الجمهورية الجزائرية الدمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Ensreignement Supérieur et de la Recheche Scientifique

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Universite Dr Yahia Fares De Médéa

جامعة الدكتور يحيى فارس

Faculte des Sciences

كلية العلوم

Département des sciences de la nature et de la vie

Mémoire

Présenté pour obtenir du diplôme de **MASTER**

En : biologie

Spécialité : Microbiologie Appliqué

Présenté par :

AISSANI Razika
BOUDINA Elchaima
BELLATRACHE Souad

Thème

Etude de l'efficacité de méthyle parabène et propyle parabène dans un produit pharmaceutique buvable (Ximalex®)

Soutenance publiquement le : 27/09/2020

Devant le jury compsé de :

Promoteur	Mr AINES M	MCB
Co-promoteur	Mr OTMANINE K	MAA
Présidant du jury	Mr HAMMOUDI M	MAA
Examinateur 1	Mr CHMI B	MAA
Examinateur 2	Mr KIRDI B	MAA

Année universitaire 2019/2020

Remerciement

Ce mémoire n'aurait pas pu être ce qu'il est, sans le bon ALLAH tout puissant qui nous a guidésur le droit chemin et nous a donné le courage et la volonté de continuer et de terminer nos études.

Nos vif remerciement s'adressent à notre promoteur.

Nos remerciements sont adressés également aux membres du jury qui ont consacré un peu de leur temps et ont bien voulu accepter de juger ce modeste travail.

Dédicace

Merci et louange à ALLAH qui m'a donné la capacité de terminer ce travail et à mes chers parents*.*

RAZIKA

Dédicace

Je dédie ce travail à ma chère mère, à l'âme pure de mon père et à toutes les bonnes personnes de ma vie.

ELCHAIMA

Dédicace

Je dédie ce présent travail :

A mes chers parents, sans vous, je ne serais jamais arrivée, je n'ai entre du qu'encouragements et inqualifiable soutien, je ne cesserais de vous remercier, puisse dieu m'accorder les moyens de bien vous le rendre.

A mes frères : mohamed et zouhire.

A ma sœur : nacera et ca petite famille.

A mes collegnes : chère Assia, Ilhem, Khdidja

A mes chère binômes.

SOUAD

Résumé :

Ce mémoire consiste à confirmer si les concentrations des parabènes (parahydroxybenzoate de méthyle et parahydroxybenzoate de propyle) utilisées lors de la préparation de sirop de XIMALEX® assurent leur consevation et stabilité.

Pour cela, nous avons évalué l'efficacité de ces parabènes vis -à- vis les souches microbiennes ayant la capacité de coloniser ce produit pharmaceutique.

Un contrôle physico-chimique et microbiologique a été réalisé avant et après l'étude de la stabilité des quarte préparations durant un moins à température différant (25°C et 40°C)

Mots clés : conservateurs, XIMALEXE®, méthyle parabène, propyleparabène , stabilité

Abstracty:

This memory consist in proofing if the concentrations of substances of preservation (methyl and propyl paraben) used over the preparation of XIMALAXE® guaranty the protection and the stability .

A physicochemical and microbiological control was carried out before and after the study of the stability of the four preparations over a month at differnt temperatures(25°C and 40°C°)

For this we studied the efficacy of this substances against microbs which have the ability to proliferate in this pharmaceutical product.

Keywords : conservative, XIMALAXE®, methylparaben, propylparaben, stability.

ملخص:

هذه المذكرة قائمة على اثبات ان كانت تراكير المواد الحافظة (المثيل و البروبييل برابين) المستعملة خلال تحضير دواء

(كزيماكس) تضمن حفاظه و استقراره.

لهذا قمنا بدراسة فعالية هذه المواد الحافظة ضد الميكروبات القادرة على التكاثر في هذا المنتوج الصيدلي

تم تنفيذ التحاليل الفيزيائية والكيميائية والميكروبيولوجية عن طريق دراسة استقرارية المحليل الاربعة خلال شهر في درجات حرارة مختلفة (25°C et40°C)

الكلمات المفتاحية: الحوافظ، كزيمالكس، مثيل بربيل، بروبيل بربيل، الاستقرارية

.

Sommaire

Résumé

Abstract

ملخص

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction : 1

CHAPITRE 1 1

Généralité sur les conservateurs 3

1.1. Historique 3

1.2. Définition 3

1.3. Classification 4

1.3.1. Les Antimicrobiens 4

1.3.2. Les Antioxydants 5

1.4. Le mécanisme d'action des conservateurs 6

1.5. Cibles des conservateurs 8

1.6. Critères de choix des conservateurs 8

1.6.1.Toxicité 8

1.6.2. Spectre d'action 9

1.6.3. pH 9

1.6.4. Solubilité 9

1.6.5. Efficacité à long terme 10

1.6.6. Volatilité 10
1.6.7. Propriétés physiques 11
1.6.8. Coût 11
1.6.9. Sa compatibilité 11
1.7. Les domaines d'utilisation 11
1.7.1. En cosmétique 11
1.7.2. En domaine agro- alimentaire 14
1.7.3. Les conservateurs en pharmacie 17
Chapitre 2 : 3
2.1. Les parabènes 21
2.1.1.Définition 21
2.1.2. Origine 21
2.1.3.propriétés chimiques 23
2.1.4. Synthèse chimique : 25
2.1.5. réglementation : 26
2.1.6. Résistance: 26
2.1.7. Utilisation et consommation : 27
2.1.8. Consommation des parabènes par l'homme 28
2.1.9. Mécanisme d'action : 29
2.1.10. Sécurité 29
2.1.11. Etude de toxicité : 30
2.2.Méthylparabene 38
2.2.1.Description 38
2.2.2.Synonymes 38
2.2.3. Noms communs 39

2.2.4.Incompatibilité 39
2.2.5.Utilisation 40
2.3.Propylparabene 40
2.3.1.Description 40
2.3.2.Synonymes 41
2.3.3. Noms communs 41
2.3.4. Incompatibilité 41
2.3.5.utilisation 42
4.1.Sirop Ximalex 42
4.1.1.Définition 42
4.1.2.Préparation 43
4.1.3.Procédés de préparation 43
4.1.4.Altération et conservation 44
4.1.5.Présentation du sirop 44
4.2.Alpha amylase 45
Chapitre : 03 .....
3. Matériel et méthodes 50
3.1. Matériel biologique 50
3.2. Le produit 50
3.3. Equipements 50
3.4. Milieu de culture 50
3.5. Méthodes de travail 51
3.5.1. préparation de sirop (Ximalex®) 51
3.5.2. Préparation de sirop simple 52
3.6. 3ième étape : Contrôle physico-chimique 53

3.6.1 But 53
3.6.2. Domaine d'application 53
3.6.3. Document de référence ..... **Erreur ! Signet non défini.**
3.6.4. Equipements, Matériels et systèmes ..... **Erreur ! Signet non défini.**
3.6.5. Préparation et stérilisation des milieux de culture. **Erreur ! Signet non défini.**
3.6.6. Méthode 54
3.7. Contrôle de la qualité microbiologique des sirops préparés (produit fini): 57
3.7.1. But 57
3.7.2. Documents de référence ..... **Erreur ! Signet non défini.**
3.7.3. Equipements, matériels et systèmes ..... **Erreur ! Signet non défini.**
3.7.4. Méthode 58
3.8. Résultats 50
Conclusion : 61
Référence
Annexe

Liste des tableaux

Tableau I: site d'activité de conservation dans la cellule microbienne 6
Tableau II: pH de croissance de micro-organisme……..9
Tableau III:Les conservateurs antimicrobiens les plus employés 12
Tableau IV: les conservateurs les plus utilisés..... ……15
Tableau V:Classification des conservateurs en fonction de leur origine..... 16
Tableau VI: Noms et formules chimiques des principales molécules de la famille des Parabènes..... 22
Tableau VII: Caractéristiques physico-chimiques des parabènes 24
Tableau VIII:Consommation totale moyenne des parabènes par l'homme, FDA USA 1987 29
Tableau VIIII: DL50 et DL100 mesurées par diverses études chez différents animaux 33
Tableau X: La quantité admissible du méthyle parabène dans les préparations pharmaceutiques 40
Tableau XI : La quantité admissible du propyle parabène dans les préparations pharmaceutiques 42
Tableau XII:Altération des sirops 44
Tableau XIII:Les constituants du sirop XIMALEX 46
Tableau XIII: Les différentes concentrations de conservateurs retenues. 51
Tableau XV: Etapes de fabrication du sirop 52
Tableau XVI: La denceté et le pH des quatre préparations 62
Tableau XVII: les résultats de calculs J0..... 62
Tableau XVIII: résultats de calculs à J30. 66

Liste des figures

Figure 1: Abricots secs sans sulfite (gauche) et avec sulfites (droite)(Doudalia ,S, 2016) 17
Figure 2 : structure générale des parabènes(R désigne un groupe alkyle) 21
Figure 3: Photographie de poudre de Méthyl parabène 23
Figure 4: la réaction de Kolb Schmitt..... 26
Figure 5: Sites d'action des parabènes sur les bactéries Gram(-) /Gram(+) et les levures 29
Figure 6 : Schéma de toxicocinétique des parabènes établi d'après les tests sur l'animal 33
Figure 7: structure chimique d'un parahydroxybenzoate de méthyl 39
Figure 8: structure chimique de propylparabene 39
Figure 9 : structure d'alpha amylase 47
Figure 10: dénombrement les souches dans un milieu soja agar……63
Figure 11: dénombrement les levures et moisissures dans un milieu ssabouraud…….64
Figure 12: dénombrement des souches dans un milieu MCA et XLD……..64
Figure 13: dénombrement des souches dans un milieu CAB……65
Figure 14: denombrement des souches dans un milieu CHAP ……65
Figure15: résultat de dénombrement d'*E.Coli* ……..……*67*
Figure 16: résultat de dénombrement salmonelles……..……*67*
Figure 17: résultat de dénombrement *staphylococcus aureus*……...67
Figure 18: résultat de dénombrement *pseudomonas aeruginossa*……..…..68
Figure 19: Résultats obtenues de gaeme aerobie vaible totaux après 30j à 25°C…….68
Figure 20: Résultats obtenues de gaeme aerobie vaible totaux après 30j à 40°C…….69
Figure 21: Résultats obtenues de levure et moisissure après 30j à 25°C……70

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

AFSSAPS : Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé

ARN : Acide ribonucléique

ATP : Adénosine Triphosphate

BPF : Bonnes pratiques de fabrication.

BPF : Bonne pratique de fabrication

BVRG : bile-violet-rouge avec glucose.

CAB : cérimide agar base

CCM : Chromatographie sur couche mince

CMI : Concentrations minimales inhibitrices

DC : Dermatite de contact

DCA : Dermatite de contact allergique

DGAT : Dénombrement des germes aérobies totaux

DL 50 : Dose létale médiane

DLCQ : Directrice de laboratoire contrôle qualité

DMLT : Dénombrement des moisissures et levures totales

HPLC : Chromatographie en phase liquide à haute performance.

ICE : Conseil international d'harmonisation

K : Coefficient de partage

MCA : Mac conkey agar

OMS : Organisation mondiale de la sante

PH : Potentiel d’hydrogène

RAQ : responsable assurance qualité

SAB : Sabouraud dextrose.

XLD : Milieu gélose xylose-lysine-désoxycholate

Introduction

Introduction :

Les conservateurs constituent un thème récurrent d'interrogations et de débat, chaque fois que ce thème est abordé, de nombreux consommateurs associent ces substances à des produits chimiques dangereux, présents dans les aliments, les produits cosmétiques et les médicaments, rappelons que cette notion de conservation, en l'occurrence des denrées alimentaires, a vu le jour il y plusieurs siècles, lorsque l'homme a utilisé pour la première fois le sel (salaison) et la fumée (fumaison) pour empêcher la viande et le poisson de se dégrader. Malgré certaines réticences de la part des consommateurs, les conservateurs constituent aujourd'hui une part indispensable des produits que nous consommons. Ceci est dû en partie à la demande croissante des consommateurs en faveur d'un choix plus vaste de produit (Moudjded,A.et al, 2019).

En plus de leurs critères généraux obligatoires en tant qu'additifs, les conservateurs sont des substances qui prolongent la durée de conservation des produits pharmaceutiques. Ils sont définit ont pour fonction :

- de protéger des altérations dues aux micro-organismes et/ou
- d'immuniser contre la croissance des micro-organismes pathogènes.

Le médicament est l'un des produits les plus délicats. Sa conception, sa fabrication, et son consommation doivent répondre à des normes strictes de sorte que son utilisation ne doit comporter aucun risque sur la santé du consommateur.

Aujourd'hui dans la majorité des produits pharmaceutiques on observe la présence d'au moins un conservateur La question que se pose est ce que les parabènes sont nécessaires pour la stabilité d'un produit pharmaceutique ?

Dans notre travail qu'on an effectué au niveau de SAIDAL, on a préparé une solution buvable(XIMALEX°) à des différents concentrations en parabènes(quatre préparations) dont on a suivi le dosage des parabènes par chromatographie phase liquide à haute performance (HPLC),dosage de alpha-amylase par UV, suivi d'un dosage microbiologique à fin de suivre l'efficacité des parabènes pendant un mois à différents températures(25°C et 40°C).

Chapitre 1 : Généralités sur les Conservateurs

Généralité sur les conservateurs

1.1. Historique:

Les conservateurs sont utilisés dans l'alimentaires. La viande fumée, par exemple, contient des phénols et d'autres produits chimiques qui retardent la détérioration. La conservation des aliments a beaucoup évoluée au fil des siècles et a contribué à accroître la sécurité alimentaire. L'utilisation des conservateurs autres que les huiles, sels, peintures,… etc. traditionnels dans les aliments a commencé à la fin du 19ème siècle, mais ne s'est généralisée qu'au 20ème siècle(Evans,G.De Challemaison,B, 2010). Les premiers agents de conservation à utiliser étaient le vinaigre, le sel et le sucre(Chiori, co.Ghobashy, A.A, 1983)**.**L'utilisation des conservateurs varie considérablement selon les pays. De nombreux pays en voie de développement qui ne disposent pas de législation pour réglementer les additifs alimentaires et les conservateurs, par exemple l'Algérie. Ces pays sont confrontés à ce problème par l'évitement complet des aliments considérés comme non naturels ou étrangers. Ces pays se sont également révélés utiles dans les études de cas relatives aux conservateurs chimiques, car ils n'ont été introduits que récemment (Ashagrie,A.Abate,D, 2012).Dans les bidonvilles urbains de pays très peuplés, les connaissances sur le contenu des aliments ont tendance à être extrêmement faibles, malgré la consommation de ces aliments importés(Moudjded,A.et al, 2019).

1.2. Définition:

Les conservateurs sont des substances de structure chimique variée, utilisés quelque fois pour prolonger la durée de conservation d'un médicament en évitant la formation de substances oxydées et /ou en évitant la prolifération de germes. Certains groupements chimiques de ces substances sont généralement agressifs pour la cellule vivante, ainsi, leur utilisation chez l'homme n'est pas absolument dénuée de risques.Un conservateur antimicrobien idéal doit avoir un large spectre d'action aussi bien sur les bactéries que sur les levures et les moisissures ; être non toxique et compatible avec les autres constituants de la formule ; être physiquement, chimiquement et microbiologiquement stable pendant la durée de vie du produit et dans une large

gamme de pH et de température ; être facilement dosable par une technique rapide et non couteuse ;avoir un gout et une odeur acceptable à la concentration utilisée ;avoir un coût réduit par rapport à celui du médicament ;être contrôlable dans le produit fini L'industrie pharmaceutique a recours à une association de plusieurs conservateurs, tout en respectant les bonnes pratiques de fabrication car aucun des conservateurs ne réunit toutes ces propriétés simultanément(Menuet,P, 2008) **.**

1.3. Classification :

Les conservateurs sont classés en deux classes principales: les conservateurs antimicrobiens et les antioxydants (Hang,H. Y. et al, 2003).

1.3.1. Les Antimicrobiens :

Un conservateur antimicrobien est tout agent qui agit contre les micro-organismes gram positifs et négatifs (bactérie) et champignon qui provoquent la dégradation de la préparation pharmaceutique. Qui agit par inhibition de la paroi cellulaire, inhibition de la synthèse des protéines, inhibition de la synthèse de l'ADN et de l'ARN .Des conservateurs antimicrobiens sont inclus dans les préparations pour éliminer ou empêcher la croissance de micro-organismes (bactéries et champignons) introduits par inadvertance lors de la fabrication ou de l'utilisation. Ils sont utilisés dans des préparations stériles comme les collyres (exemple : le chlorure de benzalkonium) et des préparations injectables (exemple : l'alcool benzylique) afin de maintenir la stabilité pendant l'utilisation. Ils peuvent également être ajoutés à des injections aqueuses qui ne peuvent pas être stérilisées dans leurs récipients définitifs et doivent être préparés avec des précautions d'asepsie. Les conservateurs sont également utilisés dans les produits cosmétiques, les aliments et les produits pharmaceutiques non stériles tels que les solutions (sirops) et les crèmes pour prévenir la détérioration microbienne. . Ils ne sont pas utilisés indifféremment, et les préparations qui ne doivent pas contenir de conservateur incluent (injections dans les liquides céphalo-rachidiens, les yeux ou le cœur). Les conservateurs antimicrobiens sont classés en deux sous-groupes principaux: les antifongiques et les antibactériens.

- **Les conservateurs antifongiques:** comprennent des composés tels que les acides benzoïques, acide sorbique et leurs sels, ainsi que des composés phénoliques tels que le p-hydroxybenzoate de méthyle, d'éthyle, de propylée et de butyle (parabènes).
- **Les conservateurs antibactériens:** comprennent des composés tels que les sels d'ammonium quaternaire, d'ammonium quaternaire, mercuriels et les biguanidines.

1.3.2. Les Antioxydants :

Les antioxydants sont des agents qui empêchent l'oxydation des formulations pharmaceutiques. Ils agissent comme des agents réducteurs et empêchent l'oxydation des ingrédients sensibles à l'oxygène. Des antioxydants sont inclus dans les produits pharmaceutiques pour prévenir la détérioration due à l'oxydation. Les antioxydants sont classés en 3 sous-groupes :

- **Le premier groupe** : Regroupant des véritables antioxydants, ou anti-oxygène, inhibant probablement l'oxydation en réagissant avec les radicaux libres bloquant la réaction en chaîne. Des exemples sont les alkyl gallates de butylate d'hydroxyanisol, d'hydroxytoluènebutylé, et les tocophérols.
- **Le deuxième groupe :** Est constitué d'agents réducteurs ; ces substances ont des potentiels réd/ox inférieurs à ceux du médicament ou de l'adjuvant qu'elles sont destinées à protéger et sont donc plus facilement oxydables. Les agents réducteurs peuvent également agir en réagissant avec les radicaux libres. Les exemples sont l'acide ascorbique, les sels de potassium et de sodium de l'acide sulfureux.
- **Le troisième groupe:** Est constitué de synergistes antioxydants qui ont généralement peu d'effet antioxydant mais qui renforcent probablement l'action des antioxydants du premier groupe en réagissant avec des ions de métaux lourds qui catalysent l'oxydation. Exemple de synergistes antioxydants: acide arécitrique, acide édétique et ses sels, lécithine et acide tartrique(Khairi M.S. et al, 2007)

1.4. Le mécanisme d'action des conservateurs: Les conservateurs offrent généralement une protection limitée contre la contamination virale. Les bactéricides et les fongicides peuvent démontrer leurs effets sur diverses cibles cellulaires microbiennes, par exemple:

- La paroi cellulaire
- La membrane cytoplasmique
- Le cytoplasme

Il est souvent difficile d'attribuer une cible précise à une classe spécifique de conservateur; la cible peut être change avec la concentration en conservateur. En conséquence, les conservateurs peuvent souvent interférer avec différents mécanismes cellulaires microbiens (Tableau I)(Moudjed,A.et al, 2019).

Tableau I : site d'activité de conservation dans la cellule microbienne

Paroi cellulaire	**Membrane cytoplasmique**	**Cytoplasme**
Phénols	2-phenoxyethanol	2-phenoyethanol et alcoolorganique
Acidesacyliques et alkyliques	Parabens	Acidesacryliques et alkyliques
Organomercuriels	Organomercuriels	Conservateurshalogénées
EDTA	EDTA	
Chlorhéxidine et cétrimide	Chlorhéxidine et hexachllorophènes	Chlorhéxidine a haut concentration
Glutaraidehyde	Bronopol et imidurée	Bronopol et imidurée
Tensioactifanionique	Chlorure de benzalkonium	

Une telle cytotoxicité peut également affecter les cellules de mammifère. Par conséquent, les niveaux d'inclusion devraient être minimes, compatibles avec une préservation adéquate. . La réglementation s'attend à ce que le demandeur aborde tous

les motifs de l'inclusion de conservateur, la preuve d'efficacité, les informations de sécurité, les méthodes de contrôle dans le produit fini et les détails de l'étiquetage dans le produit fini Les mécanismes d'activité aux emplacements énumérés dans le tableau (I) peuvent également différer avec chaque agent de conservation, comme indiqué ci-dessous:

- L'activité au niveau de la paroi cellulaire peut impliquer une lyse en raison d'une inhibition enzymatique, comme c'est le cas avec les phénols et les organo mercuriels….. etc. En revanche, le glutaraldéhyde montre son effet par une réticulation irréversible au niveau de la paroi cellulaire
- L'activité au niveau de la membrane cytoplasmique peut être dûe à des effets sur le potentiel de la membrane, la fonction enzymatique de la membrane ou la perméabilité générale de la membrane Le cétrimide, la chlorhexidine, les parabens et les phénols affectent la perméabilité de la membrane en permettant la «fuite» des constituants essentiels de la cellule, entraînant la mort cellulaire.

L'acide sorbique inhibe les mécanismes de transport à travers la membrane cytoplasmique etinhibe l'oxydation du fumarate La chlorhexidine inhibe également l'ATPase membranaire, inhibant ainsi l'activité anaérobie cellulaire. À des concentrations plus élevées, il induit la précipitation d'acides nucléiques cytoplasmiques et de protéines apparentées

- L'activité au niveau cytoplasmique peut concerner le découplage des processus d'oxydation et de phosphorylation ou l'interférence avec les mécanismes de transport actifs, comme c'est le cas avec les agents de conservation à base d'acide carboxylique et d'alcool… etc. D'autres conservateurs peuvent inhiber les chaînes de transport d'électrons, inhibant ainsi l'activité métabolique chez les bactéries aérobies.

Il est possible de sélectionner des agents de conservation spécifiques pour traiter un organisme particulièrement gênant associé à un site ou à un processus de fabrication; Cependant, l'éradication de ces organismes relève des bonnes pratiques de fabrication (BPF) et le système de préservation ne doit pas être utilisé pour remédier aux carences

des processus de fabrication. Il existe également des possibilités de combinaisons synergiques pour fournir le spectre requis dans un système ou un produit particulier (Moudjded,A.et al, 2019).

1.4. Cibles des conservateurs :

Tout d'abord, le mot micro-organisme est employé pour d'écrire un organisme de petite taille qui ne peut être visualisé sans l'aide d'un microscope, cette définition incluse les bactéries, les champignons (levures, moisissures), protozoaires, certaines micros algues, les virus**.**

Les conservateurs ne sont pas efficaces contre les virus, par contre ils sont efficaces contre les bactéries, les champignons et les levures. Ils permettent d'éviter la prolifération microbienne qui peut constituer :

- Un risque infectieux pour le malade, surtout dans le cas où les microorganismes sont pathogènes par exemple: ***Pseudomonas aerogénosa, Staphylococcus aureus, candida albicans, clostridium sp***etc.
- Une accélération de la détérioration du produit (Moudjded,A.et al, 2019).

1.5. Critères de choix des conservateurs:

Si la formule ne possède pas de pouvoir autoprotecteur (caractéristiques physico-chimiques des ingrédients) suffisant, un conservateur doit être ajouté. L'orientation du choix se fera en fonction de (Oni, M.O et al, 2013) :

1.6.1.Toxicité:

Le conservateur doit être dénué de tout effet toxique ,irritant, sensibilisant au niveau de la peau ou des muqueuses, à la concentration utilisée pour la conservation, à court et à long terme, pratique ,les conservateurs les plus efficaces sont souvent les plus toxiques.

1.6.2. Spectre d'action:

Le conservateur doit présenter un large spectre d'activité, il doit être efficace contre les bactéries Gram+et Gram-, les levures et les moisissures à faible concentration possible et à moindre cout.

1.6.3. pH:

Le pH a un rôle important dans l'efficacité d'un conservateur car la plupart des bactéries se développent à un pH neutre ou proche de la neutralité, contrairement aux levures et moisissures qui se développent à un pH acide.

