

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université de Djilali BOUNAAMA KHEMIS MILIANA



Faculté des Sciences et de la Technologie

Département de Technologie

Mémoire du Projet de Fin d'Etudes

Pour l'obtention de diplôme

Master

En

« Génie des procédés »

Option :

« Génie pharmaceutique »

Thème :

**L'Etude antimicrobienne de conservateur méthyle parabène
dans le produit dermique BETASONE**

Réalisé par :

- **Zerrouki Ikram**
- **Mouas Nadjet**

Encadré par :

Encadreur : Dr. Rezala .H
Co- Encadreur : Aissou. M

Année Universitaire 2015/2016

Remerciement

A ALLAH LE DIEU absolu qui se révèle, Le miséricordieux Le Tout-Pardonnant, celui qui étend Sa générosité et Sa miséricorde, le majestueux, qui s'attribue la grandeur du pouvoir et la gloire de Sa dignité, qui nous a donné tout le courage pour commencer et continuer à réaliser ce travail.

On tient à exprimer ma plus profonde reconnaissance à:

Madame REZALA qui nous a fait l'immense honneur de nous accepter pour diriger ce travail. On la remercie pour son soutien et ses précieux conseils qui nous ont apporté motivation, encouragement durant la préparation de ce mémoire, et pour tout son dynamisme, ses compétences scientifiques qui nous ont permis de mener à bien cette étude. Madame, veuillez trouver dans ce travail l'expression de notre plus profonde reconnaissance et de notre profond respect.

Nous sommes très reconnaissants envers les membres du jury de nous avoir fait l'honneur en acceptant de juger ce travail.

Nous souhaitons également remercier vivement toutes les personnes du laboratoire de *recherche et développement de l'unité pharmaceutique de SAIDAL de Médéa* qui ont contribué directement ou indirectement à la réussite de ce travail.

Nous tenons à remercier également l'ensemble du personnel et enseignants du université de *KHEMIS MILIANA* essentiellement le « *Le département de génie des procédés* » pour leurs soutiens et leurs précieux conseils qui nous ont encouragés durant tout le cursus universitaire.

MERCI

Dédicace

Merci Allah (mon dieu) de m'avoir donné la capacité d'écrire et de réfléchir, la force d'y croire, la patience d'aller jusqu'au bout du rêve et le bonheur de lever mes mains vers le ciel et de dire "Ya Kayoum "

*Je dédie ce travail à celle qui m'a donné la vie, le symbole de tendresse, qui s'est sacrifiée pour mon bonheur et ma réussite, à ma mère ...
A mon père, école de mon enfance, qui a été mon ombre durant toutes les années des études, et qui a veillé tout au long de ma vie à m'encourager, à me donner l'aide et à me protéger.*

Que dieu les gardes et les protège.

A mon adorable sœur.....

A mon frère

A ma binette Nadjet pour ses efforts et sa patience

A tous ceux qui me sont chères.

A tous ceux qui m'aiment.

A tous ceux que j'aime.

Je dédie ce travail.

Ikram.z



Dédicace

Je remercie mon dieu pour tout ce qu'il m'a donné

Je dédie ce modeste travail

A ceux que j'aime le plus au monde

A ma mère, à ma mère, à ma mère et à mon père

A mes chers frères pour leurs gentillesse, et leurs disponibilités

A mes sœurs pour leur soutien moral et leurs encouragements.

A mes tantes et à mes oncles

A mes cousins et à mes cousines

Je dédie aussi

A mes collègues de Master II G.P.

A mes collègues au d'autre spécialité

A toutes mes amies d'enfance.

Nadjet



Liste des abréviations

AMM : Autorisation de mise sur le marché

BPF : Bonne pratique de fabrication des médicaments.

DCI : Dénomination commune international.

ECHA : Echantillon.

TSA : Trypton Soja Agar

HPLC : Chromatographie liquide à haute performance.

Ph. Eur.: pharmacopée Européenne.

pH : Potentiel d'Hydrogène

PA : Principe actif.

Pf : produit fini

pH : Potentiel hydrotimétrique.

STD : standard.

UFC : Unité Formant Colonie.

RT : Temps de rétention

ISO: International standard organization

AFNOR: Association française

FDA: Food drug association

SA : Soja agar

SB : Soja bouillon

SAB : Sabouraud

MCA : Mac Conkey

DGAT : Dénombrement germes aérobies totaux

Liste des abréviations

DMLT : Dénombrement moisissure et levures totale

ml : millilitre

h : heure

mg : Milligramme

ect : Exitera

°C : Degré Celsius

Sommaire

Introduction.....	15
-------------------	----

Chapitre I

Généralités sur les médicaments

I.1. Définition.....	18
I.2. Dénomination.....	18
I.3. Composition.....	18
I.3.1. Principe actif	18
I.3.1.1 Origine.....	18
I.3.1.2 forme	19
I.3.2 Excipients	19
I.4. Origine	21
I.5. Intérêt	23
I.6. Formes pharmaceutiques	24
I.7. production.....	24
I.7.1 Médicaments solides.....	24
I.7.2. Médicaments liquides.....	24
I.7.3. Médicaments semi solides	25
I.7.3.1. Crèmes.....	26
I.7.3.2. Gels.....	26
I.7.3.3. Pommades.....	27

I.7.3.3.1. La production	27
I.9. BETASONE (Bétaméthasone)	27

Chapitre II

Les conservateurs

II.1. Les conservateurs.....	34
II.1.1. Classification	34
II.1. 2. Mécanismes d'action	35
II.1.3. Qualités requises d'un conservateur.....	35
II.2. Parabens.....	37
II.2. 1. Généralités.....	37
II.2 .Origine.....	38
II.3. Mode d'action	39
II.4. Domaine d'utilisation	40

Chapitre III

Contamination antimicrobienne

III .1 . Contamination.....	43
III .2. Circonstance d'une contamination.....	43
III.3. La protection vis-à-vis des micro-organismes.....	44
III .4. Contamination bactérienne.....	45
III .5. Contamination par des champignons.....	47
III .6. Résistance des micro-organismes	52

Chapitre IV

Matériels et méthodes expérimentales

IV.1. Introduction	54
IV.2. Méthodes expérimentales.....	54
IV.2.1.Méthodes biologiques	54
IV.2.1.1 Test de propreté	54
IV.2.1.2.Essai de l'efficacité du conservateur du BETHASONE.....	57
IV.2.1. 3.Technique de dénombrement des germes viables	58
IV.3. Méthode physico –chimique.....	61
IV.3.1 Dosage de parabène par HPLC.....	61

Chapitre VII

Résultats et discussions

VII.1. Introduction	65
VII .2.1. Résultats des analyses microbiologiques.....	65
VII.2.2. Résultats d'analyses physico-chimiques (HPLC).....	69
Conclusion	73
Références bibliographiques	

Liste des figures

Liste des figures

Figure I.1. Médicament : composition, origine et formes.....	21
Figure I.2 .Structure Bétamétasone dipropionate.....	28
Figure III .1. Levures de <i>candida</i>	48
Figure IV.1. Organigramme montrant le schéma descriptif de test de propreté.....	57
Figure IV.3. Différentes étapes de dilution et de dénombrement.....	60
Figure VII.1. Chromatogramme de méthyle parabène et BETASONE.....	70
Figure VII .2. Chromatogramme standard de méthyle parabène.....	71

..

Liste des tableaux

Liste des tableaux

Tableau I.1. Les différentes origines des médicaments.....	22
Tableau I.2. Les constituants de pommade BETASONE.....	28
Tableau II.1 .pH de croissance de micro-organisme.....	36
Tableau II.2 .Les caractéristiques physico –chimique	39
Tableau II.3. Le domaine d'utilisation de parabène.....	41
Tableau IV.1 .Milieux de cultures, températures et temps d'incubation des germes recherchés.....	59
Tableau VII.1. Résultats du test de propreté de produit fini.....	65
Tableau VII.2 .Dénombrement des quatre souches après incubation 24 heures.....	66
Tableau VII. 3. Critère représentant l'efficacité de conservateur.....	67
Tableau VII.4. Résultats expérimentaux de calcul de dénombrement et de la réduction logarithmique des germes en présence du parabène dans le produit.....	68

Introduction générale

Introduction

Le médicament est l'un des produits de consommation les plus délicates pour l'homme, sa conception, sa fabrication et sa consommation doit répondre à des normes strictes, de telle sorte que son utilisation ne doit comporter aucun risque pour les malades, le rôle d'un médicament est de soigner ou de réparer une fonction altérée.

La présence de certains microorganismes dans les fabrications ou les préparations non stériles, peut se développer une contamination microbienne présentant un risque de détérioration de la préparation et un danger d'infection pour le malade [1].

Les affections cutanées ne sont pas toutes des infections mais toutes favorisant, soit la colonisation de la peau par des microorganismes exogènes, soit l'accroissement et la flore cutanée déjà présente. Outre la mise en formulation d'une substance active, la conservation antimicrobienne de la formulation présente également un très grand intérêt [2].

Dans le cas où les préparations Pharmaceutiques elles-mêmes ne possèdent pas de propriétés antimicrobiennes intrinsèques, des agents de conservation antimicrobiens peuvent être ajoutés comme les parabènes sont principalement employés dans les formes liquides buvables, injectables et dermiques. Les parabènes sont difficilement substituables par d'autres produits en raison de leur efficacité antimicrobienne. Pour assurer une faible charge microbienne, les conservateurs constituent aujourd'hui une part indispensable des produits que nous consommons [2].

