REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieure et de la Recherche Scientifique

Université de Yahia FARES de Médéa

Faculté de Technologie

Département de Génie des Procédés et Environnement

MEMOIR DE FIN D'ETUDE

Projet de fin d'études En vue de l'obtention du diplôme Master 2

Spécialité : Génie des Procédés Pharmaceutiques

Thème

Etude comparative de deux méthodes de stérilisation d'une solution injectable Clofenal 75mg/3ml

Réalisé par :

-Melle : BENTALEB Wardia

-Melle : BOUKRIF Salma

Promoteur :

-Dr. NEDJHIOUI. Mohammed

Co-promoteur

-Mr. DOUAKH .Othmane

Année universitaire 2019 -2020

Dédicace

Avec un énorme plaisir, un cœur ouvert et une immense joie je dédie ce travail

A mes très chers parents, sans eux je n'aurai jamais pu être ce que je suis

A Ma chère mère,

Ma perle précieuse qui ne cesse de prier pour moi et qui m'a été toujours source de volonté dans mon parcours d'études, chez qui j'ai toujours trouvé un cœur plein de tendresse.

A Mon cher père,

Mon exemple idéal dans la vie qui m'a aidé à prendre le meilleur chemin et qui m'a apporté le soutien moral et financier pour assurer mon bien être, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir.

sans vos sacrifices et votre affection je ne pourrais arriver jusqu'aux bout, J'espère avoir répondu aux espoirs que vous avez fondus Pour moi et que vous serez toujours fière de moi. Que dieu vous prête longue vie et bonne santé.

A mon cher frère HAKIM

Pour votre soutien et vos encouragements qui me donnent la force pour continuer, que dieu vous protège et vous procure bonne santé et longue vie pleine de bonheur et de réussite.

A mes chères et adorables sœurs SAMIA et NORA

Qui étaient l'exemple de la bonne humeur et du courage extraordinaire .Pour les liens solides et intimes qui nous unissent, je vous souhaite un avenir plein de succès et de bonheur.

A mon adorable amie et binôme SALMA

Qui a été pour moi la sœur qui m'a accompagné durant toutes les années universitaires, et a toute sa famille

A tous qui m'ont nourri de leur amour et de leur tendresse.

WARDIA

Dédicace

Du profond de mon cœur, je dédie ce Modest travail à tous ceux qui me sont chers,

A Ma chère mère,

A la lumière de ma vie, tous les mots du monde ne sauraient exprimer la profonde gratitude et l'immense amour que je te porte, c'est les sacrifices que tu n'as jamais cessé de convertir pour mon instruction et mon bien-être qui m'a permis de vivre ce jour,
Que le bon Dieu vous bénir et vous prête longue vie et bonne santé.

A la mémoire de mon père

J'espère que ; du monde qui est sien maintenant, il apprécie cet humble geste comme preuve de reconnaissance de la part d'une fille qui a toujours prié pour le salut de son âme .Puisse Dieu, le tout puissant, l'avoir en sa sainte miséricorde !

A mon cher frère MOUSSA

Mon très cher frère présent dans tous mes moments d'examens par son soutien moral et ses belles surprises Je te souhaite un avenir radieux plein de joie, de bonheur, de réussite et de sérénité.

A mes très chères sœurs ADILA, HAMIDA et DINIA et leurs maris HAMZA, SAÏD, et SOFIANE

En témoignage de l'attachement, de l'amour et de l'affection que je porte pour vous,
Je vous souhaite un avenir plein de joie, de bonheur de réussite et de sérénité.

A mes neveux AKSIL et MOMOUH
et A Mes nièces ANIA et LINA

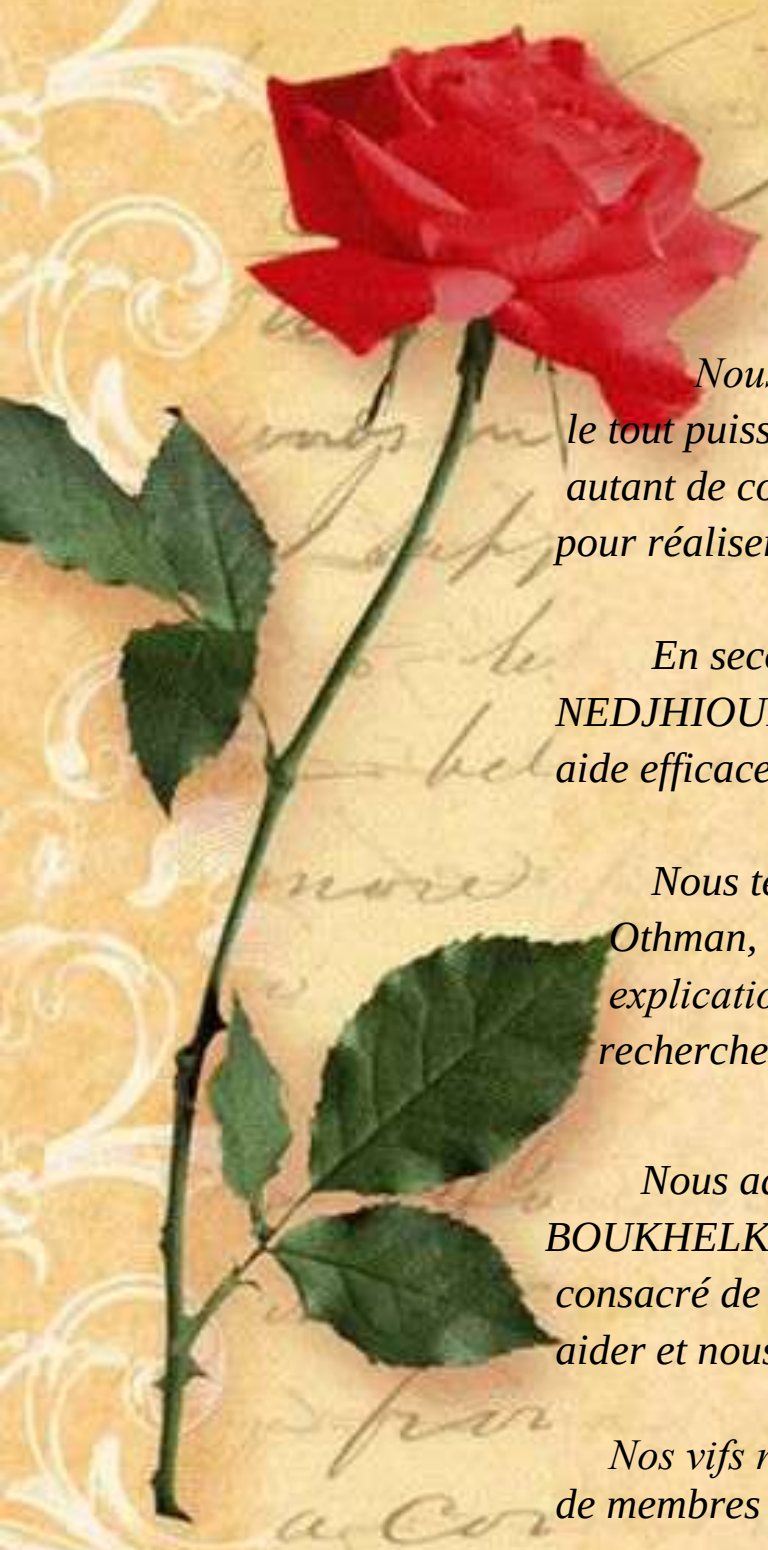
les anges de la famille auxquels je souhaite tout le bonheur du monde.

A mon adorable amie et binôme WARDIA

Qui a été pour moi la sœur qui m'a accompagné durant toutes les années universitaires, et a toute sa famille

A tous ceux qui ont cru en moi.

SALMA



Remerciement

Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné autant de courage, de volonté, de santé et de patience pour réaliser ce Modeste travail.

En second lieu, Nous tenons à remercier Mr NEDJHIOUI Mohammed notre promoteur, pour son aide efficace et ses conseils judicieux.

Nous tenons à remercier également Mr DOUAKH Othman, l'encadreur industriel pour ses bonnes explications qu'ils ont éclairé le chemin de la recherche.

Nous adressons nos sincères remerciements à Mr BOUKHELKHAL Hamide de nous avoir assisté et qui a consacré de son temps et de son énergie pour nous aider et nous orienter.

Nos vifs remerciements vont également à l'ensemble de membres du jury

Un très grand merci à nos chers parents pour leurs innombrables sacrifices

Enfin, nous voudrions remercier tous ceux qui ont contribué, de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

MERCI !

Résumé :

Le médicament, dans l'industrie pharmaceutique doit répondre à certaines exigences dont la qualité, l'efficacité et la sécurité afin d'améliorer la santé du patient.
Les injectables sont issus d'une production qui fait l'objet d'une attention particulière tout au long du process de fabrication afin de garantir leur stérilité.

Dans notre travail, nous avons choisi un médicament de forte consommation notamment dans l'automédication : le Clofenal solution injectable qui appartient à la classe thérapeutique des anti-inflammatoires.

L'objectif de cette étude consiste en la stérilisation d'une solution injectable Clofenal 75 mg/ 3ml par deux méthodes : la stérilisation par la chaleur humide (autoclave) et la filtration stérilisante. Après stérilisation on fait un dosage des deux solutions obtenues par HPLC pour valider la méthode efficace qui permet d'atteindre l'état stérile sans dégradation de la molécule.

Mots clés :
Médicament, Les injectables, process de fabrication, Clofenal 75 mg/ 3ml, solution injectable, anti-inflammatoires, HPLC, stérilisation, autoclave, filtration stérilisante**,** dégradation.

Abstract:

The drug in the pharmaceutical industry must meet certain requirements including quality, efficacy and safety in order to improve patient health.

The injectables come from a production that is the subject of special attention throughout the manufacturing process in order to guarantee their sterility.

In our work, we chose a drug of high consumption, particularly in self-medication: Clofenal injectable solution, which belongs to anti-inflammatory therapeutic class.

The objective of this study is to sterilize Clofenal 75 mg / 3 ml injectable solution by two methods: moist heat sterilization (autoclave) and sterilizing filtration. After sterilization, the two solutions obtained are assayed by HPLC to validate the effective method, which makes it possible to achieve the sterile state without degradation of the molecule.

Keywords:

Medicines, Injectables , Manufacturing process, Clofenal 75 mg / 3ml, Injectable solution, Anti-inflammatory drugs, HPLC, Sterilization, Autoclave, Sterilizing filtration, Degradation

ملخص:

في صناعة الأدوية ’الدواء يجب ان يتوفر على مميزات معينة بما في ذلك الجودة و الفعالية و السلامة من اجل تحسين صحة المريض.
إنتاج الحقن يحظى باهتمام خاص طوال عملية التصنيع لضمان تعقيمها.
في عملنا هذا اخترنا دواء ذا استهلاك مرتفع لاسيما في التطبيب الذاتي :محلول كلوفنال للحقن الذي ينتمي إلى الفئة العلاجية مضادات الالتهاب.

الهدف من هذه الدراسة هو تعقيم محلول كلوفنال 75ملغ/3مل للحقن بطريقتين: التعقيم بالحرارة الرطبة (الاوتوكلاف) و الترشيح المعقم،يتم اختبار المحلولين المتحصل عليهما بواسطة تقنية ال للتحقق من الطريقة الفعالة التي يمكن ان تحقق حالة التعقيم دون تدهورا لجزيء.

الكلمات المفتاحية:

الادوية’الحقن ’ عملية الصنيع ’كلوفنال 75ملغ/3مل’محلول الحقن ’ مضادات الالتهاب’ التعقيم’ اوتوكلاف’ الترشيح المعقم’ تدهورا لجزيء.

Table des matières

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Glossaire

Introduction générale

Chapitre 01 : Revue Bibliographique

Section I : Généralité sur les médicaments et les préparations injectables

I.1. Définition du médicament 22

I.2. Composition d'un médicament 23

I.2.1. Principe actif 23

I.2.2 Excipients 24

I.2.3. Le récipient 25

I.3. Dénomination du médicament 26

I.3.1. Le nom chimique 26

I.3.2. Dénomination commune internationale (DCI) 26

I.3.3. Nom commercial ou non protégé ou nom de marque 27

I.4. L'origine des médicaments 27

I.4.1. Origine naturelle 27

I.4.2. Médicament d'origine synthétique 29

I.4.3. Médicaments d'origine microbiologique 30

I.4.4. Médicaments d'origine biotechnologique 30

I.5. Classification des médicaments 31

I.5.1. Les classifications utilisées en médecine 31

I.5.2. Classification selon les modes d'achats 32

I.5.3. Classification selon le brevet 32

I.6. Les formes pharmaceutiques et voies d'administration des médicaments 32

I.6.1. Les formes pharmaceutiques 32

I.6.2. Voies d'administration du médicament 33

I.7. Les formes pharmaceutiques destinées à la voie parentérale 34

I.7.1.Définition 35
I.7.2.Propriétés des préparations injectables 36
I.7.3.Les avantages et les inconvénients de la voie parentérale 37
I.7.4.Récipients utilisées 33

Section II : Les anti-inflammatoire

II.1. Définition 38
II.2. Types des anti-inflammatoires 38
II.3. But de l'utilisation des anti-inflammatoires 40

Section III : La stérilité des préparations parentérales

III.1. Définition 40
III.2. Les procédés de stérilisation 41
III.2.1. Stérilisation par la chaleur 41
III.2.2. Stérilisation par les rayonnements 47
III.2.3. Stérilisation par les gaz 49
III.2.4. Stérilisation par filtration 52

Section IV. Présentation et procédé de fabrication du CLOFENAL®

IV.1. Forme et présentation 58
IV.2. Composition 59
IV.2.1. principe actif 59
IV.2.2. Excipients 58
IV.3 Propriétés 63
IV.4 Propriétés pharmacologiques 65
IV.4.1. Propriétés pharmacodynamiques 65
IV.4.2 Propriétés pharmacocinétiques 66
IV.5 Procédé de fabrication de Clofenal (75mg/3ml) 67
IV.6 Contrôle de qualité de Clofenal 69
IV.5.1 Physico-chimique 69
IV.5.2 Stérilité 69
IV.5.3 Toxicologique 69

Chapitre 02 : Etude expérimentale

I. Introduction 71
II. Objectif 71

III. Matériels et méthodes 71

III.1 Matériels et Réactifs 71

III.1.1 Matériels 68

III.1.2 Réactifs 72

III.2.Méthodes 73

III.2.1 La filtration stérilisante 73

III.2.1.1 Définition 73

III.2.1.2 Principe 73

III.2.1.3 Mode opératoire 73

III.2.2-Stérilisation par chaleur humide (autoclave).....81

III.2.2.1 Définition 81

III.2.2.2. principe 81

III.2.2.3 Mode opératoire 81

III.2.3 Dosage de principe actif dans le produit fini par HPLC 85

III.2.3.1 Définition.....85

III.2.3.2 Principe 85

III.2.3.3 Appareillage.....85

III.2.3.4 Identification et quantification de principe actif (Diclofenac) dans le produit finis (Clofenal) par HPLC 88

Conclusion

Référence Bibliographiques

Liste des abréviations

AINS : Anti-**i**nflammatoires **N**on **S**téroïdiens

AIS : Anti-**i**nflammatoires **S**téroïdiens

AMP : Ampoule

ATNC : Agent **T**ransmissible **N**on Conventionnel

BPF : Bonnes **P**ratiques de **F**abrication

BPP : Bonnes **P**ratiques de **P**réparation

CO^{60} : Cobalt 60

COX : Cyclo**ox**ygénase

CP : Comprimé

DCI : Dénomination **C**ommune **I**nternationale

DL50 : Dose **L**étale

EPPI : Eau Pour **P**réparation **I**njectable

HEPA: High **E**fficiency **P**articulate **A**ir filter

HPLC: Hight **P**erformance **L**iquid **C**hromatography

IL: Inter**l**eukines

IM : Intra**m**usculaire

IUPAC: International **U**nion of **P**ure and **A**pplied **C**hemistry

IV : Intra**v**eineuse

LAL : Lysat d'**A**moebocytes de **L**imule

NAS : Niveau d'**A**ssurance de **S**térilité

OMS : Organisation **M**ondiale de la **S**anté

O. R. L : Oto-**r**hino-**l**aryngologique

OTC: Over **T**he **C**ounter

P.A: Principe **A**ctif

SC : Sous **c**utané

THIO: Thioglycolate

T REF: Temperature de **r**eference

ST: Soja **T**rypticase

STD: Standard

SUPPOS : Suppositoire

UFC : Unité **F**ormant **C**olonie

ZAC : Zone **à A**tmosphère **C**ontrôlée

Liste des figures

Chapitre I : Revue Bibliographique

Figure I.1 : Les différents types de médicaments 22
Figure I.2 : Mise en forme d'un médicament 23
Figure I.3 : Présentation du nom commercial et DCI d'un médicament 27
Figure I.4 : Extraction de la morphine 28
Figure I.5 : Processus de fabrication d'un vaccin 30
Figure I.6 : Production de l'insuline par génie génétique 31
Figure I.7 : Exemple d'une préparation injectable 36
FigureI.8 : Sites d'action des anti-inflammatoires stéroïdiens et non stéroïdiens..... 40
Figure I.9 : Courbe de survie des microorganismes à un traitement thermique de durée « D » 42
Figure I.10 : Destruction des spores de Clostridium Botilinum par la chaleur ..44
Figure I.11 : Schéma et photo d'un autoclave 45
Figure I.12 : Stérilisateur poupinel 47
Figure I.13 : Stérilisateur UV 48
Figure I.14 : Stérilisateur par rayonnement gamma alimenté par du Co60 49
Figure I.15 : Stérilisateur médical à l'oxyde d'éthylène 51
Figure I.16 : Représentation plane et 3D de l'acide paracétique 52
Figure I.17 : Types des filtres stérilisants 53
Figure I.18 : Membrane filtrante 54
Figure I.19 : Mécanisme de la filtration stérilisante 54
Figure I.20 : Manipulateur sous flux d'air laminaire vertical 57
Figure I.21 : Schéma d'une enceinte stérile 58
Figure I.22 : CLOFENAL 75mg/3ml 58
FigureI. 23 : La structure de Diclofénac 59

Chapitre II : Etude Expérimentale

Figure II.1 : Installation de filtration stérilisante de Clofenal 75

Figure II.2 : Méthode d'ensemencement des germes 77

Figure II.3 : Contrôle de fertilité des milieux de culture 79

FigureII.4 : Exemple d'un diagramme d'enregistrement d'un cycle de stérilisation par autoclave 84

Figure II.5 : Exemple d'un indicateur de passage 84

Figure II.6 : Schéma d'une chaine HPLC 88

Figure II.7 : Appareil HPLC.....89

Liste des tableaux

Chapitre I : Revue Bibliographique

Tableau I.1 : Propriétés du principe actif qu'il faut s'efforcer de connaître avant d'aborder une formulation 24

Tableau I.2 : Formes galéniques les plus courantes 33

Tableau I.3 : Voies d'administration du médicament 34

Tableau I.4 : Nombre de survies en fonction de la durée de chauffage 43

Tableau I.5 : Les conditions de référence pour la stérilisation par autoclave 46

Tableau I.6 : Limites recommandées de contamination microbiologique des surfaces suivant les BPF et les BPP 55

Tableau I.7 : Caractéristiques physico –chimiques du Diclofénac 60

Tableau I.8 : Voies d'administration et formes galéniques du Diclofénac 60

Tableau I.9 : Les excipients incorporés dans la fabrication du Clofenal 61

Tableau I.10 : L'effet des excipients.....63

Tableau I.11 : Les propriétés de Clofenal 64

Chapitre II : Etude Expérimentale

T**ableau II.1 :** Contrôle de fertilité des milieux de culture.....78

Tableau II.2 : Contrôle de stérilisation d'un autoclave.....82

Glossaire

- **Acide arachidonique :** Est un acide gras, polyinsaturé oméga-6 à vingt atomes de carbone, libéré par une phospholipase A2. Il peut être le substrat de diverses lipoxygénases qui conduisent à la formation de leucotriènes.

- **Asepsie** : Ensemble de mesures propres à empêcher tout apport exogène de microorganisme

- **Biodisponibilité :** Est la proportion d'une substance qui atteint la circulation sanguine sous forme inchangée. C'est un outil essentiel en pharmacocinétique, car la biodisponibilité doit être prise en considération lors du calcul des doses pour des voies d'administration autres qu'intraveineuse.

- **Caractères organoleptiques :** Caractéristiques d'une substance qui sont perceptibles par les organes des sens : saveur, odeur, aspect et consistance de l'objet

- **Cycle de stérilisation :** Succession automatique d'opérations effectuées dans un stérilisateur dans un but de stérilisation.

- **Cyclo-oxygénase :** Est une enzyme qui permet la formation de prostaglandines à partir de l'acide arachidonique. Son action est inhibée par les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS). Actuellement on connait trois iso enzymes COX : COX-1, COX-2 et COX-3.

- **Indicateur de passage :** Les indicateurs de passage sont des encres thermosensibles de classe 1 selon la norme ISO 11140-1 qui réagissent, uniquement et approximativement, à la température ; ils ne donnent pas d'indication de temps.

- **Milieu de culture :** Est un support qui permet la culture de cellules, de bactéries, de levures, de moisissures afin de permettre leur étude.

- **Un micro-organisme :** Est un organisme vivant, invisible à l'œil nu, qui ne peut être observé qu'à l'aide d'un microscope tel que les bactéries, les virus, les champignons unicellulaires (levures), et les protistes.

- **Niveau d'assurance de la stérilité (NAS) :** Probabilité de présence d'un seul microorganisme viable sur un article après la stérilisation

- **Pharmacocinétique :** Étude du devenir des médicaments dans l'organisme. Elle comprend quatre grandes étapes *: absorption (A) ; distribution (D) ; métabolisme (M) ; excrétion du principe actif et de ses métabolites (E).*

- **Pharmacodynamique :** Décrit les effets qu'un principe actif produit sur l'organisme : c'est l'étude détaillée de l'interaction entre la substance active et sa cible

- **Prostaglandine :** Substance dérivé des acides gras, ayant une structure chimique commune produite par l'organisme et servent de médiateur dans un très grand nombre de phénomènes physiologiques et pathologiques.