Tableau II: pH de croissance de micro-organisme

Organismes	Croissance possible a PH
Levures	2 à 8.5
Staphylocoques	4.2 à 9.3
Pseudomonas	5.5 à 8

1.6.4. Solubilité :

Le conservateur doit être soluble dans la préparation pharmaceutique à la concentration choisie, il doit posséder une grande solubilité dans la phase aqueuse et une basse solubilité dans la phase grasse. Les micro-organismes se multiplient en phase aqueuse, il est donc important que le conservateur se maintienne à concentration efficace dans la phase hydrophile du produit, d'ou l'importance de la solubilité du conservateur dans l'eau. . Les microorganismes ont une double paroi, lipoprotéique et polysaccharidique, conservateur doit réussir à traverser cette membrane, il faut donc qu'il soit liposoluble

1.6.4.1. Solubilité dans l'eau :

Les micro-organismes se multiplient en phase aqueuse; il est donc important que le conservateur se maintienne à concentration efficace dans la phase hydrophile de produit, d'où l'importance de la solubilité du conservateur dans l'eau. Quand le produit en question est une émulsion, deux phases, hydrophile et lipophile, sont présentes, et le coefficient de partage du conservateur est déterminant. Idéalement, un conservateur doit posséder une grande solubilité dans la phase aqueuse, donnant ainsi un coefficient de partage ou répartition huile/eau faible (k).

- Si K<1, le conservateur aura un caractère hydrophile marqué.
- Si K>1, le conservateur aura un caractère lipophile marqué.

Le coefficient de répartition varie en fonction du pH de la formulation et de la nature de la phase lipophile.

Ainsi, pour deux conservateurs ayant une concentration active identique et introduits à concentration égale dans une émulsion, le plus actif sera celui ayant le plus faible coefficient de partage huile/eau.

1.6.5. Efficacité à long terme :

Les conservateurs devraient maintenir leur efficacité durant toute la vie du produit, ils doivent présenter une activité constante dans le temps. De plus, ils ne doivent pas être dégradés, existant ainsi le risque de produire des métabolites (résultats de dégradations) pouvant modifier les caractéristiques du produit, ou bien néfastes à la santé de l'utilisateur.

1.6.6. Volatilité :

Les conservateurs devraient être non-volatiles, évitant une perte d'activité si le produit est sujet à une élévation de température, que ce soit pendant la fabrication ou durant son usage.

1.6.7. Propriétés physiques :

Le conservateur idéal devrait être incolore, inodore et insipide dans le produit fini. En outre il doit être facile à utiliser et incorporer.

1.6.8. Coût :

Un conservateur doit être rentable, facilitant ainsi son utilisation sur une commerciale peu onéreuse.

1.6.9. Sa compatibilité :avec le processus de fabrication, les matériaux de conditionnement et les autres composants de la formule(Cohen , Y.Gleitz, C, 2009).

Cette liste de paramètres pouvant intervenir sur l'activité du conservateur montre qu'il est indispensable de contrôler l'efficacité de la protection antimicrobienne du produit terminé, et, autant que possible, dans le conditionnement prévu pour sa commercialisation(Moudjed .A et al, 2019).

1.7. Les domaines d'utilisation :

1.7.1. En cosmétique:

Les conservateurs antimicrobiens les plus employés sont les suivants : Tableau (3) Les acides organiques sont actifs si le nombre de carbone des chaînes alkyles est élevé. En revanche, leur solubilité dans l'eau diminue. Le pKa acide de ces conservateurs doit être contrôlé et une variation de pH de *1,5* unité ou plus au-dessus de la neutralité peut causer la perte progressive de l'activité antimicrobienne. Les alcools et les phénols sont des substances qui possèdent des propriétés antimicrobiennes Les alcools et les phénols sont des substances qui possèdent des propriétés antimicrobiennes A partir de la structure chimique des phénols, il a été remarqué que :

- Les para-substitutions de la chaîne alkyle à six atomes de carbone augmentent l'activité antibactérienne des phénols. De plus, les para-substituants linéaires confèrent une plus grande activité que les

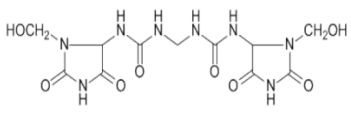
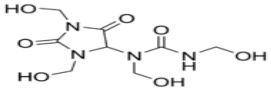
substituants à chaînes ramifiées contenant un même nombre d'atomes de carbone.

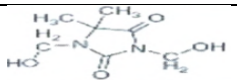
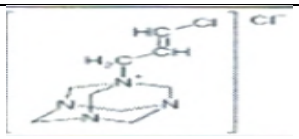
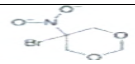
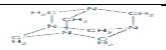
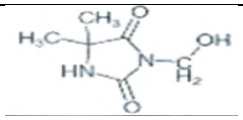
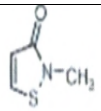
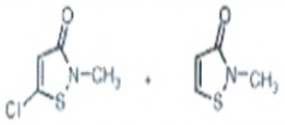
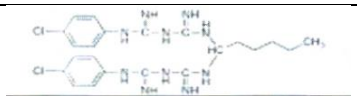
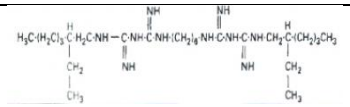
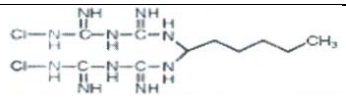
- L'halogénation augmente l'activité antibactérienne des phénols. Quand le groupe alkyl est en position ortho et l'halogène en position para, le phénol aura une plus grande activité antibactérienne.
- La nitration, présente l'avantage d'augmenter l'activité vis-à-vis des bactéries par l'altération de la phosphorylation oxydative.
- Dans la série des bisphénols, l'activité est liée avec les deux cycles C 6H5 qui sont séparés par des groupes -CH2-, -S- ou -O-. Si les groupes sont -CO-, -SO- ou -CH(OH)-, l'activité antimicrobienne chute. En outre, il a été retrouvé que l'halogénation des bisphénols et la présence des groupes hydroxyles en position 2,2' contribuent à l'augmentation de l'activité antimicrobienne des bisphénols.

Le formaldéhyde connu sous le nom d'oxyméthylène ou formaline, est un conservateur utilisé dans les shampoings, les gels douches et les savons liquides. Il est libre ou lié avec les donneurs de formaldéhyde. Au Japon et en Suède, le formaldéhyde est interdit dans les produits cosmétiques et les articles de toilettes car c'est un produit capable de produire le cancer chez les consommateurs(Debacker, M., 2018)**.**

Les isothiazolinones sont très actifs par les groupements thiols et les amines de leurs structures. Ces conservateurs sont souvent masqués sous les noms chimiques du mélange qui les constitue. Ils sont de moins en moins employés suite au grand nombre de réactions allergiques dénoncées par les dermatologues(Halla,N. 2010).

Tableau III: Les conservateurs antimicrobiens les plus employés (Halla, 2010)

Formaldéhyde et donneurs de formaldéhydes	$O{=}CH_2$	Formaldéhyde
		Imidazolidinyl urée (Germail II®)
		Diazolidinyl urée (Germait II®)

		2-bromo-2-nitro propane-1,3-diol ou le Bronopol ®
		DMDM hydantoine (1,3-diméthylol-5,5-diméthylhydantoine « Giydant® »)
		Quaternium 15 (ou 1-(3-chloroailyl)-3,*5,*7-triaza-1-azonia-adamant ane-chiorure)
		5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxane (Bronidox®)
		Hexaméthylenetetramine
		Monomethylloidimethylhydantoine
Isothiazolinones		Méthylisothiazolinone
		Chlorométhylisothizolinone, Kathon CG (5-Chioro-2-methyi-4-isothiazolin-3-one (CMIT) et 2-methyi-4- isotbiazoiin-3-one (MIT))
Biguanides		Digiuconate de chiorhexidine
		Alexidine
		Biguanide polyaminopropyl

Ethylènediaminetétracétique :est connu pour sa synergie avec plusieurs conservateurs chimiques, il perturbe la couche lipidique externe des bactéries et augmente la pénétration des autres composés antimicrobiens dans la cellule. La compatibilité physique est également importante. Le type de récipient utilisé pour emballer un produit

cosmétique influencera la concentration et l'activité des conservateurs. Généralement, les conservateurs lipophiles sont associés à un plus grand risque d'absorption par des récipients. Certains récipients ne sont pas compatibles avec certains conservateurs, tels que le Nylon avec les Parabens ou le Polyéthylène avec certains composés phénoliques, mercuriels et benzoates.

1.7.1.1. Toxicité des conservateurs:

L'usage des produits cosmétiques est à l'origine dans certaines situations des dermatites de contact rencontrées beaucoup plus chez les femmes que chez les hommes. Il existe un lien direct entre l'effet antimicrobien et la capacité à induire une sensibilité de contact. Ceci peut expliquer le fait que les conservateurs les plus efficaces sont souvent ceux qui possèdent le potentiel de sensibilité le plus important. Les conservateurs représentent, après les parfums, le deuxième grand groupe d'allergènes les plus fréquemment incriminés dans l'allergie aux cosmétiques. Typiquement, la dermite de contact est une réaction eczémateuse, habituellement à une substance appliquée à la surface de la peau. La dermatite de contact (DC) affecte approximativement 20% de la population aux États-Unis. Pathophysiologiquement, la DC peut être divisée en réactions dermatites de contact allergiques (DCA) (affecte 6% de la population générale) et réactions dermatites de contact irritatives (DCI)(COHEN , Y.GLEITZ , C, 2009).

1.7.2. En domaine agro- alimentaire :

Depuis la Préhistoire, l'Homme cherche à conserver au mieux ses aliments. Cro-Magnon sèche ses viandes au soleil pour constituer des réserves en dehors des périodes de chasse. À la haute antiquité, les composés naturels sont utilisés. Les Romains, fument les viandes et les fromages et développent les techniques de salaison. Au Moyen Orient et en Afrique, à la même époque, c'est le salpêtre (nitrate de potassium) associé au sel que l'on utilise pour conserver les viandes et les poissons(Halla, N ., 2018).

Les conservateurs sont désignés dans la nomenclature par des codes de E 200 à E 297.(annexe 1)(Adeinat,L., 2018).

les conservateurs les plus utilisés(Bindu,P.S.et al, 2011) :

Tableau IV: les conservateurs les plus utilisés

Nombre E	**Substance/classe**	**Quelques-unes des denrées alimentaires dans lesquelles ils sont utilisés.**
E 200-203	Acide sorbique et sorbates	Fromages, vins, fruits séchés, purées de fruits, garnitures.
E 210-213	Acide benzoïque et benzoates	Légumes au vinaigre, confitures et gelées à faible teneur en glucides, fruits confits, semi-conserves de produits de la pêche, sauces.
E 220-228	Dioxyde de soufre et sulfites	Fruits séchés, fruits en conserve, produits à base de pomme de terre, vins
E 235	Natamycine	Traitement de surface des fromages et des saucissons.
E 249-252	Nitrites et nitrates	Saucissons, bacon, jambons, foie gras, fromages, harengs au vinaigre.

Aujourd'hui, l'industrie de l'alimentaire utilise deux types de substances à visée conservatrices :

- **Les conservateurs d'origine minérale :** composés de matières non vivantes, ils agissent par inhibition de la croissance bactérienne ou par chélation de métaux lourds souvent catalyseurs de dégradations.
- **Les conservateurs d'origine organique :** composés de matières issues des êtres vivants, ils agissent par effet conservateur primaire (acide acétique, acide propionique et sels, acide sorbique et sels, acides benzoïques et sels) ou par un effet secondaire (acide tartrique, acide lactique)(ADEINAT ,L, 2018)

Tableau V: Classification des conservateurs en fonction de leur origine

Origine	Groupes d'additifs	Codes
Organique	**Acide sorbique et ses sels**	E 200, E 202, E 203
	Acide benzoïque et ses sels	E 110, E 211, E212, E 213
	Parabènes	E 214, E 215, E 218, E 219
	Acide acétique et ses sels	E 260, E 261, E262, E 263
	Acide propionique et ses sels	E280, E 281, E 282, E 283
	Autres	E 234, E 235, E 270, E 296, E 297
Minérale	**Nitrites et nitrates**	E 239, E 242, E 250, E 251, E 252
	Sulfites et ses sels	E 220, E 221, E 222, E 223, E 224, E 226, E 227, E 228
	Acide borique et son sel	E 284, E 285
	Autre	E 290

Exemple : les abricots secs retrouvés classiquement en grandes et moyennes surfaces, ont une couleur orangée vive grâce à l'emploi des sulfites. Sans eux, ces mêmes abricots secs seraient de couleur brune, leur donnant un aspect bien moins appétissant(Doudalia ,S, 2016)**.**

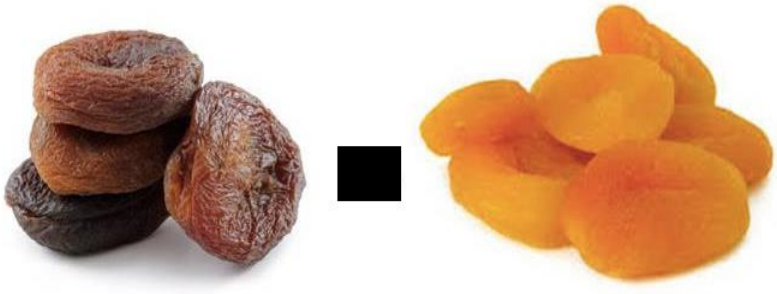


Figure 1: Abricots secs sans sulfite (gauche) et avec sulfites (droite) (Doudalia ,S, 2016)

1.7.2.1. Les effets sur la dose :

Les additifs alimentaires ne sont généralement pas nocifs pour la santé dans les conditions d'utilisation spécifiques autorisées. Cependant un certain nombre de conservateurs sont suspects ou dangereux. Certains conservateurs sont allergènes ou/et cancérigènes. Certains conservateurs agissent sur l'appareil digestif en provoquant des irritations du tube digestif ou des ralentissements de la digestion ; d'autres ont une action sur la fixation de la vitamine B1 ou sur le taux sanguin de cholestérol.

Exemples : Les Sulfites E220-8 bactéricides et antioxydants Chez personnes sensibles => crises asthmatiformes, céphalées. 5-10% de la population > DJA

Nitrites E250-51 indispensables en salaison: Bactériostatiques. Améliorent couleur et flaveur. Mais provoquent méthémoglobinémie du nourrisson. Nitrosation (inhibée par vit. C, additif systématique). Synthèse endogène de nitrosamines cancérigènes (cancer œsophage, estomac, colon)(Adeinat,L., 2018)**.**

1.7.3. Les conservateurs en pharmacie :

Les agents de conservation utilisés dans l'industrie pharmaceutique sont devenus très controversés pour les consommateurs, bien qu'il n'existe aucune preuve concluante permettant de prouver leur gravité, sauf certaines réactions allergiques courantes. Cela à conduit les autorités à publier une liste des conservateurs à effet notoire présentant toutes les caractéristiques de ces substances, allant des cas d'utilisation et des

contr-eindications à la concentration maximale qui ne pas être dépasser. Cette liste des conservateurs est incluse dans une liste appeler liste des excipients à effet notoire qui à été établie pour la premiere fois par l'AFSSAPS puis à été remise à jour par la commission européenne en 2007.

Les Excipients à Effet Notoire (EEN) sont, selon l'AFSSAPS, « excipients dont la présence peut nécessiter des précautions pour certains patients ». Sur les **47** excipients à effet notoire répertoriés, on en dénombre **12** qui sont des conservateurs : **l'acide borique** et **ses sels**, **l'acide benzoïque** et **benzoate, l'alcool benzylique**, **l'acide sorbique**et **ses sels**, **le bronopol**, le **chlorure de benzalkonium**, **le formaldéhyde, le paraformaldéhyde**, **les parahydroxybenzoates**et **leurs sels**, et **les sulfites**, **hydroxyanisol butyle**, **hydroxytoluene butyle** . Le Vidal présente le tableau des EEN et décrit les risques encourus. Ainsi les parabens peuvent entraîner des dermatites de contact et exceptionnellement des réactions immédiates avec urticaire et bronchospasmes.

Selon **ICH** les conservateurs sont analyseés dans les préparations pharmaceutiques qui en contiennent, dans les limites autorisées : **L'analyse de la teneur en agents antimicrobiens, antioxydants** doit généralement être réalisée lors de la mise en circulation. Si l'on effectue une analyse de la teneur en agents antimicrobiens, antioxydants en cours de fabrication, les critères d'acceptation doivent demeurer dans la spécification(Moudjed,A.et al, 2019) .

Les conservateurs, seuls ou en combinaisons synergiques, restent nécessaires pour prévenir la contamination microbienne des médicaments (liquides ou semi-solides) ,consemetique ou alimentaire à usages multiples, en particulier des agents pathogènes opportunistes. Leur absence peut avoir de graves conséquences sur la santé du patient. Il existe un nombre limité de conservateurs approuvés par la réglementation qui peuvent être inclus dans ces produits à usage oral ou topique à usage multiple et leur nombre est encore plus limité dans les produits à usage parentéral. En outre, il serait peut-être temps de revenir sur les tests et les exigences de performance que doivent subir les produits avant d'être considéré comme suffisamment préservés.

Des critères de performance et des techniques d'évaluation, basés sur le type de produit, la dose, les antécédents environnementaux de fabrication, pourraient être plus appropriés que l'application d'une seule norme de qualité définie dans les pharmacopées, ce qui pourrait bien représenter un «excès» dans un contexte microbiologique des produits et de bon sens pour de nombreuses personnes. Les approches sans conservateur en sont encore à leurs débuts et il faut encore beaucoup de recherche avant de pouvoir les considérer sur un pied d'égalité avec les approches préservées. Cependant, plusieurs dispositifs et preparations ophtalmiques sans conservateur sont disponibles et offrent certaines perspectives.

L'utilisation des conservateurs dans les produits pharmaceutiques, consermetique ou alimentaire reste une methode fiable et sécurisée pour la conservation des ces produits au cours de stockage ou au mement d'utilisation, mais leur integration dans la formulation reste toujours limité par des reglementations qui definissent les normes, les situations et limites d'acceptation, pour éviter toute affection pouvant affecter la santé humaine.

Chapitre 2 :
Les parabènes utilisés dans ximalex

2.1. Les parabènes

2.1.1. Définition :

Les parabènes (paraoxybenzoates) forment un groupe homologue dérivés de l'acide hydroxybenzoïque. Celui-ci est estérifié en C-4 par un alcool et, selon l'alcool utilisé, les différents parabènes obtenus sont : le méthyl-(MP), éthyl-(EP), propyl-(PP), isopropyl-, butyl-(BP), isobutyl- et benzylparaben. Ils sont employés couramment dans les cosmétiques, l'alimentation et les médicaments. Ils sont utilisés comme conservateurs, depuis les années 20, dans les produits pharmaceutiques. Les parabènes sont utilisés seuls ou en combinaison pour exercer une activité antimicrobienne et antifongique(Cohen,Y.Gleitz,C, 24 juinb 2009).

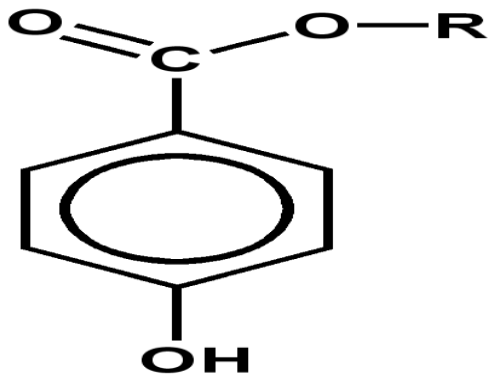


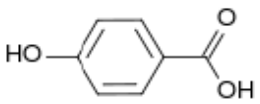
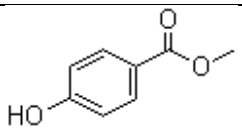
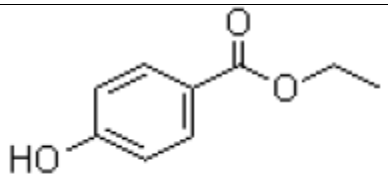
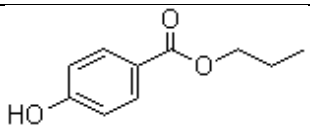
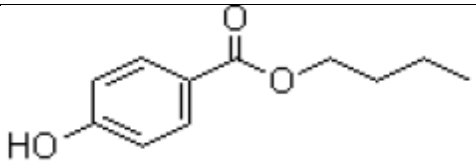
Figure 2 : structure générale des parabènes(R désigne un groupe alkyle)INERIS ,2015 in www. Ineris.fr/substances/fr/)

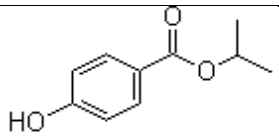
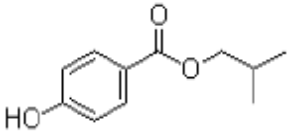
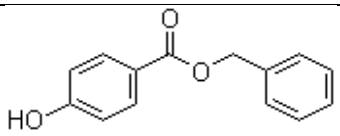
2.1.2. Origine :

les parabènes sont généralement synthétiques ,mais existent également à l'état naturel dans certains aliments .Les produits de l'abeille(propolis ,gelée royale,.....)en sont particulièrement riches ,mais c'est également le cas de fruits et légumes comme l'orge , la fraise , le cassis , la pêche ,la carotte , l'ognion , les haricots blancs , la vanille **,...**..et aussi dans les aliments préparés à partir de plantes , comme le jus de raisins et d'autre fruits , les extraits de levures , le vinaigre de vin et également les fromages .

On les trouvent naturellement comme précurseur du coenzyme Q10 dans le corps humain et plus particulièrement dans celui de la femme .() .Les noms et les formules chimiques des principales molécules de parabènes sont présentés dans le tableau(6)

Tableau VI: Noms et formules chimiques des principales molécules de la famille des Parabènes((Haman, 2014)

Nom	Abréviation	N°CAS	Formule chimique	Formule développée
Acide *p*hydroxybenzoïque	APHB	99-96-7	$C_7H_6O_3$	
Méthylparabène / 4-hydroxybenzoate de méthyle	MeP	99-76-3	$C_8H_8O_3$	
Ethylparabène / 4-Hydroxybenzoate d'éthyle	EtP	120-47-8	$C_9H_{10}O_3$	
Propylparabène / 4-hydroxybenzoate de propyle	PrP	94-13-3	$C_{10}H_{12}O_3$	
Butylparabène / 4-hydroxybenzoate de butyle	BuP	94-26-8	$C_{11}H_{14}O_3$	

Isopropylparabène	i-PrP	4191-73-5	$C_{10}H_{12}O_3$	
Isobutylparabène	i-BuP	4247-02-3	$C_{11}H_{14}O_3$	
Benzylparabène / 4-hydroxybenzoate de benzyle	BzP	94-18-8	$C_{14}H_{12}O_3$	

2.1.3 .propriétés chimiques :

A l'état pur, les parabènes sont sous la forme d'une poudre cristalline incolore et inodore.physico-chimique



Figure 3: Photographie de poudre de Méthyl parabène (Haman,c, 2014)

Les principales caractéristiques physico-chimiques des parabènes sont présentées dans le tableau suivant :

Tableau VII: Caractéristiques physico-chimiques des parabènes (Haman,C, 2014)

Caractéristiques	***APHB***	**MEP**	**ETP**	**PRP**	**BUP**	**BZP**
Poids moléculaire (g/mol)	138,12	152,15	254,38	180,21	194,23	228,24
Point de fusion (°C)	213	131	117	97	68,5	110
Point d'ébullition (°C)	250	275	297,5	285,14	300,26	
Pression de vapeur à 25°C (Pa)	_	0,114	0,01239	0,04093	0,0334	_
Solubilité dans l'eau à 25°C (mg/L)	5000	2500	885	500	207	160
Log Kow	_	1,96	2,47	3,04	3,57	3,61
PKa	2,7	8,31	8,31	8,23	8,22	8,37

Les molécules de la famille des parabènes sont faiblement solubles dans l'eau. En revanche, ces molécules sont extrêmement solubles dans les solvants tels que les alcools, l'acétone et l'éther. La solubilité décroît lorsque la longueur de la chaîne alkyle s'allonge. Dans l'industrieagroalimentaire, les sels de sodium dérivés des parabènes sont préférentiellement utilisés en raison de leur meilleure solubilité dans l'eau (Radovan,c.et al, 2008).

Le coefficient de partage octanol-eau (log Kow) augmente en fonction de l'accroissement de lalongueur de la chaîne alkyle . Il permet d'évaluer l'accumulation possible des molécules dans lestissus vivants. Pour les parabènes, celle-ci paraît faible mais semble augmenter de façonproportionnelle avec la longueur de la chaîne alkyle.

Les valeurs de pKa oscillent entre 8,22 et 8,37 selon les parabènes. Le pH de l'eau étant en général de l'ordre de 7, les parabènes se trouvent sous leur forme acide dans ce milieu.