Ceci est dû en partie à la demande croissante des consommateurs en faveur d'un choix plus vaste et de Produits pratiques à utiliser, ainsi qu'aux normes de sécurité élevées qui sont notées, il faut la mise en œuvre des lois valides sur les BPF (bonne pratique de fabrication) au cours de la fabrication et même au cours de la distribution [2].

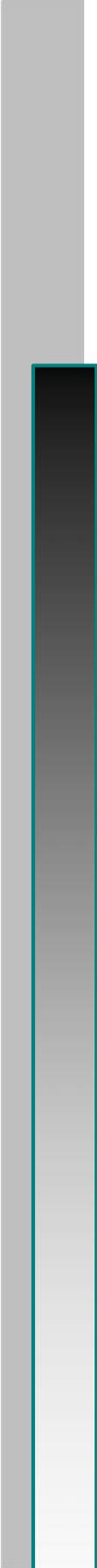
Au cours de la phase de développement d'une préparation pharmaceutique, il doit être démontré que l'activité antimicrobienne de la préparation telle quelle ou, si nécessaire, additionnée d'un ou de plusieurs agents de conservation, assure une protection adéquate contre les effets nocifs d'une contamination microbienne [2].

L'objectif de notre travail est l'étude de l'efficacité antimicrobienne dans une pommade dermique BETAMETHASONE

- Nous avons en premier lieu, présenté une étude bibliographique traitant les points suivants : généralités sur les médicaments et les conservateurs,
- Dans la deuxième partie, sont présentés les produits utilisés et matériels, préparation des milieux de culture pour les bactéries et les champignons, préparation de dilution et ensemencement des souches bactériennes.
- La troisième grande partie est consacrée à la présentation et discussion des différents résultats obtenus concernant :
 - Etude microbiologique d'efficacité de méthyle parabène vis-à-vis des bactéries (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*) et des champignons (*Candida albicans*).
 - Le dosage de conservateur Méthyle parabène et produit fini du pommade BETASON par HPLC.

Et enfin, nous avons terminé notre travail par une conclusion générale.

PARTIE
PARTIE
THEORIE
THEORIE



Chapitre 1



Généralités sur les médicaments

I. 1. Définition

On entend par médicament toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales, ainsi que tout produit pouvant être administré à l'homme ou à l'animal, en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, corriger ou modifier leurs fonctions physiologique en exerçant une action pharmacologique, immunologique ou métabolique [1].

Le médicament générique est une notion aujourd'hui très encadrée : la spécialité générique d'une spécialité de référence qui a la même composition qualitative et quantitative en principes actifs et la même forme pharmaceutique que la spécialité de référence, et dont la bioéquivalence avec cette dernière a été démontrée par des études appropriées de biodisponibilité. Lors d'une demande d'AMM pour un «générique», le laboratoire n'a pas à refaire tous les essais, il doit seulement prouver la bioéquivalence et la biodisponibilité identique au produit principes [3].

I.2. Dénomination

Les principes actifs sont désignés par une appellation abrégée en un mot, la dénomination commune. Celle-ci rappelle de plus ou moins loin la formule chimique, qui serait évidemment inutilisable en langage courant, et, surtout, comporte un suffixe commun pour les produits apparentés. Elle est officialisée par l'Organisation Mondiale de la Santé, d'où le nom de dénomination commune internationale ou DCI [4].

I.3. Composition

Un médicament comprend une partie responsable de ses effets sur l'organisme humain, le principe actif, et, le plus souvent, une partie inactive faite d'un ou plusieurs excipients [4].

I.3.1. Principe actif

I.3.1.1. Origine

Les matières premières susceptibles d'être à l'origine d'un médicament, sont des drogues (à noter au passage que la traduction de l'anglais « drug » est « médicament » et jamais « drogue ». Ce terme est surtout usité pour les produits traditionnels issus des règnes minéraux,

végétaux ou animaux. Ces médicaments restent très employés, notamment ceux qui proviennent des plantes qui continuent à fournir des nouvelles substances. La plupart des principes actifs actuels sont cependant préparés par synthèse chimique intégrale ou par semi-synthèse à partir de substances naturelles. Les biotechnologies (fermentations, génie génétique) permettent l'accès à des molécules complexes fabriquées par le vivant [4].

I.3.1.2. Forme

Avant d'être intégré dans un médicament tel qu'il se présente dans une pharmacie, un principe actif doit être obtenu sous une forme standardisée, reproductible d'un lot de fabrication à l'autre et aussi pure que possible. Les normes auxquelles ils doivent satisfaire sont fixées par la pharmacopée (recueil officiel de normes pharmaceutiques) ou précisées dans le dossier préalable à leur autorisation d'utilisation [4].

Les principes actifs préparés par synthèse chimique ou issus des biotechnologies, se présentent sous forme de poudres ou, moins souvent, de solutions. Le problème essentiel de leur fabrication est leur purification chimique et biologique. Ils sont hautement standardisés. Les principes actifs traditionnels se présentent sous des formes beaucoup plus nombreuses, autrefois appelées « formes officinales élémentaires ». Leur degré de pureté est très variable, de la poudre pratiquement pure au mélange complexe où ils sont accompagnés de substances multiples, dont certaines, les adjuvants, ne sont pas totalement dépourvus d'activité. Ces formes sont cependant standardisées de manière à avoir une activité reproductible, identique pour la même quantité ; au pire, cette activité est exprimée en unités biologiques et la quantité utilisée varie avec les lots. Ces préparations sont en règle désignées par le nom de la forme suivie de celui de la drogue. Les principales formes traditionnelles sont les poudres, les extraits, les hydrolés, les sirops, les teintures et les essences. On utilise maintenant rarement les espèces et farines, les nébulisats et atomisats, les hydrolats, les alcoolats et alcoolatures et les huiles médicinales [4].

I.3.2. Excipients

La présence d'excipients est indispensable pour assurer la conservation du médicament, lui donner un volume et une présentation utilisables par le malade et permettre son identification on verra qu'ils jouent aussi un rôle important dans la vitesse de mise à disposition de l'organisme du principe actif. Inactifs quant à leur intérêt thérapeutique, ils

peuvent néanmoins entraîner des effets nocifs. Tous doivent être autorisés par la réglementation. Les excipients sont classés selon leur fonction en [4] :

- Agrégats : excipients qui assurent la cohésion d'un mélange de poudres et permettent la réalisation de comprimés
- Diluants ou véhicules : phase continue qui permet la solution ou la dispersion des constituants du médicament dans un volume suffisant
- Intermèdes : substances permettant la réalisation physique du médicament ou assurant sa stabilité (par exemple, émulsionnant)
- Colorants : substances colorées servant de témoin d'homogénéité d'un mélange de poudres ou à identifier le médicament fini
- Edulcorants ou correctifs : modificateurs du goût permettant de rendre une préparation agréable ou de masquer le mauvais goût d'un principe actif
- Conservateurs : substances destinées à empêcher la dégradation chimique ou l'altération microbiologique d'un médicament [4].