- **Sport** : Forme de résistance propre à certaines bactéries permettant de conserver, dans des conditions hautement défavorables, les propriétés d'origine et de redonner une bactérie identique à celle dont elle est issue.

- **Suc gastrique :** Un liquide acide sécrété par les glandes de la paroi gastrique. Sa sécrétion et sa composition sont variables dans les 24 heures : faible débit et faible acidité libre (H^+) loin des repas, fort débit et pH 1,0 lors de la digestion.

- **Voie O.R.L :** Une voie oto-rhino-laryngologique ou voie ORL est une voie d'administration de médicaments au niveau oto-rhino-laryngologique, c'est-à-dire au niveau de l'oreille, du nez ou du larynx.

Introduction Générale

Avant, l'être humain a utilisé des plantes, des minéraux ou des glandes animales comme remède. Ces substances naturelles avec l'apparition des maladies graves sont devenues inefficaces, ce qui a permis l'évolution des nouveaux médicaments d'origine, de formes et de spécificités différentes.

Plusieurs types de médicaments ont été produit jusqu'à maintenant, et des recherches se font pour répondre aux situations de résistance à une molécule donnée ou une maladie ou infection nouvelle. Parmi toute la panoplie de médicaments connus et ayant prouvé leur efficacité thérapeutique, figurent les anti-inflammatoires non stéroïdien (AINS) qui sont largement utilisés, que ce soit dans le contexte de la prescription médicale ou de l'automédication. Leurs propriétés antalgiques, anti-inflammatoires et antipyrétiques sont connues depuis la fin du 19eme siècle.

Les AINS se présentent sous différentes formes (comprimés – suppositoires – ampoules…) et la voie injectable permet au patient de recevoir directement la dose complète prescrite, sans dégradation au préalable par les composants du suc digestif.

La très forte consommation de ces types d'anti-inflammatoires nous a orientés vers l'étude d'un médicament qui appartient à cette classe, utilisé sous forme d'une préparation injectable qui doit être stérile ; c'est : le Clofenal solution injectable

La fabrication des préparations pharmaceutiques parentérales nécessite un Contrôles de qualité microbiologiques incluant un test de stérilité sur chacun des lots afin d'assurer une qualité ultérieure optimale car Pour ces préparations, les pharmacopées internationales demandent une stérilité complète.

La stérilisation est un procédé utilisé pour obtenir un produit stérile, c'est-à-dire, exempt de microorganismes viables, repose sur une méthode efficace vis-à-vis de tous les microorganismes, sans altération du matériel ou produit à stériliser. Afin d'éliminer ces micro-organismes et assurer un produit stérile, différentes méthodes de stérilisation sont définies par la Pharmacopée Européenne : Stérilisation par la chaleur (sèche ou humide), par irradiation, par la voie chimique et la stérilisation par filtration

Quelle est la méthode fiable et efficace pour stériliser le CLOFENAL® 75mg/3ml injectable ?

Comment peut-on atteindre et prouver sa stérilité ?

Pour réussir à répondre à cette problématique Nous essayons dans notre modeste travail d'étudier ce médicament(Clofenal) dans le cadre de stérilité en suivant deux méthode de stérilisation : la stérilisation par filtration et par autoclave, et de faire une comparaison de ces deux méthodes.

Notre travail est divisé en deux chapitres :

- Le premier chapitre est une revue bibliographique subdivisé en quatre sections. La première section traite des généralités sur les médicaments et les préparations parentérales. La deuxième représente les types des anti-inflammatoire et leur mécanisme d'actions. la troisième aborde les procédés de stérilisation des préparations injectables. enfin, la dernière section est consacrée à la présentation de notre produit Clofenal solution injectable et son processus de fabrication.
- Le deuxième chapitre c'est l'étude expérimentale représente les produits et le matériels utilisés ainsi que les méthodes suivies.

On termine ce travail par une conclusion.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE



Section I : généralité sur les médicaments et les préparations injectables

Dans cette section, il sera question de présenter quelques notions de base sur les médicaments (définition, composition, origine...) et les préparations injectables.

I.1. Définition du médicament

Un médicament c'est toute substance utilisée pour prévenir, atténuer, ou guérir une maladie ou ses symptômes. **(1)**

Le médicament est définie par l'organisation mondiale de la santé (OMS) par : « On entend par médicament toute substance ou composition présente comme possédant des propretés curative ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales, ainsi que toute substance ou composition pouvant être utilisé chez l'homme ou chez l'animal ou pouvant leur être administré , en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, corriger ou modifier leurs fonctions physiologiques en exerçant une action pharmacologique ,immunologique ou métabolique ».

On peut distinguer différents types de médicaments selon leurs utilisations, leurs composants, leur mode d'enregistrement réglementaire, etc. **(2)**



Figure I.1 : Les différents types de médicaments **(2)**

I.2. Composition d'un médicament

Un médicament se compose d'un ou plusieurs principes actifs et d'excipients. L'ensemble étant contenu dans un récipient. **(3)**

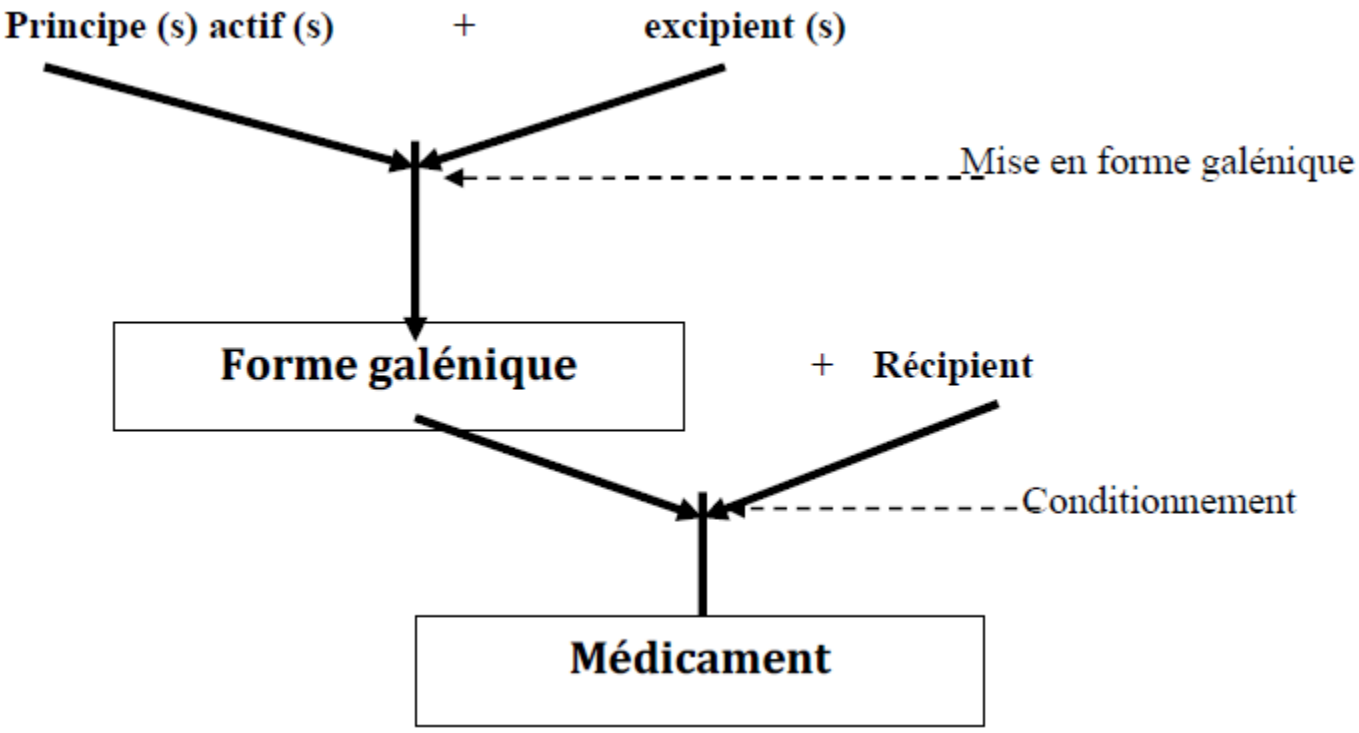


Figure I.2 : Mise en forme d'un médicament **(3)**

I.2.1. Principe actif

Le principe actif d'un médicament est une substance d'origine chimique ou naturelle caractérisée par un mécanisme d'action curatif ou préventif précis dans l'organisme**. (4)**

Il représente la partie active (substance active) responsable de l'activité pharmacologique. Cette molécule va agir dans le corps pour y apporter le soin et le soulagement attendus et est donc à la base de l'effet thérapeutique. **(5)**

a. Les propriétés physicochimiques

Les propriétés physicochimiques du principe actif et de tout ce qui concerne son devenir dans l'organisme sont présentées dans **(le tableau 01)**

• ***Propriétés physico-chimique***	• ***Devenir dans l'organisme***
✓ Caractères organoleptiques	– Pharmacocinétique :
✓ Propriétés physiques : Solubilité	✓ Répartition
✓ Propriétés chimiques	✓ Biotransformations
• ***Stabilité et incompatibilité***	✓ Élimination
✓ Température	– Activité thérapeutique
✓ Humidité	✓ Lieu
✓ Oxygène	✓ Mécanisme
✓ Lumière	✓ Effets secondaires
✓ Divers	– Biodisponibilités :
	✓ Profil optimal

Tableau I.1 : Propriétés du principe actif qu'il faut s'efforcer de connaître avant d'aborder une formulation **(6)**

b. Les formes de principe actif

Le principe actif peut exister sous plusieurs formes cristallines ou sous la forme de dérivés tels que sels, hydrates... Le choix se fait en fonction du mode d'administration et de considérations de stabilité, de solubilité et de biodisponibilité. **(7)**

I.2.2 Excipients

Un excipient (du latin excipère : recevoir ; l'excipient reçoit le principe actif) est une substance ou un mélange de substances dites auxiliaires, inactives par elles-mêmes sur la maladie, qui facilitent la préparation et l'emploi du médicament. **(8)**

L'excipient peut jouer un rôle important dans la libération du principe actif et modifier son activité thérapeutique.

a. Rôle de l'excipient

Le rôle de l'excipient est :

- de faciliter l'administration des principes actifs
- d'améliorer l'efficacité du principe actif
- d'assurer la stabilité et la conservation du médicament jusqu'à la limite d'utilisation fixée **(9)**

- Son but est de transporter le médicament (véhicule) jusqu'au lieu d'absorption par l'organisme. A l'origine, sa propriété principale était *« **l'inertie »*** :
  - Inertie vis-à-vis du principe actif
  - Inertie vis-à-vis du matériau de conditionnement.
  - Inertie vis-à-vis de l'organisme. **(10)**

b. Les différents types d'excipients

Ils sont classés selon leur fonction et apportent au principe actif les qualités qui lui manquent. Souvent un excipient peut réunir plusieurs propriétés à la fois. On distingue :

- **Les diluants :** Poudres généralement inertes, ils jouent un rôle de remplissage lorsque la quantité de principe actif est insuffisante pour réaliser la forme voulue

- **Les désagrégeant ou les délitants :** Ils accélèrent la désintégration du comprimé en fragments et particules, exposant et dispersant ainsi une certaine quantité du principe actif dans le milieu physiologique (eau et suc gastrique) **(11)**
- **Les liants :** Ils améliorent la cohésion entre les particules et apportent une résistance mécanique suffisante.
- **Les lubrifiants :** Ce sont des agents d'écoulement, des agents antifriction ou anti adhérents.
- **Les colorants et les aromatisants :** Ce sont les substances qui rendent le médicament appétissant et agréable à consommer et elles masquent un goût ou une odeur désagréable. **(12)**
- **Les conservateurs et les stabilisateurs :** Ce sont des substances destinées à empêcher la dégradation chimique ou l'altération microbiologique d'un médicament. **(13)**

I.2.3. Le récipient

Le récipient pour usage pharmaceutique est un article de conditionnement qui contient ou qui est destiné à contenir un produit et qui est ou peut être en contact direct avec celui-ci. La fermeture fait partie du récipient. **(14)**

Le conditionnement donne au médicament son aspect définitif et doit être inerte vis-à-vis du médicament. Il a pour objectifs :

- De protéger le médicament des chocs et de tous les facteurs possibles d'altération (lumière, vapeur d'eau, environnement, souillures diverses ...).
- De rendre facile l'utilisation du médicament par le malade.
- De porter un étiquetage conforme à la législation pour la sécurité du malade. **(15)**

D'après **(Fonteneau et Mathieu) :**

- Le conditionnement unitaire est constamment prioritaire pour empêcher après ouverture la détérioration du principe actif.
- Pour les médicaments sensibles à la lumière, les flacons teintés ou les blisters sombres sont utilisés.
- Pour les semi-solides, les tubes en aluminium sont employés.
- Indiquer sur les emballages les préconisations concernant les conditions de préservation.

Exemple : *produits à conserver au réfrigérateur avant ou après ouverture.* **(16)**

I.3. Dénomination du médicament

Un même médicament peut avoir plusieurs noms différents (au moins trois) :

I.3.1. Le nom chimique

Cette dénomination chimique est élaborée à l'aide de règles de nomenclatures très Strictes étudiées par L'IUPAC et Correspond à la formule chimique de la substance qui compose le médicament. **(17)**

I.3.2. Dénomination commune internationale (DCI)

La DCI Ou le nom générique est attribuée par l'OMS, désigne un médicament dans le monde entier.

Cette dénomination est composée à partir de segments-clés qui renseignent notamment sur l'origine et le mode d'action pharmacologique du produit. **(18)**

I.3.3. Nom commercial ou non protégé ou nom de marque

C'est le nom sous lequel une firme pharmaceutique vend un médicament. Protégé par un brevet, dont la durée est variable selon les pays. Le nom commercial s'écrit toujours avec un ®.

(Le signe ® veut dire : «registré =marque déposée », car ce nom est une propriété commerciale). **(19)**

Exemple :

- Nom de marque : Doliprane
- DCI : Paracétamol
- Nom chimique : Acétaminophéne.



Figure I.3 : Présentation du nom commercial et DCI d'un médicament **(19)**

I.4. L'origine des médicaments

Les médicaments sont préparés à partir de matières premières d'origine diverses.

I.4.1. Origine naturelle

a. Médicaments d'origine végétale

Les P.A. d'origine végétale composent ce qu'on appelle la phytothérapie .comprennent :

- Les plantes entières ou parties de plantes

- Préparations à base de plantes
- Substances chimiques définies et isolées des plantes, obtenues par extraction et purification comme *la morphine, digitaline, la quinine, les essences, les résines*, etc.

La thérapeutique par les plantes ou ***Phytothérapie*** est à l'heure actuelle appréciée par de nombreuses populations qui y voient une manière naturelle et écologique de se traiter. **(20)**

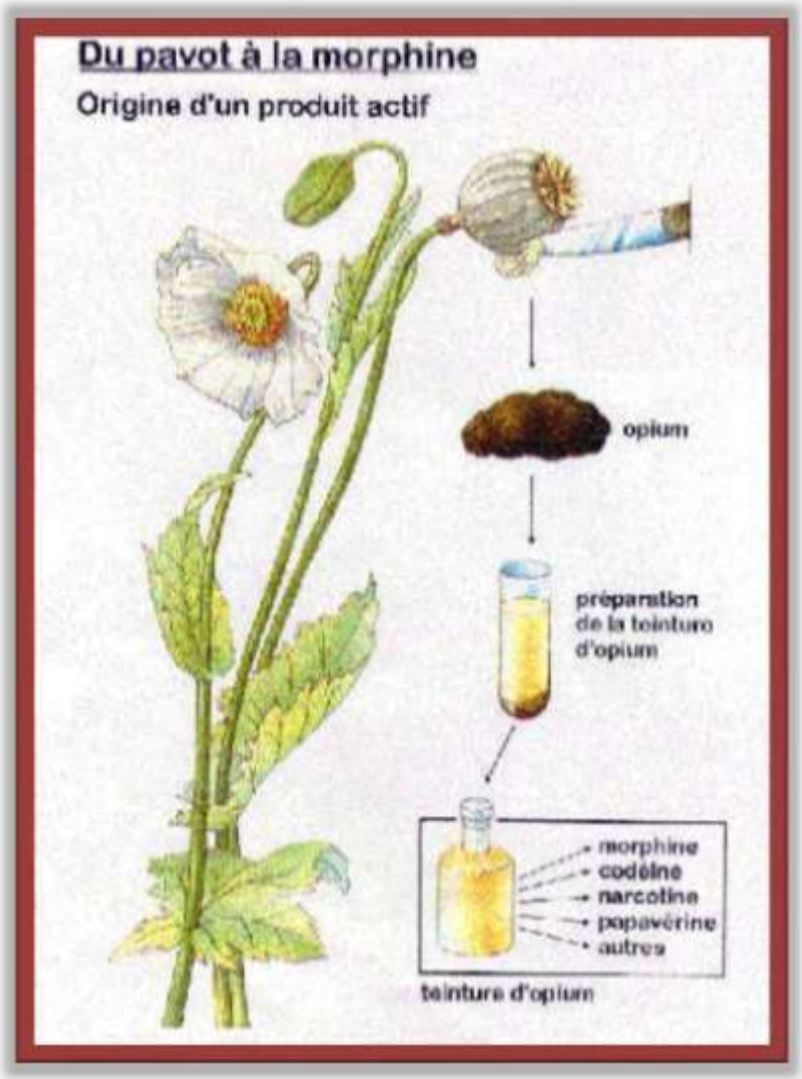


Figure I.4 : Extraction de la morphine

b. Médicaments d'origine animale

L'utilisation d'organes, glandes, tissus humains ou animaux en thérapeutique s'appelle ***l'Opothérapie.*** **(9)**

- Extrait de sang humain .Exemple : *Fibrinogène*
- Hormones polypeptidiques extractives. Exemple : *Insuline*

- Enzymes. Exemple : *Trypsine, Chymotrypsine*
- Substances diverses obtenues par technique de « Génie Génétique ». Exemple : *Interféron, Hormones de croissance.*
- Excipients pharmaceutiques. Exemple : *Lanoline, axonge.*
- Aliments et substituants nutritifs et thérapeutiques. **(21)**

c. médicaments d'origine minérale

L'utilisation des minéraux en thérapeutique est très ancienne ; avant même l'existence de la chimie moderne.

On distingue :

- Les produits naturels purifiés : par exemple, *le soufre, l'eau, l'argile, le talc...*
- Les produits obtenus par réaction de chimie minérale : Par exemple, *sel de bismuth, le bicarbonate de sodium*... **(9)**

I.4.2. Médicaments d'origine synthétique

La chimie organique représente de loin une source indispensable de production des médicaments moderne.

La plupart des médicaments actuellement commercialisé sont d'origine synthétique **(22)** Ces médicaments sont obtenus :

a. Par biosynthèse : le principe actif d'origine biologique est reproduit par synthèse, soit pour des raisons d'économie car il est parfois moins cher de le fabriquer que de l'extraire, soit par sécurité

b. Par hémi synthèse : dans ce cas les substances naturelles existantes sont modifiées chimiquement pour augmenter leur activité et diminuer leurs effets secondaires. Par exemple : les antispasmodiques de synthèse (modification apportée à la molécule d'atropine).

c. Par synthèse totale : Ces principes actifs, créés de manière entièrement synthétique, n'existent pas à l'état naturel. Par exemple : les sulfamides **(9)**

I.4.3. Médicaments d'origine microbiologique :

Certains micro-organismes exploités de manière convenable sécrètent plusieurs substances utilisées en thérapeutique. **(23)**

Par exemple :

- les vaccins sont obtenus à partir des bactéries les antibiotiques (la pénicilline vient d'un champignon : *le penicillium)* **(9)**



Figure I.5 : Processus de fabrication d'un vaccin **(9)**

I.4.4. Médicaments d'origine biotechnologique :

Il s'agit des procédures de synthèse extrêmement conçues faisant intervenir pour l'essentiel des techniques de génie génétique **(24)** . L'objectif est de séparer des cellules vivantes (microorganismes) et de leur faire produire des substances d'intérêt thérapeutique.

- Exemple : l'insuline humaine, hormone de croissance, glucagène ... **(25)**

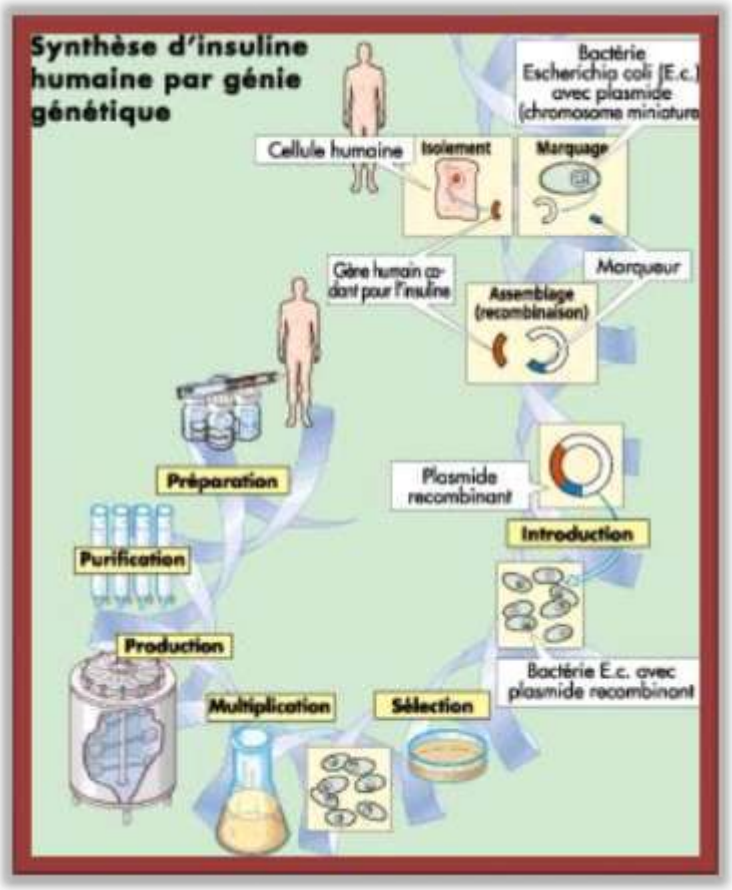


Figure I.6 : Production de l'insuline par génie génétique **(25)**

I.5. classification des médicaments

Il existe plus d'une dizaine de milliers de médicaments. Chaque médicament est utilisé but précis et par des spécialités médicales différentes. Il y a de nombreuses façons de classifier les médicaments. Voici les plus importantes **(26)**

I.5.1. Les classifications utilisées en médecine

a) Classement par DCI (dénomination commune internationale) : Un médicament est classé selon son (ou ses) principes actifs. Ce type de classification permet de retrouver un médicament dans n'importe quel pays du monde et quel que soit le nom de marque qu'il porte. La DCI a servi de base pour de nombreux médicaments génériques.

b) Classement par action thérapeutique : On appelle cela les "Familles pharmaco-thérapeutiques". Par exemple les neuroleptiques, les anxiolytiques, les hypnotiques, etc. qui sont classés dans la spécialité "Psychiatrie".