La pression de vapeur saturante à 25°C largement inférieure à 100 Pa montre que les parabènes sont des composés très peu volatils.

Les points d'ébullition des parabènes sont assez élevés. Ceci montre une certaine stabilité des molécules. Les points de fusions différents pour chaque parabène permettent de les identifier.

Enfin, les parabènes sont utilisés en tant que conservateurs car ils présentent des propriétés antibactériennes et antifongiques. Leur mode d'action, encore incertain, passerait probablement par la dénaturation des membranes microbiennes et provoquerait ainsi des altérations protéiques (Nguyen,T.et all, 2005).

Le spectre d'action des parabènes comprend les bactéries à Gram positif (comme celles du16 genre (*Staphylococcus*) ainsi que quelques bactéries à Gram négatif (comme (*Pseudomonas aeruginosa*).

Ils sont actifs également sur les levures et les moisissures. Leur activité est cependant faible sur les spores bactériennes et nulle sur les virus, les mycobactéries et les prions(Haman, 2014).C'est la raison pour laquelle ils sont utilisés le plus souvent en combinaison avec d'autres types de conservateurs.

2.1.4. Synthèse chimique :

Les parabènes sont des composés dont la synthèse a débuté dans les années 1920. Ces molécules sont issues d'une synthèse chimique à partir de l'acide *p*-hydroxybenzoïque. Cet acide est lui même un dérivé phénolique de l'acide benzoïque issu d'une synthèse industrielle. L'APHB est l'isomère en para de l'acide salicylique, préparé par réaction de Kolbe-Schmitt en présence de dioxyde de carbone et de phénolate de potassium suivie d'une isomérisation thermique. Laposition en para est orientée par l'utilisation du sel de potassium, d'où l'utilisation depotasse (KOH) dans la synthèse industrielle.

La pression et la température influent sur les proportions finales d'APHB obtenues. Des conditions idéales de synthèse ont été déterminées pour une température de 140°C et sous 5 atm de pression (Lindsey,A.S.and Jeskey.H, 1957). Les parabènes résultent ensuite de l'estérification de l'acide *p*-hydroxybenzoïque.

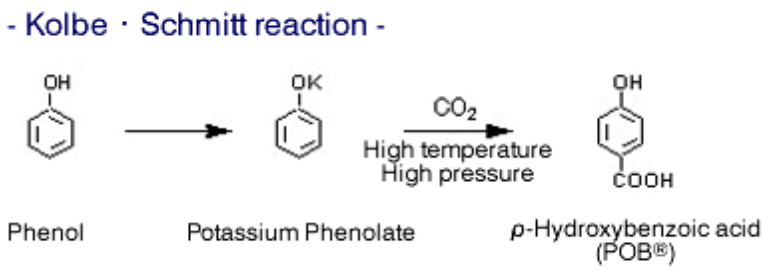


Figure 4: la réaction de Kolb Schmitt

2.1.5. Réglementation :

Le règlement 1907/2006 concernant l'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation dessubstances chimiques (REACH) oblige les producteurs et les importateurs de substances en quantité supérieure à une tonne à soumettre une demande d'enregistrement. Ces substances sont ensuite pour certaines évaluées, et éventuellement leur usage est ensuite soumis à autorisation.

Trois types de parabènes sont enregistrés au titre de REACH : éthyl-parabène, méthylparabène et propyl-parabène. Les quatre autres types de parabènes présentés dans cette fiche ont fait l'objet de pré-enregistrements.

Notons enfin qu'aucun des parabènes n'est présent sur les listes suivantes :

- Liste des substances extrêmement préoccupantes candidates en vue d'une autorisation
- Liste des substances nécessitant une autorisation
- Liste des restrictions(INERIS,2015in www.ineris.fr/substances/fr/).

2.1.6. Résistance:

Dans plusieurs études différentes, les auteurs attribuent la résistance à l'hydrolyse de l'ester des parabens en acide 4-hydroxybenzoïque par une estérase chez les souches *: Burkholderiacepacia*et *Enterobactercloacae*(CHAMAN 2003a). Récemment en 2006, DAVIN-REGLI et coll. ont rapporté *qu'Enterobaclergergoviae*montre une résistance intrinsèque aux parabens par un mécanisme d'efflux (DAVIN-REGLI et colt. 2006).

2.1.7. Utilisation et consommation :

En 2006 les parabènes se trouvaient dans plus de80 % de produits de beauté dont des shampooings, des crèmes hydratantes, des mousses à raser, des gels nettoyants, des lubrifiants, etc.…..Ils sont utilisés aussi comme additifs dans certains aliments et comme plastifiants pour certains polymères(Oishi,S, 2002).

2.1.7.1. Les aliments *:*

Les parabènes sont ajoutés aux aliments depuis 50 ans et leur emploi s'estprogressivement étendu. Les parabènes les plus utilisés mondialement sont leméthylparabene, l'éthylparaene et le propylparaben.

La plus forte incorporation de parabènes dans l'alimentation mondiale est retrouvée dans :

- Les gâteaux , pâtisseries, glaçage, garnitures : 0.03 à 0.06% avec un rapport méthyl/propyl de 1sur3 ,
- Les boissons sucrés, crèmes et pates : 0.1% avec une combinaison de parabènes,
- Les confitures, gelées, condiments : 0 .07% avec un rapport méthyl /oropyl de 2,
- Les olives, conserves : mélange de divers parabènes à 0 .1%,

Les sirops, à la concentration de 0.07%(Charline, c.et Julien,D, 2009).

2.1.7.2. Les cosmétiques :

Six parabènes sont fréquemment retrouvés dans les cosmétiques. Suivant la longueur croissante de leur chaine alkyle, ils apparaissent sur l'étiquette dans la déclaration officielle de la composition d'un cosmétique de la façon suivante : méthylpararben, éthylparaben, propylparaben, isopropylparaben, butylparaben, isobutylparaben.

Les parabènes, seuls ou en association avec d'autres conservateurs, sont utilisés dans tous types de cosmétiques qui peuvent être en contact avec la peau, les cheveux et les cuir chevelu, les lèvres, les muqueuses, les aisselles et les ongles.

L'incorporation de plus en plus fréquente des parabènes dans les cosmétiques est due à leur spectre d'activité important (bactéries, moisissures, levures et champignons) , à l'absence d'interaction avec les autres substances contenues dans les cosmétiques, à leur stabilité, leur biodégradabilité, leur acceptation par déférents organismes de régulation internationaux au regard de leur apriori faible de toxicité et, enfin, à leur faible cout (Soni,M.G.et all, 2005) .

2.1.7.3. Les médicaments :

Selon le DEPA (2013), les parabènes sont utilisés comme conservateurs dans le domaine pharmaceutique depuis les années 1920, plus souvent sous la forme d'une combinaison de parabènes que d'un type de parabène unique. Le propyl-parabène reste néanmoins le plus utilisé du fait de ses très bonnes performances antifongiques.

Les parabènes se retrouvent par ailleurs dans un grand nombre et une grande variété de médicaments. En 2011, le journal Le Monde a établi une liste de 400 médicaments en contenant15, parmi lesquels « de nombreux cosmétiques pour bébé ; des crèmes comme la Biafine ; de nombreux sirops contre la toux (Clarix, Codotussyl, Drill, Hexapneumine, Humex, Pectosan, Rhinathiol) ; des pansements gastriques (Maalox, Gaviscon) ; des traitements des troubles du transit intestinal (Motilium) ou des nausées et vomissements (Primpéran) ; les formes en suspension buvable de médicaments cardiovasculaires (Cozaar, Vastarel) ou antibiotiques (Josacine, Zinnat) ; des médicaments contre la douleur et la fièvre (formes génériques d'ibuprofène et de paracétamol) ; les traitements de l'asthénie(INERIS ,2015 in www .ineris/fr/substances/fr/).

2.1.8. Consommation des parabènes par l'homme :(Boutchiche.M, 2018)

En plus des produits alimentaires, les parabènes sont aussi consommés via les cosmétiques, les produits d'hygiène et les médicaments. Le tableau ci-dessous rassemble les données obtenues par la FDA.

Tableau VIII: Consommation totale moyenne des parabènes par l'homme, FDA USA 1987

pour une personne de 60 kg	Mg/j	Mg/kg/j
Somme des parabènes dans cosmétiques	50	0.833
Somme des parabènes dans alimentation	1	0.417
Somme des parabènes dans médicaments	25	0.160
Consommation totale moyenne des parabènes	76	0.260

2.1.9. Mécanisme d'action :

Le mode d'action présumé des parabens serait lié à la fixation de ces derniers à la surface de la membrane cytoplasmique des bactéries, ce qui provoquerait une altération et une destruction de cette membrane. On résulterait une fuite extra-cellulaire des électrolytes et des constituants vitaux.

Au niveau du cytoplasme, les parabens agissent en provoquant une perturbation de la réspiration cellulaire (effet inhibiteur sur la consommation d'oxygène),du transport desélectrons et des systems enzymatiques d'oxydation(Moudjded,A.et al, 2019).

AG :ArabinoGalactane
AT:Ac.Teichoique
C : Chitine
EP : Espace Périplasmique
FP : Force Protomotrice
G : Glycane
M :Mucopepetides
MC :MembraneCytoplasmique
ME :Membrane Externe
MP : Monoprotéine
O : Oligosaccharide
P :Porine

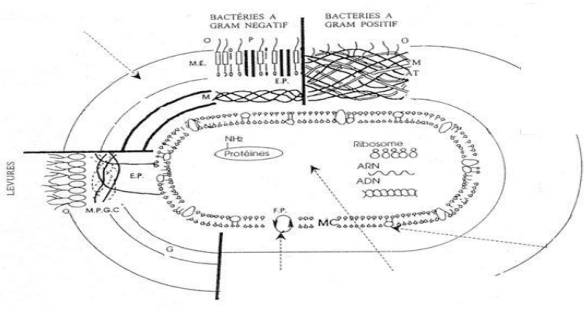


Figure 5: Sites d'action des parabènes sur les bactéries Gram(-) /Gram(+) et les levures (Toumi,N. Sellam,K, 2017)

2.1.10. Sécurité :

Bien que les parabens aient été utilisés comme agents de conservation dans les**injections** etles préparations **ophtalmiques**, ils sont maintenant considérés commeinappropriés pour ces types de formulationsen raison du potentiel irritant desparabens.Les parabens sont **non mutagènes,non neurotoxiques** et **non cancérigènes.**

La sensibilisation aux parabens est **rare** et ces composés ne présentent pas de niveauximportants de sensibilisation par photocontact ni de phototoxicité.

Une dermatite de contact retardée survient plus fréquemment lorsque les parabens sont utilisés par voie topique, mais elle a été rapportée après administration orale.

L'OMS a fixé une dose journalière totale acceptable estimée pour Méthyl, éthyl et propylparaben jusqu'à **10 mg / kg** de poids corporel(Moudjded,A.et al, 2019)

2.1.11. Etude de toxicité :

2.1.11.1. Toxycocénitique : (Cohen,Y.Gleitz,C, 24 juinb 2009)

Etudes des parabens après administration par voie orale et intraveineuse :

A. Absorption :

Dans une évaluation de 1972, le SCOGS (Select Commitee On GRAS/Generally Recognized As Safe Substances) rapporte que les MP et **PP,** après administration par voie orale,sont rapidement absorbés au niveau gastro-intestinal et métabolisés (études réalisées chez des rats, lapins, chiens, chats et humains).

B. Distribution :

Les parabènes une fois dans le sang se lient à l'albumine. Il n'existerait pas de phénomène d'accumulation chez l'homme suite à une administration orale chronique. C'est ce que confirme le SCOGS dans son rapport de 1972 pour le MP et PP. L'administration de doses de 1 g/kg/jour, par voie orale, pendant un an chez le chien, ne montre pas de phénomène d'accumulation.

Cependant, l'injection intraveineuse de métyl-, propyl-, éthyl et butylparaben (100 mg/kg/jour), en aigu chez le chien, met en évidence des esters dans le cerveau, la rate et le pancréas.

C. Métabolisation :

Chez le chien, il a été étudié le métabolisme des MP, EP, PP et BP après une administration par voie intraveineuse (IV) (50 mg/kg) et par voie orale (1 g/kg). La présence de métabolites a été détectée puis dosée dans le sang et dans les urines en fonction du temps.

Immédiatement après l'injection par voie IV, très peu de parabens sont retrouvés dans le sang, c'est l'acide p-hydroxybenzoïque qui est détecté dans le sang 6 h après l'injection et 24 **h** après l'ingestion orale.

D. Elimination :

Quelques années plus tard, plusieurs études ont été faites chez le lapin. Une dose unique de 0,4 ou 0,8 g/kg de MP a été administrée par voie orale à ces lapins. Une partie (39%) de la dose de MP administrée est excrétée sous forme d'acide p-hydroxybenzol"que libre et le reste apparaît sous forme de dérivés conjugués de la glycine (15%), del' acide glucuronique (ester 7% et éther 15%) et de l'acide sulfurique (10%).

L'excrétion urinaire des métabolites est rapide avec 86% d'élimination en 24 h. Cependant, 0,2 à 0,9% d'ester reste inchangé. Ces études montrent également que plus la longueur de la chaîne augmente, plus la vitesse d'excrétion urinaire de l'acide p-hydroxybenzol"que diminue.

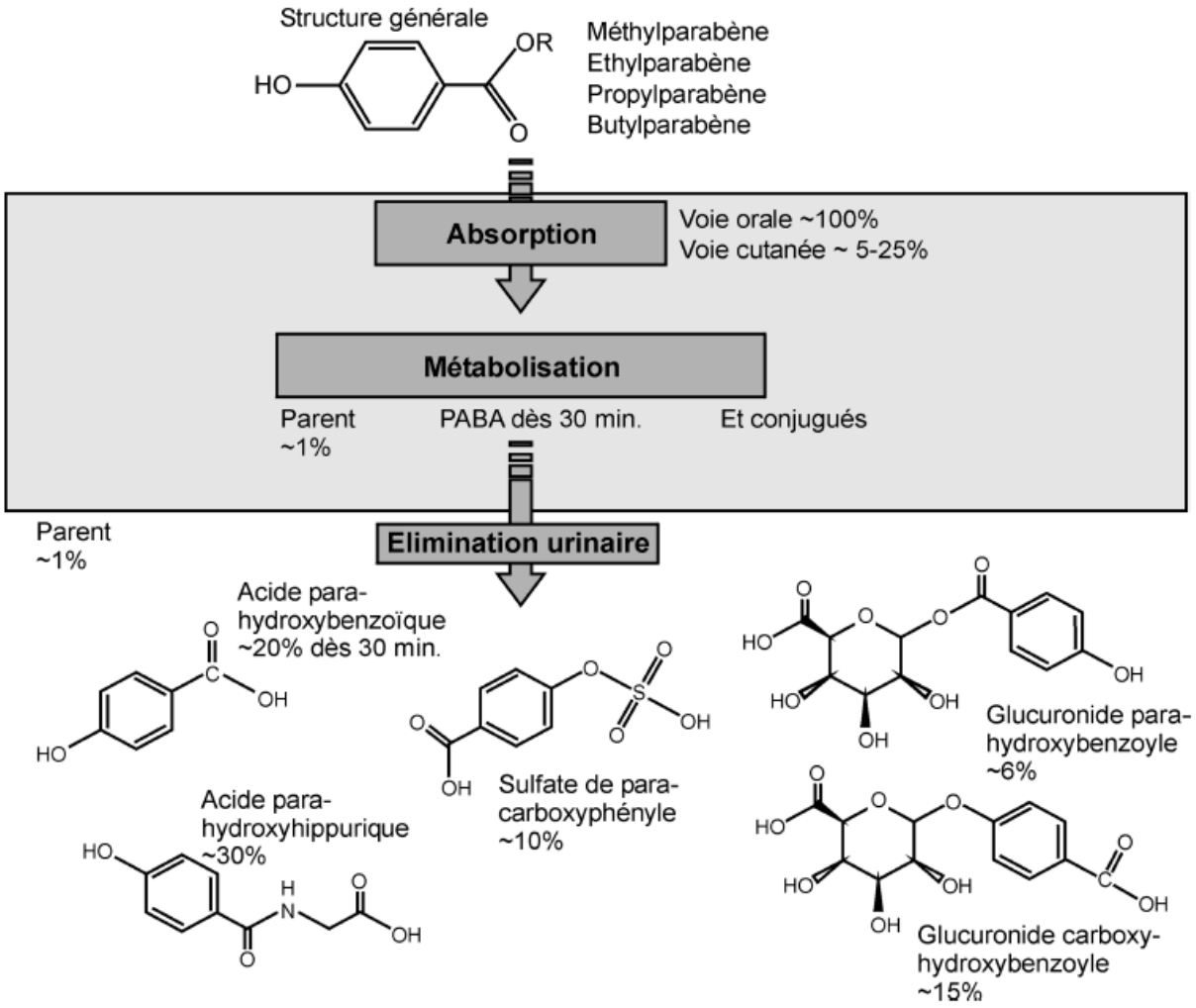
Il existe deux niveaux de détoxification des parabens, un premier avec une absorption rapide et une excrétion sous forme d'acide p-hydroxybenzol"que dans les urines et un second par une détoxification sous formes de glucurono-, sulfo- et glycino-conjugaison de l'acide phydroxybenzoïque.

Les principaux métabolites excrétés dans les urines sont par ordre décroissant: l'acide phydroxybenzoïque libre et ses dérivés avec la glycine, l'acide glucuronique et l'acide sulfurique.

le principal métabolite des parabens est l'acide phydroxybenzoique . Il est obtenu après hydrolyse des parabens par des estérases du foie et du rein.

L'élimination est faite en deux temps avec : dans un premier temps l'acide p-hydroxybenzoique seul, puis dans un deuxième temps des composés conjugués de celui-ci. Une quantité minime (moins de 1 %) de paraben est excrétée sous forme inchangée. Il semble ne pas y avoir de phénomène d'accumulation après une administration orale.

En revanche, les données concernant la voie intravefoeuse semblent montrer une accumulation des parabens dans certains organes chez le chien. Les données sur la distribution etl'accumulation étant insuffisantes, l 'Afssaps en 2005, a préconisé une réévaluation du devenir des parabens.



Légende :
Parent : molécules non modifiées
APHB : acide *para*-hydroxybenzoïque

Figure 6 : Schéma de toxicocinétique des parabènes établi d'après les tests sur l'animal (Haman,C, 2014)

2.1.11.2. Toxicodynamique :

A. Etude de toxicité aigue :

Les plus anciennes études de toxicité à court terme datent de 1956 et 1984(Yamamoto,H.et al, 2007). Il a été prouvé que la toxicité aiguë des parabènes diminuait avec l'augmentation de la longueur de la chaîne alkyle. En effet, le temps d'hydrolyse serait plus important pour les parabènes à longue chaîne.,les symptômes consécutifs à l'administration d'une importante dose de parabènes ou de leurs sels étaient une rapide ataxie, une dépression du système nerveux central et s'achevaient par une mort rapide. Néanmoins, le rétablissement après une dose non létale était rapide(Mathews,C.et al, 1956).

En 2007, (Yamamoto,H.et al, 2007),ont effectué des tests de toxicité aiguë sur des poissons âgés de 10 jours, les exposant à six concentrations de parabènes (BuP, i-BuP et BzP). Les concentrations létales pour 50% des poissons (DL50) de type Medaka (*Oryziaslatipes)* ont été de 2,9 mg/L pour le BuP, de4,6 mg/L pour l'iso-BuP et de 0,73 mg/L pour le BzP.

En 2010,(Barse,A.et al, 2010), ont établi une DL50 chez des poissons de type Carpe (*Cyprinuscarpio)* pour le MeP.

En 2011, (Yamamoto,H.et al, 2011) ont effectué des tests de toxicité aiguë (96 heures d'exposition) similaires à ceux de 2007. Cette fois, sept parabènes ont été testés sur la même espèce de poisson (Medaka). Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau VIIII: DL50 et DL100 mesurées par diverses études chez différents animaux

Type et référence	Voie	**Mep**	**Etp**	**Prp**	**I-Prp**	**Bup**	**I-Bup**	**Bzp**
DL50 chez *Oryziaslatips*(mg/L	Orale/cutané	63	14	4,9	4,5	3,1	4,6	0,73

)								
DL50 chez *Cyprinuscarpio* mg/L	Oral/cutané	120	-	-	-	-	-	-
DL50 chez la souris(mg/kg)	Orale	>8000	-	6322	-	13200	-	-
DL50 chez le rat (mg/kg)	Orale	2100	4300	>8000	-	-	-	-
DL100 chez le lapin (mg/kg)	Orale	3000	4000	6000	-	-	-	-
DL100 chez le chien (mg/kg)	Orale	3000	5000	4000	-	-	-	-

Les dernières études ont été réalisées afin de mesurer le potentiel toxique des parabènes en milieu aquatique. Aucune étude de toxicité aiguë n'a été recensée depuis 2004 sur des animaux plus physiologiquement proches de l'Homme.

B. Etudes de Toxicité chronique / Cancérogénicité :

Les études disponibles n'ont montré aucune toxicité liée à l'administration orale de parabènes à long terme.De plus, aucun indice de cancérogénicité des parabènes n'a été mis en évidence(Mathews,C.et al, 1956).

En 2007(Yamamoto,H.et al, 2007),En 2011(Yamamoto,H.et al, 2011)ont réalisé des études de toxicité subchronique sur de petits crustacés (*Daphnia magna*). Les deux études ont été conduites sur 21 jours et les concentrations à partir desquelles aucun effet n'est observé (DSEO) ont été soit mesurées soit évaluées. Les résultats sont présentés dans L'annexe 1 .

C. Effet sur la reproduction masculine :

Une étude de 2002 faisait exposée des rats juvénile à une alimentation contenant 10,100,ou 1000mg/kg de propyle parabène pendant une durée de 4 semaines ,qui a permet de mettre en évidence un effet sur la spermatogénèse sans altération de poids des organes reproducteurs ,une diminution de la production de spermatozoïdes (70%)

avec une diminution de la concentration sérique en testostérone(Toumi,N. Sellam,K, 2017) .

D. Effet sur la glande mammaire :

Une étude publiée en 2004 mettant en évidence la détection des parabènes dans les tissus mammaires, plusieurs biopsies de tumeurs de sein ont été observées, ce qui a permet de trouver des parabènes sous forme d'esters non métabolisés et à différentes concentrations(Toumi,N. Sellam,K, 2017).

E. Effet sur la peau :

Selon les données de la littérature et des données de pharmacovigilance, les parabens sont peu toxiques et bien tolérés . Ils provoqueraient rarement des dermatites de contact cosmétologiques .

Cependant, sur une peau lésée, l'application de produits contenant des parabens peut entraîner une sensibilisation. Le cas le plus rencontré concerne certains médicaments contenant des parabens sur les ulcères de jambe . Dans une étude effectuée sur 27 230 sujets atteints de dermatite, il a été observé que les patchs testés avec de 1 à 30% de parabens entraînaient une sensibilisation sur 2,2 % des personnes. Certains auteurs préconisent de ne pas utiliser le méthylparaben et le propylparaben dans des préparations destinées à être appliquées sur une peau altérée. Par contre, l'utilisation des parabens sur une peau non lésée est considérée comme sûre(COHEN , Y.GLEITZ , C, 2009).

F. Etude de toxicité :

Les données concernant les modifications histologiques dues aux parabènes sont assez récentes. En 2010, (Barse,A.et al, 2010),a observé des modification histologiques chez la carpe commune (*Cyprinuscarpio*) exposée au MeP pendant 26 jours par le biais de l'eau. A haute dose d'exposition (4.2 ppm, dose la plus importante testée dans cette étude), une dégénération histologique, des vacuolisations et des nécroses ont été observées dans le foie des poissons. Des modifications des tissus testiculaires de type fibrose et atrophie de l'épithélium germinal ont également été relevées. En conséquence, une diminution du nombre de spermatozoïdes a été remarquée.

G. Effet ostrogénique :(COHEN , Y.GLEITZ , C, 2009)

Plusieurs études *in vivo* et *in vitro,* concernant les parabens et leurs propriétés oestrogéniques, ont été publiées. Les conséquences de ces propriétés sur la santé humaine font largement débat.

- **Structure :**

Tout d'abord, la structure des parabens montre une certaine similitude avec celle du 17-bêta-oestradiol . La modélisation moléculaire indique que ce sont surtout les parabens à longue chaîne qui peuvent se fixer au domaine alpha des récepteurs oestrogéniques.

- **Les études in vitro :**

Les études *in vitro* ont montré que les parabens sont capables de se lier aux récepteurs oestrogéniques alpha et bêta, d'activer les gènes contrôlés par ce même récepteur, de stimuler la croissance cellulaire, et d'augmenter la sensibilité de la protéine du récepteur oestrogénique. Dans la majorité des études , il est démontré une activité oestrogénique des parabens.