La figure I.1 présente la composition d'un médicament

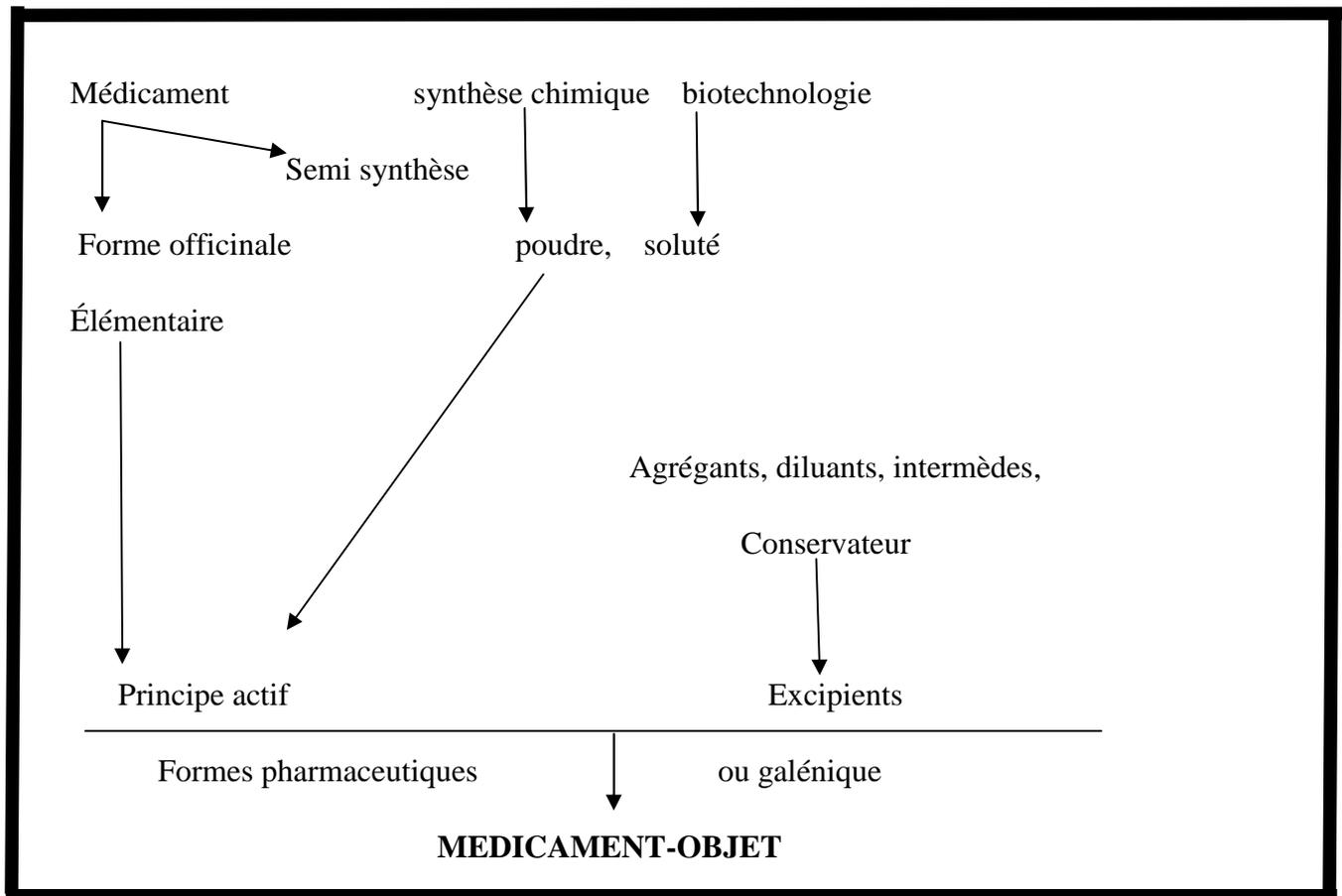


Figure I. 1. Médicament : composition, origine et formes. [4]

I.4. Origine

Les médicaments proviennent de diverses origines. Le tableau suivant représente les différentes origines des médicaments

Tableau I.1. Les différentes origines des médicaments [5].

Origine		Exemple
Origine végétale (Phytothérapie)	Plantes entières	<ul style="list-style-type: none"> • Menthe : Relâche les muscles, traite les problèmes digestifs, possède des propriétés antiseptiques.
	Parties de plantes	<ul style="list-style-type: none"> • Fleur : Pétales colorés riches en pigments : flavonoïdes, tanins (fleurs de lavande riches en essences, sommités fleuries du millepertuis contenant un antidépresseur). • pédoncules floraux : Appelés queues (les queues de cerise sont diurétiques, comme les styles de maïs).
Origine animal (opothérapie)	Extraits de plantes	<ul style="list-style-type: none"> • hétérosides : Digitaline extrait de la feuille de Digitale est un stimulant cardiaque puissant. • alcaloïdes : Alcaloïdes de la pervenche : vincristine et vinorelbine utilisées comme anticancéreux. • huiles essentielles : Essences végétales ou de résines qui donnent aux végétaux leurs parfums (le haschisch est une résine extraite du chanvre indien).
	Organes, tissus humains ou animaux	<ul style="list-style-type: none"> • Le sang et ses éléments : Considérés comme les véritables tissus (sang et plasma humains, médicaments dérivées du sang).
	Extraits de principe actif	<ul style="list-style-type: none"> • Hormones : Héparine (médicament anticoagulant extrait des poumons).
	Vaccins issus d'agents infectieux inactivés	Obtenus par destruction chimique ou par la chaleur.

Origine microbiologique	Vaccins issus d'agents vivants atténués	Agents infectieux multipliés jusqu'à la perte de leur caractère pathogène.
	Vaccins constitués de sous-unités d'agents infectieux	Vaccins comportant les constituants de ceux-ci nécessaires à l'obtention des réponses immunitaires.
	Vaccins constitués de toxines inactivées	Vaccins produits à partir de toxines inactivées (anatoxine).
Origine minérale	Produits naturels purifiés	Eau, talc, argiles, bicarbonate de sodium, sulfate de magnésium, chlorure de sodium, chlorure de calcium.
Origine synthétique	Synthèse totale	Tels que les sulfamides.
	Hémi-synthèse	Tels que certaines pénicillines.
Origine biotechnologique	Obtenus par techniques de génie génétique faisant isoler des cellules vivantes (micro-organismes) et intégrant un ADN recombiné et injecté. Pour produire des produits d'intérêt thérapeutique (interféron, insuline humaine, hormone de croissance recombinante).	

I. 5. Intérêt

Un médicament possède des rôles [6] :

➤ Curative

- Etiologique : le médicament s'attaque à la cause de la maladie
- Substitutive : il apporte l'élément manquant à l'organisme
- Symptomatique : il s'attaque seulement aux manifestations de la maladie, sans pouvoir en traiter la cause.

➤ Préventive

- Individuelle : vaccination, prévention individuelle du paludisme, chimio prophylaxies diverses.
- Collective : chimiophylaxies collectives de la méningite de la tuberculose.

I.6. Formes pharmaceutiques

La forme galénique est la forme sous laquelle le principe actif et les excipients sont associés pour former le médicament qui sera ensuite consommé par le patient. Les différentes formes pharmaceutiques [7] :

- Solide
- Semi solide
- Liquide

I.7. production**I.7.1. Médicaments solides**

Parmi Les formes solides on a, les comprimés sont des objets cylindriques formés par compression d'un mélange contenant la substance active, un excipient et divers additifs. L'excipient (lactose, sulfate de calcium) a pour fonction de donner au comprimé une taille suffisante pour permettre de le manipuler et de l'avaler facilement. Faut se rappeler que la dose unitaire de nombreux médicaments est souvent inférieure à quelques mg [7].

I. 7.2. Médicaments liquides

Les préparations liquides Pour usage oral sont habituellement des solutions, émulsions ou suspensions contenant une ou plusieurs substances actives dans un excipient approprié ; certaines préparations liquides pour usage oral (liquides buvables) sont constituées de substances actives liquides utilisées telles quelles. Certaines préparations liquides pour usage oral sont préparées par dilution de préparations liquides concentrées, ou à partir de poudres ou granulés destinés à la préparation de solutions ou suspensions buvables, de gouttes buvables ou de sirops, au moyen d'un excipient approprié. Les excipients utilisés pour préparer les préparations liquides pour usage oral sont choisis en fonction de la nature de la ou des

substances actives, et de façon à conférer à la préparation des propriétés organoleptiques appropriées à l'usage prévu. Les préparations liquides pour usage oral peuvent contenir des conservateurs antimicrobiens appropriés, des antioxydants et d'autres excipients tels que des agents de dispersion, de suspension, des substances épaississantes, émulsionnantes, des tampons, des mouillants, des solubilisant, des stabilisants, des aromatisants, des édulcorants et des colorants autorisés par l'Autorité compétente. Plusieurs catégories de préparations liquides pour usage oral peuvent être distinguées [8] :

- Solutions, émulsions et suspensions buvables.
- Poudres et granulés pour solutions ou suspensions buvables.
- Gouttes buvables.
- Poudres pour gouttes buvables.
- Sirops.
- Poudres et granulés pour sirops

I.7.3. Médicaments semi solide

Les préparations semi-solides pour application cutanée sont formulées en vue d'une libération locale ou transdermique de substances actives, ou pour leur action émolliente ou protectrice. Elles présentent un aspect homogène. Les préparations semi-solides pour application cutanée sont constituées d'un excipient, simple ou composé, dans lequel sont habituellement dissous ou dispersés 1 ou plusieurs substances actives. Selon sa composition, cet excipient peut avoir une influence sur l'activité de la préparation. Les excipients utilisés peuvent être des substances d'origine naturelle ou synthétique, et peuvent être monophasés ou multiphasés. Selon la nature de l'excipient, la préparation peut avoir des propriétés hydrophiles ou hydrophobes. La préparation peut également contenir d'autres excipients appropriés Tels que des agents antimicrobiens, des antioxydants, des agents stabilisants, des émulsifiants, des épaississants et des agents de pénétration. Les préparations semi-solides pour application cutanée destinées à être appliquées sur une peau gravement lésée sont stériles.

Dans les cas appropriés, les récipients destinés aux préparations semi-solides pour application

Cutanée satisfont aux exigences relatives aux Matériaux utilisés dans la fabrication des récipients et aux Récipients. Plusieurs catégories de préparations semi-solides pour application cutanée peuvent être distinguées [8] :

- crèmes.
- gels.
- Pommades

I.7.3.1. Crèmes

Les crèmes sont des préparations multiphasées composées d'une phase lipophile et d'une phase Hydrophiles [8] :

➤ **Crèmes Lipophiles**

Dans les crèmes lipophiles, la phase externe est la phase lipophile. Ces préparations contiennent généralement des agents émulsifiants eau-dans-huile tels que des alcools de graisse de laine, des esters de sorbitan et des monoglycérides.

➤ **Crèmes hydrophiles**

Dans les crèmes hydrophiles, la phase externe est la phase aqueuse. Ces préparations contiennent des agents émulsifiants huile-dans-eau tels que des savons de sodium ou de trolamine, des alcools gras sulfatés, des polysorbates et des esters d'acides et d'alcools gras polyoxyéthylénés, éventuellement en combinaison avec des agents émulsifiants eau-dans-huile

I.7.3.2. Gels

Les gels sont constitués de liquides gélifiés à l'aide d'agents gélifiants appropriés et on distingue les gels lipophiles et hydrophiles [8] :

➤ **Gels lipophiles**

Les gels lipophiles (oléogels) sont des préparations dont l'excipient est habituellement de la paraffine liquide additionnée de polyéthylène, ou des huiles grasses gélifiées par de la silice colloïdale ou des savons d'aluminium ou de zinc.

