, A.K., Thaver, D., Ali, S.A. and Khan, T.A. Pathogens associated with sepsis in newborns and young infants in developing countries. *Pediatr Infect Dis J*, 2009. 28(1 Suppl): S10-8.
- Zaoutis, T.E., Foraker, E., McGowan, K.L., Mortensen, J., Campos, J., Walsh, T.J. and Klein, J.D. Antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolated from pediatric patients: a survey of 4 children's hospitals. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2005. 52(4): 295-8.
- Zeitlin, J., El Ayoubi, M., Jarreau, P.H., Draper, E.S., Blondel, B., Kunzel, W., Cuttini, M., Kaminski, M., Gortner, L., Van Reempts, P., Kollee, L. and Papiernik, E. Impact of fetal growth restriction on mortality and morbidity in a very preterm birth cohort. *J Pediatr*, 2010. 157(5): 733-9 e1.
- Zeitlin, J., Papiernik, E. and Breart, G. Regionalization of perinatal care in Europe. *Semin Neonatol*, 2004. 9(2): 99-110.
- Zupancic, J.A., Gillie, P., Streiner, D.L., Watts, J.L. and Schmidt, B. Determinants of parental authorization for involvement of newborn infants in clinical trials. *Pediatrics*, 1997. 99(1): E6.

Documents réglementaires

- EMA, 2000. Points to Consider on Pharmacokinetics and Pharmacodynamics in the Development of Antibacterial Medicinal Products (CPMP/EWP/2655/99). [http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003420.pdf].
- EMA, 2004a. Evidence of harm from off label or unlicensed medicines in children [http://www.cabrnoch.cz/media/emea_statement_harmfull_drugs.pdf].

- EMA, 2004b. Note for Guidance on Clinical Investigation of Medicinal Products in the Paediatric Population. [http://www.emea.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003410.pdf].
- EMA, 2004c. Note for Guidance on Evaluation of Medicinal Products Indicated for Treatment of Bacterial Infections. [http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003417.pdf].
- EMA, 2006. Ciproxin (ciprofloxacin). Pediatric Public Assessment report, EU Worksharing Project - Assessment of Paediatric Data, MAH: Bayer HealthCare AG [http://www.hma.eu/fileadmin/dateien/Human_Medicines/CMD_h_/Paediatric_Regulation/Assessment_Reports/Previous_worksharing_project/Ciproxin_ciprofloxacin_PaedPAR.pdf]
- EMA, 2008. Guideline on the need for non-clinical testing in juvenile animals of pharmaceuticals for paediatric indications. EMEA/CHMP/SWP/169215/2005. [http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003305.pdf].
- EMA 2009a. Guideline on the Investigation of Medicinal Products in the Term and Preterm Neonate (Doc. Ref. EMEA/536810/2008). [http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003750.pdf].
- EMA, 2009b. Guideline on the Clinical Development of Medicinal Products for the Treatment of HIV Infection. [http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003460.pdf]
- EMA, 2011. Revised priority list for studies into off-patent paediatric medicinal products [http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Other/2009/10/WC500004017.pdf].
- EMA, Paediatric Committee, [http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/about_us/general/general_content_000217.jsp&mid=WC0b01ac0580028c77].
- European Commission, 2006. Regulation (EC) No 1901/2006 of the European Parliament and of the Council of 12 December 2006 on medicinal products for paediatric use and amending Regulation (EEC) No 1768/92, Directive 2001/20/EC, Directive 2001/83/EC and Regulation (EC) No 726/2004, [http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol1/reg_2006_1901/reg_2006_1901_en.pdf].

- FDA, 2003. Guidance for Industry: Exposure-Response Relationships - Study Design, Data Analysis and Regulatory Applications. [<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM072109.pdf>].
- FDA, 2006. Guidance for Industry: nonclinical safety evaluation of pediatric drug products. [<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM079247.pdf>].
- ICH E11, 1999. Clinical Investigation of medicinal products in the paediatric population (CPMP/ICH/2711/99). [http://www.emea.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002926.pdf].
- ICH, 2008. M3 (R2) Guidance on Nonclinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials and Marketing Authorization for Pharmaceuticals. [<http://www.ema.europa.eu>].
- WHO, 2009. The Selection and Use of Essential Medicines, Report of the WHO Expert Committee. [<http://www.who.int/medicines/publications/TRS958June2010.pdf>].