I.5.2. Classification selon les modes d'achats

Il existe aussi d'autres façons de classer les médicaments :

a)Les médicaments "éthiques" qui sont vendus en pharmacie uniquement sur présentation de l'ordonnance du médecin. **(27)**

b) Les médicaments OTC (Over the counter), désigne dans certains pays les médicaments en vente libre (c'est-à-dire accessible au patient sans l'intermédiaire d'un professionnel de santé et donc, disponibles sans ordonnance médicale) **(28)**

I.5.3. Classification selon le brevet

a) Les médicaments appelés, « princeps » ou « originaux » : ou aussi de marque est le produit pharmaceutique original qui a fait l'objet d'un brevet tombé dans le domaine publique, et qui va servir de référence à la création d'autres médicaments. **(29)**

b) Les médicaments génériques : est similaire à un médicament original appelé princeps, et doit avoir la même composition qualitative et quantitative en substances actives, la même forme pharmaceutique et dont la bioéquivalence avec la substance de référence (Princeps) est démontrée par des études de biodisponibilité appropriées **(30).**

I.6. Les formes pharmaceutiques et voies d'administration des médicaments

I.6.1. Les formes pharmaceutiques

On appelle «formes pharmaceutiques» ou «formes galéniques», les présentations pratiques des médicaments qui permettent leur administration. **(31)**

Elle est déterminée par :

- Le choix de la voie d'administration (oral, injectable, cutané) ;
- Les caractéristiques physico-chimiques de la molécule (solubilité du produit, organe à atteindre, etc.)

- La quantité à administrer
- L'âge du patient
- La vitesse d'action désirée, etc.

Ainsi une même molécule peut exister sous différentes formes (comprimés, poudre, suppositoires, etc.)

Principes actifs + Excipients = Médicament

Médicament + Récipient = Forme galénique. **(32)**

voie d 'administration	Forme pharmaceutique
Orale	Comprimés, gélules, solutions ou suspensions aqueuses
Parentérale	Solution aqueuses
Rectale	Suppositoires
Vaginale	Comprimés, solutions aqueuses
Ophtalmique	Solution aqueuses
O. R. L	Solution aqueuses pulvérisées ou non
Percutanée	Pommades et solutions

Tableau I.2 : Formes galéniques les plus courantes **(33)**

I.6.2. Voies d'administration du médicament :

Ce sont les portes d'entrée du médicament dans l'organisme. Plusieurs voies d'administration peuvent être utilisées : la voie parentérale (injectable) et la voie transmuqueuse (pulmonaire, rectale, oculaire...).

Mais la voie la plus courante est la voie orale. Le médicament est pris par la bouche, emprunte la voie digestive, parcourt la barrière intestinale pour circuler dans le sang. **(34)**

La voie digestive (ou voie orale)	*Le médicament passe par la bouche*
La voie respiratoire	*Le médicament passe par les narines et les poumons*
La voie cutanée	*Le médicament passe à travers la peau*
La voie muqueuse	*Le médicament passe à travers la muqueuse* *Exemples de muqueuses : L'anus, l'œil, la bouche, le vagin*
La voie parentérale	*Une seringue est nécessaire pour administrer le médicament* *(Exemples : Voie IM ; Voie IV ; Voie SC).*

Tableau I.3 : Voies d'administration du médicament **(34)**

- Le choix de la voie d'administration dépend :
  - de la biodisponibilité du principe actif
  - de la vitesse d'action désirée, de la durée du traitement et du nombre de prises par jour
  - du type de malade, c'est-à-dire de son âge (nourrisson, enfant, adulte, vieillard) et aussi de sa situation (debout ou alité, à domicile ou hospitalisé, traitement ambulatoire ou non). **(7)**

I.7.les formes pharmaceutiques destinées à la voie parentérale :

Il existe plusieurs voies d'administration des médicaments tels que la voie orale, parentérale, cutané,… **(35)**

Tous les médicaments ne sont pas obligatoirement administrés par la **voie orale,** c'est-à dire avalés. Ils peuvent être aussi donnés par **voie parentérale. (36)**

I.7.1.Définition

Les préparations parentérales sont des préparations stériles destinées à être injectées, perfusées ou implantées dans le corps humain. **(37)**

Il existe 4 catégories principales de préparation destinées à être injectée, perfusée ou implanté.

a. Préparations injectables

Ce sont des solutions, des émulsions ou des suspensions stériles dans l'eau Pour préparation injectable ou un liquide stérile non aqueux ou un mélange de ces deux liquides. Elles doivent être apyrogènes.

b. Préparations pour perfusions I.V

Ce sont des solutions aqueuses ou des émulsions en phase aqueuse stériles et apyrogènes. Elles sont destinées à être administrée en grand volume, ce sont les solutés massifs.

c. Poudres pour injection ou perfusion I.V

Ce sont des substances solides et stériles répartie dans leur récipient définitif, elles forment rapidement une solution ou une suspension après agitation avec le volume prescrit d'un liquide approprié et stérile.

d. Les Implants

Préparations solides, stériles d'une taille et d'une forme appropriées à l'implantation Parentérale. **(38)**



Figure I.7 : Exemple d'une préparation injectable **(38)**

I.7.2.Propriétés des préparations injectables

Les préparations injectables doivent répondre à un certain nombre d'exigences **(39)**

a) Qualités obligatoires

- **Stérilité :**

Une préparation injectable ne doit pas contenir de micro-organisme vivant qui provoquerait une infection lors de l'injection **(40)**

- **l'apyrogenicité : (Absence de pyrogène) :**

Une préparation injectable ne doit pas contenir de substance pyrogène (toxines) qui provoquerait des excès de fièvre. **(41)**

- **la limpidité :**

Les solutions doivent être limpide et ne pas renfermer de particules visibles à l'œil nu ; Les émulsions doivent avoir un aspect homogène et ne pas présenter de séparation des phases. Les suspensions peuvent présenter une sédimentation mais une légère agitation doit redonner une suspension suffisamment stable pour permettre des prélèvements homogènes. **(38)**

b) Qualités facultatifs

- **Isotonicité :**

Une préparation injectable doit avoir une pression osmotique aussi proche que possible de celle du sang afin de ne pas risquer de détruire les hématies.

- **la neutralité :**

Le PH des préparations injectables doit être le plus proche du PH physiologique **(37)**

I.7.3.Les avantages et les inconvénients de la voie parentérale

a. Avantages

- Action rapide du PA (peu ou pas de dégradation du P.A.)
- Traitement des patients inconscients, (coma)
- Biodisponibilité optimale.
- Pas de destructions du PA par sucs digestifs (37)
- Absorption de la dose totale.
- Pas d'action néfaste des principes actifs sur l'appareil digestif **(35)**

b. Inconvénients

- Douleur à l'injection
- Risque d'infection
- Coût élevé
- Nécessite de varier les points d'injection.
- obligation d'un appareillage approprié et Le matériel utilisé (seringue) doit être stérile
- Néssecité d'un personnel compétant(Le malade ne peut que rarement pratiquer lui-même les injections) **(42)**
- La résorption est moins rapide dans le cas d'une injection intramusculaire **(43).**

I.7.4.Récipients utilisées

Les préparations injectables sont conservées dans des récipients fermés, en verre ou en matière plastique, à l'abri de l'air. La solution contenue dans les ampoules ou las flacons est injectée avec une seringue à travers une aiguille. **(36)**

a) En verre

Les ampoules et flacons doivent être en verre incolore afin d'éviter une confusion avec les ampoules buvables en verre jaune ; ces avantages sont : la transparence, la résistance à la chaleur, l'inertie chimique et l'imperméabilité aux gaz.

b) En matières plastiques

Les flacons, poches et seringues pré-remplis doivent être en matière plastique transparente, leur avantage la légèreté et la résistance aux chocs. **(38)**

Section II : Les anti-inflammatoire

Les médicaments sont souvent regroupés en fonction de l'effet biologique qu'ils exercent et c'est ainsi qu'on parle par exemple d'analgésiques, d'anti-psychotiques, d'antihypertenseurs, d'anti-asthmatiques, d'antibiotiques et d'anti-inflammatoires, etc.

Dans cette section nous allons parler des anti-inflammatoires, les types des anti-inflammatoires et leur mécanisme d'action.

II.1. Définition

L'inflammation est une réaction de défense immunitaire du corps à une agression externe (infection, brûlure, allergie) ou interne (cellules cancéreuses).

Les anti-inflammatoires sont des médicaments qui antagonisent les processus inflammatoires **(44),** c'est à dire les substances chimiques luttant contre les phénomènes inflammatoires généraux ou secondaires [sont des réactions systématiques qui se développent à distance « chroniques » et locaux ou primaires (aiguës)] d'origine diverses (infections, brûlures, irritations, troubles métaboliques, etc.) **(45)**

Ce sont des médicaments symptomatiques, qui n'agissent pas sur l'étiologie (cause) de l'inflammation, ils sont indiqués quand ce processus physiologique devient gênant, notamment à cause de la douleur qu'il provoque. **(46)**

II.2. types des anti-inflammatoires

On distingue deux catégories d'anti-inflammatoires : les uns sont hormonaux (les anti-inflammatoires stéroïdiens *AIS ou* des corticoïdes*)* et les autres ne sont pas (les anti-inflammatoires non stéroïdiens *AINS*).

a- Anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) :

Egalement appelés *corticostéroïdes*, ces produit sont dérivés des corticostéroïdes naturels, hormones secrétées par les glandes surrénales principalement les *glucocorticoïdes* [cortisol (hydrocortisone) et la cortisone] qui sont biosynthétisés à partir du cholestérol et employés dans le domaine médical Ils sont très puissantes et permettent de contrôler l'inflammation quand elle devient sévère ou qu'elle se déclenche sans raison apparente, comme dans les maladies Dites inflammatoires (polyarthrite rhumatoïde, allergie sévère....). **(47) (48)**

Mécanisme d'action

Les anti-inflammatoires stéroïdiens agissent en inhibant la réaction inflammatoire par l'inactivation de la *phospholipase* membranaire (A2 qui est l'enzyme catalysant la libération de l'acide arachidonique, à partir de la membrane cellulaire **(49).**Ils empêchent la libération de l*'acide arachidonique* précurseur des *prostaglandines* et ils induisent la formation d'une protéine appelée *lipocortine* qui se fixe sur la *phospholipase* et la rend inactive. **(50)**

b- anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) sont des médicaments symptomatiques capables de s'opposer au processus inflammatoires, quelle qu'en soit la cause (mécanisme, chimique, infectieuse, immunologique), ils agissent sur les signes locaux de l'inflammation rougeurs, chaleur, douleur et œdème. En outre, tous les AINS possèdent à coté de leur action anti-inflammation, une action antalgique et antipyrétique. Les AINS se caractérisent par l'absence d'une structure chimique stéroïdienne, s'opposant en cela aux corticostéroïdes anti-inflammatoires qui sont des glucocorticoïdes. **(51)**

Mécanisme d'action :

Les AINS n'agissent que sur une partie de la composante inflammatoire. Le mécanisme d'action des AINS est l'inhibition de la *cyclooxygénase*(COX), (enzyme clé de la biosynthèse de la prostaglandine), ils s'opposent donc à la production des prostaglandines et du thromboxanes A2. Les AINS peuvent agir également sur la composante cellulaire de l'inflammation en bloquant la mobilité des cellules **(49)** .

II.3. But de l'utilisation des anti-inflammatoires

C'est de suspendre ou de ralentir la réaction inflammatoire. Ils sont utilisés lorsque la réaction inflammatoire est exagérée et chronique ou associée à des phénomènes immunologiques **(52)**

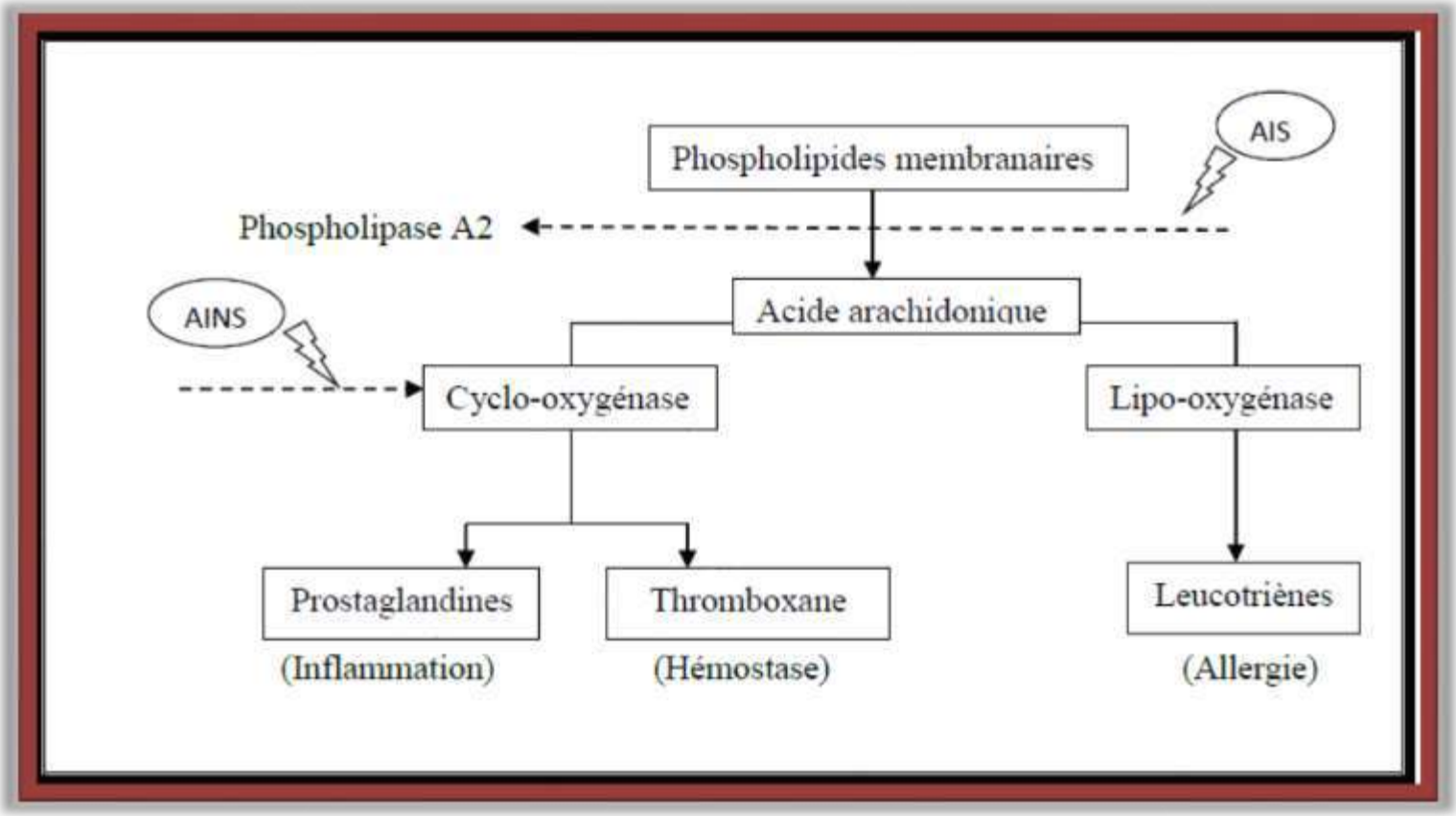


Figure I.8 : Sites d'action des anti-inflammatoires stéroïdiens et non stéroïdiens **(52)**

Section III : La stérilité des préparations parentérales

Toutes les préparations injectables doivent être stériles ; le choix de la méthode de stérilisation est en fonction de la préparation à stériliser. Quelles sont les différentes méthodes de stérilisation ?

III.1.Définition :

« **La stérilité** est l'absence de micro-organismes viables. » **(53)**

La Stérilisation est la mise en œuvre d'un ensemble de méthodes et de moyens visant à éliminer (ou détruire) tous les micro-organismes vivants (bactérie, virus, champignons) de façon durable. **(9)**

Elle s'exprime en terme de probabilité, le risque retenu est d'avoir au plus un micro-organisme vivant pour 10^6 unités soumise à la stérilisation. C'est le « Niveau d'Assurance de Stérilité **(NAS)** »

- La stérilisation s'applique aux formes qui selon la pharmacopée doivent être stériles :
  - Préparations injectables, collyres.
  - A certaines préparations dont la conservation exige l'absence des germes : gels oraux.
  - Au matériel chirurgical, ligatures, articles de pansement, articles à usage unique, vêtements des personnes travaillant en ambiance stérile.
  - A certaines enceintes de l'industrie pharmaceutique et des hôpitaux blocs et hottes stériles. **(54)**

III.2. les procédés de stérilisation

III.2.1. Stérilisation par la chaleur

Pour aborder ce problème, il est absolument nécessaire d'avoir quelques notions de la sensibilité des micro-organismes à la chaleur.

- ***Sensibilité des micro-organismes à la chaleur*** **:**

La sensibilité des micro-organismes à un traitement thermique donnée est fonction :

- **L'espèce microbienne et la forme sous laquelle elle se trouve** : Pour une espèce donnée, les spores sont plus résistantes que les formes végétatives.
- **Durée et nombre de germes :** Lorsqu'on soumet une suspension de micro-organismes à une certaine Température pendant un certain temps le nombre de germe varie en sens inverse de la durée du traitement suivant une relation logarithmique :

$$\mathbf{Log\ N/N_0 = K\ t}$$

N_0 : nombre de germe initial.

N : nombre de germe au temps t.

- Si par exemple on part d'une suspension contenant **106** spores/ml et si **D** représente la durée de chauffage (à une température donnée) qui entraine dans les conditions de l'expérience une réduction de **90 %** de la population microbienne.

(**D** peut varier de **0,2** à **2** minutes suivant les micro-organismes), cette expérience représentée dans **(Tableau I.4 , Figure I.9). (55)**

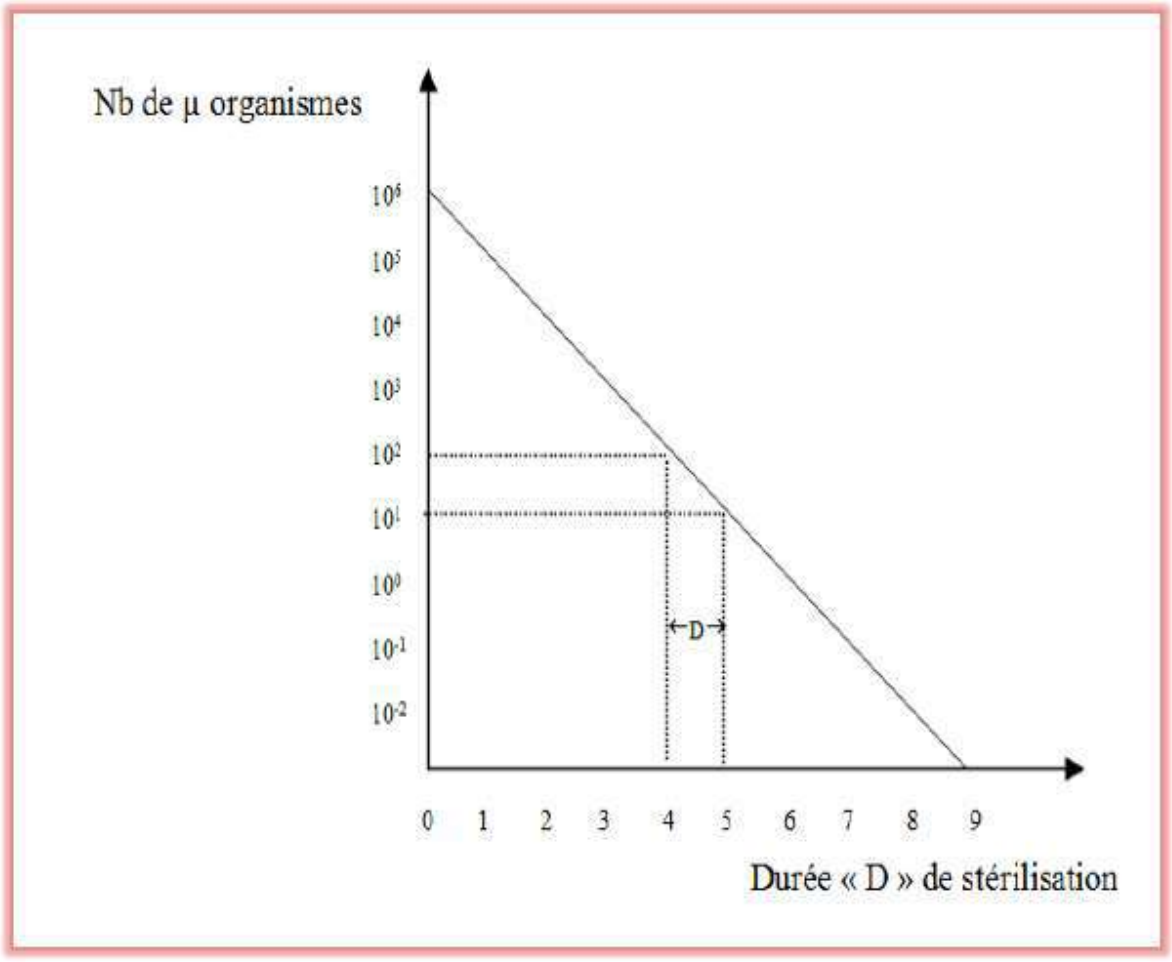


Figure I.9 : Courbe de survie des microorganismes à un traitement thermique de durée « D » **(55)**

NB : 10^{-1}(= non pas **1/10** germe mais **1**germe possible/**10unités**)

Durée de chauffage	*Nombre de microorganismes détruits (90%)*	*Nombre de survies*	
0D	0	1000000	10^6
1D	900 000	100000	10^5
2D	90 000	10000	10^4
3D	9000	1000	10^3
4D	900	100	10^2
5D	90	10	10^1
6D	9	1	10^0
7D	0,9	0,1	10^{-1}
8D	0,09	0,01	10^{-2}
9D	0,009	0,001	10^{-3}
10D	0,0009	0,0001	10^{-4}
11D	0,00009	0,00001	10^{-5}
12D	0,000009	0,000001	10^{-6}

Tableau I.4 : Nombre de survies en fonction de la durée de chauffage **(61).**

Conclusions *:*

• Le risque de survie après un traitement thermique donné est d'autant plus faible qu'il y'avait moins de germes au départ.