➤ Gels hydrophiles

Les gels hydrophiles (hydrogels) sont des préparations dont l'excipient est habituellement de l'eau, du glycérol ou du propylène glycol gélifiés à l'aide d'agents gélifiants appropriés tels que des poloxamères, de l'amidon, des dérivés de la cellulose, des carbomères ou des silicates de magnésium-aluminium.

I.7.3.3. Pommade

Les pommades se composent d'un excipient monophasé dans lequel peuvent être dispersés des liquides ou des solides et on distingue deux types [8] :

➤ Pommades hydrophobes

Les pommades hydrophobes ne peuvent absorber que de petites quantités d'eau. Les excipients les plus communément employés pour la formulation de telles pommades sont la paraffine solide, la paraffine liquide, la paraffine liquide légère, les huiles végétales, les graisses animales, les glycérides synthétiques, les cires et les polyalkylsiloxanes liquides.

➤ Pommades Hydrophiles

Les pommades hydrophiles sont des préparations dont l'excipient est miscible à l'eau. Cet excipient est habituellement constitué de mélanges de macrogols (polyéthylène glycols) liquides et solides. Il peut contenir des quantités appropriées d'eau

➤ Fabrication de pommade

La fabrication est très simple. Les ingrédients, probablement purifiés, sont chauffés à environ 60-70 °C. On laisse ensuite le mélange refroidir sous agitation continue jusqu'à environ 35 °C. Le parfumage et, le cas échéant la coloration, sont ensuite effectués. Et à la fin la finition qui consiste au conditionnement dans des pots (pots de récupération en plastique ou en verre par exemple) et en l'étiquetage pour une bonne présentation du produit mettant la clientèle en confiance [9].

I.8. BETASONE (Bétaméthasone)

Ce médicament est un corticoïde local d'activité forte

A. Classe pharmaco thérapeutique

Dermocorticoïdes.

B. Forme et présentation

Pommade dermique à 0,05 %, tube de 15 g.

C. Composition

Excipients : vaseline blanche, huile de vaseline, paraoxybenzoate de méthyle, essence de lavande. Le tableau I.2 montre les différents constituants de la pommade BETASONE

Tableau I. 2. Les constituants de pommade **BETASONE** [10].

Matières premières	Fonction
Bétamétasone dipropionate	Principe actif
vaseline blanche (Excipients)	lubrifiant
huile de vaseline (Excipients)	lubrifiant
paraoxybenzoate de méthyle (Excipients)	conservateur
essence de lavande (Excipients)	aromatisant

➤ Formule développée

La figure I.2 présente un schéma simplifié de la structure de Bétamétasone dipropionate

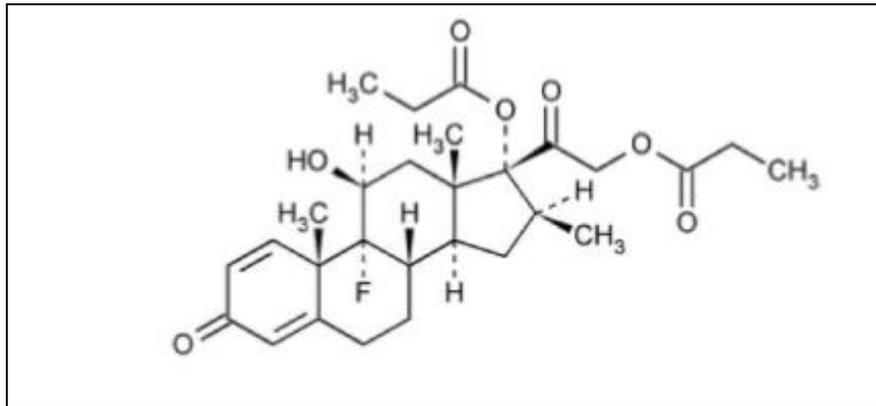


Figure I. 2. Structure Bétamétasone dipropionate [10]

D. Indication thérapeutique

Les indications thérapeutiques peuvent être résumées comme suite [10]

Plaques limitées et résistantes de psoriasis, particulièrement dans leurs localisations palmo-plantaires, de lichénifications (névrodermites), de lupus érythémateux discoïde, de lichens.

- Cicatrices hypertrophiques.
- Lésions corticosensibles, limitées en surface, ayant résisté à un corticoïde de la catégorie inférieure.

E. Contre indication

- Infections bactériennes, virales, fongiques primitives et parasitaire même si elles comportent une composante inflammatoire.
- Lésions ulcérées.
- Acné et rosacée.
- Hypersensibilité à l'un des composants.

F. Mises en garde et précaution d'emploi

Mises en garde

- En raison du passage du corticoïde dans la circulation générale, un traitement sur de grandes surfaces ou sous occlusion peut entraîner les effets systémiques d'une corticothérapie générale, particulièrement chez le nourrisson et l'enfant en bas âge. Ils consistent en un syndrome cushingoïde et un ralentissement de la croissance : ces accidents disparaissent à l'arrêt du traitement, mais un arrêt brutal peut être suivi d'une insuffisance rénale aiguë.
- Chez l'enfant de moins de 12 ans, le traitement ne peut être qu'exceptionnel et sous une stricte surveillance.

Précautions d'emploi

- En cas d'infection bactérienne ou mycosique d'une dermatose corticosensible, faire précéder l'utilisation du corticoïde d'un traitement spécifique.
- Si une intolérance locale apparaît, le traitement doit être interrompu et la cause doit en être recherchée.
- En cas d'application palpébrale, la durée du traitement doit être limitée. Une application prolongée expose en effet à des risques de ptosis par atteinte musculaire du releveur de la paupière, de glaucome, d'effet rebond.
- Il faut se méfier particulièrement des phénomènes d'occlusion spontanés pouvant survenir dans les plis ou sous les couches.
- La pommade Bétasone 0.05 % n'est pas destinée à usage ophtalmique.
- Ne pas appliquer la pommade Bétasone 0.05 % sur les muqueuses.

G. Posologie et mode d'administration

1 ou 2 applications (s) par jour. Une augmentation du nombre d'applications quotidiennes risquerait d'aggraver les effets indésirables sans améliorer les effets thérapeutiques.

Traitement des grandes surfaces nécessite une surveillance du nombre de tubes utilisés.

- Étaler le produit sur les lésions et faire pénétrer par un léger massage.
- Arrêt du traitement se fera de façon progressive, en espaçant les applications et/ou par l'utilisation d'un corticoïde moins fort ou moins dosé.

H. Effets indésirables

Les effets indésirables sont [10]

- L'utilisation prolongée de corticoïdes d'activité forte peut entraîner une atrophie cutanée, des télangiectasies (à redouter particulièrement sur le visage), des vergetures (à la racine des membres notamment, et survenant plus volontiers chez les adolescents), un purpura ecchymotique secondaire à l'atrophie, une fragilité cutanée.
- Au visage, les corticoïdes peuvent créer une dermatite péri-orale ou bien aggraver une rosacée.
- Il peut être observé un retard de cicatrisation des plaies atones, des escarres, des ulcères de jambe.
- Possibilité d'effets systémiques.
- Des éruptions acnéiformes ou pustuleuses, une hypertrichose, des dépigmentations ont été rapportées.
- Des infections secondaires, particulièrement sous pansement occlusif ou dans les plis, et des dermatoses allergiques de contact ont été également rapportées lors de l'utilisation de corticoïdes locaux.

I. Pharmacodynamique

BETASONE 0.05% est un dermocorticoïde d'activité très forte (classe I selon les tests de vasoconstriction cutanés). Cette très forte activité résulte de la solubilisation du dipropionate de BETAMETHASONE dans du propylène glycol. Actif sur certains processus inflammatoires (par exemple : hypersensibilité de contact) et l'effet prurigineux qui leur est lié. Vasoconstricteur. Inhibe la multiplication cellulaire.

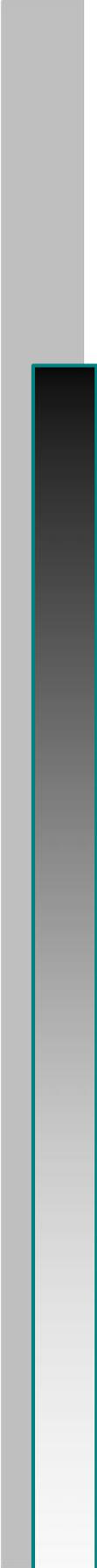
j. Pharmacocinétique

L'importance du passage transdermique et des effets systémiques dépend de la surface à traiter, du degré d'altération épidermique et de la durée du traitement. Ces effets sont d'autant plus à redouter que le traitement est prolongé.

K. Conditions Particulières de Conservation

À conserver à une température ne dépassant pas 25 °C.

La production des médicaments rencontre plusieurs problèmes, notamment la contamination. Par différents microorganismes pour cela l'ajout d'un conservateur est obligatoire.