Dans ces études, tous les parabens possèdent une affinité inférieure pour les récepteurs oestrogéniques par rapport à l'oestradiolnaturel . L'activité oestrogénique augmente avec la longueur de la chaîne alkyl et l'affinité pour le récepteur à l'oestradiol va dans le même sens: MP< EP<PP< BP.

Dans une étude de 2001, l'évaluation des propriétés à induire une réponse oestrogénique des différents parabens (MP, EP, PP, BP, isopropyl et isobutylparaben) a montré qu'il fallait des concentrations de parabens 105 à 107 plus importantes que celles du 17-bêta-oestradiol pour induire une prolifération similaire. Ce sont les isopropyl- et isobutylparaben qui ont donné une prolifération maximale, puis les parabens à chaînes longues et en dernier le MP. Plus la chaîne alkyl est longue et ramifiée, plus la réponse est forte. Le BP et l'isobutylparaben augmentent l'expression du gène du récepteur à la progestérone.

L'acide p-hydroxybenzoïque, le métabolite commun, apparaît comme inactif dans plusieurs études *in vitro* . Cependant, une étude de 2005, comparant l'activité oestrogénique intrinsèque de cette molécule par rapport au MP, présente une activité oestrogénique similaire à celle du MP en terme de liaison au récepteur. Mais, l'activité est plus basse quant à la prolifération cellulaire. Les auteurs concluent que le retrait du

groupe ester lors du métabolisme des parabens n'annule pas complètement l'activité oestrogénique de ceux-ci.On peut retenir, d'après ces études, que:

1. plus la chaîne (alkyl) est longue et ramifiée, plus il y a une augmentation de l'effetoestrogénique.Cependant cette réponseest très inférieureà celle obtenueavec l'oestradiol.
2. l'acide p-hydroxybenzoïque présente une activité oestrogénique très faible.
3. le BP et l'isobutylparaben présenteraient aussi une activité sur l'expression du gène du

récepteur de la progestérone.

- **Les études in vivo :**

Les études *in vivo* effectuées sur des rongeurs montrent une activité utérotrophe de certainsparabens, par une augmentation du poids et des changements histologiques de l'utérus, reflétant une activité oestrogénique. Sur trente études concernant l'ensemble des parabens, par voie orale et sous-cutanée, sept d'entre elles ne concluent pas à cette activité .

Pour la majorité des études, le BP et l'isobutylparaben présentent une activité utérotrophe après une administration sous-cutanée. Ainsi, le butylparaben, administré par voie orale à des rats, est inactif, tandis que celui-ci administré par voie sous-cutanée chez ces mêmes rats, donne une réponse oestrogénique significative. Ces résultats sont identiques lors de l'administration d'isobutylparaben . Malgré tout, ces effets restent très en dessous des effets obtenus avec l' oestradiol naturel.

Concernant les MP, EP et PP, les résultats sont contradictoires : la moitié des études concluent à un effet positif . Ainsi, de même que pour les études *in vitro,* l'isobutyl- et le butylparaben semblent plus puissants que le propyl-, l'éthyl et le méthylparaben.

Quant à l'acide p-hydroxybenzoïque, les données sont aussi contradictoires. Les études effectuées sur des souris donnent une réponse faible, tandis que les études faites sur des rats ne donnent pas de réponse.

En revanche, toutes les études s'accordent sur une non réponse des parabènes par voie orale.

Les études *in vitro* et *in vivo* montrent dans l'ensemble une activité oestrogénique des

différentsparabens. L'affinité pour le récepteur ainsi que la possibilité de donner une réponse oestrogénique sont croissantes avec la longueur de la chaîne alkyl. Ainsi, dans l'ordre croissant d'un effet oestrogénique, nous retrouvons le MP, EP, PP, BP puis l'isopropylparabenetl'isobutylparaben. Cependant, cette activité oestrogénique est 1000 à 100 000 fois inférieure à celle du 17-bêta-oestradiol naturel.

Le caractère oestrogénique doit être étudié chez l'homme plus spécifiquement. En effet, ces études nous montrent que, le métabolisme et l'élimination des parabens dépendent de la dose administrée, de la voie et de l'espèce étudiée.

2.2. Méthylparabene :

2.2.1. Description :

Le méthylparabene est un ester 4 –hydroxybenzoate résultant de la condensation formelle du groupe carboxy de l'acide 4-hydroxybenzoique avec le méthanol.

C'est le conservateur antimicrobien le plus utilisé en cosmétique. Il se produit naturellement dans plusieurs fruits, en particulier dans les myrtilles. Il a un rôle de métabolite végétal, de conservateur alimentaire antimicrobien, d'agent neuroprotecteur et d'antifongique. Il est inodore, petits cristaux incolores ou poudre cristalline blanche(http:/pubchem . NCBI.nlm.nih .gov).

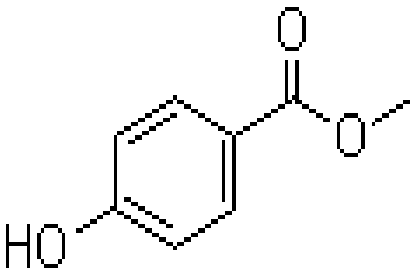


Figure 7: structure chimique d'un parahydroxybenzoate de méthyl

2.2.2.Synonymes :(http:/pubchem . NCBI.nlm.nih .gov)

- Hydroxybenzoate de méthyl
- Méthylparabene
- P-hydroxybenzoate de méthyl

- Nipagine
- Parahydroxybenzoate de méthyl
- Maseptol
- Ester méthylique d'acide p-hydroxybenzoique
- E218

2.2.3. Noms communs :

- BP: Hydroxybenzoate de méthyle
- JP: Parahydroxybenzoate de méthyle
- PhEur: Parahydroxybenzoate de méthyle
- USP-NF: Methylparaben

2.2.4.Incompatibilité :

L'activité antimicrobienne du méthyle parabène et des autres parabènes est considérablement réduite en présence de tensioactifs non ioniques, Comme le polysorbate 80, à la suite de la micellisation.

Cependant, ils ont montré que le propylène glycol (10%) potentialisait l'activité antimicrobienne des parabènes en présence d'agents tensioactifs non ioniques et empêche l'interaction entre le méthyle parabènes le polysorbate 80.

D'autres incompatibilités ont été rapportées avec d'autres substances, comme la bentonite, trisilicate de magnésium, talc, gomme adragante, alginate de sodium, les huiles essentielles, le sorbitol, et l'atropine, Il réagit aussi avec divers sucres et alcools de sucre apparentés.

L'absorption de méthyle parabène par des matières plastiques a également été rapportée; La quantité absorbée dépend du type de matière plastique et du véhicule. Ils ont prétendu que les systèmes à faible densité et à haute densité comme les bouteilles en polyéthylène n'absorbent pas le méthyle parabène. Il est décoloré en présence de

fer et est soumis à une hydrolyse par des alcalis faibles et des acides forts(Toumi,N. Sellam,K, 2017).

2.2.5.Utilisation :

Différentes concentrations de méthyle parabène dans les préparations pharmaceutiques sont mentionnées dans le tableau ci après

Tableau X: La quantité admissible du méthyle parabène dans les préparations pharmaceutiques (Toumi,N. Sellam,K, 2017).

Utilisation	Concentration %
Préparations topiques	0.02-0.3
Injections IM, IV, SC	0.065-0.25
Solutions pour inhalation	0.025-0.07
Injections intradermique	0.10
Solutions nasales	0.033
Préparations vaginales	0.1-0.18
Préparations rectales	0.1-0.18
Préparation ophtalmiques	0. 015-0.2

2.3.Propylparabene

2.3.1.Description :

Le propylparabene est un solide cristallin ou prisme blanc. Il est inodore ou a une légère odeur. Il est très soluble dans l'eau.

Le propylparabene est utilisé comme conservateur dans les aliments, les emballages alimentaires, les cosmétiques, les parfums, et les produits pharmaceutiques(http:/pubchem .NCBI.nlm.nih .gov).

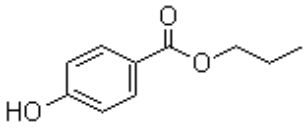


Figure 8: structure chimique de propylparabene

2.3.2.Synonymes :(Moudjded,A.et al, 2019)

- 4-hydroxybenzoate de propyle
- Propylparaben
- Ester propylique de l'acide 4-hydroxybenzoique
- P-hydroxybenzoate de propyle
- Nipazol
- Nipasol
- Parahydroxybenzoate de propyle
- E216

2.3.3. Noms communs :

- BP: Hydroxybenzoate de propyle sodique
- PhEur: Propylparahydroxybenzoate de sodium
- USP-NF: propylparabène sodique

2.3.4. Incompatibilité :

L'activité du propyle parabène peut être affectée par la présence d'autres excipients ou ingrédients actifs, tels que l'atropine, les huiles essentielles, fer, trisilicate de magnésium, talc, polysorbate80 et d'autres tensioactifs non ioniques, le sorbitol, les alcalins faibles et les acides forts(Toumi,N. Sellam,K, 2017).

2.3.5. Utilisation :

Différentes concentrations de propyle parabène dans les préparations pharmaceutiques sont mentionnées dans le tableau ci après

Tableau XI : La quantité admissible du propyle parabène dans les préparations pharmaceutiques (Toumi,N. Sellam,K, 2017)

Utilisation	**Concentration%**
Injections IM, IV, SC	0.005-0.2
Solutions pour inhalation	0.015
Injections intradermiques	0.02-0.26
Suspensions et solutions orales	0.01-0.2
Préparations ophtalmiques	0.005-0.01
Solutions nasales	0.017
Préparations rectales	0.02-0.1
Préparations topiques	0.01-0.6
Préparations vaginales	0.02-0.1

- **utilisations thérapeutiques :**

Les auteures ont étudiés l'effet prophylactique du propylparabene sur l'alvéolite sicca dolorosa(TSA). Chacun des 45 patients a reçu trois comprimés contenant 33mg de propylparabene ou un placebo dans l'alvéole immédiatement après le retrait d'une troisième molaire mandibulaire.

Aucun des patients recevant du propylparabene n'a développé de TSA , contrairement à 24% du groupe placebo.

L'effet prophylactique du propylparabene était hautement significatif et aucun effet secondaire du traitement n'a été signalé(http:/pubchem . NCBI.nlm.nih .gov).

4.1.Sirop Ximalex

4.1.1.Définition :

Les sirops sont des préparations aqueuses contenant une forte proportion de sucres ce qui leur donne leur consistance et assure leur conservation sous certaines conditions. La forte proportion de sucre a pour rôle de masquer la saveur désagréable des principes actifs et d'assurer la conservation .

4.1.2.Préparation :

Ils son préparés généralement avec du sucre qui a une concentration minimale de 45% m/m ; à une concentration voisine de 65% m/m (densité de l'ordre de 1.32 à 20 °C), le Saccharose l'assure, sous certaines conditions, une protection anti microbienne. L'orsqu' il est porté à ébullition, le sucre subit une décomposition ou interversion. Le saccharose se décompose en glucose et lévulose. La lumière, la présence d'acidité, la pulvérisation peuvent également entrainer la décomposition du saccharose (Ziane Bouziane, F.2015)

4.1.3.Procédés de préparation :

- **Dissolution à chaud :** La dissolution est facile et rapide ; obtenue par chauffage : en remuant de temps à autre : le sirop prend une discrète coloration jaunâtre et contient de petite quantité de sucre invertie. Industriellement ; la dissolution est obtenue très rapidement par le passage de vapeur d'eau sous légère pression dans des cuves de grande contenance renferment le sucre à dissoudre. Cette dissolution entrainetoujoursunelégèrealtération .
- **Dissolution à froid :** Elle est préférable car elle évite tous risque d'altération du sucre par la chaleur ; mais elle est difficile et lent. Elle est réalisée par contacte prolongé du solvant avec le sucre ; dans un récipient en agitant sans cesse. Elle peut s'effectuer de façon continue dans un appareil spécial (Saccharolyseur) .
- **Cuisson des sirops :** Elle consiste à chauffer le sirop dans un matériel convenable ; pour faciliter l'évaporation d'eau en excès tous en surveillant la densité. Cette cuisson à pour but d'amener le sirop à la densité exactement désirée. Après dissolution du sucre d'une part et de concentrer convenablement le sirop trés dilué d'autre part .
- **Classification du sirop :** Cette méthode permet de rendre le sirop limpide en éliminant les impuretés. La pharmacopée préconise une classification avec de la pate à papier pour la méthode à chaude. Du blanc d'oeuf pour celle à froid ; le

sirop et l'albumine sont chauffés ; la coagulation du blanc d'oeuf emprisonne les impuretés ; puis il y a une filtration .

4.1.4. Altération et conservation:

Il est conseillé de mettre les sirops dans des flacons hermétiques dans des endroits frais malgré leur forte concentration en sucre ; ils se conservent plus en moin bien. L'altération peut être du à une très faible ou trop forte concentration de sucre.

Tableau XII: Altération des sirops

Cristallisation	**Fermentation**
Quand le sirop est trop concentré en Saccharose, il faut ajouter de l'eau pour réajuster la densité.	Quand un sirop est trop dilué c'est-à-dire pas assez concentré ; il se conserve mal ; il permet la prolifération des levures et moisissures. Il peut se produire une fermentation alcoolique.

4.1.5. Présentation du sirop:

Classe pharmaco thérapeutique : Un sirop contenant une enzyme a effet anti inflammatoire

Forme et présentation: Sirop à 200 U CEIP/ml, des flacons de 125 ml, 100 ml et 200 ml

Indication thérapeutique : Ce médicament est indiqué dans les maux de gorge peu intenses est en cas de Traitement d'appoint des états congestifs de l'oropharynx, Manifestation inflammatoire et hyper sécrétoire des voies respiratoires chez l'adulte et l'enfant, Bronchites, pneumopathies aigues, Manifestation respiratoire des maladies infectieuses.

Contre indication : Allergie a alpha amylase ou l'un des composants de sirop.

Effets indésirables : Quelque très rare érQuption de type urticaire. En raison de présence d'alpha-amylase et de jaune orangé (E110) rare réaction d'allure allergique, généralement cutané, en particulier urticaire et oedèmeQUINCKE .

Précaution d'emploi : En cas d'apparition d'autres symptômes (maux de gorge importants, céphalées, nausées, vomissement ….) ou de fièvre associe, la conduite à tenir doit être réévalué. Ce médicament ne doit pas être utilisé de façon prolongée sans avis médicale.

Posologie et mode d'administration :

a. **posologie :**

Adulte : 1 cuillère a soupe (15 ml), 3 fois par jour ,

Enfant entre 3 et 12 ans (15 kg) :1 cuillère a dessert (10 ml), 3 fois par jour.

Nourrisson et enfant de 6 mois a 3 ans (7 kg a 15 kg) :1 cuillère a café (5 ml3), fois par jour.

b. **Mode d'administration :** Voie orale, autiliser selon prescription médicale

- ✓ **Conservation :** A conserver a une température inferieure a + 25C° et a l'abri de la lumière et de la chaleur
- ✓ **Composition :** Ce sirop renferme Un seul principe actif :
- ✓ **Sept excipients suivants :**
  - **a.** Saccharose
  - **b.** Para-hydroxybenzoate de méthyle
  - **c.** Para-hydroxybenzoat de propyle
  - **d.** Glycérole
  - **e.** Arome de mandarine
  - **f.** Colorant jaune FCS(E110)
  - **g.** Eau purifié(Ziane bouziane F , lachemi ben bokreta I, 2015)

4.2. Alpha amylase : C'est une enzyme dont le rôle est l'hydrolyse de l'amidon et d'autres glucides complexes en sucres plus simples, comme le maltose. elle a un rôle majeur dans la digestion et la nutrition en prise directe avec le milieu environnant ; c'est donc un modèle de choix dans l'étude de l'évolution moléculaire et de l'adaptation. Cette enzyme est répondue dans l'ensemble du monde vivant, bactéries, plantes, champignons, animaux …, mais présente de grandes différences de séquence entre

ces différents règnes(Nicola p, 2005)**.**Le tableau 13 montreles différents constituants du sirop Ximalex

Tableau XIII:Les constituants du sirop XIMALEX .

Matières premières	**Fonction**
alpha amylase	Principe actif
Saccharose (excipient)	Agent sucrant
Glycérol	Conservateur
Parahydroxy benzoate de methyle (excipient)	Conservateur
Parahydroxybenzoatedepropyle (excipent)	Conservateur
Colorant jaune FCF(E110)	Agent colorants
Eau purifiée (excipient)	Solvant
Arome de mandarine	Aromatisant, masqué le gout

- **Nomenclature :**

- Dénomination commune internationale : alpha – amylase

- Dénomination chimique : alpha –amylase (glucose α_1.4 _ glucose)

- **Description :**

  - Aspect physique : liquide limpide de couleur brunâtre.

- **Formuledéveloppée**

La figure présente un schéma simplifié de la structure d'alpha amylase

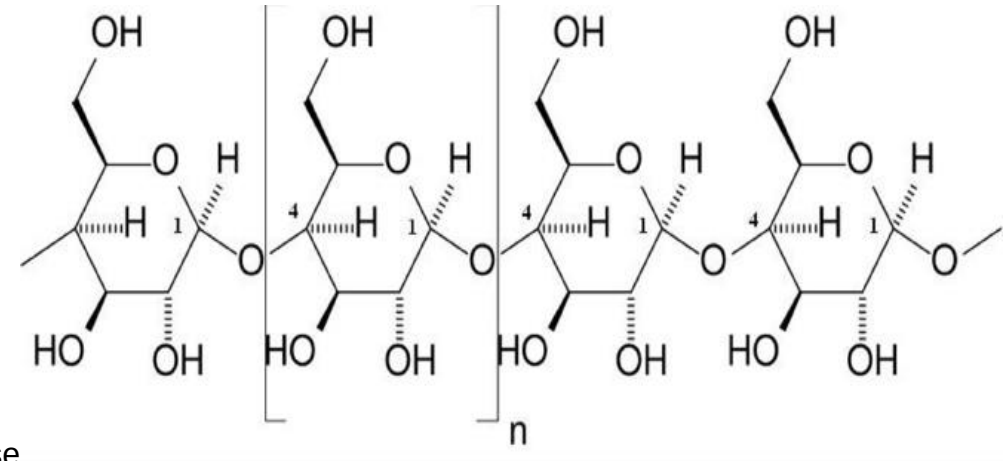


Figure 9 : structure d'alpha amylase

Chapitre 3 :
Matériel et méthodes

3. Matériel et méthodes :

3.1. Matériel biologique : Les souches recherchées sont celles recommandées par la pharmacopée Européenne 8.0 (2016) qui sont :

- Germes aérobies viables totaux (incubés en aérobiose)
- Levures et moisissures
- *Eschérichia coli*
- *Staphylococcus aureus*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- salmonelles

3.2. Le produit: Il s'agit du produit anti-inflammatoire (XIMALEX®) qu'est un sirop liquide à différentes concentrations en conservateurs en flacon de 100ml.

3.3. Equipements : dans notre travail on a utilisé la chromatographie à haute performance phase liquide(HPLC) pour faire le dosage des parabènes et la spectrophotométrie (UV-VIS)pour faire le dosage de principe actif (alpha amylase).
Voir annexe 03

3.4. Milieu de culture : les milieux de culture utilisés sont :

-Milieu liquide aux peptones de soja : milieu d'enrichissement.

-milieu gélosé aux peptones de caséine et de soja : permet la recherche des germes aérobies totaux.

-Milieu sabouraud dextrosé-gélose : pour chercher des levures et de moisissures.

-Milieu liquide de MAC CONKEY : milieu sélectif d'*E.coli.*

-milieu de rappaport et XLD : permet la recherche des salmonelles.

-Milieu CAB : permet la recherche de *pseudomoas aérogénosa.*

-Milieu de CHAPMAN : permet la recherche de *staphylococcus aureus.*

Voir en annexe 05

3.5. Méthodes de travail : dont le but est de rechercher des souches indicatrices. En suivant le protocole proposé par un dossier pharmaceutiques .

3.5.1. préparation de sirop (Ximalex®) :

Les sirops Ximalex® ont été préparés à l'échelle de laboratoire selon la méthode de fabrication citée ci-dessous.

Quatre concentrations différentes de méthyle et propyle parabènes ont été retenues pour notre étude plus celles de sirop de production du site Saidal.

La concentration du principe actif dans les sirops préparés reste intacte.

La formule et les quantités pour un lot de préparation de 500ml de sirop ximalex sont données dans le tableau suivant :

Matières	Quantité g
Alpha amylase	6,155
Saccharose	1280
Parahydroxybenzoate de méthyl	0,47
Parahydroxybenzoate de propyl	0,15
Glycérol	38,45
Arome de mandarine	2
Colorant jaune FCS	0,0075
Eau distillée	500

Tableau XV: Etapes de fabrication du sirop

Chronologie des opérations	**Étapes**	**Contrôles en cours**
Préparation et filtration du sirop simple	0	Matériel, pesée, nettoyage, préparation, et atmosphère
Ajout des conservateurs	1	T° à 60-70°C. Contrôle de l'agitation Contrôle de la dissolution. Contrôle de la vitesse et la durée.
dissolution du principe actif	2	T° à 80°C puis à 100°C jusqu'à ébullition Contrôle de l'agitation Contrôle de la dissolution. Contrôle de la vitesse et de la durée.
Aromatisation et coloration	3	T° (30°C) Contrôle de l'agitation Contrôle de la dissolution. Contrôle de la vitesse et la durée. Contrôle du pH.
Filtration finale.	4	Contrôle de l'agitation (20 min).
Répartition en unité de prise.	5	Contrôle de la clarté, Contrôle du volume du réacteur, du pH & du titre en PA.
Conditionnement	6	Contrôle de conformité.

3.5.2. Préparation de sirop simple :

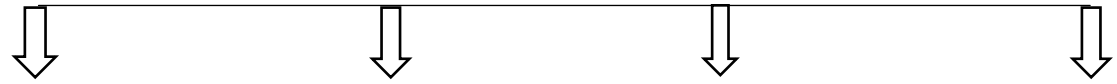
1er étape : reconstitution

- Sucre : saccharose
- Eau distillée

2eme étape : ajout des additifs et répartition

- Alpha-amylase(6,155gr)
- Glycerol(38,45gr)
- Colorant jaune 0,0075gr)

diviser la solution en quatre flacons de 500ml



Préparation 1	Préparation 2	Préparation3	Préparation 4
Méthyl 100% (0,47gr) Propyl 100% (0,15gr)	Méthyl 50%(0,235gr) Propyl 100% (0,15gr)	Méthyl 0%(0gr) Propyl 100% (0,15gr)	propyl 0%(0gr) méthyl 100% (0,47 gr)

Voire annexe 04

3.6. 3ième étape : Contrôle physico-chimique :

3.6.1 But : ce mode opératoire a pour but de décrire la méthode d'analyse de produit XIMALE® à 200UCEIP / ml. qui permet de déterminer les teneures en principe actif(alpha-amylase) et en parabènes.

3.6.2. Domaine d'application :

Ce mode opératoire s'applique au mélange final du produit XIMALE® à 200UCEIP / ml.

3.6.3. Méthode :

3.6.3.1. Dose du principe actif : Le dosage est effectué au spectrophotométrie à longueur d'onde maximale de 590nm Titre par spectrophotomètre UV-VIS

Limite : MIN 260 UCEIP/ml, en alpha amylase.

A. Préparation de la solution standard :

- Peser 150mg de standard de référence amidon dans une fiole jaugée de 100ml.
- Ajoute 50ml de le tampon PH 6,3 puis agiter jusqu'à dissolution.
- Laisser refroidir et compléter au volume avec la solution tampon PH=6,3

B. Préparation de solution échantillon : compose des étapes suivantes:

- Peser 1,9 g d'échantillon dans une fiole jaugée de 50ml.
- Faire dissoudre puis compléter jusqu'au trait jaugée de 50ml.
- Prélever 1ml de la solution précédente dans une fiole jauge de 50ml,
- compléter jusqu'au trait jauge au volume avec la même solution.

C. Méthode d'analyse : dans des tube à numérotés I, II, III, introduire les quantités suivant :

N° tube à essai	(I) STD	(II) ECH	(III) Blond
Substrat (amidon)	0,7ml	1ml	/
Solution tampon pH=6,3	0,8ml	/	1,5ml

- Palace les tubes à dans un bain marie à 37°C
- A temps T0, introduire 0,5mlde la solution finale échantillon dans le tube II.
- Après 15 minutes dans le bain marie, retirer les tube et introduit immédiatement 1,5ml d'acide sulfurique 0,2N dans chacun d'eux simultanément 10ml d'eau distillée et 0,5ml de solution d'acide 0,002N
- Ensuite, faire les ajouts suivants :

0,5ml du tube (I) ⟶ dans le tube 1

0,5ml du tube (II) ⟶ dans le tube 2

0,5ml du tube (III) ⟶ dans le tube 3

-Bien agiter

-Lire les densités optiques au spectrophotomètre UV VIS dans l'intervalle (540-590) nm.