• Il n'est théoriquement pas possible d'atteindre la stérilité absolue.

- **La température :** Lorsqu'on étudie expérimentalement le temps nécessaire à la destruction d'une espèce microbienne donnée en fonction de la température, on obtient une courbe logarithmique qui tracée sur une échelle semi-logarithmique donne une droite. Plus La température augmente, moins de temps faudra pour atteindre le même résultat. **(Figure I.10)**

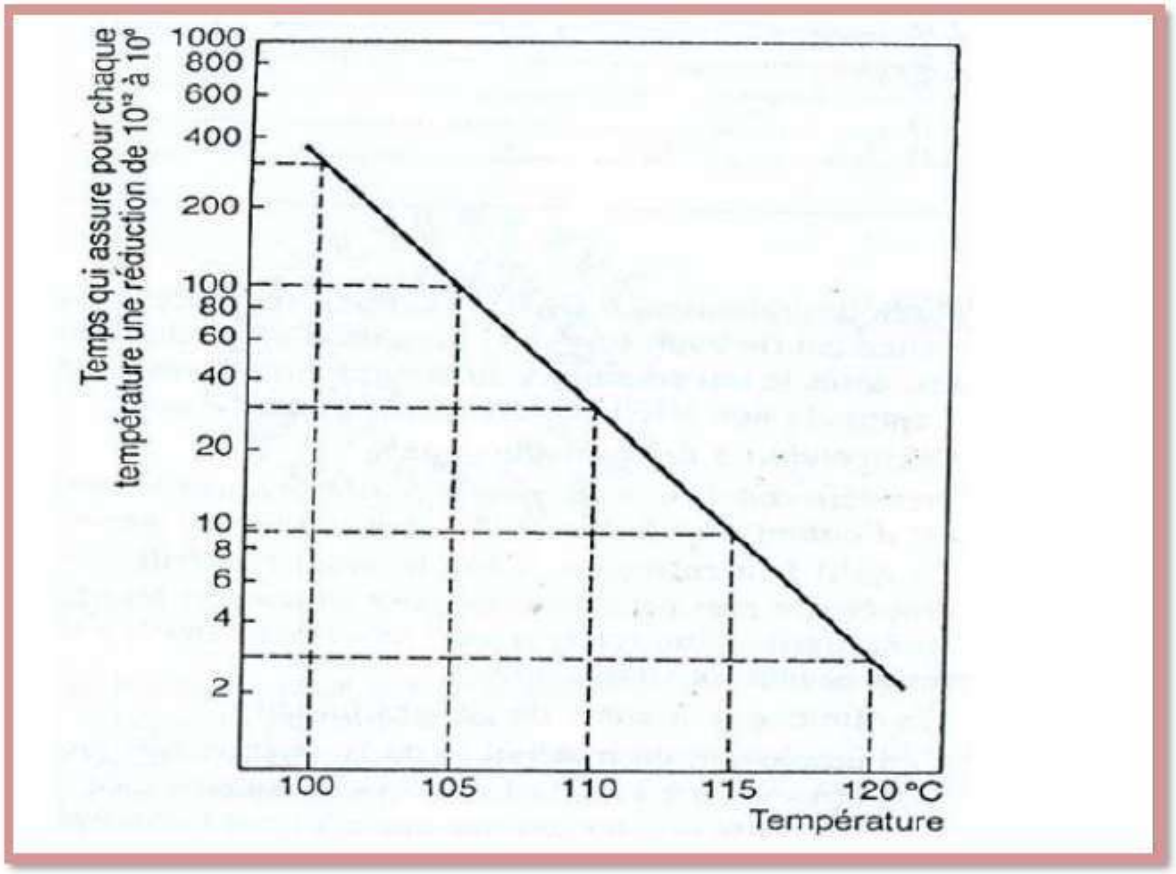


Figure I.10 : Destruction des spores de Clostridium Botilinum par la chaleur. **(55)**

- **Nature du milieu :**

• ***Humidité :*** les germes sont beaucoup plus difficiles à détruire en milieu sec qu'en milieu humide. En chaleur sèche, le germe de référence pour le calcul de la valeur stérilisatrice est **Bacillus subtilis (T réf = 170 °C)**

• ***Principe actif :*** certains principes actifs possède un pouvoir bactéricide qui ne se manifeste qu'après élévation de la température, exemple : Le salicylate de sodium, le carbonate acide de sodium.

• ***pH :*** la destruction des micro-organismes est plus aisée en milieu acide ou alcalin**. (61)**

a. La stérilisation par la chaleur humide

La stérilisation par la chaleur humide est la méthode de choix lorsqu'elle est envisageable (Pour les produits non thermolabiles), car elle est efficace, rapide et peu couteuse**. (56)**

Cette méthode est également appelée autoclavage. Elle est réalisée dans un autoclave.

L'autoclave : se compose d'une enceinte cylindrique de cuivre ou d'acier inoxydable munie d'un couvercle massif fixé par des boulons. L'étanchéité est assurée par un joint en caoutchouc épais

- ✓ Le couvercle comporte
- *une soupape de sécurité* pour éviter d'atteindre des surpressions
- *un robinet d'évacuation* de la vapeur
- un *manomètre* permettant de mesurer la pression intérieure.
- ✓ À l'intérieur *un panier métallique* dans lequel sont placés les objets ou les produits à stériliser. **(9)**

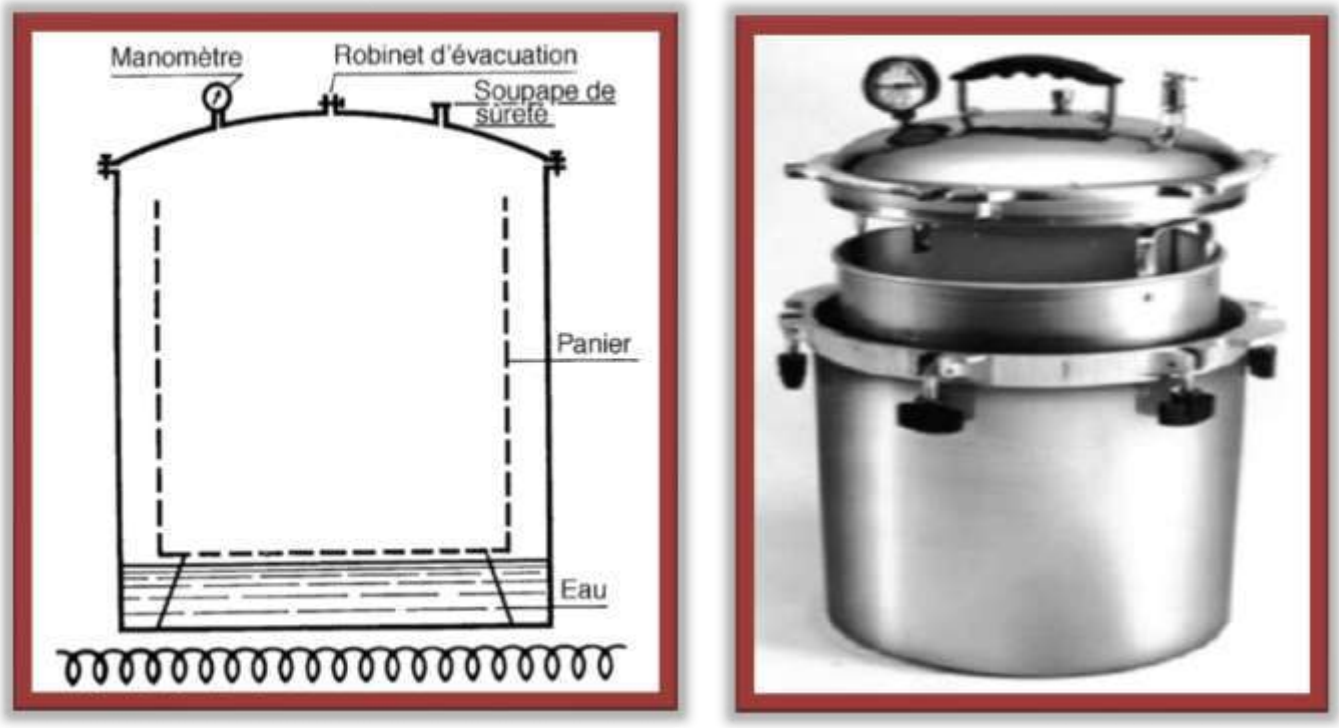


Figure I.11 : Schéma et photo d'un autoclave **(9)**

- **Principe**

Le principe de fonctionnement est la production de vapeur d'eau par chauffage à 120 °C sous pression, de manière à obtenir une vapeur saturante. C'est en effet cette vapeur d'eau qui constitue le gaz stérilisant.

- **Les produits à stériliser**

Les produits à stériliser	Conditions de référence
Les médicaments *(injectable* et collyre)	121 °C minimum pendant 15 minutes
dispositifs médicaux, objets de conditionnement	134 °C pendant 10 minutes
risque de présence d'ATNC	18 minutes à 121°C

Tableau I.5 : Les conditions de référence pour la stérilisation par autoclave **(7)**

b. La Stérilisation par la chaleur sèche :

La stérilisation par la chaleur sèche est une méthode de stérilisation terminale reposant sur le transfert de chaleur aux articles à stériliser. **(57)** .La chaleur sèche entraine un durcissement des cellules externes des germes, qui les protègera contre la pénétration de la chaleur. C'est pour cela que la stérilisation par la chaleur sèche nécessite des traitements plus longs et des températures plus élevées que la stérilisation par la chaleur humide**. (58)**

La stérilisation par la chaleur sèche est réalisée dans des *fours ou étuves à air chaud*, f*ours Pasteur* ou *stérilisateurs Poupinel* **(figureI.12)**, sont chauffés habituellement à l'électricité et convenablement calorifugés pour assurer une température constante. Ils sont pourvus d'un indicateur ou mieux d'un enregistreur de température. **(7)**



Figure I.12 : Stérilisateur poupinel **(7)**

- **Principe**

Dans une enceinte étanche appelée **four** la température est portée à 180°C pendant une heure, le produit à stériliser est soumis à de l'air filtré sur filtre ***HEPA*** *(High Efficiency Particulate Air)* et chauffé. L'air circulant doit être au préalable filtré sur filtre HEPA et doit maintenir une surpression suffisante pour éviter toute entrée d'air non stérile. **(7)**

L'homogénéité de la température doit être assurée au sein des fours par un système de ventilation. **(9)**

- La stérilisation par la chaleur sèche est réservée aux produits thermostables (objets de résistance thermique suffisante) qui ne supportent pas la vapeur, donc essentiellement au matériel métallique et aux récipients en verre. **(59)**
- Les conditions de référence pour cette méthode de stérilisation sont de 180°C minimum pendant 1 heures ou 160 pendant 2 heures
- Dans la pratique, on chauffe à des températures de 250 à 350 °C pour ***stérilisation*** + ***dépyrogénisation*** du matériel s'il est destiné aux préparations injectables. **(60)**

III.2.2. Stérilisation par les rayonnements

a. Les rayons Ultraviole

Ils sont doués d'un pouvoir microbicide très élevé. En pharmacie ce mode de stérilisation ne peut être appliqué aux préparations en ampoules ou flacons car les rayons **UV** ne peuvent

franchir les parois de verre (La stérilisation **UV** est un phénomène de contact, seules les surfaces en contact direct avec les rayonnements sont stérilisées) **(61)**



Figure I.13 : Stérilisateur UV **(61)**

b. Rayonnements beta et gamma

- Des accélérateurs d'électrons émetteurs de rayonnement ***beta* β** : faisceaux d'électrons énergisés et très puissants qui sont focalisés sur le produit à stériliser.
- le radioélément **Cobalt 60 (^{60}Co)** émet un rayonnement ***gamma* γ** (photon à haute énergie)
- Le rayonnement β est cependant moins pénétrant que le rayonnement gamma (γ) **(60)**
- La stérilisation par irradiation s'utilise essentiellement pour la stérilisation d'éléments sensibles à la chaleur. Cette méthode ne peut être utilisée que pour les médicaments et les conditionnements pour lesquels une absence de détérioration par les radiations a été prouvée expérimentalement. **(57)**

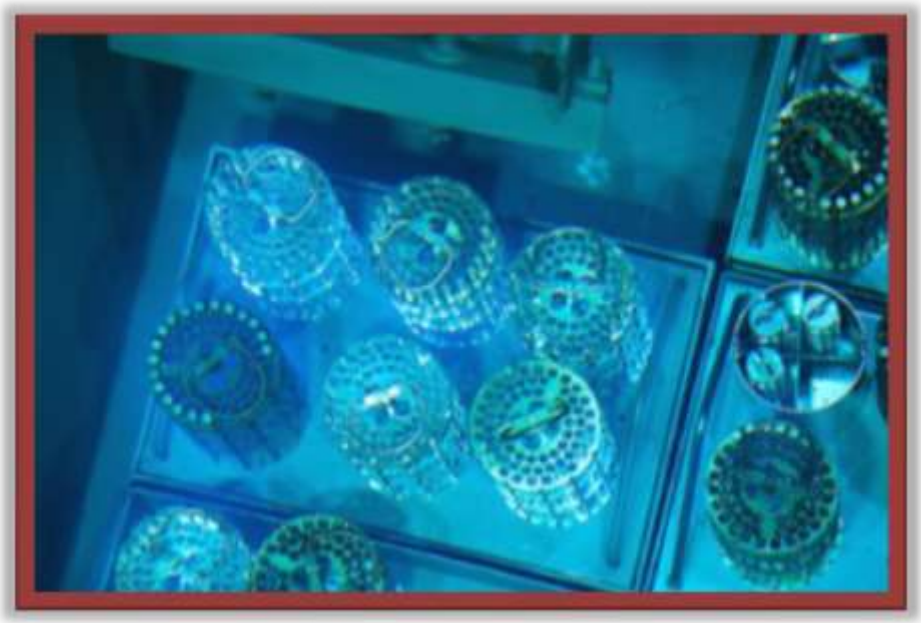


Figure I.14 : Stérilisateur par rayonnement gamma alimenté par du Co^{60} **(57)**

Exemples :

Le matériel médico-chirurgical (les seringues, aiguilles, perfuseur), sondes, appareils pour dialyse sanguine… et pour les articles de pansement et de suture. Il s'agit d'articles à usage unique, dont le réemploi est interdit. La stérilisation doit être effectuée dans l'emballage étanche définitif. *(Ex : Stérilisation d'un médicament contenu dans une seringue pré-remplie)* **(7)**

c. ***les rayons X***

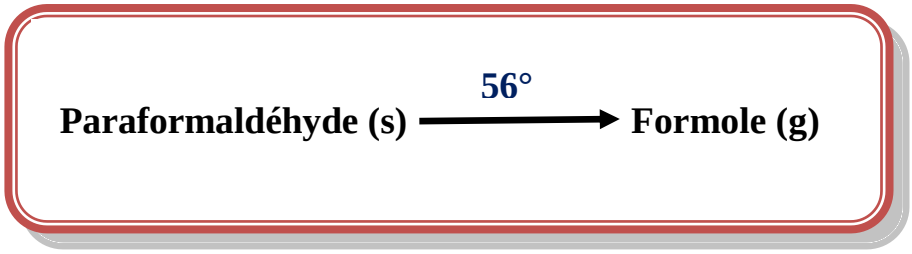
Des rayons X produits par bombardement d'une cible avec des électrons énergisés. Ils présentent un plus grand pouvoir de pénétration et donc une alternative prometteuse aux autres rayonnements **(9)**

III.2.3. Stérilisation par les gaz

Elle est applicable au matériel dans des conditions déterminées de température, de durée, d'humidité et de concentration.

a. Le formaldéhyde

On l'utilise pour la désinfection du matériel et pour les enceintes stériles. C'est un gaz qui est peu pénétrant donc on l'utilise comme désinfectant de surface. On l'utilise sous forme de **(61)**



b. L'oxyde d'éthylène

(Agent alkylant), est principalement utilisé dans l'industrie pharmaceutique pour stériliser le matériel médico-chirurgical qui ne supporte pas la stérilisation à l'autoclave (PVC, polyéthylène, certains caoutchoucs…).

- Il présente l'avantage de pouvoir être utilisé pour des articles placés dans leur emballage définitif.
- La manipulation de ce gaz n'est pas sans danger et ne peut être effectuée que par un personnel entraîné et expérimenté C'est un gaz toxique et très réactif, il forme avec des nombreux gaz des mélanges explosifs. **(7)**



Figure I.15 : Stérilisateur médical à l'oxyde d'éthylène **(7)**

c. Le peroxyde d'hydrogène

Le principal agent stérilisant utilisé pour la stérilisation basse température des dispositifs médicaux thermosensibles **(62)**

On utilise le peroxyde d'hydrogène en phase plasma, c'est-à-dire sous forme de gaz ionisé instable, à une concentration de 200 volumes environ. **(9)**

d. L'acide peracétique

Est parfois utilisé à la place de l'oxyde d'éthylène. C'est un liquide incolore à la température ordinaire. On ne le rencontre pas à l'état pur mais sous forme d'un mélange en équilibre de quatre constituants

- ✓ L'acide péracétique est un agent d'oxydation très puissant. Son efficacité est due à la libération d'oxygène sous forme atomique**. (7)**
- ✓ La méthode classique consiste à chauffer à **40 – 47°C** une solution à **3,5 %** d'acide peracétique et à faire passer à la surface de cette solution de l'air qui circulera ensuite dans l'enceinte à stériliser. **(61)**

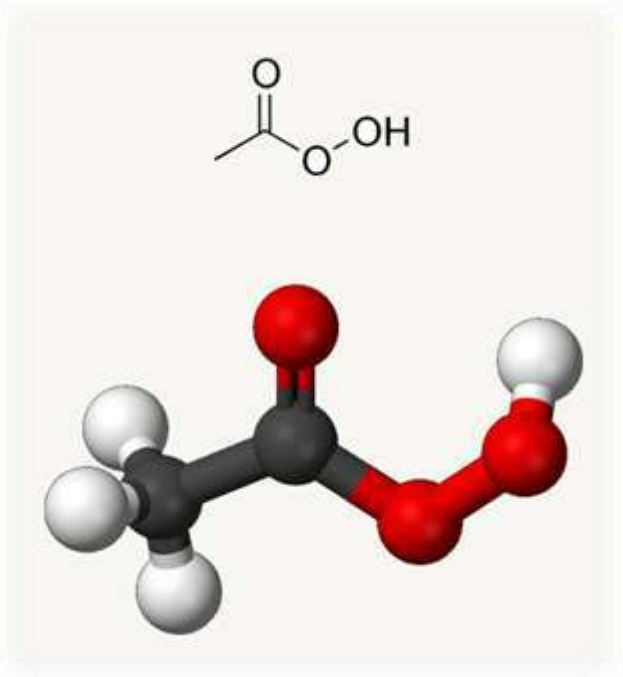


Figure 1.16 : Représentation plane et 3D de l'acide paracétique **(61)**

III.2.4. Stérilisation par filtration :

a. Généralité

Ce mode de stérilisation est applicable aux fluides : liquides monophasiques et gaz. Pour les solutions, la filtration stérilisante n'est appliquée qu'à celles qui ne supportent pas l'action de la chaleur (médicaments fragiles, thermolabiles), ne pouvant être stérilisés dans leur emballage terminal.

Ce procédé est basé sur la rétention des micro-organismes et particules par un réseau filtrant de porosité variable, sous pression **d'un** gaz inerte (azote) .Cette rétention se fait soit par criblage, soit par adsorption, soit par les deux à la fois.