Chapitre II



Les conservateurs

II.1. Les conservateurs

Les conservateurs sont des additifs ajoutés entre autres aux aliments. Le terme d'additif est issu du domaine de l'industrie alimentaire on entend par conservateurs « des substances qui prolongent le durée de conservation des denrées alimentaires en les protégeant des altérations dues aux micro-organismes ». L'autorisation et les conditions d'utilisation des conservateurs sont régies par cette même directive [11].

II.1.1 Classification

Il existe deux types des conservateurs [11] :

- conservateurs antimicrobiens
- conservateurs antioxydants

A. Les conservateurs antimicrobiens

Les conservateurs antimicrobiens sont des substances destinées à prolonger la durée de validité des spécialités pharmaceutiques, en réduisant la prolifération microbienne. L'efficacité de la conservation antimicrobienne doit être contrôlée dans le produit fini par l'essai recommandé par la Pharmacopée Européenne [12].

B. Conservateurs Anti oxydants

Un antioxydant est défini comme une substance qui, ajoutée à faible dose à un produit naturellement oxydable à l'air, est capable de ralentir ou d'inhiber le phénomène d'oxydation. Cette définition peut être élargie et le terme "antioxydant" englobe ainsi toutes les substances qui protègent les systèmes biologiques contre les effets délétères potentiels des processus ou réactions qui engendrent une oxydation excessive. Ils agissent en formant des produits finis non radicaux, d'autres en interrompant la réaction en chaîne de peroxydation, en réagissant rapidement avec un radical d'acide gras avant que celui-ci ne puisse réagir avec un nouvel acide gras, tandis que d'autres antioxydants absorbent l'énergie excédentaire de l'oxygène singlet pour la transformer en chaleur. En même temps, les antioxydants arrêtent la réaction, la plupart du temps parce que la structure des antioxydants est relativement stable [13].

II.1. 2 Mécanismes d'action

On distingue deux mécanismes d'action, suivant le type de conservateur antimicrobien utilisé [14] :

- Conservateurs bactéricides tuent directement les bactéries : c'est une action dite irréversible.
- Conservateurs bactériostatiques inhibent la multiplication des bactéries. C'est une action dite réversible car ils ne tuent pas les micro-organismes.

Dans tous les cas, le conservateur doit agir sur les micro-organismes tout en préservant les cellules humaines. Cette différence de toxicité vis-à-vis de ces deux types de cellules s'explique par leurs différences de structure. Les conservateurs agissent sur les micro-organismes de façon différente selon le conservateur considéré, à un niveau bien déterminé de la structure ou du métabolisme du micro-organisme, appelé site d'action ou cible du conservateur. L'action peut se situer au niveau de la paroi bactérienne, des membranes, au niveau ribosomal sur la synthèse des protéines, ou au niveau des acides nucléiques et des enzymes associées. Les mélanges de conservateurs présentent de nombreux avantages comme la possibilité de diminuer la concentration de chaque éléments et par là même les éventuels effets secondaires, et augmenter l'efficacité par synergie.

II.1.3 Qualités requises d'un conservateur

Aucun conservateur ne remplit tous les critères d'un système idéal. En pratique, on utilise des associations de conservateurs. Si le conservateur idéal existait, il devrait présenter les critères suivants (en plus d'une conformité aux réglementations en vigueur) [14] :

➤ **Innocuité**

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

➤ **Spectre d'activité**

Le conservateur doit présenter un large spectre d'activité. Il doit être efficace contre les

bactéries Gram+ et Gram-, les levures et les moisissures.

De plus, un haut niveau d'activité est demandé aux concentrations les plus faibles possibles, aussi bien pour diminuer la toxicité que le coût.

➤ Solubilité dans l'eau

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

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

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

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

➤ pH de la formulation

La plupart des bactéries se développent à un pH neutre ou proche de la neutralité, contrairement aux levures et moisissures pour lesquelles un pH acide (de 3 à 6) semble idéal, comme le montre le tableau II.1.

Tableau II.1. pH de croissance de micro-organisme [14]

Organismes	Croissance possible à pH
Levures	1.5 à 8.5
Staphylocoques	4.5 à 8.5
Pseudomonas	3 à 11

Etant donné que les micro-organismes peuvent supporter des variations de pH allant de 1,5 à 11, le conservateur idéal devrait être actif sur toute cette fourchette. En pratique, la majorité des préparations cosmétiques est ajustée à un pH voisin de la neutralité, pH qui

permet la meilleure tolérance cutanée.

➤ L'efficacité

L'efficacité d'un système conservateur peut être évaluée par le challenge test décrit aux diverses pharmacopées française, européenne, américaine. C'est un test efficace et très prédictif qui permet de prévoir la conservation du produit dans le temps (exigence légale quant à la date de péremption d'un produit) et d'éviter des réactions d'intolérance imprévisibles liées à un développement bactérien non contrôlé. Il a une importance sur le plan marketing : l'aspect du produit n'évoluera pas dans le temps. En pratique, on ensemence le produit fini (protégé par son système conservateur) avec des souches bactériennes et fongiques décrites dans les Pharmacopées française, européenne ou américaine, à raison de 10^6 UFC/ ml (Unités Formant Colonies/ ml). Les micro-organismes choisis par les instances règlementaires sont des souches pathogènes pour l'être humain (par exemple : *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Aspergillus niger*) et certaines d'entre elles sont difficiles à détruire, voire résistantes à certains types de conservateurs. L'inoculum de cellules bactériennes se fait à 30-35°C pendant 18 à 24h, celui de *C. albicans* à 20-25°C pendant 48h, et celui d'*A. niger* à 20-25°C pendant une semaine.

On dénombre les bactéries et les champignons survivants à (2, 7, 14 et 28 jours). En fonction du pourcentage de diminution dans le temps, on en déduit l'efficacité du système conservateur ; les critères d'acceptation varient pour les diverses catégories de préparations, selon le degré de protection recherché.

II.2. Parabènes

II.2. 1 Généralités

Les parabènes représentent une famille constituée d'esters de l'acide phydroxybenzoïque. D'ailleurs, le nom « parabène » est une compression du nom de PARAhydroxyBENzoates. C'est dans le milieu des années 1920 que les parabènes ont commencé à être utilisés en tant qu'agent de conservation antimicrobien et antifongique dans les produits cosmétiques. Ils ont l'avantage d'avoir un large spectre d'activité sur les bactéries, les levures, les moisissures et les champignons. Ils sont efficaces à faible concentration et sont utilisés généralement seuls ou en combinaison pour exercer une activité optimale. Comme ils se sont avérés très efficaces et

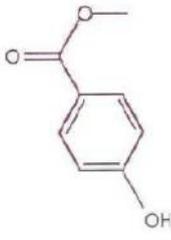
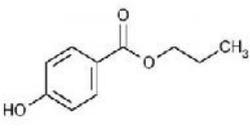
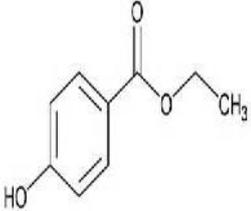
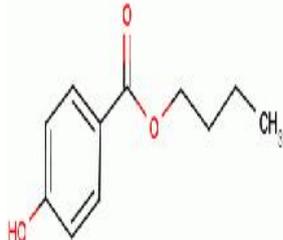
relativement sans danger pour l'homme, ils ont rapidement été utilisés comme principaux agents de conservation dans les produits alimentaires, les produits pharmaceutiques ainsi que les produits cosmétiques. L'action la plus connue et la plus utilisée des parabènes est leur effet inhibiteur sur le transport membranaire microbien et sur la fonction mitochondriale. On retrouve donc dans les produits cosmétiques, différents parabènes retrouvés sous les noms méthyl-parabènes, éthyl-, propyl- et butyl-parabènes. L'absence de problèmes liés à leur utilisation depuis des années en ont fait des substances considérées comme sûres. Mais leur innocuité a été remise en question dernièrement par des études qui montrent une activité oestrogénique des parabènes et leur présence dans des cellules cancéreuses. Ces nouvelles informations sont arrivées comme une bombe, lançant ainsi une véritable polémique autour de ces composés [15].

II.2 Origine

Les parabens représentent un groupe de série homologue de l'acide parahydroxybenzoïque, estérifié en position 4 par différents groupements alkyles : méthyl, éthyl, propyl, isopropyl, butyl, benzyl etc. Ces différents parabens sont obtenus par estérification de l'acide para-hydroxybenzoïque avec l'alcool correspondant (méthanol, éthanol, propanol etc.) en présence d'un catalyseur acide.

La structure des parabènes est stable dans l'air et présente une résistance accrue à l'hydrolyse quand la chaîne alkyl est longue. La température de fusion des parabens est assez haute, cela permet de les utiliser dans des produits qui peuvent être placés à très forte chaleur sans les dénaturer [15].

Tableau II.2 : Les caractéristiques physico-chimique [15].