-Le maximum d'absorption est trouvé à l'aide du tube à éssaie1

-L'auto zéro sera réglé en utilisant la solution du tube 3

- la teneur en alpha amylase par ml de sirops est donné par la formule suivante :

$$Titre(UCEiP/ml) = \left[5 - \frac{A2 \times 3{,}5}{A1}\right] \times \frac{16667 \times d}{P(e) \times 100}$$

A1 : absorbance du tube à essai1.

A2 : absorbance du tube à essai 2

P : pesée échantillon en gr

d : densité de l'échantillon

3.6.3.2. Dosage de parabène : en utilisant HPLC

- **Dosage parahydroxybenzoate de méthyl :** doit être dans l'intervalle **(0,87-1,01)mg /ml.**
- **Dosage parahydroxybenzoate de propyle :** doit être dans l'intervalle**(0,28-0,32)mg/ml.**

A. Conditions chromatographiques :

- Phase mobile : [acétonitrile/solution tampon acétate] : [30 / 70] à pH= 4,5
- Solution tampon acétate pH =4,5 : dissoudre 377 mg d'acétate de soduim trihydraté , ajouter 4,1 ml de la dilution d'acide acétique [12 g d'acide pur dans 100ml d'eau] et compléter avec de l'eau jusqu'à un volume final de 1000 ml , agiter et filtrer puis dégazifier .

L'analyse chromatographique est réalisé dans les conditions suivants :

- Débit : 1,0ml/min.
- Longueur d'ondedétection: 254 nm.
- Volume injection : 20ul .

- Température de la colonne : 25°C.
- **Colonne licrosorbRp(C18) : 18,5um, (125X4) mm**

B. préparation de la solution standard :

- Peser 400 mg de parahydroxybenzoate de méthyle dans une fiole jaugée de 100ml, dissoudre dans l'éthanol et compléter jusqu' au trait jaugé avec le même solvant(solution a)
- Peser 80 mg de parahydroxybenzoate de propyle dans une fiole jaugéé de 100ml, dissoudre dans l'éthanol et compléter jusqu' au trait jaugé avec le même solvant (solution b)
- Prélever 2,0 ml de chacune de solution (a) et (b) dans une fiole jaugée de 100ml et compléter avec l'éthanol jusqu' au trait jaugé(solution c) .
- Prélever 5,0 ml de la solution précédente dans une fiole jaugée de 50ml et compléter avec la phase mobile jusqu' au trait jaugé.

C.préparation de la solution échantillon :

- Prélever 4,0ml du mélange final dans une fiole jaugée de 50ml, compléter jusqu' au trait jaugé avec l'éthanol.
- Agiter la solution pendant 5 min en utilisant l'ultrason
- Centrifuger (vitesse =1000 tours / minute pendant 15 minutes) une partie de la solution, prélever 5,0ml du surnagent dans une fiole jaugée de 50ml et compléter avec la phase mobile jusqu' au trait jaugé.
- Injecter les solutions finales du standard et échantillon et lire les aires.

D. Formules de calcul : après apparition de deux pic

Le pic à temps de rétention court ⟶ 1^{ier} pic(correspond à parahydroxybenzoate de méthyle).

Le pic à temps de rétention plus grand ⟶ 2eme pic(correspond à parahydroxybenzoate de propyle) .

Calcule le titre de parahydroxybenzoate de méthylen en mg / ml selon la formulation suivent :

$$Titre\ (mg/ml) = \frac{S_e \times C_{ST}}{S_{ST} \times C_e}$$

S_{ST} : Surface de la solution standard de référence.

S_e : Surface de la solution échantillon.

C_{ST} : Concentration de la solution standard de référence.

C_e : Concentration de la solution échantillon.

- Calcule le titre de parahydroxybenzoate de propyle en mg / ml selon formulation suivent :

$$Titre\ (mg/ml) = \frac{S_e \times C_{ST}}{S_{ST} \times C_e}$$

S_{ST} : Surface de la solution standard de référence.

S_e: Surface de la solution échantillon.

C_{ST} : Concentration de la solution standard de référence.

C_e : Concentration de la solution échantillon.

NB : les pics sont respectivement.

3.6.3.3. **PH :** doit être dans l'intervalle : **[5-7]**

3.6.3.4. Densité *:* doit être dans l'intervalle : 1,08-1,23

3.7. Contrôle de la qualité microbiologique des sirops préparés (produit fini):

3.7.1. But : ce mode opératoire à destiné au contrôle de qualité de produits premiers et produits finis administrés par voie orale durant la conservation en suivant les normes imposées par la pharmacopée 9.D.

3.7.2. Méthode d'analyse microbiologique :

A. Préparation d'échantillon (solution A) :

Désinfecter l'échantillon avec de l'alcool éthylique, puis l'exposer à la lumière UV sous une hotte à flux laminaire pendant 20 minutes.

Préparation 10ml de sirop, ajouter à 100ml de solution tampon pH = 7 et ajuster le pH si nécessaire

B. Dénombrement des germes aérobies totaux et levures et moisissures (DGAT-DMLT):

Technique de filtration sur membrane :

- Filtrer 10ml de la solution A en deux fois à travers deux filtres membranes de porosité0.45µsteriles.
- Laver chaque filtre avec 100ml de solution tampon peptoné au chlorure de sodium pH= 7.
- Mettre un filtre dans une boite de Pétri contenant du milieu gélosé aux peptones de caséine et de soja(DGAT).
- Mettre le deuxième filtre dans une boite contenant du milieu Sabouraud dextrosé Gélosé(DMLT).

  Incuber la première boite à une température entre 30-35C° pendant 5jours et la deuxième à 20-25°C pendant 5-7jours.
- Calculer le nombre d'UFC par millilitre ou par gramme de produit**.**
  - **la recherche de germes en suivant le protocole proposé par groupement SAIDAL :**

-Recherche *Escherichia coli :*

- Prélever 10ml de la solution A et ensemencer 90 ml de liquide aux peptones de caséine et de soja.
- Mélanger et incuber à 30-35C° pendant 18-24 heures.
- Agiter le récipient, puis transférer1ml du milieu liquide aux peptones de caséine et de soja dans 100ml de milieu liquide de Mac Conkey.
- Incuber à 42-44C° pendant 24 à 48 heures.

- Repiquer sur milieu gélosé MCA.
- Incuber à 30-35C° pendant 18 à 72 heures.

Interpretation:

- Le produit satisfait à l'essai si aucune colonie n'est observée.
- La croissance de colonies indique la présence possible d'*Escherichia coli*.
- Confirmer par un test d'identification API20E.

- Recherche de SALMONELLES :

- Dissoudre 10g ou 10ml de produit dans 90ml de milieu liquide aux peptones de caséine et de soja.
- Mélanger et incuber à 30-35C° pendant 18-24heures.
- Transférer 0.1ml du milieu liquide aux peptones de caséine et de soja dans 10ml de milieu liquide Rappaport vassiliadis.
- Incuber à 30-35C°pendant 18-24heures.
- Repiquer sur milieu XLD.
- Incuber à 30-35C° pendant 18-48heures.

Interprétation:

- Le produit satisfait à l'essai si aucune colonie rouge avec ou sans centre noir n'est observée.
- La croissance de colonies rouges doit être confirmée par des essais d'identification.

-Recherche de Pseudomonas *aéruginosa*:

- Prélever 10ml de la solution A et ensemencer 90ml de milieu liquide aux peptones de caséine et de soja.
- Agiter le récipient et incuber à 30-35C° pendant 18-24heures.
- Repiquer sur du milieu CAB et incuber à 30-35C° pendant 18-72heures.

Interprétation :

- Le produit satisfait à l'essai si aucune colonie n'est observée.
- S'il y'a présence de colonies, confirmer par des essais d'identification.

-Recherche de *Staphylococcus aureus*:

- Prélever 10ml de la solution A et ensemencer 90ml aux peptones de caséine et de soja.
- Agiter le récipient et incuber à 30-35C° pendant 18 à 24 heures.

- Repiquer sur du milieu mannitol-sel et incuber à 30-35C° pendant 18-72 heures.

Interprétation :

- Le produit satisfait à l'essai si aucune colonie n'est observée.
- La croissance de colonies jaunes /blanches entourées d'une zone jaune indique la présence Possible de *Staphylococcus aureus* qui doit être confirmé par des tests d'identification(galerie API STAPH).

Résultats et discussion

Résultats et discussion :

A J0 :

- **Calculer le dosage des parabènes par HPLC :**

Préparation à 100%de méthyle :

p (std)Méthyle= 200mg P = 99,72%

p (st) Propyle= 40,6mg P = 99,55%

Air (std) méthyle = 588192,9 Air (std) propyle =9504,4

Air (ech) méthyle= 562217 Air (ech)propyle = 134937,5

$$Tm = \frac{562217}{588192,9} \times \frac{200}{50} \times \frac{1}{50} \times \frac{2}{20} \times \frac{50}{4} \times \frac{20}{2} \times 0,9972 = 0,953 mg/ml$$

On a suivi les mêmes calculs pour les trois autres préparations,(tableau 3.1)

- **Calculer le dosage d'alpha- amylase :**

DO (std) : 0,07235

DO (ech) : 0,02845

$$T = \left[5 - \frac{0,2845 \times 3,5}{0,7235}\right] \times \frac{1667 \times 1,23737}{1,9022 \times 100} = 392,87\ UCEiP/ml$$

Tableau XVI : la densité et pH de quatre préparations

	Préparations 1	Préparations 2	Préparations 3	Préparations 4
Ph	5,80	6,58	6,56	5,36
Densité	1,23737	1,25032	1,2523	1,24667

On a suivi les mêmes calculs pour les trois autres préparations (tableau17).

- **Dénombrement des souches :** dénombrer les colonies vues à l'œil nu (voire l'annexe –photos)

NB : UCEiP : unité centre d'évaluation et d'information de la pharmacopée dépendant → quantité d'enzyme qui catalyse l'hydrolyse de 1mg d'amidon dans les condition de dosage .

Tableau XVII: les résultats de calculs J0

préparation / test	Préparation (1) 100% Méthyl	Préparation (2) 50%	Préparation (3) 0%	Préparation (4) 0%
Dosage des parabène par HPLC	**Méthyl :** 0,953mg /ml Norme :0,87 – 1,01mg /ml	**Méthyl :** 0,953mg /ml Norme :0,87 – 1,01mg /ml	**Méthyl :** / Norme :0,87 – 1,01mg /ml	**Méthyl :** 0,943mg /ml Norme :0,87 – 1,01mg /ml
	Propyl :0,286 ~ 0,29 mg/ml Norme :0,28– 0,32 mg /ml	**Propyl** :0,286 ~ 0,29 mg/ml Norme :0,28– 0,32 mg /ml	**Propyl :** 0,308mg/ml Norme :0,28– 0,32 mg /ml	**Propyl :** / Norme :0,28– 0,32 mg /ml
Dosage du principe actif par UV	• 392,87 UCEiP/ml Norme : min 260 UCEiP /ml	• 442,69UCEip Norme : min 260 UCEiP /ml	• 409,34 UCEiP/ml Norme : min 260 UCEiP /ml	• 398,14 UCEiP/ml Norme : min 260 UCEiP /ml
Dosage microbiologique	**Germe aèrobies viable tatoux :** 00 UFC/100ml [≤ 200 UFC/ml]	02 UFC / 100ml	30 UFC/ 100ml	21 UFC/100ml
	Levure et moisissures : 00 UFC/100ml [20 UFC /ml]	00 UFC/ 100ml	02 UFC /100ml	02 UFC/100ml
	Escherichia *coli* : 00 UFC/ 100ml [20 UFC/100ml]	(_)	(_)	(_)
	Staphylococcus *aureus* : 00 UFC/100ml [00UFC/ml]	(_)	(_)	(_)
	Pseudomonas *aeruginosa :* 00 UFC/ 100ml	(_)	(_)	(_)
	Salmonelle : 00UFC/100ml [00 UFC/100ml]	(_)	(_)	(_)

Résultat de dosage microbiologique à J0

- Germe aérobies viable totaux dans quatre préparations :



Figure 10 : dénombrement les souches dans un milieu soja agar

Fait le dénombrement des souches :

100% Méthyl : $00\ UFC/100ml$

50% Méthyl : $02UFC/100mL$

0% Méthyl : $30UFC/100ml$

0% Propyl :21 $UFC/100ml$

Levures et moisissures

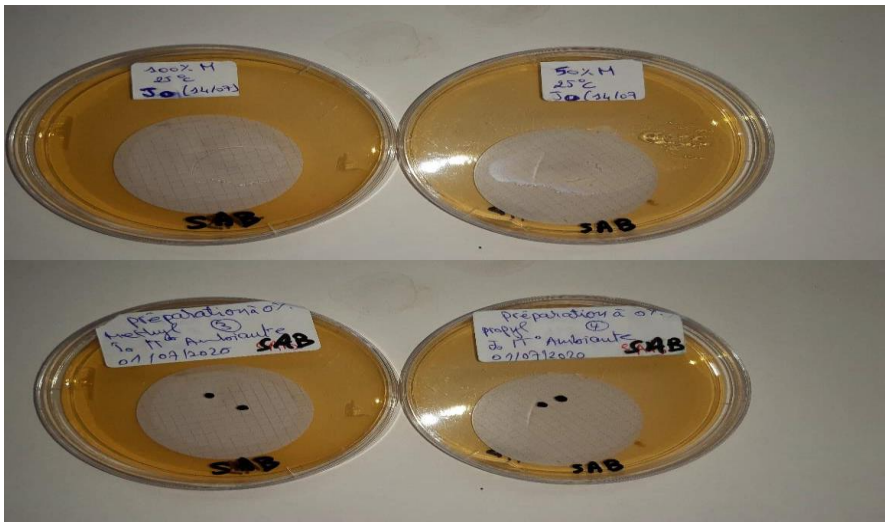


Figure11 : dénombrement des levures et moisissures dans un milieu sabouraud

On a fait le dénombrement des souches :

100% Méthyl : $00\ UFC/100ml$ 0% Méthyl : $02UFC/100ml$

0% Propyl :$02\ UFC/100ml$ 50%Méthyl : $00UFC/100mL$

***Escherichia coli* et salmonelles** *:*

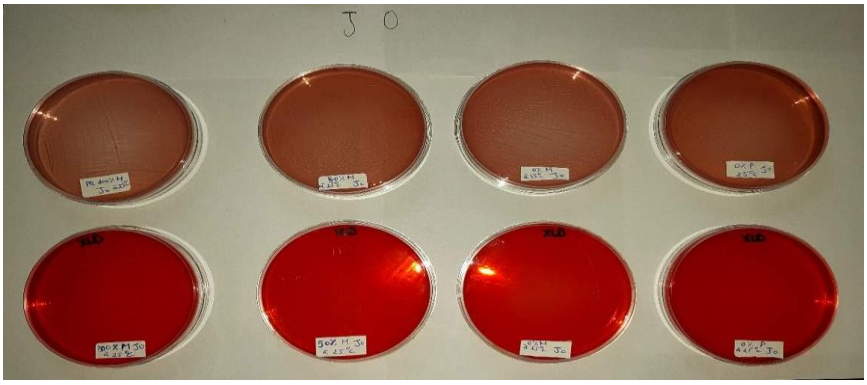


Figure12: dénombrement des souches dans un milieu MCA et XLD

On a fait le dénombrement des souches :

100% Méthyl : $00\ UFC/100ml$ 0% Méthyl : $02UFC/100ml$

50% Méthyl : $00UFC/100mL$ 0% Propyl :$02\ UFC/100ml$

Pseudomonas *aeruginosa*:

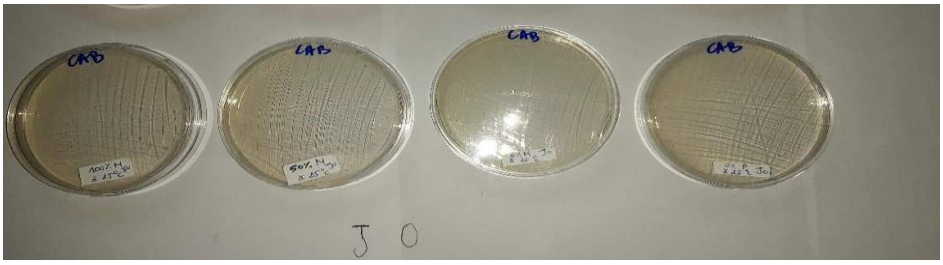


Figure 13: dénombrement des souches dans un milieu CAB

Fait le dénombrement des souches :

100% Méthyl : $00\ UFC/100ml$ 0% Méthyl : $02UFC/100ml$

50% Méthyl : $00UFC/100mL$ 0% Propyl : $02\ UFC/100ml$

***Staphylococcus aureus* :**

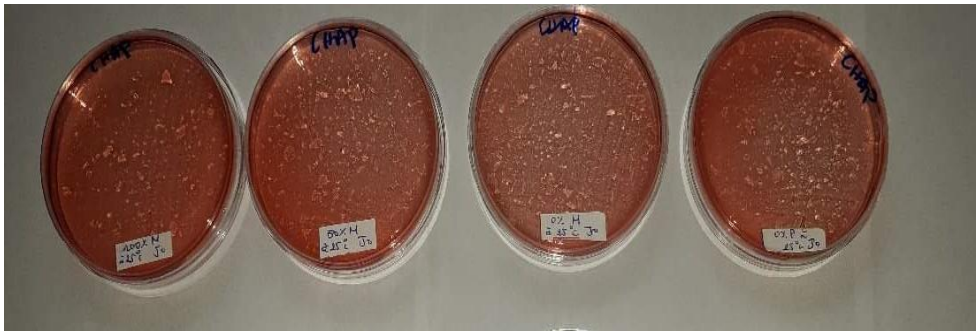


Figure14 : dénombrement des souches dans un milieu CHAP

00 UFC / ml pour tous les boite

A J30 : mêmes calculs suivis J0 mais on a joué sur le paramètre de température (à T= 25°C et à T=40°C).

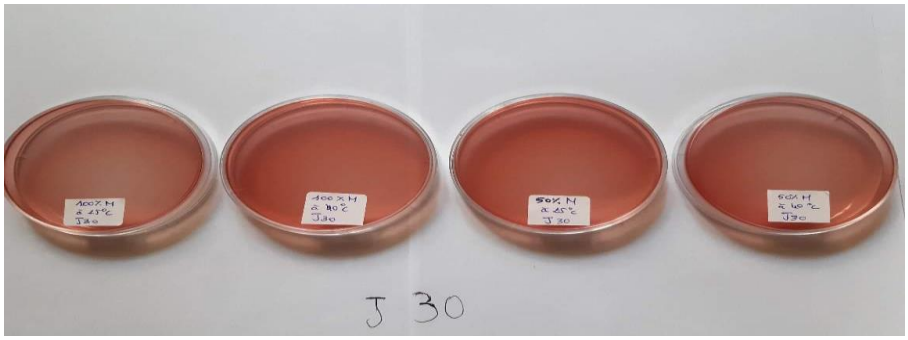
Tableau XVII: résultats de calculs à J30.

Préparation / Test	**Préparation (1) 100% Méthyl**	**Préparation (2) 50%**	**Préparation (3) 0%**	**Préparation (4) 0%**
Dosage des parabène par HPLC	**Méthyl à 25°C** → 0,903mg/ml **à 40°C** → o, 879mg/ml Norme :0,87 – 1,01mg /m	**Méthyl : à 25°C** → 0,423mg/ml **à 40°C** → 0,409mg/ml	**Méthyl : à 25°C** → 00mg/ml **à 40°C** → 00mg/ml	**Méthyl : à 25°C** → 0,882mg/ml **à 40°C** →0,87 mg/ml
	Propyl : à 25°C→0,287≈0,29mg/ml **à 40°C** → 0,304mg /ml norme Norme :0,28–0,32 mg /ml	**propyl : à 25°c** → 0,423 mg/ml **à 40°C** → 0,409mg/ml	**propyl : à 25°C**→0,29mg/ml **à 40°C** → 0,28mg/ml	**Propyl : à 25°C** → 00mg/ml **à 40°C** → 00mg/ml
Dosage du principe actif par UV	**à 25°C** → 398,26 µFC /ml **à 40°C** → 407, 31 $UCEiP/$ ml	**à 25°C** → 395,29UCEiP/ml **à 40°C** → 402, 35 $UCEiP/$ ml	**à 25°C** → 389,83UCEiP/ml **à 40°C** → 413,06 $UCEiP/$ ml	**à 25°C** → 388,25UCFiP/ml **à 40°C** → 365,11$UCEiP/ml$
Dosage microbiologique	**Germeaèrobies viable tatoux**	(_)	(_)	(_)
	Levure et moisissures	(_)	(_)	(_)
	Escherichia *coli* :	(_)	(_)	(_)
	Staphylococcus *aureus* :	(_)	(_)	(_)
	Salmonelles :	(_)	(_)	(_)

UCEiP : Unité centre d'évaluation et d'information de la pharmacopée dépendant → quantité d'enzyme qui catalyse l'hydrolyse de 1mg d'amidon dans les conditions de dosage.

Résultat de dosage microbiologique à J 30

Escherichia *coli* :



Figue 15 : résultats de dénombrement d'*E .coli* (résultat négative)

Salmonelles :

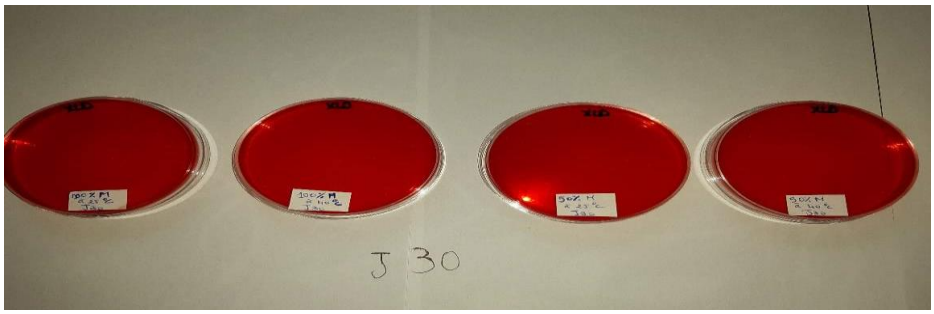


Figure 16 : résultats de dénombrement de Salmonelles (résultat négative)

***Staphylococcus aureus* :**

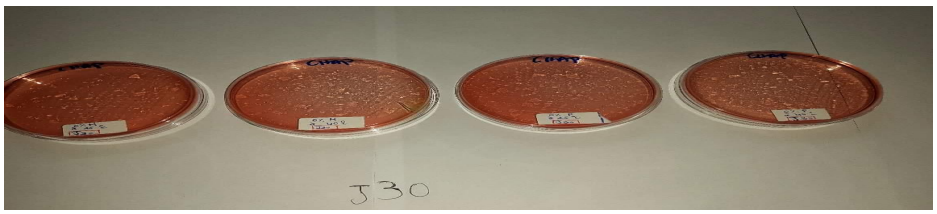
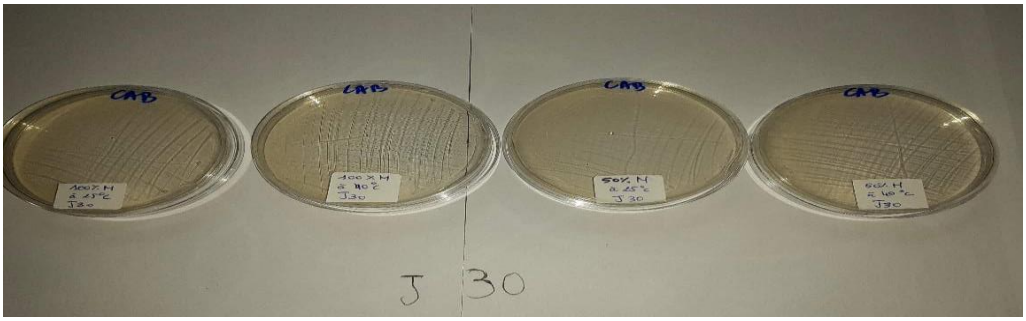


Figure 17 : résultats de dénombrement de *Staphylococcus aureus* (résultat négative)

***Pseudomonas aeruginosa* :**



Figue18 : résultats de dénombrement *Pseudomonas aeruginosa* (résultat négative)

Germes aérobies viables totaux :