Selon la taille des particules à retenir, on parle de :

- Particules **> 10 µm** = ***Filtration***
- **10 µm >** Particules **> 0,02µm** = ***Microfiltration***
- Particules **< 0,02 µm** = ***Ultrafiltration*** **(63)**

b. Filtres stérilisants :

Pour la filtration stérilisante on utilise soit :

- ***Filtres en profondeur*** (plaques, cartouches et bougies filtrantes) ***:*** les micro-organismes peuvent être arrêtés soit par criblage soit par adsorption. Ils sont stérilisables. Certains retiendraient de plus des substances pyrogènes, ce qui en fait un intérêt supplémentaire. **(7)**



Figure I. 17 : Types des filtres stérilisants **(7)**

- ***Membranes filtrantes (filtre écran)*** : La filtration sur membrane se fait par le passage à travers des filtres stériles de porosité de 0,22 µm. Elles sont très fines, agissent surtout par criblage. stérilisables à l'autoclave à 121 °C. Elles sont le plus souvent en ester de cellulose. **(64)**

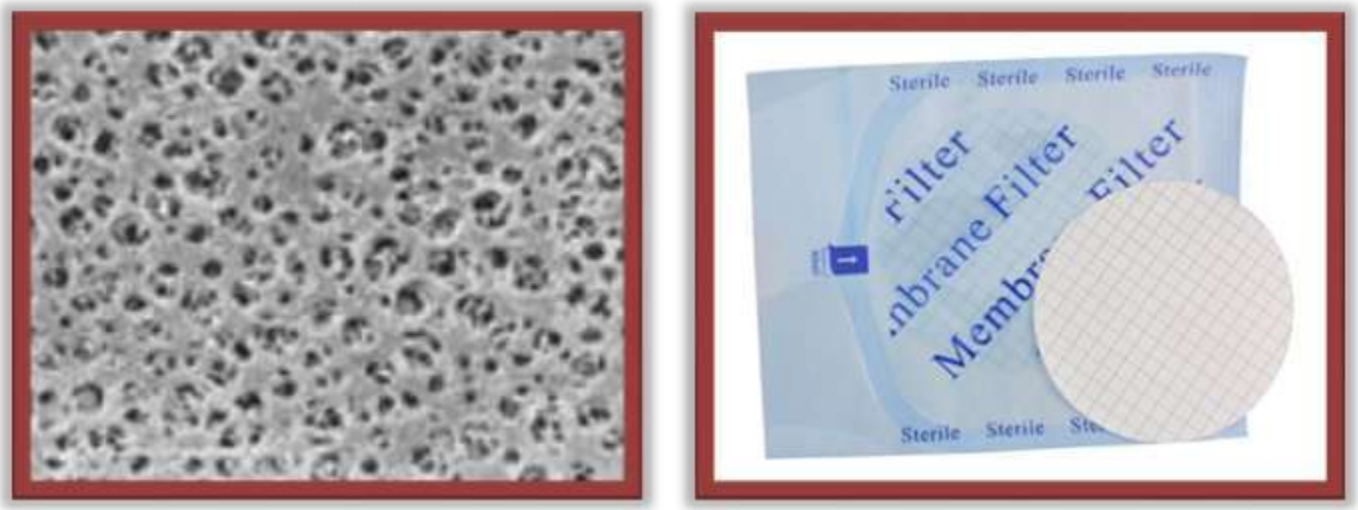


Figure I.18 : Membrane filtrante à 0, 22 µm **(64)**

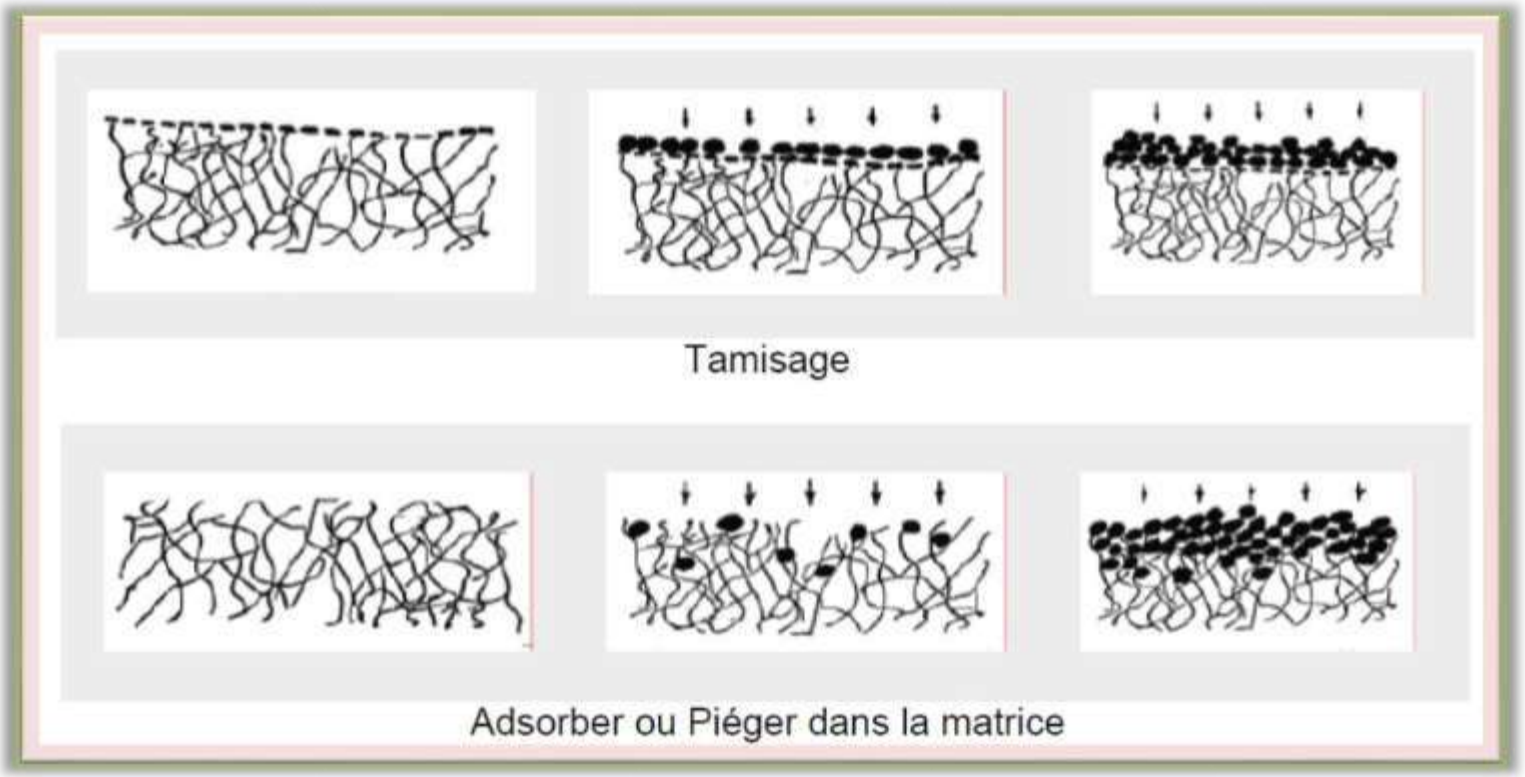


Figure I.19 : Mécanisme de la filtration stérilisante **(64)**

c. Conduite de la filtration stérilisatrice :

- Stériliser à l'autoclave tout le matériel de filtration et de répartition.
- Partir d'une solution aussi pauvre en germe que possible.
- Assurer un débit régulier, éviter toute surpression et ne pas prolonger la filtration.
- Les filtres rigides réutilisables doivent être contrôlés périodiquement car leur porosité peut évoluer. **(65)**

- Avant l'étape de stérilisation, plusieurs étapes sont mises en place pour limiter la contamination et assurer des préparations stériles :

- **Fabrication en Zone à Atmosphère Contrôlée (ZAC) :**

  Les zones à atmosphère contrôlée (**ZAC**) sont des locaux dans lesquels le niveau de propreté est contrôlé et la contamination microbienne et particulaire est définie.

  Les **ZAC** sont construites de manière à minimiser le nombre de substances contaminantes. L'accès se fait par plusieurs sas (pour le personnel, pour le matériel, pour les substances).

Il existe différentes classes, selon le niveau de propreté dans chacune d'entre elles :

Classe A : Opération à haut risque (flux laminaire)

Classe B : Préparation et remplissage aseptique (enceinte stérile)

Classe C et D : Destinée aux étapes moins critiques de la fabrication des médicaments stérile.

- Différents paramètres sont régulés, tels que le taux de renouvellement de l'air, le nombre de particules et de micro-organismes admis, la pression relative, la température, l'humidité relative.

Le tableau ci-dessous représente **(Tableau I.6)** les limites de contamination microbienne dans les différentes **ZAC**, selon les **BPF**. **(66)**

Classe	Boite de pétri (diamètre 90 mm) ufc/ 4 heures	Gélose de contact (diamètre 55 mm) ufc/ plaque	Empreintes de gant (5 doigts) ufc/ gant
A	<1	<1	<1
B	5	5	5
C	50	25	-
D	100	50	-

Tableau I.6 : limites recommandées de contamination microbiologique des surfaces suivant les **BPF** et les **BPP (66)**

- **la fabrication en conditions en aseptiques**

L'asepsie est l'ensemble des précautions prises pour empêcher tout apport exogène de micro-organismes ; La préparation aseptique a pour but de maintenir la stérilité d'un produit obtenu à partir de composants préalablement stérilisés.

Le travail en asepsie requiert des précautions particulières. Il s'agit ici d'agir contre la nature. En effet, les micro-organismes sont omniprésents et l'asepsie demande de les éliminer. Le fait de travailler dans des conditions d'asepsie permet de garder un médicament stérile, si celui-ci est déjà stérile à la base, c'est-à-dire exempt de micro-organismes viables. **(67)**

- **Nettoyage des surfaces, tenues du personnel adaptées**

L'opérateur travaillant sous flux vertical porte une tenue adéquate : (*Blouse, gants charlotte, surchaussures,…)*.Il est recommandé de travailler avec des gants stériles qui seront décontaminés régulièrement avec de la teinture de chlorhexidine, par exemple, afin de garder au mieux les conditions aseptiques au cours de la session de travail. Avant de commencer les manipulations, il faut préparer la place de travail, allumer le flux laminaire **15** minutes avant, décontaminer le plan de travail et y mettre un champ stérile. Le matériel qui rentre sous flux devrait être décontaminé et le matériel emballé stérilement, pelé sous flux. **(68)**



Figure I.20 : Manipulateur sous flux d'air laminaire vertical **(68)**

- **Enceintes stériles :**

On distingue :

a. Enceinte stériles classiques :

• Les vitrines stériles

• Les salles ou blocs stériles

b. ***Enceintes stériles à flux d'air laminaire :***

• Les salles blanches stériles à flux d'air laminaire.

• Les hottes ou poste de travail stérile à flux d'air laminaire. **(69)**

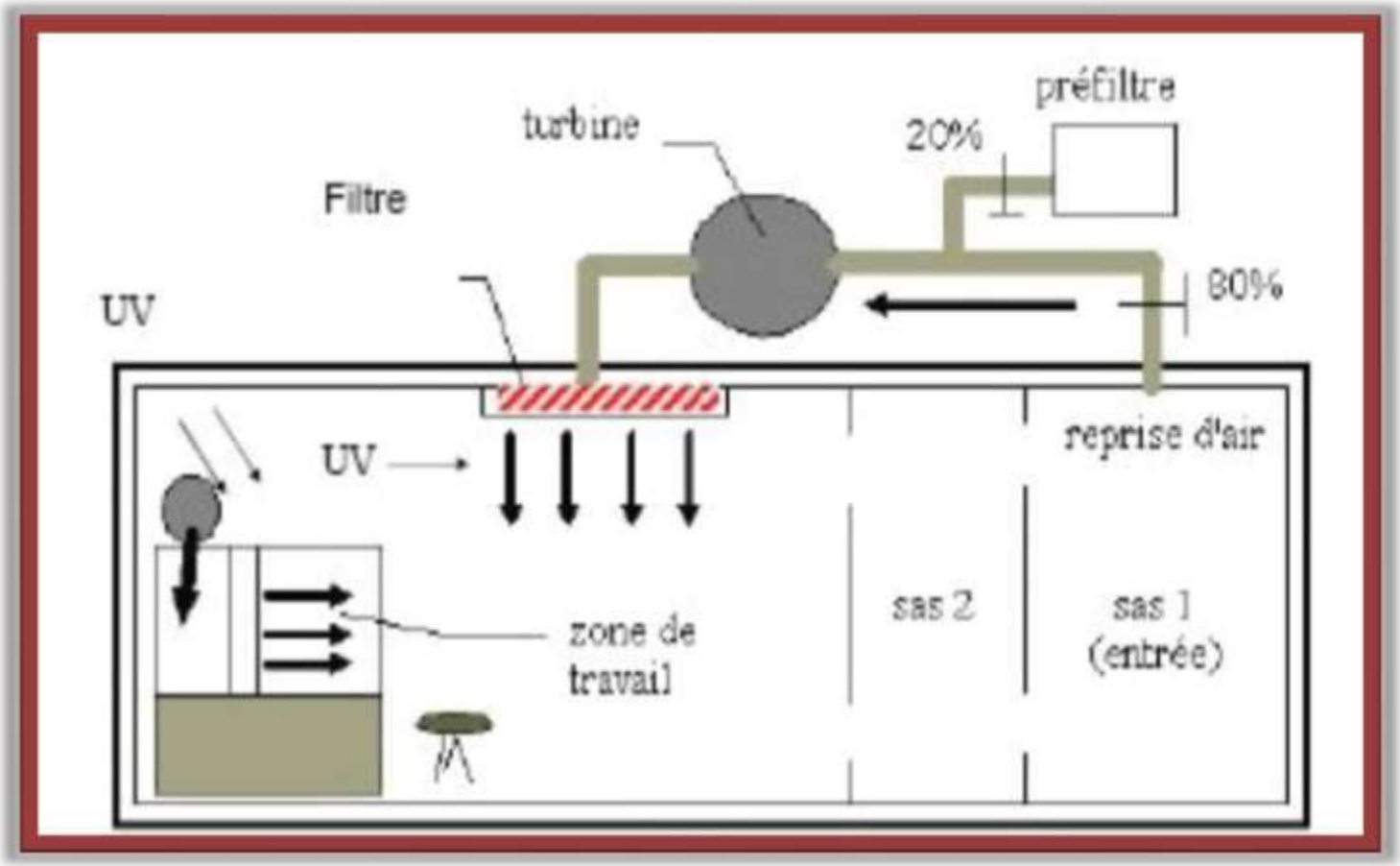


Figure I. 21 : Schéma d'une enceinte stérile **(69)**

Section IV. Présentation et procédé de fabrication du CLOFENAL®



Figure I. 22 : CLOFENAL 75mg/3ml

IV.1. Forme et présentation

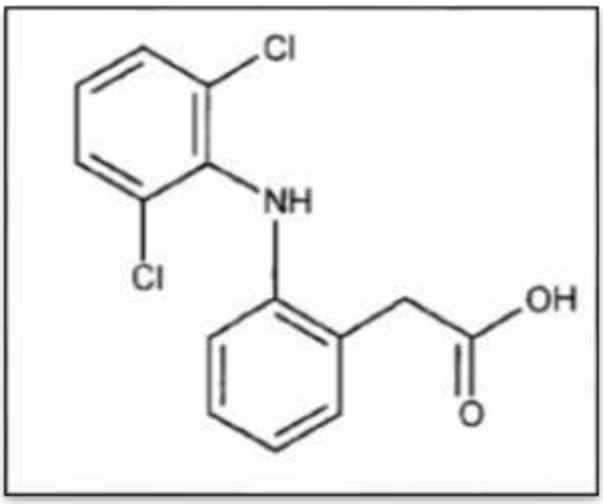
CLOFENAL® est un médicament anti-inflammatoire sous forme de solution injectable (IM) à 75mg/3 ml, boite de 2 ampoules autocassables de 3 ml. **(70)**

IV.2. Composition

IV.2.1. principe actif

Diclofénac de Sodium *:* Le Diclofénac est un dérivé de l'acide anilino-phénylacétique **Cl4Hl1NCl2*O2* (71) ,** C'est une substance active anti-inflammatoire de la famille non stéroïdienne (AINS) **(72).** Il est recommandé dans les pathologies inflammatoires chroniques telles que la polyarthrite chronique et l'arthrose, ainsi que dans le traitement des douleurs aiguës musculo-squelettiques **(73)** , il est souvent prescrit dans le traitement des maladies rhumatismales et utilisé comme analgésique. **(74) (75)**

a. Structure chimique de Diclofénac



Formule : Cl4Hl1NCl202

Poids molaire 296,148 g/mol

[2-[(2,6-Dichlorophényl) aminophényl]acétate de

Figure I. 23 : la structure chimique de *diclofénac* **(76)**

b. Caractéristiques physico –chimiques du Diclofénac de Sodium

Les Caractéristiques physico –chimiques du Diclofénac sont regroupées dans le tableau ci-dessous :

Aspects	-Poudre cristalline -blanche à faiblement jaunâtre -faiblement hygroscopique
Solubilité	-assez soluble dans l'eau -facilement soluble dans le méthanol -soluble dans l'alcool, peu soluble dans l'acétone
T de décomposition	280°C
Pka	4.1
L'absorption maximale dans UV visible	276 ± 2 nm

Tableau I.7 : Caractéristiques physico –chimiques du Diclofénac **(77)**

c. Formes galéniques

Le Diclofénac existe sous plusieurs formes galéniques destinées à être administrées par différentes voies.

Générique	Forme	Voie d'administration
-Voltarène **-Diclofenacmylan** **- Diclofenacteva**	25mg, voie orale, Cp gastro-résistant	Voie orale
-Diclofenac injectable **- Voltarène injectable** **- Voldal Injectable**	75mg/3ml, 2 amp contenant des sulfites	Voie parentérale (IM)
COMPRALFENE **- Diclofenac Arrow** **- Diclofenacbgr**	1g/100g, gel en tube 1%	Voie cutanée
-Diclofenac **- Voltarène** **- Voldal**	25mg suppos	Voie rectale

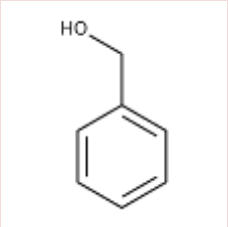
Tableau I.8 : Voies d'administration et formes galéniques du Diclofénac **(78) (79)**

d. Contrôle du Diclofenac sodique

- **Physico-chimique**
- La solubilité
- Identification D
- Point de fusion
- Identification par spectrophotomètre U.V
- La recherche des métaux lourds
- Perte à la dessiccation
- Dosage (Titrimétrie). **(80)**

IV.2.2. Excipients

Les excipients incorporés pour l'élaboration de Clofenal à différentes étapes du processus de fabrication sont :

L'excipient	Sa Description	Sa formule chimique
L'alcool benzylique	L'alcool benzylique est un liquide huileux ; limpide, incolore, réfringent, soluble dans l'eau, miscible à l'alcool, à l'éther, aux huiles grasses et aux huiles essentielles.	 **C_7H_8O** **M=108.1**
Metabisulfite de sodium	Poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche ou cristaux incolores, facilement solubles dans l'eau, peu solubles dans l'alcool. Métabisulfite de Sodium contient 24.19% sodium, 42.08% oxygène, et 33.73% sulfure	**Na_2S_2O** **M =190.1**
Mannitol: "monnitolum "	Mannitol est une poudre blanche, inodore, cristalline, ou des granules gracieux libres Il a un goût sucré,	**$C_6H_{14}O_6$** **M=182.2**

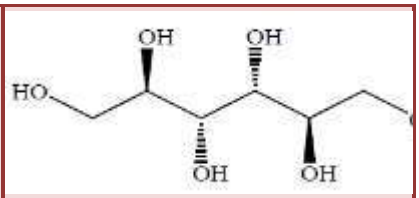
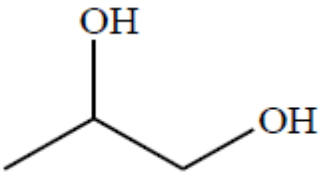
	facilement soluble dans l'eau, très peu soluble dans l'alcool, pratiquement insoluble dans l'éther, soluble dans les alcalins	
Propylène glycol	C'est un liquide visqueux, incolore sensiblement inodore, hygroscopique (conservation en récipient bien fermés), miscible à l'eau, l'alcool et le chloroforme, soluble dans l'éther, il est insoluble dans l'eau ou insoluble en solution aqueuse (acétyle choline).il est utilisable pour la voie parentérale	 **$C_3H_8O_2$** **M=76.1**
Hydroxyde de sodium : « Natrii hydroxymum »	Masse blanche à structure cristalline, présentée sous forme de pastilles, de cylindre ou de plaques, déliquescentes, absorbant facilement le dioxyde de carbone, très solubles dans l'eau facilement solubles dans l'alcool.	**NaOH** **M=40.00**
Eau pour préparation injectable « EPPI »	Elle est destinée à la préparation de médicament administrés par voie parentérale, dont le véhicule est aqueux (EPPI en vrac),soit à la dissolution ou à la dilution des substances ou préparations parentérales ou moment de l'emploi	**H_2O** **Mr=18.02**

Tableau I.9 : Les excipients incorporés dans la fabrication du Clofenal **(80) (81)**

- **Rôle des excipients**

L'excipient	Son effet
Mannitol	Agent de biodisponibilité
Propylène glycol	Agent solubilisant
Alcool benzylique	Un conservateur et solvant
Métabisulfite de sodium	Un antioxydant et agent de conservation
Hydroxyde de sodium	Correcteur de pH
Eau pour préparation injectable « EPPI »	Pour la préparation

Tableau I.10 : Le rôle des excipients **(82)**

IV.3 Propriétés

Propriétés du CLOFENAL	Descriptions
Nom Commercial	Clofenal ® 75 mg
DCI	Diclofenac sodique
Dosage	(75mg/3ml)
Forme	Solution injectable
Classe Pharmaco-thérapeutique	Anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS)
Indications	Il est indiqué, chez l'adulte et l'enfant à partir de 15 ans, en traitement des douleurs inflammatoires aiguës lorsqu'un effet rapide est souhaité : sciatique, lombalgie, colique néphrétique, crise de rhumatisme.
Posologie	-Une ampoule à 75 mg par jour en une seule

	injection. - Le traitement peut être complété, si besoin, par la forme orale
Mode d'administration :	-Voie intra musculaire. - Les injections doivent être faites d'une façon rigoureusement aseptique, dans la partie externe du quadrant supéro-externe de la fesse, profondément et lentement. Lorsqu'elles sont répétées, il est recommandé de changer de côte à chaque injection
Contre-indication	Ce médicament est contre-indiqué dans les situations suivantes : -Grossesse, en particulier à partir de 6eme mois ; - Antécédent de crise d'asthmes liés à la prise d'anti-inflammatoires non stéroïdiens ; - Enfant de moins de 15 ans - Ulcère gastroduodénal en évolution ; - Insuffisance hépatique, cardiaque ou rénale sévère ; - Trouble de l'hémostase et patient sous anticoagulant.
Durée du traitement :	Elle est de 2 à 3 jours. Au-delà, poursuivre le traitement par voie orale ou rectale.
Surdosage	En cas de surdosage ou d'intoxication accidentelle, prévenir immédiatement un médecin.

Conditions de conservation	Après ouverture : le produit doit être utilisé immédiatement. A conserver à l'abri de la lumière et à une température inférieure à 30°C.

Tableau I. 11 : Les propriétés de Clofenal **(79) (83)**

IV.4 Propriétés pharmacologiques

IV.4.1. Propriétés pharmacodynamiques

a. Classe pharmaco thérapeutique

Le Clofenal solution injectable est un anti-inflammatoires, non stéroïdiens, dérivé de l'acide phénylacétique

b. mécanisme d'action

Le mécanisme d'action exact est mal connu, mais reste que le mécanisme principal responsable de son action anti-inflammatoire, antipyrétique et antalgique est l'inactivation de la synthèse des prostaglandines (production de la prostacycline et du thromboxane) par inhibition de la cyclooxygénase.