R	Methyl	Ethyl	Propyl	Butyl
Structure chimique				
Poids moléculaire (g/mol)	152,15	166,18	180,2	194,09
PKa	8,17	8,22	8,35	8,37
Solubilité dans l'eau (g/100ml a 25°C)	0.25%	0.17%	0.05%	0.02%
Température de fusion (°C)	131	117	97	68.5
Forme physique	Petit cristaux non odorants, sans gout			

II.3 Mode d'action :

Les parabens sont donc utilisés depuis plus de 80 ans, et pourtant leur mécanisme d'action sur les microorganismes reste encore mal connu. Toutefois, les parabens sont actifs vis-à-vis d'un grand nombre de microorganismes. Ils agissent au niveau de voies métaboliques clés. Ils sont plus efficaces sur les levures et les moisissures que sur les bactéries. Les parabens vont tuer les bactéries de façon irréversible : c'est ce qu'on appelle une action bactéricide. Ils vont agir au cours du développement de ces micro-organismes à différentes phases du processus. Il apparaîtrait que les parabens agissent en se fixant sur la membrane ; cytoplasmique des bactéries entraînant une rupture puis une destruction de cette

membrane. La bactérie se viderait alors peu à peu de son contenu ce qui entrainerait sa mort [15].

II.4. Domaine d'utilisation :

Il est reconnu que les conservateurs doivent être utilisés pour assurer la stabilité et la sûreté du produit, et que les parabens sont des conservateurs présentant une relative innocuité. De ce fait, les parabens constituent les conservateurs de choix pour la plupart des formulations. L'usage courant de ces parabens dans les produits cosmétiques, n'entraînant pas un nombre de plaintes significatif de la part des consommateurs, conforte cette notion de sûreté et d'efficacité. Les parabens sont les conservateurs les plus utilisés à travers le monde. Ils sont largement introduits dans les aliments, les cosmétiques et les produits pharmaceutiques depuis plus de 50 ans. L'importance de leur emploi, toute catégorie de produits confondue, classe par ordre décroissant le méthylparaben, le propylparaben, le butylparaben puis l'éthylparaben [11].

Ces conservateurs bien tolérés sont très largement employés dans les cosmétiques, les médicaments topiques ou d'usage systémique, et les aliments (tableau II.3). Chaque individu est continuellement exposé à ces conservateurs [11].

Tableau II.3 : représente le domaine d'utilisation de parabens [11].

Produits cosmétique	Très nombreux produits d'hygiène, de soin et de maquillage, crèmes dépilatoires, crèmes solaires, dentifrices, déodorants, lotions après-rasage, gels, poudres, savons, rouges à lèvres, teintures capillaires, mascaras, shampooings, détergents
Médicaments	Crèmes, pommades, onguents, lotions, ovules, suppositoires, crèmes « barrière », solutions injectables, gouttes nasales/ophtalmologiques/ auriculaires/ buvables, ampoules buvables, aérosols, sirops, comprimés, lyophilisats oraux, médicaments vétérinaires
Aliments	Assaisonnements, caviar et autres œufs de poissons, conserves de poissons/fruits, crèmes, friandises, gelées, jambons, jus de fruits, préparations à base de lait, sauces industrielles, sirops, viandes hachées, articles de boulangerie et pâtisserie, confitures, olives, crustacés, poissons fumés, tomates
Divers	colles et pansements graisses industrielles et huiles, cirages



Chapitre IV



Matériels et méthodes expérimentales

III.1. Contamination

La plupart des micro-organismes ne présente aucun risque pour la santé. Seuls quelques-uns peuvent être considérés comme pathogènes pour l'homme. Ainsi, il est nécessaire de bien faire la distinction entre les micro-organismes contaminants nuisibles et les représentants de la flore cutanée endogène, qui sont indispensables à un bon équilibre cutané [11].

Dans un produit contaminé, le micro-organisme utilise celui-ci comme nourriture pour en tirer de l'énergie. En échange, il diffuse dans le milieu des déchets provenant de cette transformation. Dans la contamination microbienne des produits, il faut distinguer la contamination primaire qui peut survenir lors de la fabrication, de la contamination secondaire, qui, elle, survient après. La contamination primaire peut avoir plusieurs origines. Elle peut être due aux matières premières (eau, produits biologiques d'origine animale, végétale, ou tellurique, colorants ou pigments insolubles, agents de surface...), aux locaux, au matériel, ou encore au personnel chargé de la fabrication, du conditionnement ou de l'entretien. Les bactéries sont les agents contaminants les plus fréquemment rencontrés dans les produits finis. Les champignons inférieurs (moisissures, levures) sont moins fréquents. Les bactéries du genre *Pseudomonas* sont les plus souvent isolées des produits cosmétiques avant leur utilisation par le consommateur : cette fréquence s'explique par l'origine hydrique de ces germes. Viennent ensuite les bactéries de la famille des *Enterobacteriaceae*, puis les bactéries des genres *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Clostridium*... Les règles de Bonne Pratique de Fabrication (BPF) sont à suivre rigoureusement de façon à éviter toute contamination à ce niveau. La contamination secondaire concerne quant à elle le consommateur. Les germes retrouvés dans des produits cosmétiques contaminés par le consommateur ne sont pas les mêmes que ceux présentés précédemment. Il s'agit principalement de bactéries du genre *Staphylococcus* et de moisissures. L'identification et le courtage de la contamination microbiologique peuvent être réalisés à l'aide de plusieurs techniques [9].

III.2. Circonstances d'une contamination

Dans un produit contaminé, le micro-organisme utilise celui-ci comme nourriture pour en tirer de l'énergie. En échange, il diffuse dans le milieu des déchets provenant de cette transformation. Dans la contamination microbienne des produits, il faut distinguer la contamination primaire qui peut survenir lors de la fabrication, de la contamination

secondaire, qui, elle, survient après [11].

- La contamination primaire peut avoir plusieurs origines. Elle peut être due aux matières premières (eau, produits biologiques d'origine animale, végétale, ou tellurique, colorants ou pigments insolubles, agents de surface...), aux locaux, au matériel, ou encore au personnel chargé de la fabrication, du conditionnement ou de l'entretien. Les bactéries sont les agents contaminants les plus fréquemment rencontrés dans les produits finis. Les champignons inférieurs (moisissures, levures) sont moins fréquents. Les bactéries du genre *Pseudomonas* sont les plus souvent isolées des produits cosmétiques avant leur utilisation par le consommateur : cette fréquence s'explique par l'origine hydrique de ces germes. Viennent ensuite les bactéries de la famille des *Enterobacteriaceae*, puis les bactéries des genres *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Clostridium*... Les règles de Bonne Pratique de Fabrication (BPF) sont à suivre rigoureusement de façon à éviter toute contamination à ce niveau [11].
- La contamination secondaire concerne quant à elle le consommateur. Les germes retrouvés dans des produits cosmétiques contaminés par le consommateur ne sont pas les mêmes que ceux présentés précédemment. Il s'agit principalement de bactéries du genre *Staphylococcus* et de moisissures [11].

III.3. La protection vis-à-vis des micro-organismes

La protection vis-à-vis des micro-organismes peut être réalisée par stérilisation dans le cas des produits injectables, ou plus communément par addition d'agents antimicrobiens. Ces substances permettent d'éviter la prolifération microbienne qui peut constituer un risque infectieux pour le malade ou le consommateur (de cosmétiques ou d'aliments) et accélérer la détérioration du produit. L'usage des conservateurs en cosmétique remonterait à l'Égypte antique où le sulfate de cuivre aidait à la conservation des fards à paupières [11].

Il faut agir à tous les niveaux de la vie du produit : il importe, en premier lieu, de bien connaître les sources possibles de micro-organismes. On adoptera une hygiène industrielle maximale, en respectant les Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF), on instaurera un système de protection efficace du produit à l'utilisation, on fixera des taux de contamination

maximum pour les produits finis. Aucune norme officielle n'est encore parue à propos de la teneur limite en micro-organismes des préparations cosmétiques. Cependant, la plupart des fabricants respectent les principes suivants, proposés pour la propreté microbiologique des cosmétiques [11]:

- Le taux de micro-organismes viables totaux doit être inférieur ou égal à 10^3 /mL ou g de produit.
- L'absence de micro-organismes pathogènes, soit *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* et *Clostridium sp.* doit être totale.

III .4. Contamination bactérienne

➤ *Escherichia coli*

Escherichia coli, aussi mentionné comme *E. coli*, est un type de coliforme fécal (voir la définition ci-dessous) les bactéries qui sont trouvées dans les intestins d'humains et d'animaux à sang chaud en santé. La plupart d'*E. Coli* est inoffensif et sert une fonction utile dans le corps en arrêtant la croissance d'espèce de bactéries nuisible et en faisant des vitamines nécessaires. Cependant, quelques tensions peuvent être des pathogènes opportuniste, tandis que d'autres peuvent causer la maladie gastro-intestinale dans des gens sains quand ingéré. Un opportuniste pathogène est un organisme qui vit normalement à l'intérieur d'un hôte sans causer la blessure, mais peut causer l'infection dans les gens avec des systèmes immunitaires affaiblis. *E. coli* est présent dans le gros intestin, donc il sera aussi dans la matière fécale des gens et des animaux. Si la contamination récente de sources d'eau avec des vidanges ou des déchets animaux est arrivée, *E. coli* sera présente [8].

➤ *Staphylococcus aureus*

CARACTÈRES BACTÉRIOLOGIQUES

- **Morphologie**

Staphylococcus aureus est, comme tous les staphylocoques, une coque à Gram positif d'un diamètre d'environ 1 micromètre apparaissant en amas à l'examen microscopique. Il est immobile, non sporulé et ne présente pas de capsule visible au microscope optique.