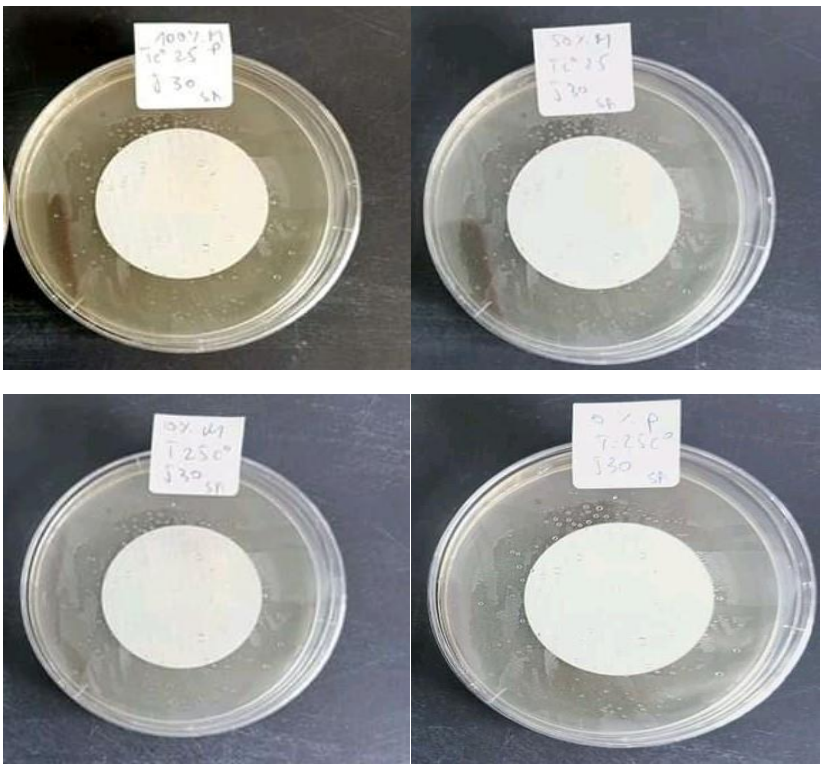


Figure19 :Résultats obtenues après 30j à 25°C

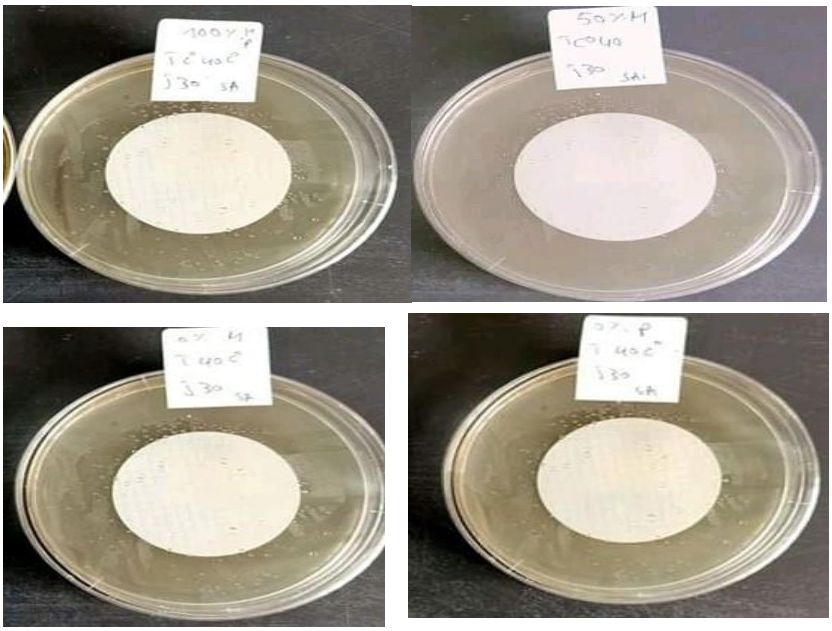
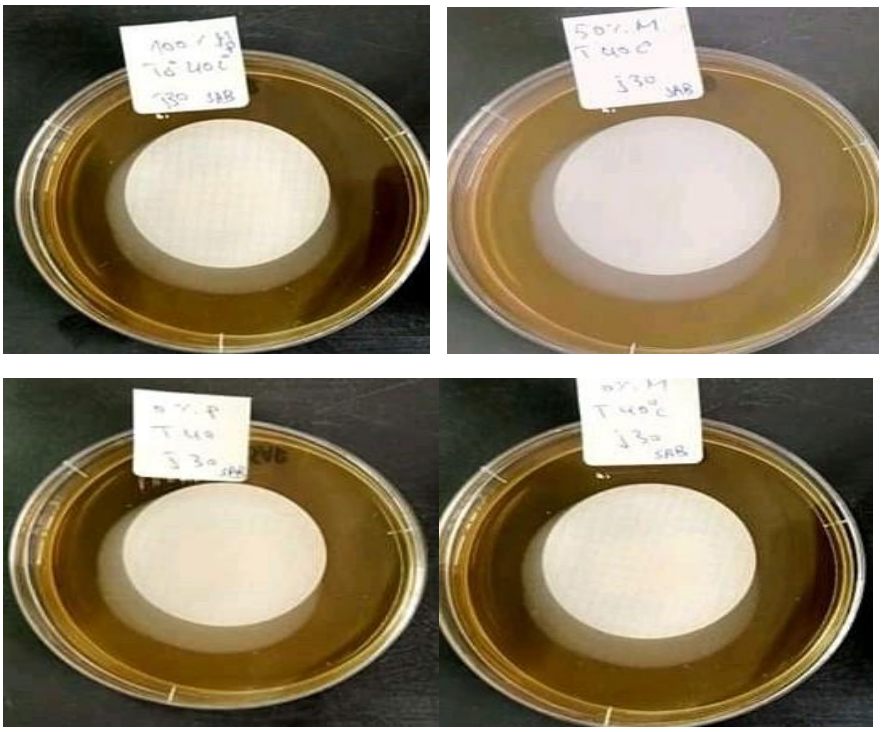


Figure20 : résultats obtenues apres 30j à 40°C

Levure et moisissure :



Figue 21 : résultats obtenues après 30J à 25°C



Figue 22 : résultats obtenues après 30J à 40°C

3.9. Interprétations :

- D'après les résultats obtenues à J0 représentées dans les tableaux on a confirmé les concentrations des parabènes utilisés dans les préparations sont précises d'après les aires obtenues dans la chromatographie : à concentration de 100% l'air de méthyle parabène obtenu= 562217, L'air de méthyle parabène obtenu à concentration de 50%= 266681,6. Absence d'air de méthyl à concentration de 0%. Absence d'air de propyle parabène à concentration de 0%.
- Concernant le principe actif le dosage reste toujours dans les normes par ce que on a utilisé la même pesée dans les quarte préparations.

Concernant la recherche de la charge bactérienne dans les quatre préparations :

- Germes aérobies viables totaux : la charge bactérienne dans la préparation à 0% propyle a été plus grande que celle dans la préparation à 0% méthyl par ce que on a diminué la concentration de méthyle en moitié. à 0% de méthyl la charge bactérienne a augmenté par rapport à la concentration de 50% mais plus grande que celle de propyle (0%) par ce que ce le méthyle est plus efficace que le propyle (longueur de la chaine carbonée).
- Levures et moisissures : La présence des deux parabènes inhibe la croissance. L'absence de l'un des deux parabèns améliore la croissance (Moudjded,A.et al, 2019).
- *Echerichia.coli, Staphylococcus. aurues, Pseudomonas. Aerugenosa,*salmonelles :

La négativité de résultats signifie la stérilité de préparations.

à J30 :

- à température de 25°C et à 40°C les résultats restent stables pour les quatre préparations par ce que la durée a été insuffisante pour avoir un changement de l'efficacité des parabènes .
- Absence de croissance des bactéries et de levures ⟶ Inhibée par les deux parabènes.

Conclusion

Conclusion :

Les résultats obtenus montrent effectivement que les quatre solutions préparées à différents concentrations en conservateurs (méthyle et propyle parabène) dans notre étude possèdent les propriétés antimicrobiennes et elles contribuent réellement à la conservation du produit.

Les concentrations de parabènes et du principe actif (alpha-amylase) utilisées lors la préparation du XIMALEX® sont précises et restent stables durant les 30 jours du travail.

Les conservateurs (méthyle parabène et propyle parabène), seuls ou en combinaisons, restent nécessaires pour prévenir la contamination microbienne des médicaments liquides.

L'utilisation des conservateurs dans les produits pharmaceutiques reste une méthode fiable et sécurisée pour la conservation des médicaments au cours de stockage ou au moment d'utilisation, mais leur intégration dans la formulation reste toujours limité par des règlementations qui définissent les normes, les situations et limites d'acceptation, pour éviter toute affection pouvant affecter la santé humaine

Mais la durée de travail a été insuffisante pour répondre exactement à notre question et pour effectuer des tests de toxicité (anapate) et tests de stabilité (pH, lumière, indice d'iode……..) à cause de covid19.

Référence

Référence

Adeinat,L. (2018). L'impact des colorants et des conservation de l'industrie alimentaire sur notre santé. Thèse de docteurat, Universite de poitiers.

Ashagrie,A.Abate,D. (2012). Amélioration de la durée de conservation d' Injera grâce à l'utilisation de conservateurs chimiques. Journal africain de l'alimentation, de l'agriculture, de la nutrition et du développement.(Vol12)(5).

Barse,A.et al. (2010). vitellogenin induction and histo-metabolic changes following exposure of Cyprinus carpio to metyl parabe. Asian-autralasianassociation of animal production societies, Vol23(12), 1557-1565.

Bindu,P.S.et al. (2011). Clinical and imaging observations in isolated sulfite oxidase deficiency. journal of child neurology,(Vol 26), 1036-40.

Boutchiche.M. (2018). Etude de la capacité d'adsorption d'un charbon actif végétal sur le méthyl parabene. Université de Saida.

Charline, c.et Julien,D. (2009). Les parabenes: Quele problématique pour la santé . ingénieur du génie sanitaire .

Chiori, co.Ghobashy, A.A. (1983). Un effet potentialisateur de l'EDTA sur l'activité bactéricide des concentrations inférieures d'éthanol International journal of pharmaceutics. (Vol17). 121-128.

Cohen , Y.Gleitz, C. (2009). les conservateur dans les produit consermetique : cas des parabens et du phénoxyéthanl . thèse de doctorat, universite joseph fourier.

Debacker, M. (2018). Conservation des produits cosmetique : evolutions, risques associes et strategies d'optimisation. Université de Lille 2.

Evans,G.De Challemaison,B. (2010). Evaluation par les consommateures de qualités naturelles et non natureiies des aliment Appetite. (Vol45).557-563.

Halla, N. (2010). Evaluation de l'activité antifongique et antibactérienne et de la cytotoxicité de quatre conservateurs : Imidazolidinyl urée, Diazolidinyl urée, Germaben II ® et Bromure de N-cétyl-N,N,Ntriméthylammonium.Mémoire de magister,Département de biologie, Université Aboubekr belkaid Tlemcen.

Haman,C. (2014). Les parabens dans l'eau : intorduction dans l'environnement,occurrence et toxivité. faculté de pharmacie,université de Lorraine.

Huang,H. Y. Lai,Y.C,Chiu.C.W,Yeh.J.M. (2003). Comparaison de la chromatographie électrocinétique micellaire et de la chromatographie électrocinétique microémulsion pour l'analyse des conservateurs dans les produits pharmaceutiques et cosmétiques. journal of chromatography A,(Vol 993),153-164

INERIS ,2015 in www .ineris/fr/substances/fr/.

Khairi M.S. et al. (2007). Analyse des conservateurs dans les produits pharmaceutiques. mémoire de magister, Université des sciences et technologies d'Ajman.

Lindsey,A.S.and Jeskey.H. (1957). The kOLBE-Schmitt reaction. chemical reviews, (Vol 57), 583-620.

Mathews,C.et al. (1956). p-hydroxybenzoic acid esters as preservatives II:Acute and chronic toxicity in dogs,rats,and mice. journal of american pharmaceutical association, (Vol45), 260-267.

Menuet,P. (2008). Identification d'un conservateur antimicrobien optimal pour une solution protéinique injectable .thèse de doctorat ,Université de Rouen, France.

Moudjed .A.Temmar,O et Eddib,M. (2019). les conservateure en pharmacie . thèse de doctorat universite de blida 1 .

Nguyen,T.et all. (2005). The effects of parabens on the mechanosensitivechannels of E. coli. Eeropean biophysics journal, Vol34(5), 389-395.

Nicola p. (2005).. Département de chimie et Institut des sciences végétales Acyclic Peptide Inhibitors of Amylases, Gilman Hall, Iowa State University, Ames, Iowa 50011. (Vol. 12)

Oishi,S. (2002). Effects of propylparaben on the mal reproductive system. Food and chemical toxicology,(Vol20), 1807-1813.

Oni,M.O, Adeyemo,I.A. and Agbolade J.O.(2013).Poteny of preservation in selected drug mixtures in ibadan,oyo state, nigeria. International journal of pharmaceutical science invention.(Vol 2),15-25.

Radovan,c.et al. (2008). Electrochemical sensing and assessement of parabens inhydro-alcoholic solutions and water using a boron-doped diamond electrode. sensors, Vol 8(7), 4330-4349.

Soni,M.G.et all. (2005). safety assessmnt of esters of p-hydroxybenzoate acid(parabens). Food and chemical toxicology, 43, 985-1015.

Référence

Toumi,N. Sellam,K. (2017). Etusde de la réduction de la concentration de méthyl et propyl parabene(conservateurs universel)dans la formulation pharmaceutique. Faculté de sciences rt de technologie, université de Médéa.

Yamamoto,H.et . (2007). preliminary ecological risk assessment of butyl paraben and benzyl paraben-1.Removal effeciency in wastewater treatment,acute/chronic toxicity for aquatic organisms, and effects on medaka gene expression. Environnemental scinces: an international journal of environmental physiology and toxicology, 73-87.

Yamamoto,H.et al. (2011). aquatic toxicity and ecological risk assessment of seven parabens: Individual and additive approach . science of the total environnement, 102-111.

Ziane bouziane F , lachemi ben bokreta I. (2015). Etudede la contamination au cours de la fabrication du sirop ximalex . thèse ,Universite de Djilali BOUNAAAMA de khemis miliana.

Annexe

Annexe 1 : Liste des conservateurs

CODE	NOM
E200	Acide sorbique
E202	Sorbate de potassium
E203	Sorbate de calcium
E210	Acide benzoique
E211	Benzoate de sodium
E212	Benzoate de potassium
E213	Benzoate de calcium
E214	Ethylparabène
E215	Ethyparabène sodique
E218	Méthylparabène
E219	Methylparabène sodique
E220	Dioxyde de soufre
E221	Sulfite de sodium
E222	Bisulfite de sodium
E223	Métabisulfite de sodium
E224	Métabisulfite de potassium
E226	Sulfite de calcium
E227	Sulfite acide de calcium
E228	Sulfite acide de potassium
E234	Nisine
E235	Natamycine
E239	Héxathylènetétramine
E242	Dicarbonate de diméthyle
E249	Nitrite de sodium
E250	Nitrate de sodium
E251	Nitrate de calcium
E252	Nitrate de potasium
E260	Acide acétique
E261	Acétate de potassium
E262	Acétate de sodium
E263	Acétate de calcium
E270	Acide lactique
E280	Acide propionique
E281	Propionate de sodium
E282	Propionate de calicium
E283	Propionate de potasium
E284	Acide borique
E285	Tétraborate de sodium (borax)
E290	Dioxyde de cabone
E296	Acide malique
E297	Acide fumarique

Annexe 2 : tableau DSEO mesurées ou estimées par Yamamato et al en 2007 et 2011 sur des daphnies

Parabene testé	BSEO chez daphnia Magna, 2007	DSEO chez daphni Magna , 2011
MeP	-	2,4
EtP	-	[1 .6]
PrP	-	[1 .1]
i-PrP	-	[1 .2]
BuP	0,80	0,80
i-BuP	0,64	0,64
BzP	0,84	0,84

Annexe 3 : Equipements, Matériels et systèmes :

- Balance.
- Agitateurmagnétique.
- Spectrophotomètre UV-VIS.
- Chromatographie à haute performance phase liquide de type waters.
- Bain marie.
- Phmètre.
- Bain ultrason.
- Fioles jaugées de 50ml, 100ml ,1000ml.
- Eprouvette de 100ml.
- Pipette graduée de 1ml, 2ml, et 4ml.
- Tube à essais.
- Pompe à vide.
- Etuve, bain-marie.
- Hotte à flux laminaire.
- Incubateurs.
- Rampe de filtration.
- Dispositifs de filtration.
- Fioles erlenmeyer, tube à essai stériles.
- pinces en inoxstériles.
- Filtres membrane de porosité 0,45u stériles.
- Boites de pétristériles.
- Eprouvette, pipettes graduéesstériles.



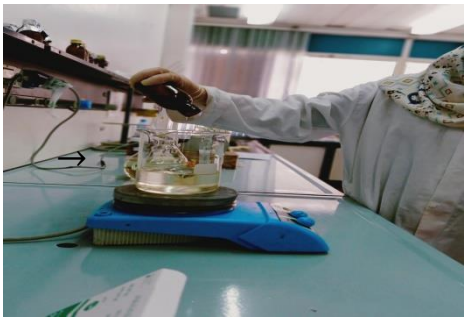
Figure 22: chromatographie à haute performance phase liquide



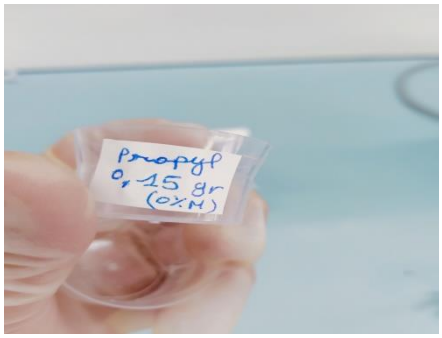
Figure: spectrophotometer

Annexe 4 : préparation les quatre solutions :

Péréparation 1 (100% Méthyl) :

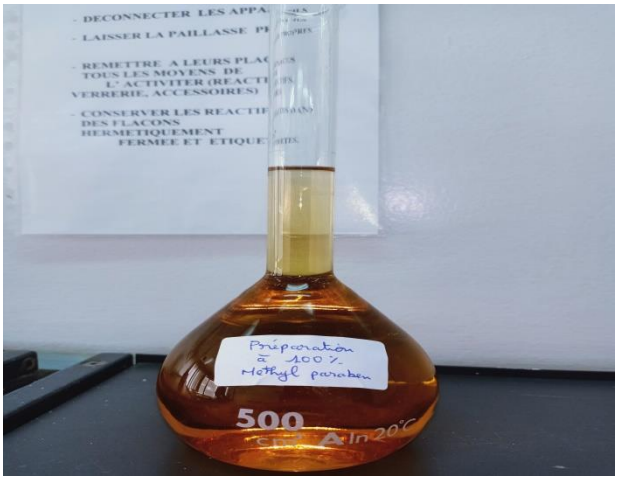






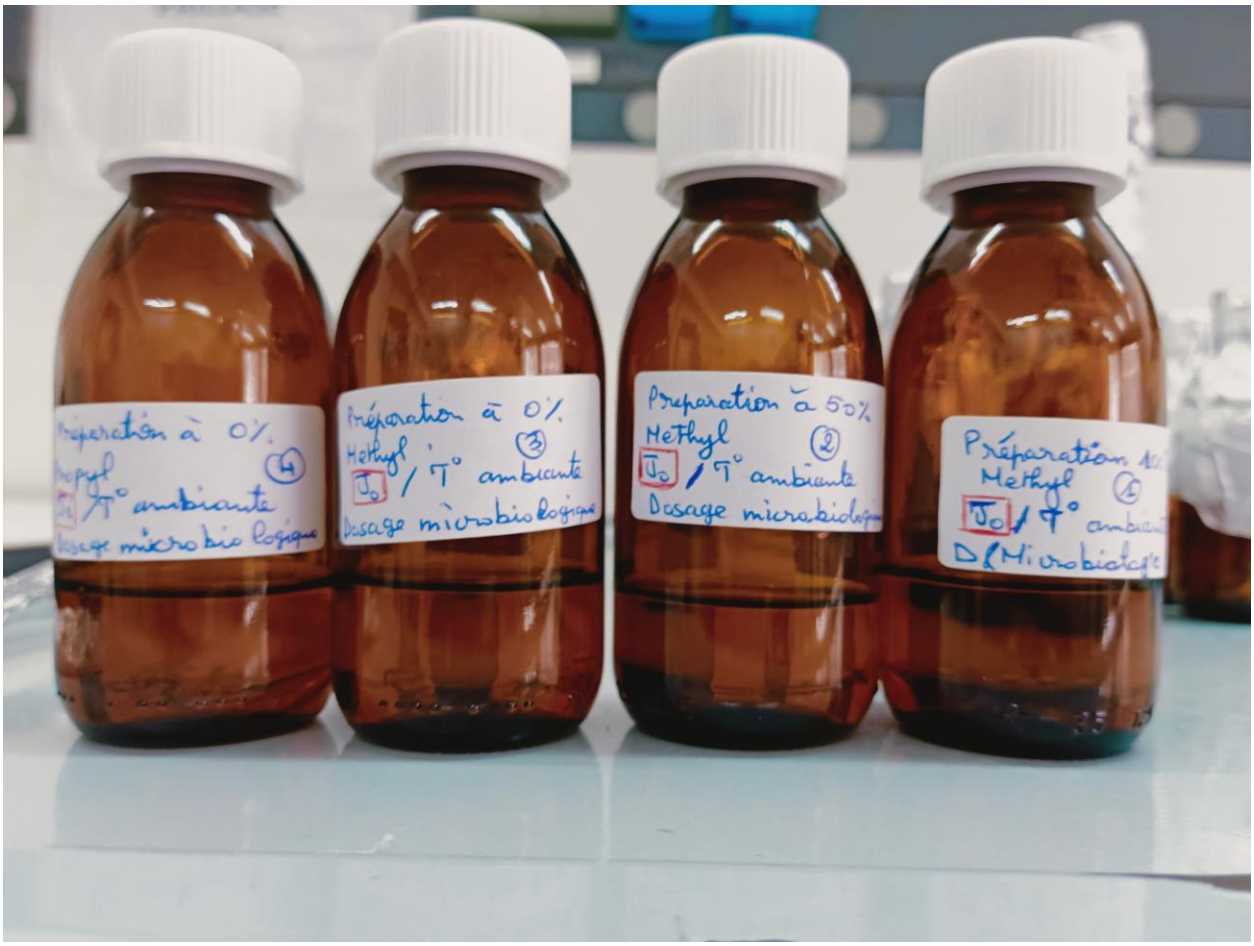






Colorant jaune

Même étapes pour les autres préparations



Annexe 5 : préparation et stérilisation des milieux de culture

- Solution tampon peptonée au chlorure de sodium :

Phosphate monopotassique	3,6g
Phosphate disodiquedehydrate	7,2g
Chlorure de sodium	4,3g
peptone de viande ou de caséine	1,0g
Eau purifiée	1000ml

Sléri liser à l'autoclave à 121°C pendant 20minutes

- Milieu liquide aux peptones de caséine et de soja :

Peptone pancréatique de caséine	17 ,0 g
Peptonepapaiquedesoja	3,0g
Chlorure de sodium	5 ,0g
Phosphate dipotassique	2,5g
Glucose monohydrate	2 ,5g
Eau purifiée	1000ml

Ajuster le pH pour qu'il soit de pH entre 7, 3plus ou mois 0,2 à 25°C après stérilisation, stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 20 minutes.

- Milieu gélosé aux peptones de caseine et de soja :

Peotone pancréatique de caseine	15 ,0g
Peptone papaique de soja	5 ,0g
Chlorure de sodium	15,0g
Gélose	15,0g
Eau purifiée	1000ml

Ajuster le pH pour qu'il soit de pH entre 7, 3 plus ou mois 0,2 à 25°C après stérilisation, stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 20 minutes.

- Milieu sabauraud dextrosé-gélose :

Dextrose	15 ,0g
Peptone pancréatique et peotique (1 ;1)	10 ,0g
Gélose	15 ,0g
Eau purifiée	1000ml

Ajuster le pH pour qu'il soit de 5,6 plus ou mois 0,2 à 25°C après stérilisation, stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 20 minutes.

- Milieu liquide de mac conkey :

Hydrolysatpancréation de gélatine	20,0g
Lactose monohydrate	10,0g
Bile de bœufdéshydratée	5,0g
Pourpre de bromocrésol	10mg
Eau purifine	1000ml

Chauffer à ébullition pendant 1minute sous agitation, puis ajuster le pH entre 7.2 plus ou mois 0,2 à 25°C après stérilisation, stériliser à 121°C pendant 20 minutes .

- Milieu gélosé cétrimide :

Hydroysatpancreatique de gélatine	20,0g
Chlorure de magnésine	1 ,4g
Sulfate dipotassique	10,0g
Cétrimide	0 ,3g
Gélose	13 ,6g
Eau purrifiée	1000ml
Glycérol	10,0ml

Chauffer à ébullition pendant 1minute sous agitation, puis ajuster le pH entre 7.2 plus ou mois 0,2 à 25°C après stérilisation , stériliser à 121°C pendant 20 minutes .