Le Diclofénac a une préférence faible à modérée pour bloquer la COX-2 (environ 10 fois), il a une incidence gastro-intestinale un peu plus faible que l'indométacine et l'aspirine **(84)**

c. Effets pharmacodynamique*s*

Clofenal 75 mg/3 ml, solution injectable contient du Diclofénac sodique, un composé non stéroïdien doté de propriétés, anti-inflammatoires, antalgiques et antipyrétiques.

- **Effet anti-inflammatoire**

Porte principalement sur la composante vasculaire de la réaction inflammatoire, responsable de la classique tétrade : œdème, douleur, rougeur, chaleur.

Cette action requiert généralement à des posologies d'AINS plus élevées que celles nécessaires dans les autres variétés de douleurs ou dans la fièvre **(85)**

- **Effet antipyrétique**

Les pyrogènes provoquent la libération d'IL-1 par les macrophages, ce qui induit la formation des prostaglandines E2 dans l'hypothalamus, provoquant ainsi l'augmentation de la température corporelle. L'inhibition de la formation de ces médiateurs par les AINS, abaisse

le seuil du thermostat hypothalamique et permet le retour à la normale de la température corporelle **(86)**.

- **Effet analgésique** L'action analgésique des *AINS* s'exerce à la fois au niveau périphérique et au niveau central, mais l'effet périphérique prédomine, leur effet analgésique est habituellement associé à leur effet anti-inflammatoire et résulte de l'inhibition de la synthèse des prostaglandines conduit à une diminution, voire à une suppression de la douleur d'intensité faible à modérée. **(87)**

IV.4.2 Propriétés pharmacocinétiques

a. Absorption

L'absorption est rapide. La concentration plasmatique maximale moyenne de 2,5 microgrammes/ml (8 micromoles/L) est atteinte environ 20 minutes après une injection IM de 75 mg de diclofénac.

b. distribution

Dans le plasma, 99% de la dose administrée se trouve sous forme liée aux protéines plasmatiques majoritairement à l'albumine (99,4%). La diminution des concentrations plasmatiques est biphasique. Elle correspond à une phase rapide de distribution tissulaire et à une phase plus lente d'élimination.

Le Diclofénac passe faiblement dans le lait maternel. Il diffuse aussi dans le liquide synovial où les concentrations maximales sont mesurées 2 à 4 heures après le pic plasmatique

c. métabolisme

Le diclofénac est métabolisé rapidement et pratiquement totalement, essentiellement au niveau du foie.

Les principales voies métaboliques sont l'hydroxylation et la glycuroconjugaison, qui conduisent à des métabolites inactifs.

d. Elimination

L'excrétion est à la fois urinaire et biliaire avec un cycle entéro-hépatique. Dans les urines, moins de 1% de la quantité administrée est éliminée sous forme inchangée alors qu'environ 60% est éliminée sous forme de métabolites.

La demi-vie d'élimination plasmatique du Diclofénac inchangé se situe autour de 1 à 2 heures. La clairance plasmatique totale est d'environ 263 ml/minute **(88)**

IV.5 Procédé de fabrication de Clofenal (75mg/3ml)

Les procédés de fabrication doivent être choisis en fonction des objectifs à atteindre et du matériel à utiliser.

Selon la pharmacopée européenne (1997), la fabrication comprend les étapes décrites dans le (Schéma 1).

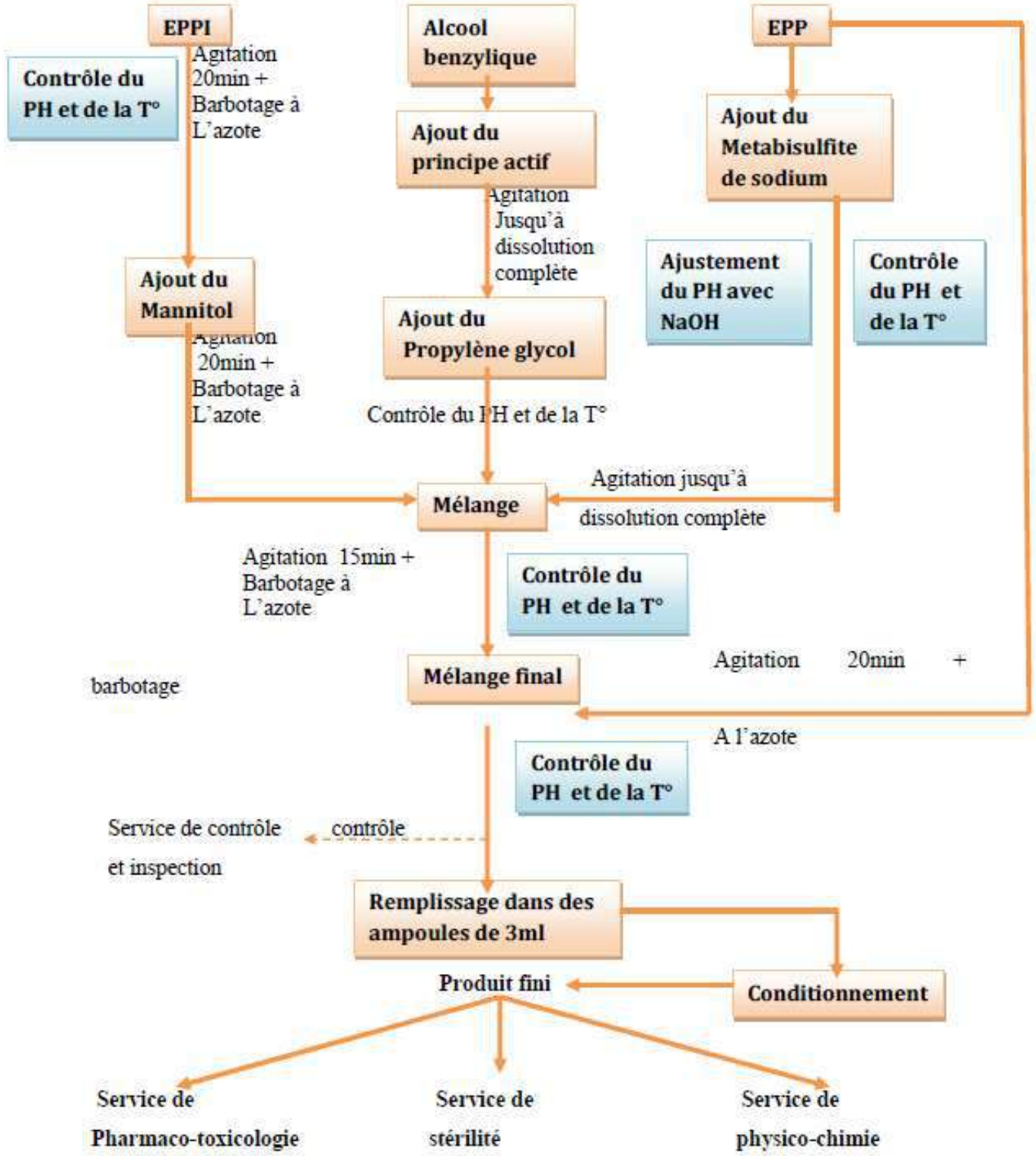


Schéma 1 : Les différentes étapes de production du Clofenal (75mg/3ml) « Solution injectable »

IV.6 Contrôle de qualité de Clofenal

IV.5.1 Physico-chimique

Le contrôle physico-chimique consiste à vérifier :

- L'aspect de la solution qui doit être incolore, limpide et sans particules en suspension.
- Le volume moyen de Clofenal doit être compris entre 3 et 3.3ml.
- La limite d'acceptation du ph doit être entre 8 et 9.
- L'identification par U.V : présente un maximum d'absorbance a la longueur d'onde ʎ=275nm
- Dosage par UV : Le contrôle du mélange constitué par le principe actif et les excipients, se fait par le dosage du principe actif dans le mélange et comparé avec les normes en vigueurs.
- Le contrôle des particules (débris de verre, poussière, fragments de fibres…) : est réalisé sur un fond blanc pour détecter les particules noires, en présence d'une source de lumière.

IV.5.2 Stérilité

Les préparations pharmaceutiques ne sont de qualité que, s'ils sont conformes aux normes microbiologiques **(89)**

Le contrôle microbiologique du Clofenal comme toutes les solutions Injectables nécessite un test de stérilité qui à pour but de vérifier l'absence de contamination bactérienne et/ou fongique dans les préparations obligatoirement stériles **(80)**

IV.5.3 Toxicologique

a. Détermination de la DL50 : c'est la dose létale pour 50% des animaux.

b. La recherche des endotoxines « LAL teste » : L'essai des endotoxines bactériennes a pour objectif la détection et la quantification des endotoxines produites par les bactéries gram négatif, en utilisant un lysat d'amoebocytes de limule ***«Limulus polyphemus»*** (un arthropode marin de sang bleu qui contient de l'hémocyanine au lieu d'hémoglobine) qui se coagule en contact des endotoxines bactériennes **(90)**

Etude Expérimentale

I. Introduction

Pour les préparations pharmaceutiques telles que les solutions parentérales, injectées dans le système sanguin ou sous la peau, les pharmacopées internationales demandent une stérilité complète c'est des Préparations obligatoirement stérile.

Pour la stérilisation des préparations injectables il va être possible de procéder deux méthodes soit le faire au moyen d'un autoclave dans leur conditionnement primaire ou grâce à une filtration stérilisante pour du remplissage aseptique. Avant la réalisation ces deux mode de stérilisation les mélange finales sont obligatoirement passés par un préfiltre de 0.45 µm. pour réduire la biocharge aussi pour éviter le colmatage rapide des filtres stérilisants par des particules en suspension

II. Objectif

Notre travail a pour but de maitriser les principes et les exigences de la stérilisation d'une solution injectable par deux méthodes différentes :

-Réaliser la stérilisation de Clofenal 75mg/3 ml par la chaleur humide (autoclave) et la filtration stérilisante.

-faire une comparaison de ces deux procédés par dosage des solutions obtenues par l'HPLC pour savoir quelle est la méthode qui permet d'atteindre l'état stérile de Clofenal injectable et obtenir un médicament exempt de microorganismes sans dégradation ni destruction de Principe actif.

III. Matériel et méthode

III.1 matériel et réactifs

III.1.1 matériel

- Hotte à flux laminaire horizontal
- Ciseaux
- Flacons en verre à bouchons en caoutchouc type perfusion de 500 ml
- Boites de pétri

- Seringues jetables de 5 ml
- Filre 0.45 µm
- Filtre MILLEX 0.2 µm
- Filtre 0.1 µm
- compteur de particules (CLIMET) avec accessoires
- HPLC
- Fioles
- Pipette gradué
- Éprouvette
- Marqueur
- Etuve bactériologique
- Pompe péristaltique
- Lampe ultra-violet
- Autoclave
- Bain marie à 60°C
- Chariot en inox inoxydable
- Bidon en plastique pour élimination des filtrats
- Canisters
- Ultrason
- indicateurs de passage de stérilisation
- Indicateur chimique (bandelettes)
- Gants

III.1.2 Réactif

- Désinfectant (Benzelkounium, alcool éthylique, alcool Isopropylique)
- Souche de référence
- Eau peptonée à 0.1% en flacon de 400 ml stérile
- Milieu de culture Thioglycolate 100 ml
- Milieu Trypticase soja 100 ml
- Mélange final de solution clofenal
- ampoules remplies de Clofenal
- Acétonitrile grade HPLC.

- Tween 80
- spore de Bacillus stéothermophilus dérivée ATCC 7953 Ampoule attest 3M
- Bacillus subtilis ATCC 9372 Ampoule attest 3M
- Eau distillée
- Méthanol grade HPLC
- Acétonurile grade HPLC
- Acide phosphorique
- Diclofenac de sodium
- Hydroxyde de sodium(NaOH)

III.2.Méthodes

III.2.1 La filtration stérilisante

III.2.1.1 Définition

C'est un procédé d'élimination des microorganismes à l'aide des média filtrants poreux. Ce mode de stérilisation est applicable aux préparations qui ne supportent pas l'action de la chaleur. Elle n'est pas applicable aux médicaments conditionnés, le recueillement et la répartition de la solution stérile se font de manière aseptique dans des enceintes stériles. Son usage ne cesse de se multiplier du fait de la découverte de principes actifs de plus en plus fragiles.

III.2.1.2 Principe

Basé sur le principe de rétention, c'est la séparation des microorganismes présent dans la solution à l'aide d'un média filtrant stérile de diamètre **= 0, 1 µm**. La filtration s'effectue sous pression d'un gaz inerte (Azote)

III.2.1.3 Mode opératoire

a. Contrôle de l'intégrité des filtres :

Le contrôle s'applique dans les zones à atmosphère contrôlée « ZAC », tunnels de stérilisation, hotte à flux d'aire laminaire de la production et laboratoire.

La décontamination

- Exposer l'appareil pendant 30 min sous la lampe ultra-violet selon l'instruction « stérilisation par rayonnement Ultra-Violet ».
- Faire entrer la sonde de la rallonge métallique, les faire décontaminer par un cycle de stérilisation.
- Entrer en stérile selon l'instruction « Règles s'entrée et de sortie du personnel des zones à atmosphères contrôlées ».
- Placer la sonde sur la rallonge et mettre l'appareil sous tension, selon le mode opératoire « Mode d'utilisation du climet (compteur de particules) ».
- Travailler selon le plan établi par le demandeur.
- Choisir le temps d'échantillonnage selon l'aire du filtre soit :
  - 02 minutes pour les plus grandes
  - 01 minute pour les plus petites.
- Ballayer la surface du filtre on respectant une distance de 03 cm environ entre la sonde et la cage du filtre.
- Surveiller le comptage en cherchant les fuites et étanchéité sur les bords du filtre .
- Fixer la sonde sur la fuite jusqu'à ce que le temps d'échantillonnage soit écoulé.

b. stérilisation de Clofenal par filtration stérilisante

Apres l'agitation du mélange final dans le réacteur.

- Faire passer la solution du CLOFENAL® par un préfiltre de 0.45 µm, puis par un filtre stérilisant de 0.22 µm sous une pression exécrée pour la filtration stérilisante de 0,5Kg/cm².
- Le filtrat obtenu se stocke dans des ballons de récolte en verre transparent muni d'un filtre évent de 0,1 µm pour du remplissage aseptique des ampoules.
- Le remplissage se fait dans la ZAC, sous conditions climatique bien adaptés à température 22°C et sous pression entre 1.5-2.5 mm H2O, par une remplisseuse qui consiste à remplir les ampoules vide stérile à l'aide des aiguilles d'un volume bien déterminer, les ampoules remplie passent par une flamme de gaz naturelle et dioxygène afin d'avoir une soudure bo

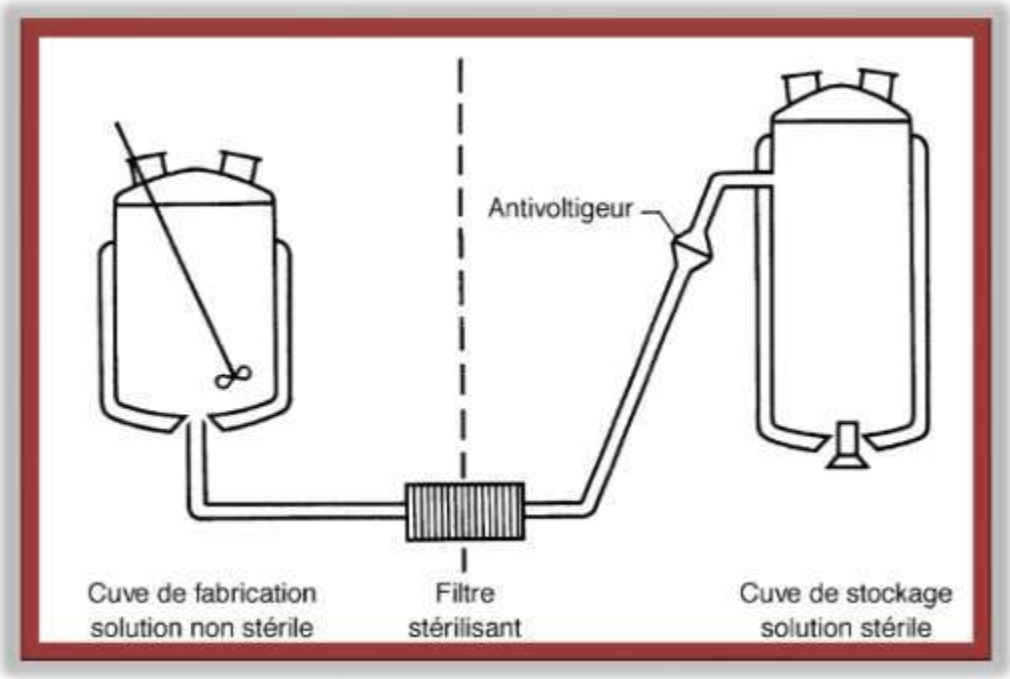


Figure II.1 : Installation de filtration stérilisante de Clofenal

c. Contrôle de stérilité

Ce contrôle a pour but de vérifier l'absence de tout contaminant dans la solution injectable et donc d'assurer l'efficacité de la méthode utilisé

Mode opératoire :

On a prélevé 20 ampoules de Clofenal au cours de la chaine de production à des intervalles de temps différents. On met les ampoules dans un sachet en plastique, on le ferme et on note le Nom du produit, le N° du lot et la date de prélèvement. Les ampoules sont destinées au le service de stérilité

- **Préparation des souches :**

Nous avons effectué la réactivation des souches pures suivantes :

Staphylococcus aureus	ATCC	6538
Candida albicans	ATCC	2091
Bacillus subtil us	ATCC	6633
Clostrodiumsporogens	ATCC	19404

Prélève à partir de la culture stock sur gélose inclinée. On introduit l'anse en platine dans le tube de conservation jusqu'au contact de la gélose en évitant de toucher les parois, puis on prélève la quantité de germes qui se trouve en surface, on les ensemence dans d'autres tubes de gélose nutritive inclinée qu'on incube dans une étuve à 25 °C pendant 24 à 48 h.

- **Dilution :**

On prépare 10 tubes (pour chaque souche) contenant chacun 9 ml d'eau physiologique (9%).on procède aux différentes dilutions jusqu'au stade 10-10 en transférant à chaque fois 1ml de la dilution précédente.

- **Ensemble du milieu gélosé :**

A l'aide d'une seringue stérile on prend 0,1 ml de chaque dilution et on fait un ensemencement en profondeur de la boite de Pétri (2 essais par dilution). Les milieux de culture (soja agar, sabouraud) sont déjà maintenus en surfusion. On coule dans chacune de ces boites un de milieu de culture de façon à couvrir toute la surface, on utilise : volume

Sabouraud : pour *C. albicans.*

On mélange l'inoculum, les boites sont maintenues bien plates sur le plan de travail. On agite légèrement dans un sens puis dans l'autre en évitant tout mouvement brusque qui risque de projeter le milieu contre la paroi de la boite. On laisse refroidir, puis on incube les boites en position inversée (le couvercle vers le bas). On incube les boites de pétri contenant les bactéries à 35°C pendant 24 à 48 h et celles contenant les levures (*C. Albicans*) à 25 °C pendant 24 à 48 h.

- **Dénombrement** :

On retire les boites de pétri de l'incubateur puis on sélectionne celles contenant 30 à 300 UFC (unité formant colonies).on dénombre les colonies en surface des boites. Après, on fait la moyenne entre les deux essais pratiqués avec la même dilution, et on multiplie le nombre de colonies par l'inverse de cette dilution pour avoir le nombre de bactéries dans 1ml d'inoculum. Ce dénombrement se fait pour chaque type de germe.

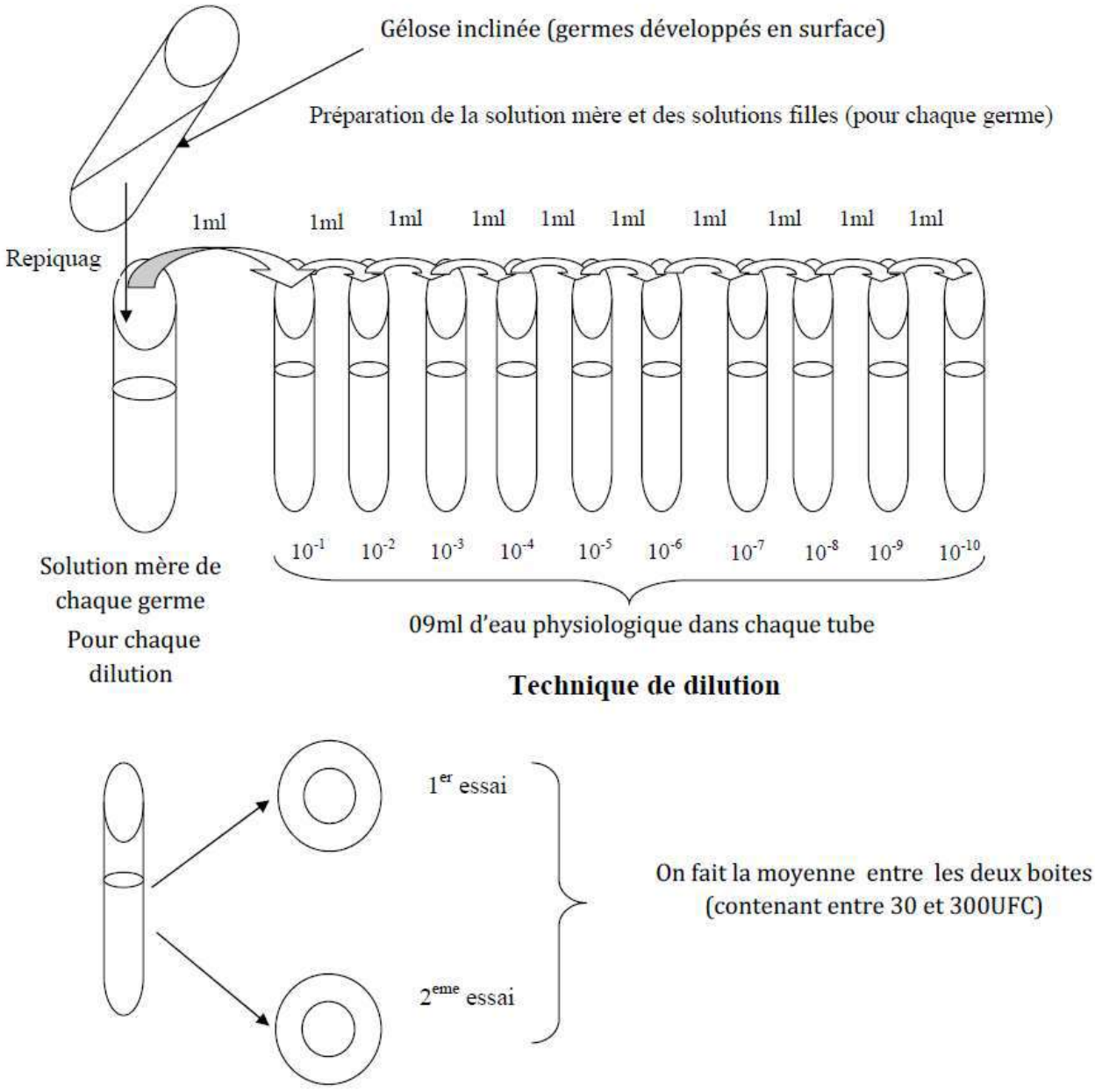


Figure II.2 : Méthode d'ensemencement des germes

- **Etapes de contrôle :**

- **Contrôle de stérilité des milieux de culture :**

Afin de vérifier la stérilité des milieux de culture qui utilisés dans notre expérimentation, nous procédons a leur incubation pendant 7jours. Apres une semaine d'incubation, ces milieux ne doivent présenter aucun développement microbien (absence de trouble). Dans le cas contraire, le milieu n'est pas stérile. Les milieux sont rejetés et l'essai doit être recommencé avec un nouveau lot de milieux.