- **Caractères de culture**

Il cultive facilement sur milieux ordinaires en aérobiose comme en anaérobiose en formant, sur milieux solides, des colonies lisses, luisantes, bombées, plus ou moins pigmentées en jaune or, d'où l'appellation *Staphylacaceus aureus* ou staphylocoque "doré". En milieu liquide, il produit, dans le bouillon, un trouble homogène.

Il n'a pas d'exigences particulières. Si les conditions idéales de croissance sont une température de 37° C et un pH de 7,5 de grandes variations sont tolérées. Comme tous les Micrococacæae, il se multiplie dans des milieux contenant une forte concentration de NaCl (5 à 10 g pour cent).

Il est capable de transformer de nombreux substrats, notamment les sucres, ce qui a peu d'intérêt pratique sauf en ce qui concerne le mamitol (un polyalcool), que *SI. aureus* peut fermenter, contrairement à la plupart des SCN.

chez *Staphylococcus aureus* : catalase, qui existe chez tous les Micmcocacceae, coagulase, désoxyribonucléase, phosphatase, hyaluronidase, fibrinolysine, lipase et protéolysines, qui caractérisent *SI. aureus*.

La présence d'une coagulase identifie, en pratique courante, l'espèce aureus. Il existe une coagulase libre et une coagulase liée [8] :

- la coagulase libre est une protéine diffusible, réagissant comme la prothrombine et coagulant, en quelques heures, le plasma citraté de l'homme ou du lapin.
- la forme liée, ou dumping factor, réagit directement avec le fibrinogène, entraînant l'agglutination des staphylocoques quand on les mélange à un plasma.

L'activité de toutes ces enzymes explique en partie la physiopathologie de l'infection staphylococcique , leur recherche est, par ailleurs, utile pour la classification et le typage des souches.

Le pouvoir pathogène de *Staphylococcus aureus* tient également a la production d'un grand nombre de substances diffusibles.

- **Hémolysines**

L'hémolysine oc ou *staphylolysine* on est cytotoxique et cytolytique. Elle a un effet nécrotique sur la peau lié à son effet vasoconstricteur. C'est une hémolysine active surtout sur

les hématies de lapin. La *staphylolysine* 0L entraîne la production d'anticorps, appelés anti-*staphylolysines* oc (ASTA) et recherchés dans le sérodiagnostic.

Il existe d'autres hémolysines, B, y et 5 dont le pouvoir toxique est incertain.

Certaines souches de *Staphylococcus aureus* élaborent des toxines protéiques responsables de toxi-infections alimentaires : les entérotoxines staphylococciques, au nombre de cinq: A, B, C, D, E. C'est leur activité de superantigène qui explique les effets toxiques. La toxine du syndrome de choc toxique. Certaines souches de *Staphylococcus aureus* élaborent une toxine pyrogène et létale : la toxine du syndrome de choc toxique ou TSST (toxic-shock syndrome toxin). Elle se comporte aussi comme un superantigène.

Certaines souches de *Staphylococcus aureus* élaborent des toxines protéiques A ou B. Elles sont responsables de staphylococcies cutanées bulleuses dues à des lésions histologiques caractérisées par un décollement intra-épidermique donnant lieu au syndrome de la "peau ébouillantée" ou syndrome de Ritter [16].

Les *staphylocoques* sont une composante essentielle de la flore humaine normale, mais comprennent aussi des espèces qui sont d'importants pathogènes. Après coloration, ils apparaissent sous la forme de cocci à Gram positif [16].

➤ *Pseudomonas*

Le genre *Pseudomonas* et les espèces voisines comprennent des bactéries largement distribuées dans l'environnement, et dont certaines sont d'importants pathogènes pour l'homme. Ce sont des germes résistants à de nombreux antibiotiques. *P. aeruginosa* est responsable de toute une gamme d'infections, en particulier de plaies de l'arbre urinaire, ou septicémiques [8].

III .5. Contamination par des champignons

- **Définition**

Les infections localisées ou généralisées dues au genre *Candida* sont groupées sous le terme de candidoses. Les levures du genre *Candida* sont la cause de pathologies graves et dont la fréquence reste constante malgré le développement de nouveaux moyens thérapeutiques, *Candida albicans* est une levure non capsulée, non pigmentée, et aérobie. Cette levure diploïde, dont le matériel génétique se répartit en huit chromosomes, se reproduit

de façon asexuée par bourgeonnements multilatéraux d'une cellule mère (le blastospore), formant ainsi des colonies blanches crémeuse [16].

- **Classification:**

Le genre *Candida* apparaît comme un groupe complexe hétérogène selon les auteurs un nombre variable de champignons levuriformes. *Candida albicans* est le plus fréquent; mais il existe de nombreuses autres espèces [17].

- **Morphologie des agents pathogènes:**

Les *Candida* sont des levures: microorganismes unicellulaires dont la multiplication se fait par bourgeonnement, les levures peuvent émettre des filaments (figure 1)



Figure III .1. Levures de *candida* [17].

➤ **Facteurs favorisants** [17] :

- **Facteurs locaux**

L'irritation toxique ou traumatique, la macération, les corps étrangers (cathéters) favorisent les *candidoses* cutanées.

L'humidité favorise l'apparition des manifestations cutanées de candidose notamment, *Candidose* des plis.

- **Facteurs pathologiques**

Il existe de nombreuses maladies qui entraînent l'apparition de candidoses Le SIDA favorise la survenue de candidose buccale.

Le diabète, la maladie de Hodgkin, le cancer notamment l'hémopathie maligne, l'anomalie. Fonctionnelle des monocytes et des macrophages peuvent influencer la présence de candidose.

- **Facteurs liés aux médicaments:**

L'emploi d'antibiotiques à large spectre change la flore microbienne endogène et favorise la colonisation de la bouche et du rectum.

Il a été démontré que les aminosides altèrent la fonction neutrophile et que l'amphotéricine B peut aussi inhiber la migration des neutrophiles. Les corticoïdes, les immunodépresseurs, les cytostatiques sont aussi des facteurs qui sont importants.

- **Mode (la contamination):**

Les *Candidas* pénètrent dans l'organisme par la muqueuse du tractus digestif. Par contact (candidoses génitales). Mais aussi occasionnellement par l'intermédiaire des cathéters [17].

- **Signes cliniques:**

Les candidoses peuvent provoquer des affections de la peau et des muqueuses mais aussi [17].

III .6. Résistance des micro-organismes

La résistance des micro-organismes est variable selon les espèces considérées. Les formes les plus résistantes sont les endospores des bactéries à Gram+ qui peuvent survivre dans une eau à 90°C. Similaires aux spores fongiques en ce qui concerne la résistance à la sécheresse, elles sont retrouvées dans la poussière et les sols. De nombreuses bactéries Gram-, en particulier les espèces du genre *Pseudomonas*, se rencontrent plus fréquemment en atmosphère humide. En conditions défavorables, elles peuvent se protéger de la déshydratation en sécrétant d'épaisses membranes muqueuses qui rendent difficile l'accès des molécules antimicrobiennes à la cellule. Ces types bactériens présentent, par conséquent, une résistance particulière aux conservateurs [11].

La résistance des micro-organismes aux conservateurs peut être soit naturelle, concernant par exemple toutes les bactéries d'une espèce donnée vis-à-vis d'un conservateur donné, soit acquise, ne concernant alors que certaines souches devenues résistantes, au sein d'une espèce habituellement sensible [11].

Chez les bactéries, on distingue la résistance chromosomique qui est liée au phénomène de mutation génétique, phénomène héréditaire, stable dans le temps et rare, et la résistance extra-chromosomique, liée à l'acquisition de fragments d'ADN extra-chromosomique : plasmides et transposons. On observe trois principaux mécanismes biochimiques de résistance : la résistance par inactivation enzymatique (le micro-organisme sécrète une enzyme inhibant le conservateur), celle par défaut de pénétration (en changeant la structure des membranes) et celle par altération de cible (l'affinité du conservateur pour le micro-organisme se trouve alors réduite). Un contrôle correctement conduit du produit fini permettra d'écarter les lots accidentellement contaminés lors de la fabrication par des germes résistants au conservateur [11].



Chapitre III



Contamination antimicrobienne

III.1. Introduction

Notre projet de fin d'études s'est effectué au sein du laboratoire de développement, physicochimique et microbiologique de l'unité antibiotical du groupe SAIDAL « Médéa », Durant la période allant de février jusqu'à avril 2016.

III.2. Méthodes expérimentales

III.2.1. Méthodes biologiques

L'objectif de contrôle microbiologique est d'assurer que le produit fini est conforme aux normes préconisées par la pharmacopée européenne 2011. Le contrôle microbiologique permet de détecter la présence éventuelle des micro-organismes viables (bactéries, levures et moisissures), leur dénombrement ainsi que l'absence des micro-organismes pathogènes.

Pour étudier l'effet de méthyle parabène sur la qualité microbiologique du produit BETHAMETASONE on a réalisé les étapes suivantes :

- Contrôle de propreté microbiologique de produit fini
- Essai de l'efficacité de la conservation du produit

III.2.1.1 Test de propreté

L'un des paramètres de qualité d'une préparation pharmaceutique est sa conformité aux normes microbiologiques des pharmacopées. Ce contrôle repose sur la recherche et le dénombrement des germes suivants dans une pommade d'application locale BETHAMETASON :

- Dénombrement des germes aérobies viables totaux
- Dénombrement des levures et moisissures
- Recherche et dénombrement de l'espèce *Staphylococcus aureus*
- Recherche et dénombrement de l'espèce *Pseudomonas*

Ce test est en premier lieu destiné à contrôler la propreté microbiologique de la pommade d'application locale BETHAMETASONE qui s'effectue afin de parvenir toute contamination microbienne qui pourrait avoir des conséquences sur la qualité du produit et la santé de consommateur, il est destiné également à mettre en évidence l'influence des conservateurs de type Parabènes sur la qualité microbiologique du produit fini .