Annexe 6 : résultats de dosage du principe actif par UV à défirents concentrations(J0)

Wavelength program - Lambda 25 jeudi 2 juillet 2020 17:39 Paris, Madrid (heure d'été)

Data Table

Sample ID	Description	590,0
std1	ALPHA AMYLASE	0,0724
std2		0,0723
Ech1 (preparation1)	ximalex a 100%methyle	0,0284
Ech2 (preparation1)		0,0285
Ech1 (preparation2)	ximalex a 50% methyle	0,0200
Ech2 (preparation2)		0,0198
Ech1 (preparation3)	ximalex a 0% methyle	0,0252
Ech2 (preparation3)		0,0246
Ech1 (preparation4)	ximalex a 0% propyle	0,0280
Ech2 (preparation4)		0,0278

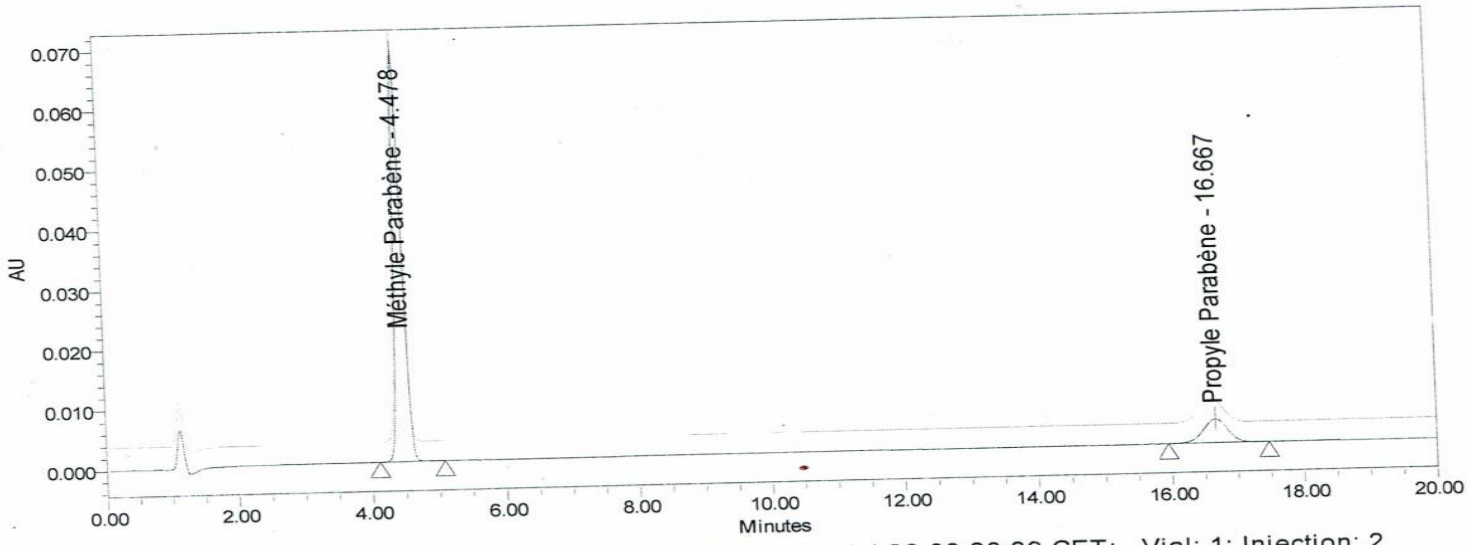
les résultat de dosage du principe actif par UV à défirents concentrations (J30)

Sample	Description	590,0	
Std 1	ALPHA AMYLASE	0,0708	0,07045
Std 2			
ECH (préparation 1) à 25°c	Ximalex a 100% Méthyle	0,0701	0,0265
ECH (préparation 2) à 25°c		0,0275	
ECH (préparation 1) à 40°c	Ximalex a 100% Méthyle	0,0255	0,02505
ECH (préparation 1) à 40°c		0,0240	
ECH (préparation 1) à 25°c	Ximalex a 50% Méthyle	0,0261	0,02785
ECH (préparation 1) à 25°c		0,0280	
ECH (préparation 1) à 40°c	Ximalex a 50% Méthyle	0,0277	0,02655
ECH (préparation 2) à 40°c		0,0281	
ECH (préparation 1) à 25°c	Ximalex a 00% Méthyle	0,0250	0,2775
ECH (préparation 2) à 2540°c		0,0275	
ECH (préparation 1) à 40°c	Ximalex a 00% Méthyle	0,0280	0,02365
ECH (préparation 2) à 40°c		0,0241	
ECH (préparation 1) à 25°c	Ximalex a 00% Propyl	0,0287	0,02905
ECH (préparation 2) à 25°c		0,0294	
ECH (préparation 1) à 40°c	Ximalex a 00% Propyl	0,0335	0,03315
ECH (préparation 2) à 40°c		0,00328	

résultats de dosage des parabène par HPLC à défirent concentration(J0)

Empower™ 3 SOFTWARE

Peak Summary Report



Sample Name: STD Ximalex ; Date Acquired: 05-Jul-20 09:23:26 CET; Vial: 1; Injection: 2
Sample Name: STD Ximalex ; Date Acquired: 05-Jul-20 09:44:07 CET; Vial: 1; Injection: 3

Peak Summary with Statistics
Name: Méthyle Parabène

	Sample Name	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height
1	STD Ximalex	1	2	Méthyle Parabène	4.478	589844	85.27	68915
2	STD Ximalex	1	3	Méthyle Parabène	4.465	588561	85.19	68984
Mean					4.471	589202.3		
Std. Dev.					0.009			
% RSD					0.20	0.2		

Peak Summary with Statistics
Name: Propyle Parabène

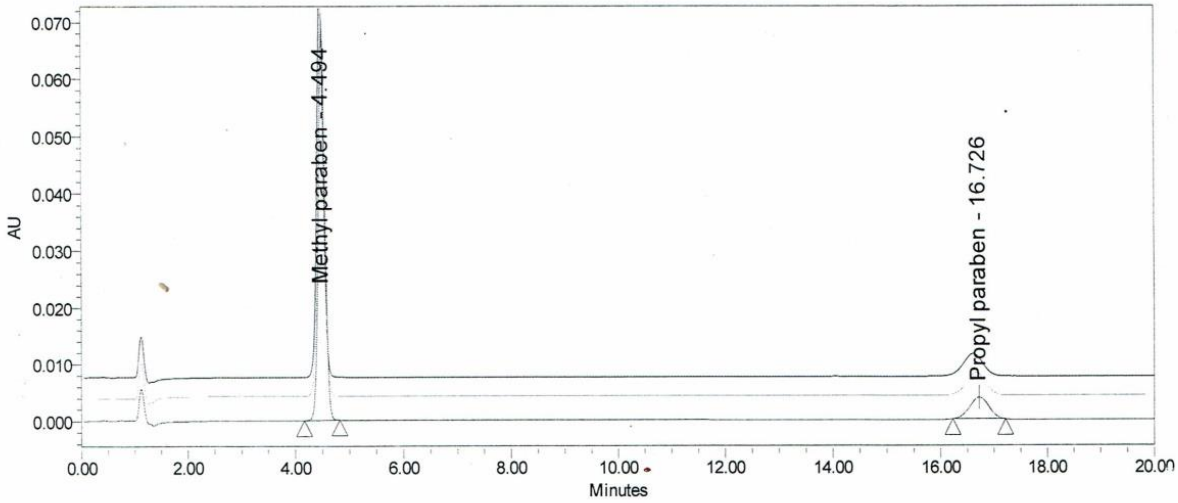
	Sample Name	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height
1	STD Ximalex	1	2	Propyle Parabène	16.667	101904	14.73	3935
2	STD Ximalex	1	3	Propyle Parabène	16.610	102314	14.81	3954
Mean					16.639	102108.9		
Std. Dev.					0.040			
% RSD					0.24	0.3		

Reported by User: System
Report Method: Peak Summary Report
Report Method ID: 1193
Page: 1 of 1

Project Name: C:\BELATRACHE\XIMALEX\07 06 20
Date Printed:
06-Jul-20
08:44:23 Africa/Algiers

Empower 3 SOFTWARE

Peak Summary Report



Sample Name: STD Ximalex ; Date Acquired: 05-Jul-20 09:02:44 CET; Vial: 1; Injection: 1
Sample Name: STD Ximalex ; Date Acquired: 05-Jul-20 09:23:26 CET; Vial: 1; Injection: 2
Sample Name: STD Ximalex ; Date Acquired: 05-Jul-20 09:44:07 CET; Vial: 1; Injection: 3

Peak Summary with Statistics
Name: Methyl paraben

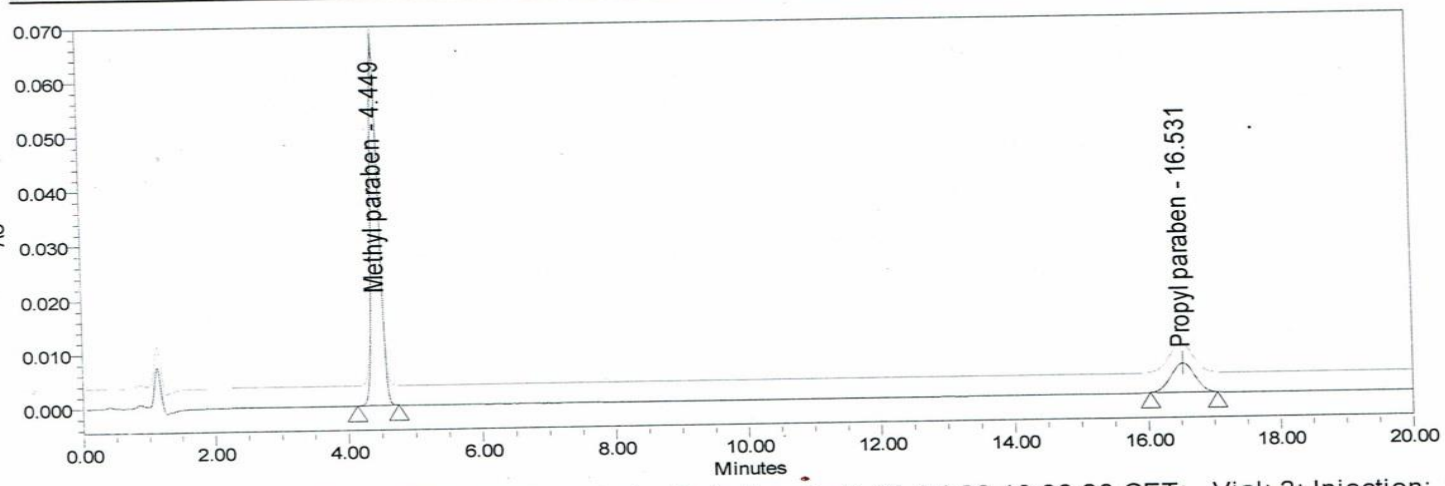
	Sample Name	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height
1	STD Ximalex	1	1	Methyl paraben	4.494	589207	85.97	69819
2	STD Ximalex	1	2	Methyl paraben	4.478	588304	86.18	68882
3	STD Ximalex	1	3	Methyl paraben	4.465	587068	86.12	68953
Mean					4.479	588192.9		
Std. Dev.					0.014			
% RSD					0.32	0.2		

Peak Summary with Statistics
Name: Propyl paraben

	Sample Name	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height
1	STD Ximalex	1	2	Propyl paraben	16.667	94364	13.82	3819
2	STD Ximalex	1	3	Propyl paraben	16.610	94609	13.88	3836
3	STD Ximalex	1	1	Propyl paraben	16.726	96175	14.03	3842
Mean					16.668	95049.4		
Std. Dev.					0.058			
% RSD					0.35	1.0		

Empower 3 SOFTWARE

Peak Summary Report



Sample Name: ECH 1 prép à 100% methyl; Date Acquired: 05-Jul-20 10:33:23 CET; Vial: 2; Injection: 1

Sample Name: ECH 1 prép à 100% methyl; Date Acquired: 05-Jul-20 10:54:07 CET; Vial: 2; Injection: 2

Peak Summary with Statistics
Name: Methyl paraben

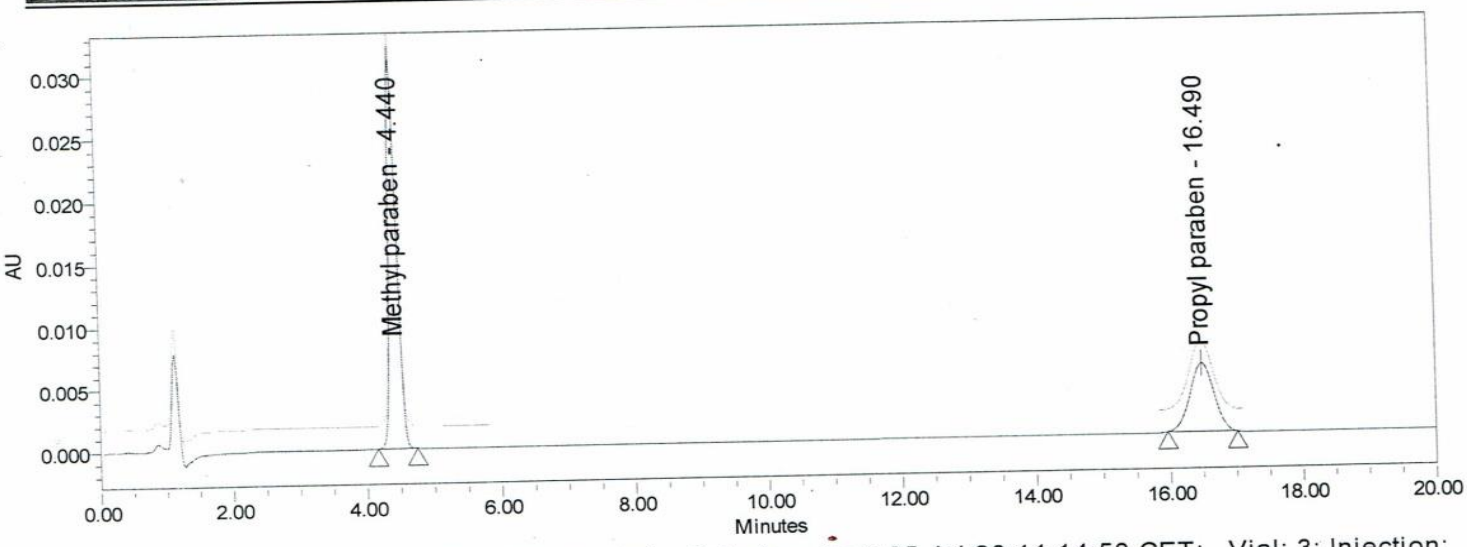
	Sample Name	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height
1	ECH 1 prép à 100% methyl	2	2	Methyl paraben	4.446	561376	80.62	66248
2	ECH 1 prép à 100% methyl	2	1	Methyl paraben	4.449	563058	80.67	66380
Mean					4.448	562217.0		
Std. Dev.					0.003			
% RSD					0.06	0.2		

Peak Summary with Statistics
Name: Propyl paraben

	Sample Name	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height
1	ECH 1 prép à 100% methyl	2	2	Propyl paraben	16.510	134941	19.38	5418
2	ECH 1 prép à 100% methyl	2	1	Propyl paraben	16.531	134934	19.33	5418
Mean					16.520	134937.5		
Std. Dev.					0.015			
% RSD					0.09	0.0		

Empower™ 3 SOFTWARE

Peak Summary Report



Sample Name: ECH 2 prép à 50% methyl; Date Acquired: 05-Jul-20 11:14:50 CET; Vial: 3; Injection: 1

Sample Name: ECH 2 prép à 50% methyl; Date Acquired: 05-Jul-20 11:35:34 CET; Vial: 3; Injection: 2

Peak Summary with Statistics
Name: Methyl paraben

	Sample Name	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height
1	ECH 2 prép à 50% methyl	3	2	Methyl paraben	4.437	267212	66.05	31617
2	ECH 2 prép à 50% methyl	3	1	Methyl paraben	4.440	266151	65.78	31407
Mean					4.439	266681.6		
Std. Dev.					0.002			
% RSD					0.05	0.3		

Peak Summary with Statistics
Name: Propyl paraben

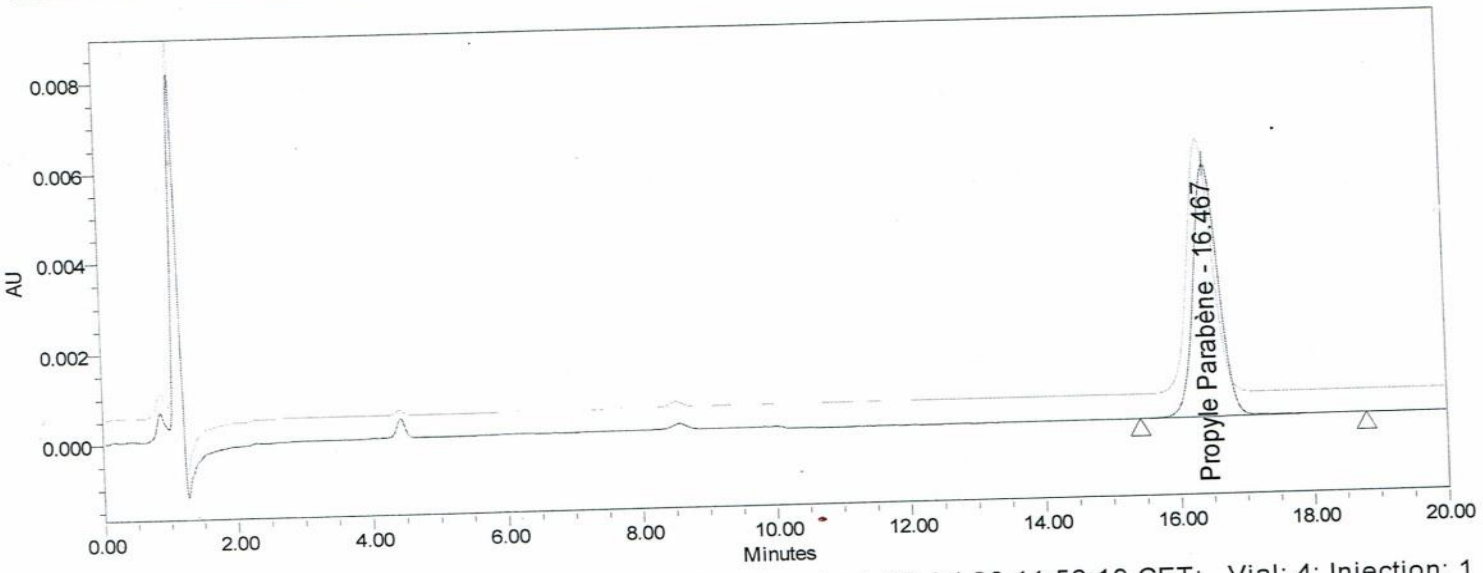
	Sample Name	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height
1	ECH 2 prép à 50% methyl	3	2	Propyl paraben	16.480	137338	33.95	5529
2	ECH 2 prép à 50% methyl	3	1	Propyl paraben	16.490	138475	34.22	5536
Mean					16.485	137906.4		
Std. Dev.					0.008			
% RSD					0.05	0.6		

Annexe

J-

Empower 3 SOFTWARE

Peak Summary Report



Sample Name: ECH 3 prép à 0 % methyl; Date Acquired: 05-Jul-20 11:56:19 CET; Vial: 4; Injection: 1
Sample Name: ECH 3 prép à 0 % methyl; Date Acquired: 05-Jul-20 12:17:01 CET; Vial: 4; Injection: 2

Peak Summary with Statistics
Name: Méthyle Parabène

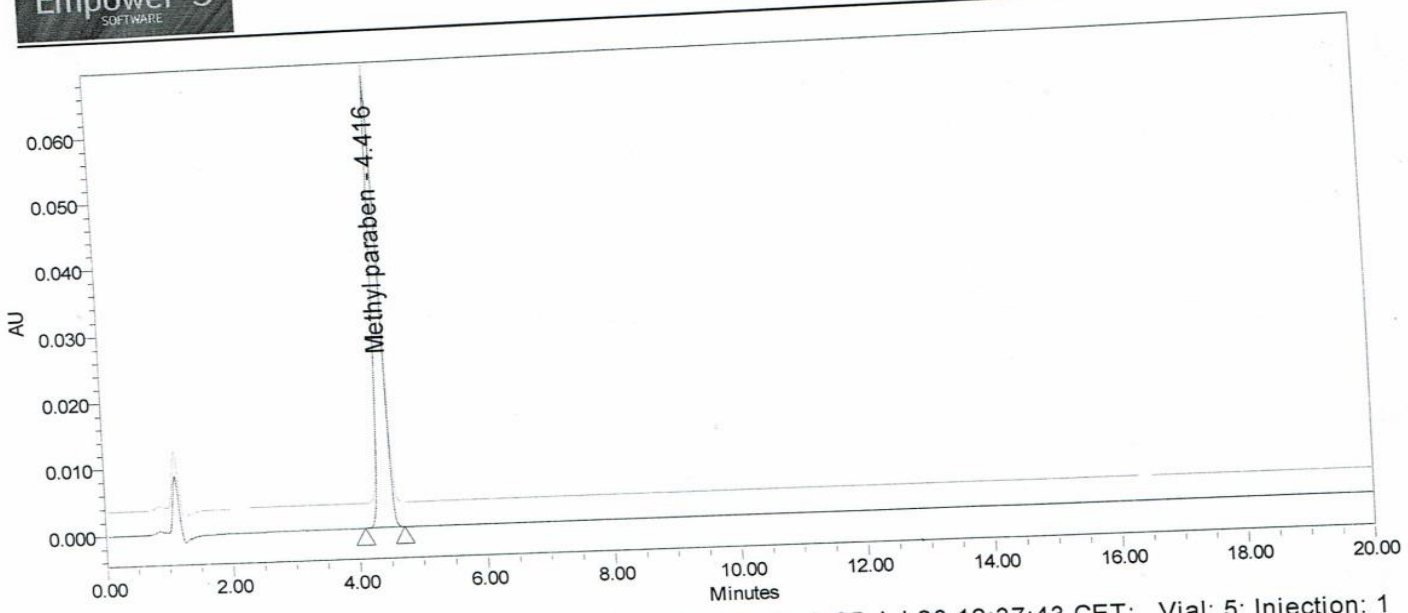
	Sample Name	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)
1	ECH 3 prép à 0 % methyl	4	1	Méthyle Parabène	4.465
2	ECH 3 prép à 0 % methyl	4	2	Méthyle Parabène	4.465
Mean					4.465
Std. Dev.					0.000
% RSD					0.00

Peak Summary with Statistics
Name: Propyle Parabène

	Sample Name	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height
1	ECH 3 prép à 0 % methyl	4	1	Propyle Parabène	16.467	145500	100.00	5613
2	ECH 3 prép à 0 % methyl	4	2	Propyle Parabène	16.381	145192	100.00	5639
Mean					16.424	145346.1		
Std. Dev.					0.060			
% RSD					0.37	0.2		

Empower™ 3 SOFTWARE

Peak Summary Report



Sample Name: ECH 4 prép à 0 % propyl; Date Acquired: 05-Jul-20 12:37:43 CET; Vial: 5; Injection: 1
Sample Name: ECH 4 prép à 0 % propyl; Date Acquired: 05-Jul-20 12:58:28 CET; Vial: 5; Injection: 2

Peak Summary with Statistics
Name: Methyl paraben

	Sample Name	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height
1	ECH 4 prép à 0 % propyl	5	2	Methyl paraben	4.420	558548	100.00	66229
2	ECH 4 prép à 0 % propyl	5	1	Methyl paraben	4.416	555034	100.00	65844
Mean					4.418	556790.9		
Std. Dev.					0.003			
% RSD					0.06	0.4		