- **Contrôle de fertilité des milieux de culture :**

Cet essai renseigne sur la fertilité des milieux préparés, et assure qu'ils ne sont pas Périmés. On ensemence 1ml dans chaque flacon contenant les milieux bouillon Thioglycolate et bouillon soja trypticase. Leurs incubations durent 07 jours.

On ensemence 1 ml de dilution différente en fonction des souches.

Germes	Germes/ml	Milieux de Culture	T° d'incubation (C°)	Dilution utilisée
C. albicans	105	Soja trypticase	25	10-6
B. subtilus	142	Soja trypticase	25	10-3
S. aureus	196	Thioglycolate	35	10-7
C. sporogens	100	Thioglycolate	35	10-6

Tableau II.2 : Contrôle de fertilité des milieux de culture

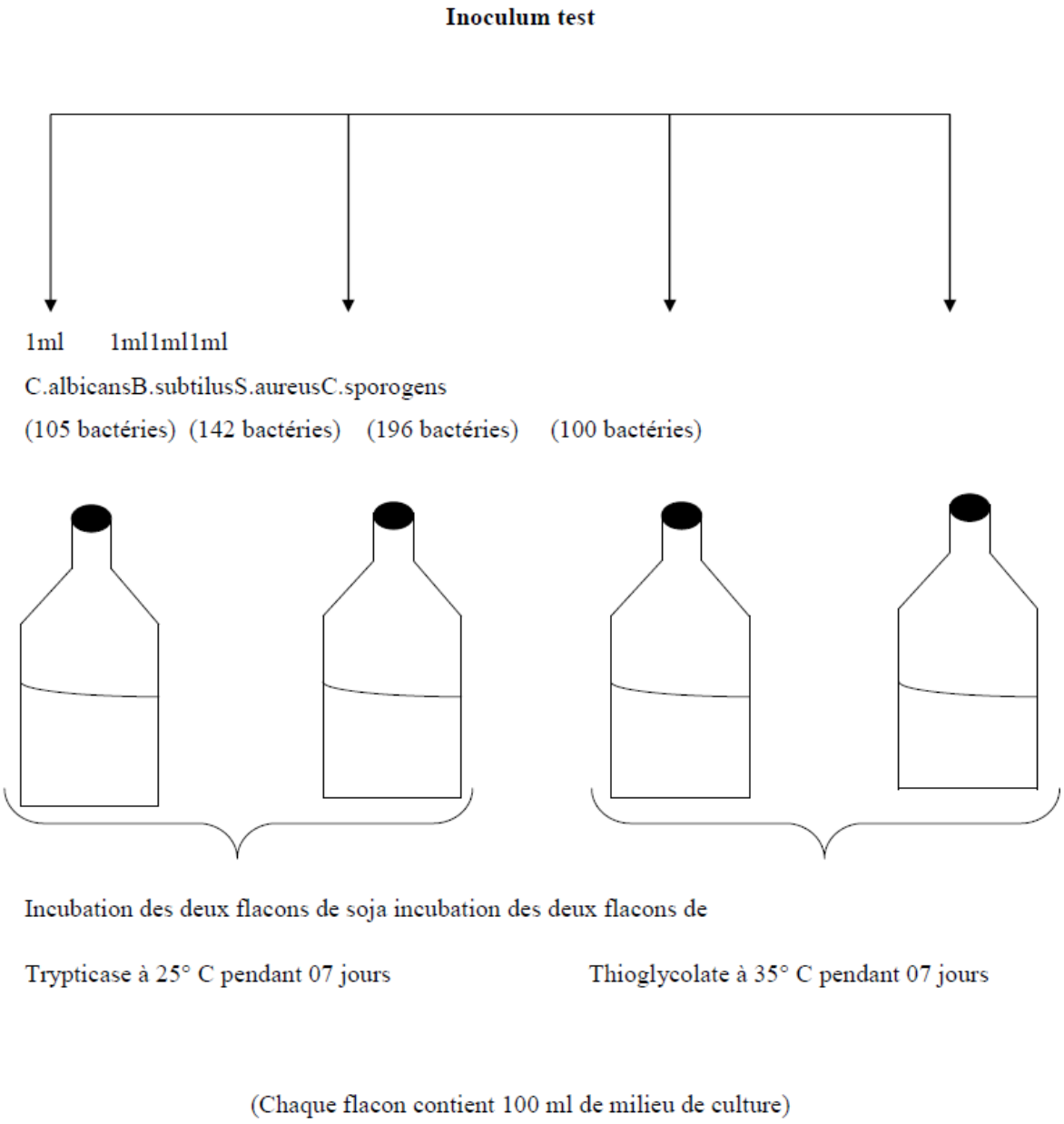


Figure II.3 : Contrôle de fertilité des milieux de culture

- **Teste de stérilité du Clofenal :**

On a effectué l'essai de stérilité du Clofenal dans une chambre stérile de classe **A** (ZAC) qui contient une hotte à flux laminaire horizontal. À l'intérieur de la chambre stérile, on porte obligatoirement une tenue spéciale et des gants de protection.

-Allumer la hotte, puis placer les dispositifs de filtration ou encore appelé steritest (contient un filtre d'une porosité ≤ 0,45µm) dans la pompe péristaltique.

- Casser l'ampoule par la lime casse ampoule

- Aspirer le contenu de 20 ampoules par la pompe péristaltique qui va le faire passer à travers les filtres millipore (0,45 µm) de l'unité steritest.

-Rincer les filtres avec le liquide de rinçage (eau peptonée stérile 0,1% 400 ml) a l'aide de la pompe péristaltique.

- Placer les bouchons jaunes en dessous de l'unite steritest

-Introduire les deux milieux de cultures dans les deux vases de filtration de l'unité stéritest (trypticase soja dans un vase et le milieu Thioglycolate dans l'autre vase),

-Placer les clamps d'entrées de l'unité

-Couper les tubulures à l'aide d'un ciseau

-Fixe ces tubulures dans les filtres event.

-Identifie les deux vases en inscrivant le n° de lot, le nom du produit et la date d'analyse sur les deux unités steritest contenant trypticase soja bouillon et Thioglycolate bouillon. Les deux milieux de culture sont incubés pendant 14 jours :

- Soja bouillon à 25 °C, pour la recherche des levures et moisissures et les germes aérobies.

- Thioglycolate bouillon à 35°C, pour la recherche des germes aéroanaérobies facultatifs.

- ✓ **Lecture :**

Au 14 ème jour, on sort les deux vases des étuves et on examine les milieux de culture pour déceler éventuellement les signes macroscopiques d'une prolifération microbienne représentée par une turbidité (trouble) du milieu.

S'il n'y a aucune manifestation de croissance, le produit contrôlé est considéré comme Satisfaisant à l'essai de stérilité.

S'il y a une prolifération microbienne, le produit ne satisfait pas à l'essai de stérilité alors on identifie le ou les germes contaminants et on répète l'essai, pour démontrer que la

Prolifération microbienne observée dans les milieux utilises n'est pas due à une contamination intrinsèque du produit examiné, mais à une contamination au cours de la manipulation.

Il y a une première et une deuxième répétition.

- **Test de fertilité du Clofenal (challenge test) :**

A la fin de la période d'incubation, étape de la lecture des résultats. Ensemencer 1 ml du mélange des souches (*S. aureus + C. sporogens*) dans l'unité steritest contenant du bouillon Thioglycolate.

On ensemence aussi 1 ml du mélange de souches (*B. subtilus +C. albicans*) dans l'unite Stéritest contenant du soja trypticase. On injecte des quantités de germes ≥ 100UFC /ml.

On incube les deux vases de stéritest à 35°C pendant 48h maximum et après on fait la Lecture.

III.2.2-Stérilisation par chaleur humide (autoclave)

III.2.2.1 Définition

C'est un procédé de destruction des microorganismes présents dans la préparation au moyen de vapeur d'eau saturé. C'est la méthode de stérilisation à recommander car la plus fiable et la plus facile à valider et à contrôler. Lorsqu'elle est réalisable la stérilisation par la chaleur est la technique de choix. Elle appliqué aux solutions conditionnées en ampoules en verre.

III.2.2.2. principe

Le principe est de porter de l'eau à ébullition à une température de **121°C** grâce à des appareils permettant une augmentation de la pression **(1.1bar)** de manière à obtenir une vapeur saturante. C'est en effet cette vapeur d'eau qui constitue le gaz stérilisant..Dans ces conditions la destruction des germes est assurée en **20 min** .La stérilisation est effectuée dans des autoclaves

III.2.2.3 Mode opératoire

a. Contrôle de la stérilisation de l'autoclave

- ***Contrôle bactériologique***

-Déposer 5 ampoules de spores de Bacillus Stéarothermophilus ou de Bacillus subtilis, sous forme de croix à chaque niveau de l'autoclave.

-Effectuer un cycle de stérilisation pendant 15 min à 121°C pour autoclave à la vapeur

-Casser les 05 ampoules à l'aide d'une pince spéciale

-Incuber pendant 24 h à 56°C dans un bain marie (voir le tableau)

-Casser une ampoule témoin non stérile et incuber de la même façon que les autres (doit être positif).

Autoclave à la vapeur		
Température d'incubation 56 °C ± 2°C au bain marie		
Stérilisation efficace	Stérilisation incorrecte	Témoin
Rouge	Jaune	Jaune

Tableau II.3 : Contrôle de stérilisation d'un autoclave

➢ ***Contrôle chimique***

- coller un ruban adhésif ou attacher une bandelette colorée aux objets à stériliser

-Effectuer un cycle de stérilisation pendant 20 min à 121°C.

Un changement catégorique de la couleur de la bandelette ou de ruban indique qu'il y 'avait une bonne stérilisation.

b. Stérilisation de clofenal par la chaleur humide

L'appareil utilisé est l'autoclave avec un programmateur qui permet de réaliser

- Soit des cycles classiques par vapeur d'eau sous pression à 121°C ou 134°C pour la stérilisation
- Soit des cycles sous vides avec vapeur d'eau et formaldéhyde pour le teste d'étanchéité sous le vide

Dans notre travail nous allons réaliser un cycle classique par vapeur d'eau sous pression pour stériliser les ampoules remplies du Clofenal.

Déroulement de cycle

-Apres l'agitation du mélange final dans le réacteur. Faire passer la solution du CLOFENAL® par un préfiltre de 0.45 µm seulement

-Après le remplissage de mélange des ampoules en verre, transférer ces dernières à la salle d'autoclave

-Identifier le chariot par les indicateurs de passage

-Placer les ampoules dans le panier métallique perforé et remplir le cylindre avec suffisamment d'eau.

-L'autoclave est soigneusement fermé et le chauffage est allumé.

-L'air intérieur est purgé par le robinet d'évacuation (sinon il reste des poches d'air et la température n'est pas uniforme où la stérilisation ne se fait pas en milieu humide et risque donc d'être inefficace), qui est ensuite fermé au moment de la sortie de vapeur (sifflement)
-La température et la pression intérieure vont augmenter parallèlement. (T=121 °C et P=1.1bar)
-Lorsque la pression est atteinte, le chauffage est réglé pour la maintenir ainsi pendant 20 minutes
-Le chauffage est arrêté et l'autoclave se refroidit lentement.
-Quand le manomètre est revenu à 0, on peut ouvrir (il ne faut pas ouvrir le robinet d'échappement avant le retour du manomètre au zéro (100 °C) sinon la dépression brutale provoque l'ébullition des liquides et l'éclatement des ampoules. Si on attend trop, il se produit une condensation sur les objets stérilisés.
-Ouvrir le robinet de décharge et laisser l'air entrer dans l'autoclave
-Ouvrir le couvercle de l'autoclave et retirer les ampoules.

c. Contrôle à la fin de cycle

En fin de cycle, le bon déroulement de la procédure et l'état des emballages (siccité et l'intégrité) sont contrôlés. Toute anomalie doit faire réfuter la stérilisation.
La stérilisation est évaluée sur chacun des plans (physique, chimique et biologique).

On utilise :

- **Des contrôles d'ordre physique** : consistent à vérifier l'obtention des paramètres (Température, pression, temps) se fait par comparaison avec les paramètres retenus (lecture du diagramme d'enregistrement pression/température/temps).

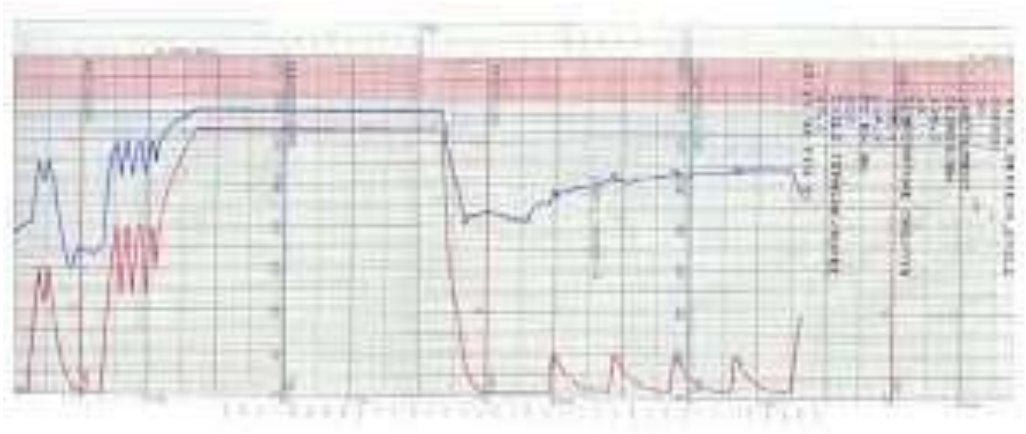


Figure II.4 : Exemple d'un diagramme d'enregistrement d'un cycle de stérilisation par autoclave

Il permet de vérifier le déroulement conforme du cycle et l'obtention de la valeur stérilisatrice, par comparaison avec l'enregistrement de référence obtenu lors de la qualification opérationnelle du stérilisateur avec une charge type de même nature.

- **D'ordre chimique :** On a recours aux :
  - *Virage des indicateurs de passage* : le changement de couleur permet d'identifier les objets passés dans l'autoclave mais ne constitue pas une garantie de l'état stérile. (contrôle le contact avec l'agent stérilisant sans en affirmer l'efficacité).

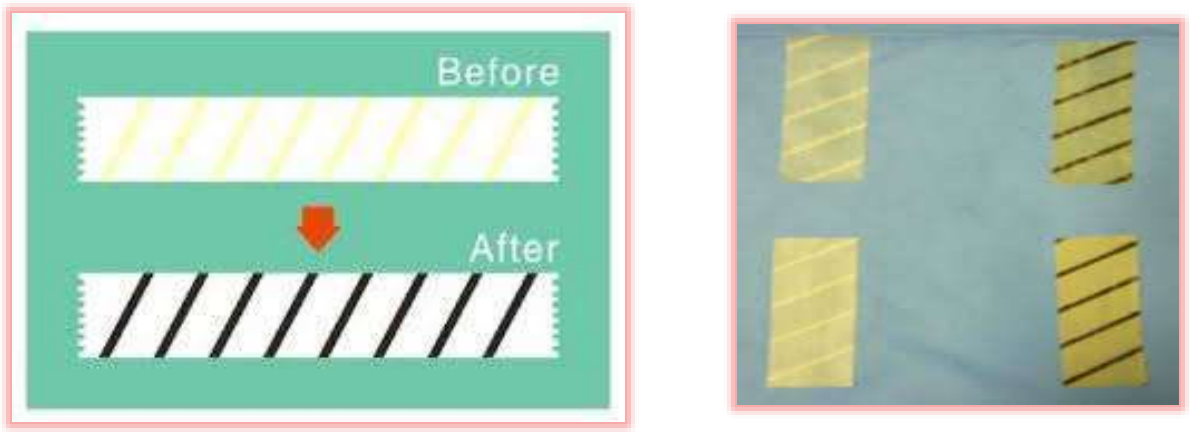


Figure II.5 : Exemple d'un indicateur de passage

- **D'ordre biologique :** ce sont les seuls qui traduisent réellement la stérilité du produit. C'est des analyses qui durent 14 jours (le même protocole appliquer pour le contrôle de stérilité de Clofenal en suivant la méthode de filtration stérilisante), ***voir (c. Contrôle de stérilité).*** **(91)**

III.2.3 Dosage de principe actif dans le produit fini par HPLC

III.2.3.1 Définition

Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC) ou simplement *la chromatographie en phase liquide* (CPL) ou liquid chromatography (LC) est une technique d'analyse quantitative, qualitative permet la séparation ou la purification d'un ou de plusieurs composés d'un mélange en vue de leur identification et de leur quantification. Principalement employée dans le domaine de la chimie analytique comme outil scientifique majeur mais aussi dans des domaines variés tels que la Toxicologie et la Biochimie.

III.2.3.2 Principe :

Les composés à séparer (solutés) sont mis en solution dans un solvant. Ce mélange est introduit dans la phase mobile liquide (éluant). Suivant la nature des molécules, elles interagissent plus ou moins avec la phase stationnaire dans un tube appelé colonne chromatographique.

La phase mobile poussée par une pompe sous haute pression, parcourt le système chromatographique.

Le mélange à analyser est injecté puis transporté au travers du système chromatographique.

Les composés en solution se répartissent alors suivant leur affinité entre la phase mobile et la phase stationnaire.

En sortie de colonne grâce à un détecteur approprié les différents solutés sont caractérisés par un pic. L'ensemble des pics enregistrés est appelé chromatogramme.

III.2.3.3 Appareillage

Un chromatographe liquide haute pression comporte une ou plusieurs pompes qui propulsent l'éluant dans une colonne analytique. L'injection de l'échantillon à analyser est pratiquée en introduisant un faible volume de produit (quelques µl) dans l'éluant sous pression. Après leur séparation, les différents constituants de l'échantillon sont détectés en sortie de colonne. Un logiciel assure l'acquisition et le traitement des données**. (92)**

a. Un réservoir de solvant (éluant)

Il contient la phase mobile en quantité suffisante. La phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants qui doit être de pureté analytique et filtré pour éliminer les particules solides qui risqueraient d'endommager la pompe ou débloquer la colonne. Le filtre, en acier

inoxydable d'une porosité de 2 µm, est placé à l'extrémité dans le réservoir à solvant **(93).** Plusieurs flacons d'éluant (solvants de polarités différentes) sont disponibles pour pouvoir réaliser des gradients d'élution (mélange de plusieurs solvants à des concentrations variables) à l'aide de la pompe doseuse **(94)**

b. La pompe

Elle est munie d'un système de gradient permettant d'effectuer une programmation de la nature du solvant. Elle permet de travailler

- ***En mode isocratique***, c'est-à-dire avec 100% d'un même éluant tout au long de l'analyse, on utilise une pompe simple, réglable en pression, ou en débit.
- ***En mode gradient*** (de polarité, de force ionique, ou de pH), c'est-à-dire avec une variation de la concentration des constituants du mélange d'éluant. Les pompes actuelles ont un débit variable de quelques µL à plusieurs m/min. **(92)**

c. L'injecteur

L'injection de l'échantillon se fait de deux manières :

- ***Manuelle*** : l'injecteur comporte une vanne à plusieurs voies montée sur le parcours de la phase mobile, juste avant la colonne. L'échantillon à analyser est introduit avec une microseringue dans un petit volume tubulaire appelé boucle ; l'échantillon est ainsi inséré avec un flux de phase mobile.
- ***Automatique*** : l'injection se fait automatiquement, l'injecteur utilisé comporte une vanne à boucle d'échantillonnage d'une capacité fixe, cette boucle permet d'introduire l'échantillon sans modifier la pression dans la colonne. **(95)**

d. La colonne

La colonne est la partie la plus importante du système, puisque c'est à cet endroit que se fait la séparation des composés. Les colonnes sont en acier inoxydable, de longueur variant de 5 à 25 cm avec un diamètre interne de 4 à 4,6 mm. Ces colonnes sont remplies de la phase stationnaire, dont le diamètre des particules varie de 3 à 10 µm. Des compagnies se spécialisent dans la vente de colonnes pour HPLC. **(93)**

e. Phase stationnaire

La phase stationnaire est maintenue entre deux disques frittés, on distingue deux types de phase stationnaire **(95)**

- ***La phase stationnaire normale***

La phase normale est constituée de gel de silice. Ce matériau est très polaire. Il faut donc utiliser un éluant apolaire. Ainsi lors de l'injection d'une solution, les produits polaires sont retenus dans la colonne, contrairement aux produits apolaires qui sortent en tête.