Peak Summary with Statistics
Name: Propyl paraben

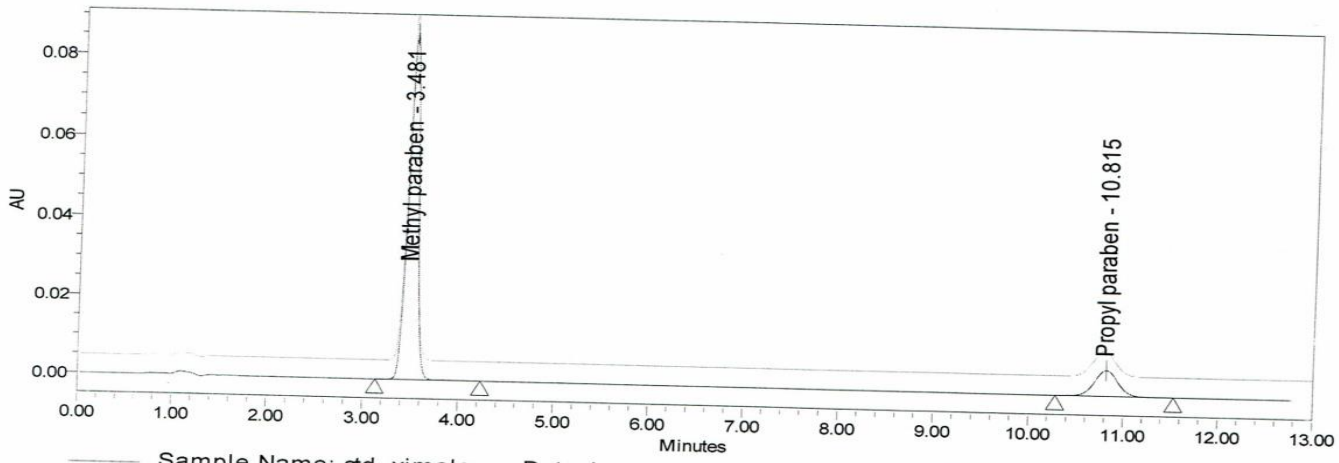
	Sample Name	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)
1	ECH 4 prép à 0 % propyl	5	2	Propyl paraben	16.726
2	ECH 4 prép à 0 % propyl	5	1	Propyl paraben	16.726
Mean					16.726
Std. Dev.					0.000
% RSD					0.00

Résultats de la dosage des parabène par HPLC à J30 en défirent concentration et température

J30

Empower 3 SOFTWARE

Peak Summary Report



Sample Name: std ximalex ; Date Acquired: 02-Aug-20 13:43:36 CET; Vial: 1; Injection: 2
Sample Name: std ximalex ; Date Acquired: 02-Aug-20 13:59:33 CET; Vial: 1; Injection: 1

Peak Summary with Statistics
Name: Methyl paraben

	Sample Name	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height
1	std ximalex	1	2	Methyl paraben	3.481	644186	85.42	86745
2	std ximalex	1	1	Methyl paraben	3.476	643469	85.39	86598
Mean					3.478	643827.2		
Std. Dev.					0.003			
% RSD					0.10	0.1		

Peak Summary with Statistics
Name: Propyl paraben

	Sample Name	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height
1	std ximalex	1	2	Propyl paraben	10.815	109987	14.58	6442
2	std ximalex	1	1	Propyl paraben	10.792	110110	14.61	6454
Mean					10.803	110048.3		
Std. Dev.					0.017			
% RSD					0.16	0.1		

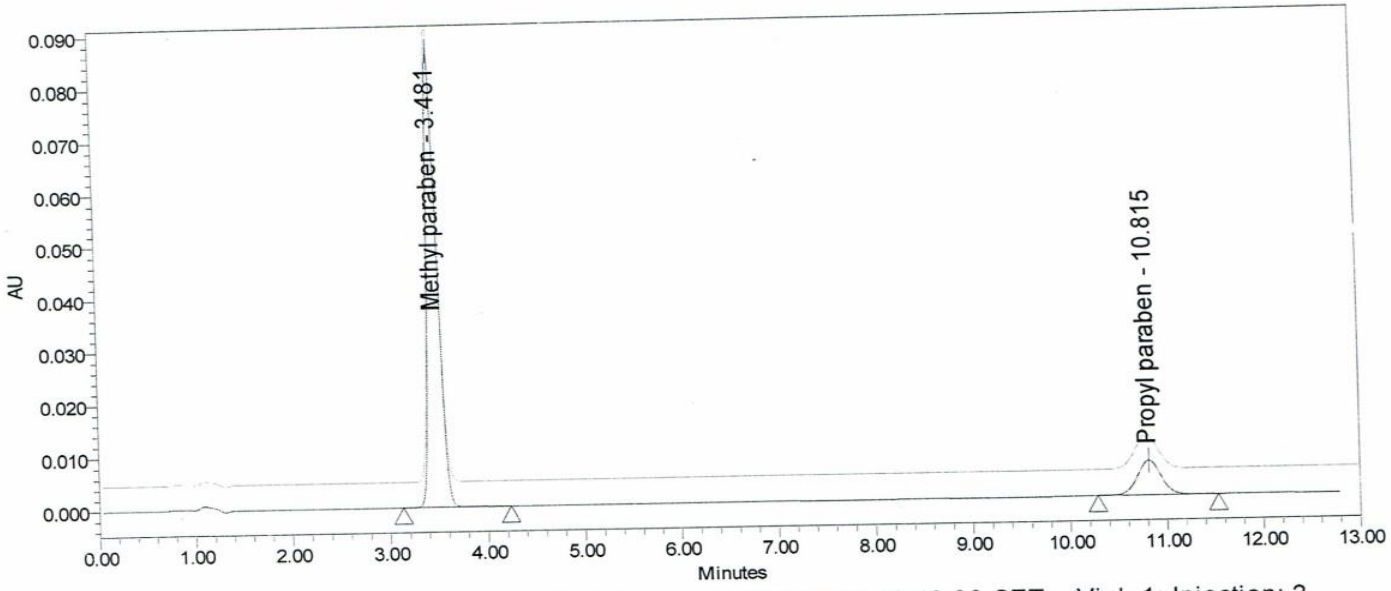
Reported by User: System
Report Method: Peak Summary Report
Report Method ID: 1355
Page: 1 of 1

Project Name: C\BELATRACHE\XIMALEX\02 08 2020
Date Printed:
03-Aug-20
09:10:31 Africa/Algiers

J30

Empower 3 SOFTWARE

Peak Summary Report



Sample Name: std ximalex ; Date Acquired: 02-Aug-20 13:43:36 CET; Vial: 1; Injection: 2
Sample Name: std ximalex ; Date Acquired: 02-Aug-20 13:59:33 CET; Vial: 1; Injection: 1

Peak Summary with Statistics
Name: Methyl paraben

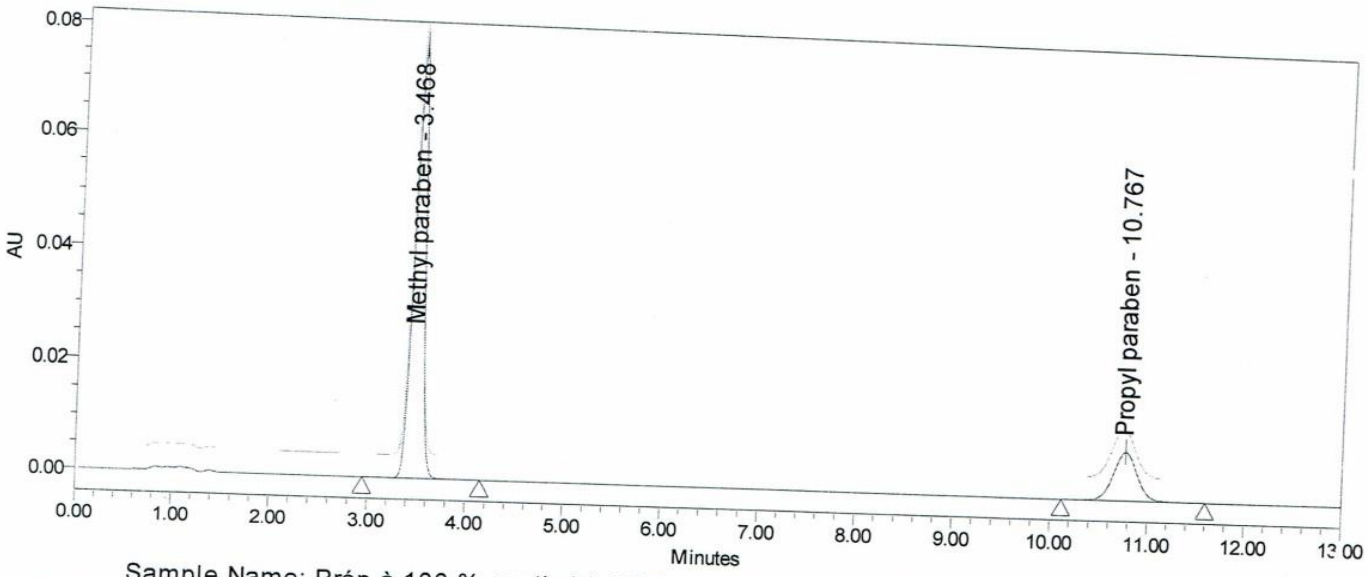
	Sample Name	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height
1	std ximalex	1	1	Methyl paraben	3.476	643469	85.39	86598
2	std ximalex	1	2	Methyl paraben	3.481	644186	85.42	86745
Mean					3.478	643827.2		
Std. Dev.					0.003			
% RSD					0.10	0.1		

Peak Summary with Statistics
Name: Propyl paraben

	Sample Name	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height
1	std ximalex	1	1	Propyl paraben	10.792	110110	14.61	6454
2	std ximalex	1	2	Propyl paraben	10.815	109987	14.58	6442
Mean					10.803	110048.3		
Std. Dev.					0.017			
% RSD					0.16	0.1		

Empower™ 3 SOFTWARE

Peak Summary Report



Sample Name: Prép à 100 % methyl à 25°C; Date Acquired: 02-Aug-20 14:13:31 CET; Vial: 2; Injection: 1

Sample Name: Prép à 100 % methyl à 25°C; Date Acquired: 02-Aug-20 14:27:29 CET; Vial: 2; Injection: 2

Peak Summary with Statistics
Name: Methyl paraben

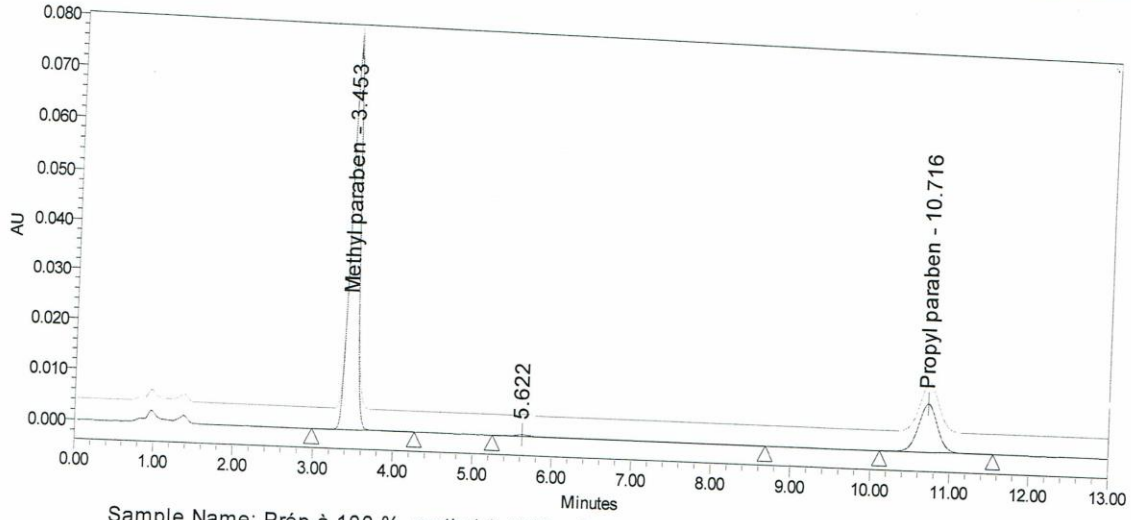
	Sample Name	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height
1	Prép à 100 % methyl à 25°C	2	2	Methyl paraben	3.461	584640	78.84	78124
2	Prép à 100 % methyl à 25°C	2	1	Methyl paraben	3.468	583574	78.88	78093
Mean					3.465	584106.7		
Std. Dev.					0.005			
% RSD					0.14	0.1		

Peak Summary with Statistics
Name: Propyl paraben

	Sample Name	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height
1	Prép à 100 % methyl à 25°C	2	2	Propyl paraben	10.744	156874	21.16	9220
2	Prép à 100 % methyl à 25°C	2	1	Propyl paraben	10.767	156231	21.12	9171
Mean					10.755	156552.6		
Std. Dev.					0.016			
% RSD					0.15	0.3		

Empower 3 SOFTWARE

Peak Summary Report



Sample Name: Prép à 100 % methyl à 40°C; Date Acquired: 02-Aug-20 15:08:38 CET; Vial: 4; Injection: 1
Sample Name: Prép à 100 % methyl à 40°C; Date Acquired: 02-Aug-20 15:22:19 CET; Vial: 4; Injection: 2

Peak Summary with Statistics
Name: Methyl paraben

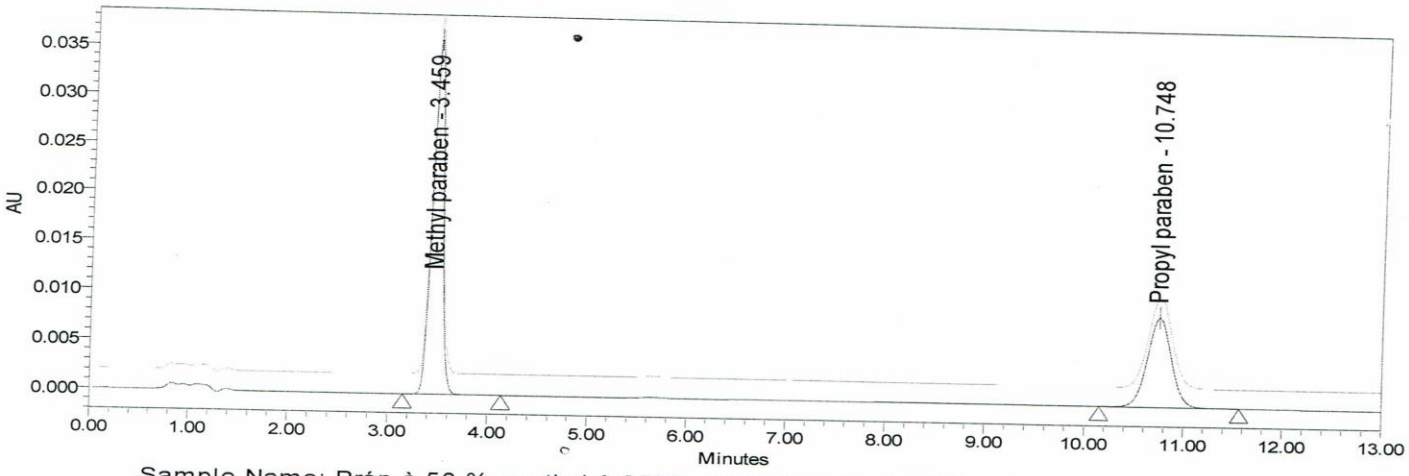
	Sample Name	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height
1	Prép à 100 % methyl à 40°C	4	1	Methyl paraben	3.453	569138	76.88	76489
2	Prép à 100 % methyl à 40°C	4	2	Methyl paraben	3.454	568072	76.88	76255
Mean					3.454	568604.9		
Std. Dev.					0.001			
% RSD					0.03	0.1		

Peak Summary with Statistics
Name: Propyl paraben

	Sample Name	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height
1	Prép à 100 % methyl à 40°C	4	2	Propyl paraben	10.728	166502	22.53	9767
2	Prép à 100 % methyl à 40°C	4	1	Propyl paraben	10.716	165401	22.34	9759
Mean					10.722	165951.7		
Std. Dev.					0.008			
% RSD					0.08	0.5		

Empower™ 3 SOFTWARE

Peak Summary Report



Sample Name: Prép à 50 % methyl à 25°C; Date Acquired: 02-Aug-20 15:45:18 CET; Vial: 5; Injection: 1

Sample Name: Prép à 50 % methyl à 25°C; Date Acquired: 02-Aug-20 15:59:01 CET; Vial: 5; Injection: 2

Peak Summary with Statistics
Name: Methyl paraben

	Sample Name	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height
1	Prép à 50 % methyl à 25°C	5	2	Methyl paraben	3.462	274742	63.64	36786
2	Prép à 50 % methyl à 25°C	5	1	Methyl paraben	3.459	272460	63.60	36467
Mean					3.460	273600.9		
Std. Dev.					0.002			
% RSD					0.06	0.6		

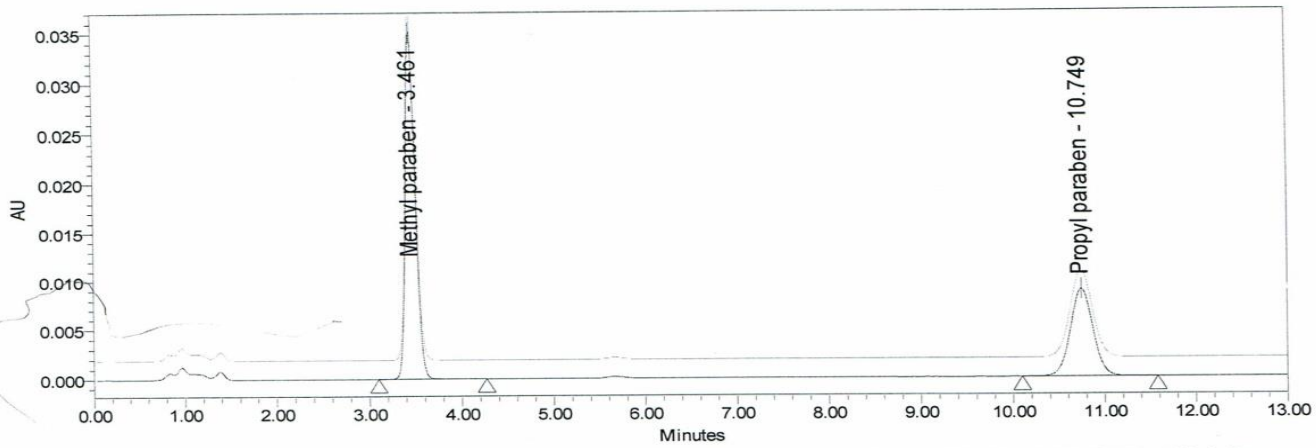
Peak Summary with Statistics
Name: Propyl paraben

	Sample Name	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height
1	Prép à 50 % methyl à 25°C	5	2	Propyl paraben	10.754	156961	36.36	9233
2	Prép à 50 % methyl à 25°C	5	1	Propyl paraben	10.748	155931	36.40	9171
Mean					10.751	156445.8		
Std. Dev.					0.004			
% RSD					0.03	0.5		

J30

Empower 3 SOFTWARE

Peak Summary Report



Sample Name: Prép à 50 % methyl à 40°C; Date Acquired: 02-Aug-20 16:40:08 CET; Vial: 7; Injection: 1
Sample Name: Prép à 50 % methyl à 40°C; Date Acquired: 02-Aug-20 16:53:49 CET; Vial: 7; Injection: 2

Peak Summary with Statistics
Name: Methyl paraben

	Sample Name	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height
1	Prép à 50 % methyl à 40°C	7	2	Methyl paraben	3.460	265121	63.44	35433
2	Prép à 50 % methyl à 40°C	7	1	Methyl paraben	3.461	264224	63.53	35314
Mean					3.461	264672.8		
Std. Dev.					0.000			
% RSD					0.01	0.2		

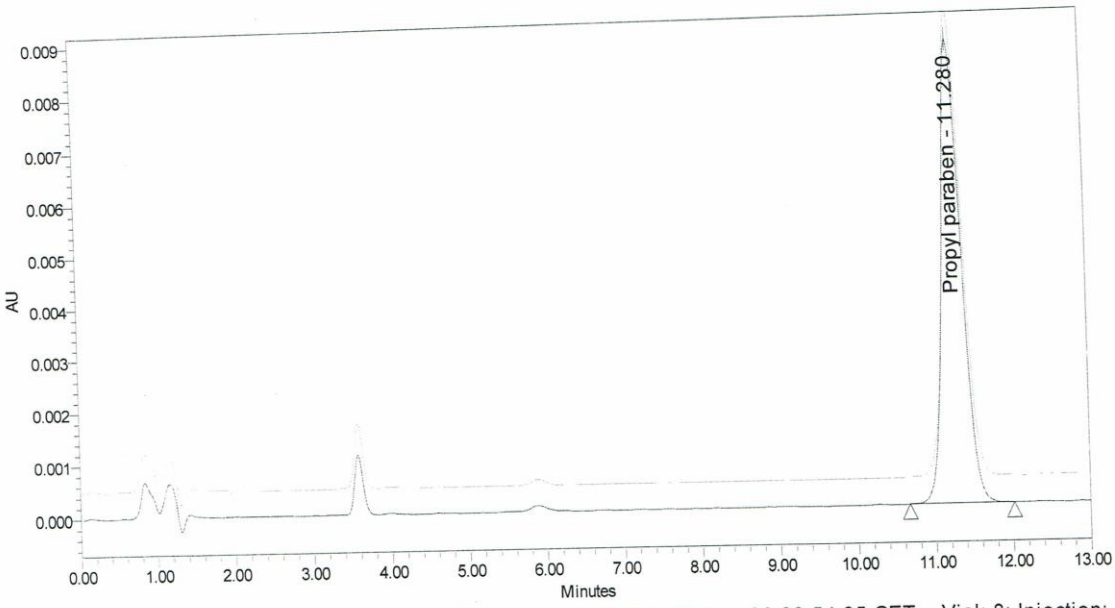
Peak Summary with Statistics
Name: Propyl paraben

	Sample Name	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height
1	Prép à 50 % methyl à 40°C	7	2	Propyl paraben	10.746	152779	36.56	8973
2	Prép à 50 % methyl à 40°C	7	1	Propyl paraben	10.749	151682	36.47	8938
Mean					10.747	152230.0		
Std. Dev.					0.002			
% RSD					0.02	0.5		

J30

Empower 3 SOFTWARE

Peak Summary Report



Sample Name: Prép à 0 % methyl à 25°C; Date Acquired: 02-Aug-20 23:54:05 CET; Vial: 8; Injection: 1

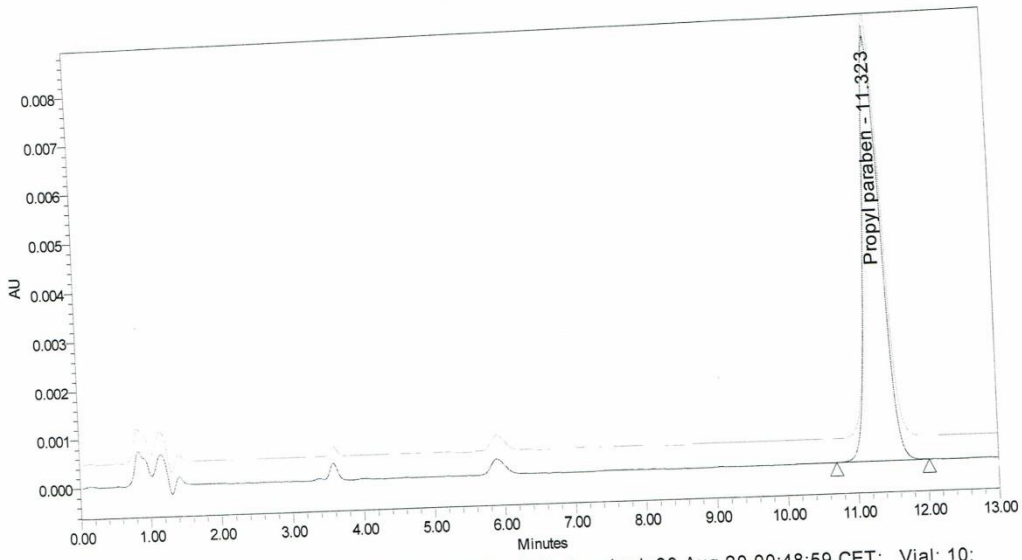
Sample Name: Prép à 0 % methyl à 25°C; Date Acquired: 03-Aug-20 00:07:46 CET; Vial: 8; Injection: 2

Peak Summary with Statistics
Name: Propyl paraben

	Sample Name	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height
1	Prép à 0 % methyl à 25°C	8	1	Propyl paraben	11.280	155682	100.00	8670
2	Prép à 0 % methyl à 25°C	8	2	Propyl paraben	11.291	156776	100.00	8733
Mean					11.285	156229.1		
Std. Dev.					0.007			
% RSD					0.06	0.5		

Empower 3 SOFTWARE

Peak Summary Report



Sample Name: Prép à 0 % methyl à 40°C; Date Acquired: 03-Aug-20 00:48:59 CET; Vial: 10; Injection: 1

Sample Name: Prép à 0 % methyl à 40°C; Date Acquired: 03-Aug-20 01:02:40 CET; Vial: 10; Injection: 2

Peak Summary with Statistics
Name: Propyl paraben

	Sample Name	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height
1	Prép à 0 % methyl à 40°C	10	1	Propyl paraben	11.323	152901	100.00	8485
2	Prép à 0 % methyl à 40°C	10	2	Propyl paraben	11.335	152454	100.00	8445
Mean					11.329	152677.3		
Std. Dev.					0.009			
% RSD					0.08	0.2		

Reported by User: System
Report Method: Peak Summary Report
Report Method ID: 1355
Page: 1 of 1

Project Name: CI\BELATRACHE\XIMALEX\02 08 2020
Date Printed: 03-Aug-20 09:07:23 Africa/Algiers