- ***La phase stationnaire inversée***

La phase inverse est majoritairement composée de silice greffée par des chaînes linéaires de 8 ou 18 atomes de carbones (C8 et C18). Cette phase est apolaire et nécessite donc un éluant polaire tels que l'acétonitrile, le méthanol et l'eau. Dans ce cas, ce sont les composés polaires qui seront élués en premier**. (96)**

f. La phase mobile

L'interaction plus ou moins forte entre la phase mobile et la phase stationnaire normale ou à polarité inversée se répercute sur les temps de rétention des solutés. La polarité de la phase stationnaire permet de distinguer deux situations de principe :

- Si la phase stationnaire est polaire, on utilisera une phase mobile peu polaire, la chromatographie est dite en phase normale.
- Si la phase stationnaire est très peu polaire, on choisira une phase mobile polaire

(le plus souvent des mélanges de méthanol ou d'acétonitrile avec de l'eau), c'est la chromatographie en phase inverse

g. Le détecteur

C'est un élément essentiel d'un système HPLC, il permet de suivre en continu la séparation et de mesurer la concentration instantanée des solutés. Les principaux détecteurs utilisés en HPLC sont :

- ***Détecteur UV- visible*** : il mesure l'absorption de la lumière par le produit à la sortie de la colonne.
- ***Détecteur a indice de réfraction*** : il mesure en continue la différence d'indice de réfraction entre la phase mobile et l'effluent de la colonne.

h. L'enregistreur

L'enregistreur reçoit un signal électrique proportionnel à la concentration de l'analyte qui Traversé le détecteur. Ce signal est traité, amplifié puis utilisé pour tracer le chromatogramme **(94)**

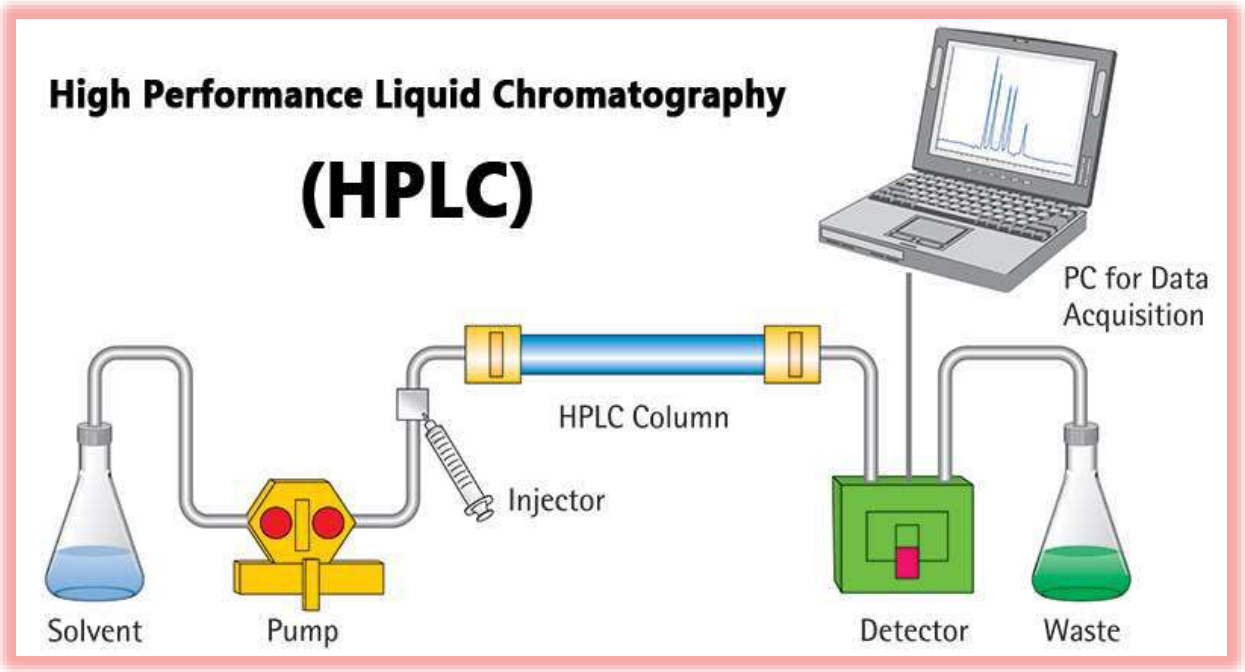


Figure II.6 : Schéma d'une chaine HPLC

III.2.3.4 Identification et quantification de principe actif (Diclofenac) dans le produit finis (Clofenal) par HPLC :

Le dosage du diclofénac de sodium dans les préparations injectables peut s'effectuer selon plusieurs méthodes analytiques.

L'objectif du cette partie est de mettre au point et de valider une nouvelle méthode de dosage du diclofénac sodique dans la solution injectable (Clofenal) par Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC).

- **Protocoles expérimentale**

- **Préparation du diluant (NaOH 0,1 N)**

  Dans une fiole jaugée de 1 L, peser 40g de NaOH, dissoudre dans un volume suffisant d'eau purifiée. Agiter et mettre dans l'ultrason pour une dissolution complète puis compléter au trait de jauge. Effectuer une dilution au 1/10 dans l'eau purifiée (100 ml de NaOH 1N dans 1 L d'eau purifiée).

- **Préparation de la phase mobile**

  Dans une éprouvette graduée de 1000 ml, mélangez 500 ml de méthanol grade HPLC, 280 ml d'acétonurile grade HPLC, 219 ml d'eau purifiée et 1 ml d'acide phosphorique. Filtrer puis verser dans le réservoir de la phase mobile.

- **Préparation d'échantillon**

Effectuer le volume moyen sur 10 ampaules.Agiter puis prélever 1 ml de la solution dans une fiole de 20 ml completer jusqu'au trait de jauge par le diluant ; puis faire une autre dilution de 2ml de cette dernière dans une fiole de 20 ml , completer au volume avec le diluant

- **Préparation de la Solution standard**

Dans une fiole de 100 ml, peser 100 mg de diclofénac de sodium, ajouter 50 ml du diluant et mettre dans l'ultrason pour une dissolution complète. Compléter au trait de jauge avec le même diluant. Effectuer une dilution au 1/10 avec le même diluant (5 ml de la préparation dans 50 ml de NaOH 0,1N).

.

➢ **Conditions chromatographique :**

Detecteur UV : λ =254 nm.

Colonne : C18(30 cm *4 mm)

Débit :1.6ml/min

Volume à injecter 20 µl

➢ **Critère d'acceptation**

Le temps de rétention du pic de la solution échantillon correspond à celui de la solution standard.



Figure II.7 : Appareil HPLC

Conclusion

Selon la pharmacopée européenne Les formes pharmaceutiques destinées à la voie parentérale sont des préparations qui doivent être obligatoirement stérile car la présence de certains micro-organismes dans ces dernières peut réduire voire annuler l'activité thérapeutique du produit, et constitue un danger potentiel pour la santé du patient.

La stérilisation des préparations injectables peut s'effectuer soit :

-En tuant les microorganismes par la chaleur (sèche ou humide), ou par des agents chimiques, ou encore par rayonnement

-Soit on les élimine par filtration

Dans ce travail Nous avons choisi deux méthodes pour stériliser la solution injectable Clofenal, la première par chaleur humide ou autoclavage et la deuxième par filtration stérilisante.

Après la stérilisation, des contrôles de stérilité sont mise en œuvre au niveau de laboratoire microbiologique qui sont standardiser par las pharmacopées.

Pour s'assurer de la fiabilité et de l'efficacité de chaque méthode un dosage par HPLC est réalisé sur les produits stérilisés.

Références Bibliographiques

[1]. **GAIGNAULT (G.-A.).** *"principe de la recherche du médicament"*. paris : Masson, 1982. p. 75.

[2]. **M.L .Castelli, L.Braverman,.** *"Les 1000 médicaments les plus utilisés"*. 3ème édition . paris,1998.

[3]. **Talbert. M, Labayle. D, et Willoquet. G.** *"Guide Pharmaco"*. France, : Lamarre, 2001.

[4]. **article L.511-1.** *"le code de la santé publique"*.

[5]. **J-M.Aiache, E. Beyssac , Cardot J. R.Renoux, V. Hoffart,.** *"Initiation à la connaissance des médicament"*. 5 ème édition. France, : Elsevier Masson, 2008.

[6]. **Clive.P, Michoel. J , Morley. C, Brion. B,.** *« pharmacologie intégrée »*. 1 ème édition : De Boeck, 1997.

[7]. Le hir. A, Chameil. J-C, Brossard.D,. *« Pharmacie galénique: Bonnes pratique de fabrication des médicaments »*. 9 ème édition. France : Elsevier Masson, 2009.

[8]. AIACHE. J.-M, AIACHE. S et RENOUX .R,. *"Initiation à la connaissance des mésicaments"*,.2 ème édition . Paris : Masson., 1995.

[9]. Olivier.ALLO, Pascale. BLANC, Marie-Ange. DALMASSO,. *"Pharmacie Galénique B.P"*. 2 ème édition : Groupe Liaison SA, 2005.

[10]. Le Hir. A. *"Pharmacie galénique: bonnes pratiques de fabrication des médicaments"*,. 7 ème éditio,. Paris. : Masson, 2001.

[11]. Onahès. R, Devaller. B,. *"Chimie générale"*. [éd.] Raymond. 4 ème édition. 1998.

[12]. Khouilegue. S. Kimouche. CH. *"Contrôle de qualité, analyse physicochimique et microbiologique des différentes formes médicamenteuses de Sulpuren et d'Amoximex".Mémoire de master en chimie pharmaceutique.* . Université de Constantine-Algérie, , 2013.

[13]. Dell. P. *"La vériré sur les vaccins"*. 1 ème édition : Alpen, 1989.

[14]. AM.CHAUVEL. *"Méthodes et outils pour améliorer la qualité de votre organisation"*. [éd.] Dunod. Paris, 1996.

[15]. Touitou. Y. *"Pharmacologie : diplome d'état d'infirmières et professionnels"*. [éd.] Masson. 9 ème édition. Paris, 2000.

[16]. J.M Fonteneau et M.J Mathieu. *"Le manuel prophyre du préparateur en pharmacie"*. [éd.] Wolters Kluwer. France, 2008.

[17]. J. Aspar, P. Auriéres, P.Cûer,. *"Gastro-entérologie hépatologie"*. [éd.] Estem. 1 ème édition. 1999.

[18]. CHELLAKH. Ahlem. *"Formulation et détermination de qualité d'un produit pharmaceutique par une méthode d'analyse",Master academique en Chimie pharmaceutique.* 2017-2018.

[19]. I. Philippe. *«Guide médical des espaces sauvages»*. [éd.] Olizane. 1 ème édition,. 1997.

[20]. TOUITOU.Y. *"Pharmacologie:diplome d'état d'infirmière et professionnels".* 9 ème édition,. Paris : Masson, 2000.

[21]. M.Moulin, A.Coquerel,. *"Pharmacologie".* 2 ème édition,. paris, : Masson, 2002.

[22]. UE6-cours 3 et 4, définition et description des médicamentspdf.

[23]. Talbert.M, Willoquet. G, et Gervais.R,. *"Le guide pharmaco clinique".* France, : Wolters Kluwer, 2009.

[24]. Abelli.C, Andriollo.O, Machuron.L, Videau.J-Y, Vennat.B, et Ouget. M-P,. *"Equivalence pharmaceutique des médicaments essentiels génériques".STP pharma pratiques.* 2001.

[25]. BERROUAG.M, GANDI.H,. *"Contrôle de Qualité physico-chimique, microbiologique et toxicologique de l'Acide Folique (comprimé ZANITRA® 5mg)".*Mémoire master2 ,PROCEDES ORGANIQUES ET MACROMOLECULAIRES,Université M. BOUGARA - Boumerdes, . Algerie, 2017.

[26]. A.Berrached. *"Le rôle des visiteurs médicaux dans la promotion des produits pharmaceutique en Algérie",* Université de Abou Bakr Belkaid-Telemcen, mémoire de Magister,. 2010.

[27]. Gherrarba.H, Imoudane.Z,. *"Etude comparative de deux médicaments, Motilium et Nausedium : Etude qualitative et statistique".* Mémoire master en Génie pharmaceutique, Université Université Djilali Bounaâma - Khemis Miliana.2015,.

[28]. Jean-Louis. MONTASTRUC. *"Lexique de pharmacologie medicale ", Faculté de medecine de toulouse.* Toulouse , 2018.

[29]. Miri.F. *"Enregistrement d'un médicament générique fabriqué en Algerie",* Université de Tlemcen. 2014.

[30]. L.Chouchana, N.Dussaule,. *"Méga Guide PHARMACO infirmier".* [éd.] Masson. Paris, 2016.

[31]. J.Dangoumau. *"pharmacologie générale",* Université de Victor Segalen, Département de pharmacologie , Bordeaux2. 2006.

[32]. Petit jean.F, Marie Cardine.M,. *"Sachizophrénies débutantes diagnostic et modalités thérapeutiques".*John Libbey Eurotext, 2003.

[33]. R.Denine. *« Cours de pharmacie galénique », OPU,*. Alger, (2008).

[34]. Stora.D. *"Pharmacie et surveillance infirmière"*. 5 ème édition,. France, : Wolters Kluwer, 2008.

[35]. Fouteneau .(J.-M.), Orecchioni. (A.- M.) et PAIN. j,. *"Galénique, préparateur en pharmacie"*. Paris, 1999.

[36]. Lùllmann. H, Mohr. K , Ziegler .A,. *"Atlas de poche de pharmacologie"*. 2 ème édition, Lavoisier, 1996.

[37]. Gouraud.A. *"Généralité sur la pharmacologie et les médicaments"*. Bruxelles, Aden , 2012.

[38]. CHAMPE. C-P, HARVEY .A-R et MYCEK J.M,. *"Pharmacology, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia"*. 2 ème édition,. 2000.

[39]. Le Hir.A. *" Abrégé , Pharmacie galénique, bonnes pratiques de fabrication des médicaments",*. 7 ème édition. Paris : Masson, 2000.

[40]. CUQ (J.-L.). *"Les méthodes modernes d'analyse rapide en microbiologie Alimentaire. Agro-Alimentaire Information (9)", CDIUPA.* 1993,.

[41]. Kevin.Williams. *Endotoxins pyrogens, « LAL testing ,and depyrogrnation »*,James Swarbrick, 2001.

[42]. Bourin.M et Jolliet. P, B. *" Pharmacologie générale et pratique"*. Paris : Ellipses, 1999.

[43]. Ahmed Y.M. *«Elaboration des sirops».Mémoire d'ingénieur d'état en génie pharmaceutique.Université de Sétif-Algérie.* 2008.

[44]. Y. Cohen, C. Jacquot. *"Abréges pharmacologie"*. 5 ème édition . 2001.

[45]. J.P. Grunfeld. *"Dictionnaire médecine Flammarion"*. 7 ème édition. 2002.

[46]. Moussaoui. A, Dahman. M,. *"Contrôle physico-chilique, microbiologique et pharmaco-toxicologique d'un anti-inflammatoire Kétoprofène",[Mémoire]*. Blida : Université Saad Dahlab, 2012.

[47]. Morin. *" Histoire naturelle et médicale des nouveaux médicaments introduits dans la thérapeutique depuis 1830 jusqu'à nos jours"*. 2002.

[48]. M. del Arcoa, S. Gutierreza, C. Martina, V. Rivesa, J. Rochab. *"Synthesis and characterization of layered double hydroxides (LDH) intercalated with non-steroidal anti-antiinflammatory"*. 2004.

[49]. Souaga. K, Adou. A, Amantchi. D, Angoh. Y. *"Plaidoyer pour une utilisation raisonnée des anti-inflammatoires en odontostomatologie"*. Cocody – Abidjan.

[50]. M. Neal. *"Pharmacologie médicale"*. 2 ème édition. France , 1999.

[51]. Bannwath et al, B. *"Pharmacologie B.P.classes pharmacologique"*. 4 ème édition. 2005.

[52]. Gazengel (J.- M) et Orecchioni (A.-M.). *"Le préparateur en pharmacie, Guide théorique et pratique;*. 2 ème édition. Paris : Tec et Doc, 1999.

[53]. *"Pharmacopée Européenne V9.6. 5.1.1. méthodes de préparation des produits stériles"*. 2018.

[54]. *"PHARMACOPÉE EUROPÉENNE 6.0 chapitre 5.1.4. Qualité microbiologique des préparations pharmaceutiques"*.

[55]. *Recommandations en matière de techniques de stérilisation, 1993, Conseil Supérieur d'Hygiène, nr°7848.*

[56]. " *ANSM.guide des bonnes pratiques de fabrication"*. [En ligne] https://ansm.sante.fr/content/download/108495/1374645/. consulté le 23 08 2020.]

[57]. Sandle.T. *"Sterilisation And Sterility Assurance For Pharmaceuticals Technology, Validation And Current Regulations"*. 2013.

[58]. D.FROMENTIN, J. BRUN et J. LENGLART, *"Santé et assurance Qualité"*. 1998.

[59]. *Recommandations en matière de techniques de stérilisation, 1993, Conseil Supérieur d'Hygiène., nr°7848.*

[60]. Denis WOUESSI DJEWE. *"UE6 - Pharmacie Galénique : Voies d'administration et Formes Pharmaceutiques,Chapitre 6 :Formes galéniques administrées par voies parentérales", Université Joseph Fourier – Grenoble 1).* 2012.

[61]. *"Matériaux et systèmes d'emballages pour les dispositifs médicaux devant être stérilisés"* . 1999.

[62]. AFFSAPS. Note information stérilisateur STERRAD [Internet]. [En ligne] 2007,. https://www.ansm.sante.fr/content/download/26501/.../Information_STERRAD.pdf. consulté le 28.08.2020

63]. MATHIEU. S, DEL CERRO. C, NOTIS .M-H. *"Gérer et assurer la qualité", AFNOR.* 6ème édition. 1996.

[64]. Julien.Ami. *"Stérilité des préparations injectables hospitalières de 5-Fluorouracile : recherche d'une méthode alternative à l'essai de stérilité de la Pharmacopée Européenne",Thèse pour le diplôme d'État de docteur en Pharmacie, Université de Limoges.* 2018.

[65]. *Recommandations en matière de techniques de stérilisation, 1993, Conseil Supérieur d'Hygiène., nr°7848.*

[66]. Eudralex. *"EU Guidelines to Good Manufacturing Practice: Medicinal Products for Human and Veterinary"*. 2009.

[67]. TRISSEL.L.A. *"Using a medium-fill simulation to evaluate the microbial contamination rate for USP medium-risk-level compounding. American journal of health-system pharmacy "*. 2005.

[68]. SADEGHUPOUR.F. *"La préparation des médicaments parentéraux à l'hôpital - Hottes à flux d'air laminaire, in Séminaire DESS en pharmacie hospitalière"*. 2005.

[69]. *"Bonnes pratiques de pharmacie hospitalière (BPPH), Ligne directrice particulière pour la préparation des dispositifs médicaux stériles"*. 2001.

[70]. *"Dictionnaire des médicaments Saidal"*. 2005.

[71]. Y.Cohen, C.Jacquot,. *"Abréges pharmacologie"*. 5 ème édition. 2001.

[72. A.Gouzy, J-M.Brignon. 2012.

[73]. B. G. Katzung. *" pharmacologie fondamentale clinique";*. 7eme édition. 1998.

[74]. M.G. Lechon, X. Ponsoda, E. Connor, T. Donato, R. Jover, J. Castell. *"Diclofenac induces apoptosis in hepatocytes; Toxicology in Vitro"*. 2013.

[75]. D.J. Naisbitt, L.S. Sanderson, X. Meng, A.V. Stachulski, S.E. Clarke, B.K. Park,. "*Investigation of the immunogenicity of diclofenac and diclofenac metabolites; Toxicology"*. 2007.

[76].Schorderet.M.*"Pharmacologie des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques"* . Genève. 1989.

[77]. *"Pharmacopée européenne "*. 6 ème édition. 16 juillet 2007.

[78]. Pinel.J, Weiss.F, Henkens.M, Grouzard.V. *"Guide pratique d'utilisation des médicaments essentiels"*. 4 ème édition . 2006.

[79]. *"Dictionnaire des médicaments Saidal:CDR ; Diclofénac"*. Algérie , 2005.

[80]. ***Anonyme 1997 :****" Pharmacie, Documentation juridique"*. 2ème Edition. Alger .

[81]. Raymond.C rowe, Paul.J sheskey and marian.E Quinn,. *"Handbook of pharmaceutical excipients"*. 6éme édition.

[82]. Le Hir. A. *"Abrége Pharmacie galénique, bonne pratique de fabrication des médicaments"*. 7ème Edition. Paris : Masson, 2000.

[83].*https://www.saidalgroup.dz/fr/component/k2/item/297-Clofenal consulté le 05.09.2020.*

[84]. Swarnlata.S. *"NON-STEROIDAL ANTI-INFLAMMATORY DRUG". Sultan Bazar :PharmaMedPress* . 2008.

[85]. Collège Français des Enseignants de Rhumatologie. *"Prescription et surveillance des anti-inflammatoires stéroïdiens et non stéroïdiens"*. 2011.

[86]. Dangoumau.J et al. *"Pharmacologie générale,*. Bordeau: Université Victor Segalen, 2006.

[87]. M.Neal. *"Pharmacologie médicale"*. 2eme édition. France . 1999.

[88]. *Dictionnaire Vidal ; Diclofénac ;*. 2010.

[89]. ***Anonyme 1997 :*** *"Pharmacopée européenne, Strasbourg, Cedex France.* 3èmeEdition,. Strasbourg, Cedex France.

[90]. *"Pharmacopée européenne"*. 6eme édition. Allemagne : Druckerei C.H.Beck; 2008.

[91]. Documentation interne de Saidal

[92]. Audigié .CL, Dupont. G, Zonszain F. « *Principes des méthodes d'analyse Biochimiques »*, Doin Editeurs Paris tome 1. 1995.

[93]. R. Salghi. *« Cours d'analyses physico-chimiques des denrées alimentaires II, GPEE, ENSA Agadir »*. Ecole Nationale des Sciences Appliquées d'Agadir. 2004.

[94]. ***«*** *Cours de chimie organique, minérale et structurale »* www.a cnancymetz. fr/enseign/Physique/CHIM/Jumber/Default.htm

[95]. Thierry B. 2001.Professeur agrégé – Département de Chimie, Université de La Réunion,

[96]. A. Coursimault, *« STP pharma pratiques »*, 2éme édition, (1998).