❖ Mode opératoire**➤ Préparation de l'échantillon :**

Préparer une solution A de nature lipidique (pommade), diluer 10 g par 100 ml ou bien 10 ml par 100 ml, et puis faire la dilution dans la myristate d'isopropyle stérilisé par filtration additionne à 1 g/l de polysorbate 80 ainsi que chauffer à température qui ne dépasse pas 40°C ou dans certains cas exceptionnels 45°C.

➤ Dénombrement des germes aérobies totaux

Le dénombrement des germes aérobies viables totaux sert à évaluer le nombre de micro-organisme contaminant le produit pharmaceutique afin de déterminer le degré de salubrité du produit à analyser par comptage de tous les micro-organismes présents.

- introduire dans chaque boîte 1 ml de l'homogénéisât A, ajouter 15 à 20 ml du milieu gélosé B (voir Annexe 1). Le temps qui s'écoule entre le moment où l'on a distribué l'inoculum dans la boîte et celui où le milieu est coulé ne doit pas excéder 15 min.
- mélanger soigneusement et l'incubation se fait à 37°C pendant 5 jours.

➤ Dénombrement des levures et moisissures

Le dénombrement des levures et moisissures est effectué sur un milieu sélectif qui permette seulement le développement des levures et des moisissures

- Procéder à l'analyse comme précédemment en utilisant le milieu gélosé C (voir Annexe 1)
- Incuber à 25°C pendant 5 jours puis faire le dénombrement des microorganismes de produit examiné

Le tableau IV.1 regroupe les différents germes recherchés dans leurs milieux de culture à différents temps et température d'incubation

Tableau III.1. Milieux de cultures, températures et temps d'incubation des germes recherchés

Microorganisme	Germes recherchés	Milieux de cultures	Température et temps d'incubation
Bactérie	Germes totaux	TSA	35°C/5j
Champignon	Leveurs totales	SAB	25°C/7j

➤ **Technique d'ensemencement en profondeur**

- Déposer 1ml de la solution A dans une boîte de pétri (essai effectué en double).
- Couler 15-20 ml du milieu gélosé aux peptones de caséine et de soja une température ne dépassant pas 45°C (DGAT).
- Faire la même démarche en utilisant le milieu Sabouraud dextrose gélosé (DMLT)
- Incuber les premières boîtes à 30-35°C.
- Incuber les deuxièmes boîtes à 20 -25 °C.
- Calculer le nombre d'UFC par millilitre ou par gramme de produit.

➤ **Recherche et dénombrement des microorganismes spécifique**

✓ *Pseudomonas aeruginosa*

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

Il faut signaler que s'il y a présence de colonie il faut confirmer par des essais d'identification

✓ *Staphylococcus aureus*

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

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

Il faut signaler que la croissance de colonie jaune et blanche entourées d'une zone indique la présence possible de *Staphylococcus aureus* qui doit être confirmée par des tests d'identification.

L'organigramme ci-dessous résume les différentes étapes de test de propreté

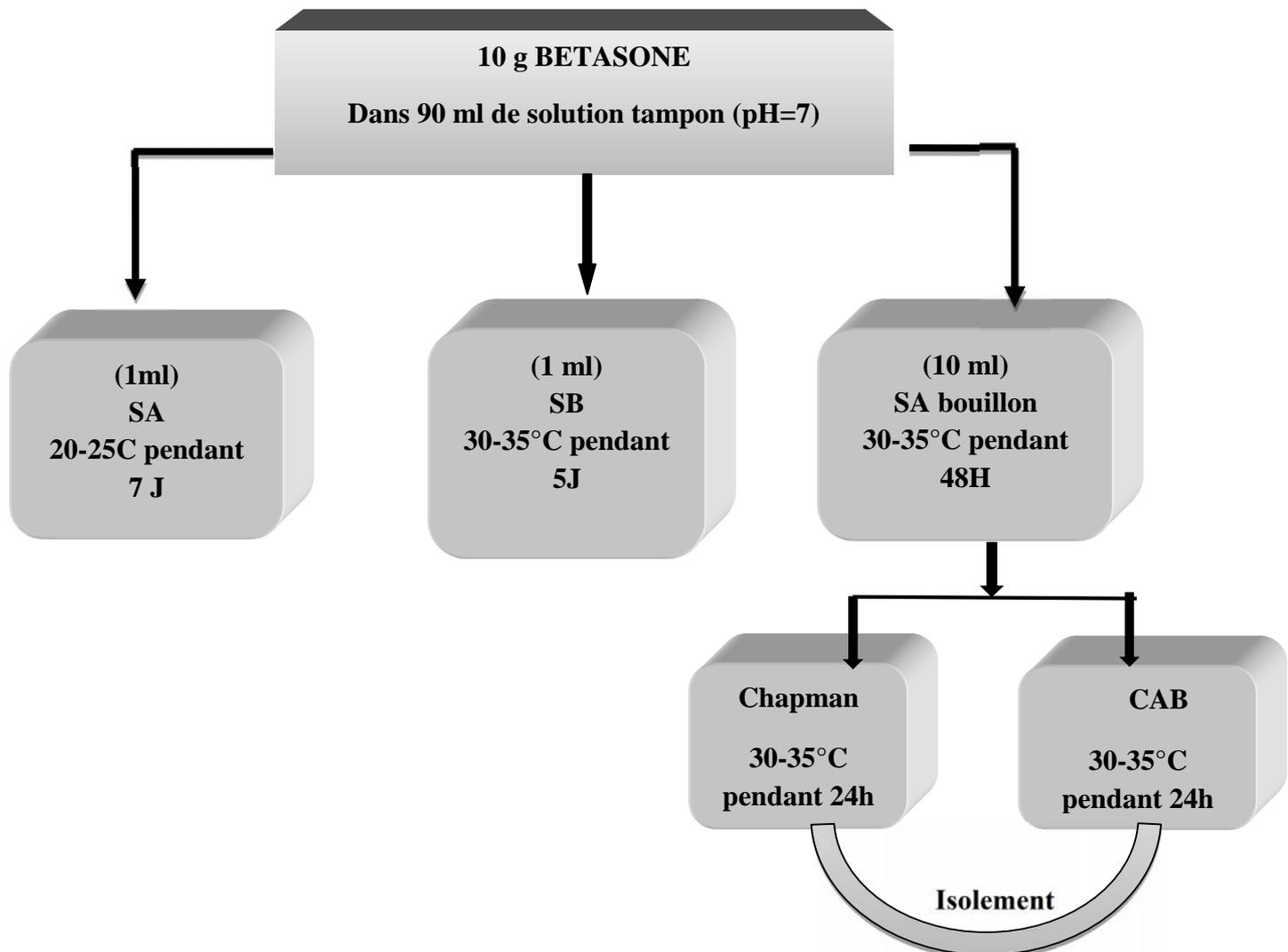


Figure III.1. Organigramme montrant le schéma descriptif de test de propreté

III.2.1.2. Essai de l'efficacité du conservateur du BETHASONE

Essai de l'efficacité de la conservation antimicrobienne consiste en la contamination artificielle de la préparation, si possible dans son récipient définitif, au moyen d'un inoculum de micro-organismes appropriés prescrit, au maintien de la préparation inoculée à une

température prescrite, au prélèvement d'échantillons à partir du récipient à intervalles de temps donnés et au dénombrement des organismes dans les échantillons ainsi prélevés.

Les propriétés de conservation de la préparation sont adéquates si, dans les conditions de l'essai, une diminution importante ou, selon le cas, l'absence d'augmentation du nombre de micro-organismes dans la préparation ensemencée se produit après les temps et aux températures prescrits. Les critères d'acceptation, en terme de diminution du nombre de micro-organismes en fonction du temps, varient pour les diverses catégories de préparations, selon le degré de protection recherché.

III.2.1. 3. Technique de dénombrement des germes viables

La technique de dénombrement des germes viable par ensemencement en profondeur sur le milieu gélose est souvent utilisée en microbiologie générale

❖ Mode opératoire

➤ Microorganisme d'essai

Les germes de référence l'utilisés pour essais sont : *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Pseudomonas*.

➤ Préparation des milieux de culture

La plupart des milieux de culture utilises sont sous forme de poudre déshydratée

➤ Ensemencement des milieux de culture (ensemencement sur milieu solide)

Il s'agit de réaliser les étapes suivantes :

- ensemencer la surface du milieu géloses (soja agar) avec *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* et le milieu gélose (Sabouraud) avec *Candida albicans* à l'aide de la culture mère de chacun de ces microorganismes dans des conditions aseptiques.
- incuber à une température de 37°C pendant 18 à 24 heures pour les bactéries, et à 25°C pendant 2 à 5 jours pour la culture *Candida albicans*

➤ **Dénombrement par ensemencement en profondeur**

Après avoir préparé les dilutions décimales, nous avons effectué le dénombrement sur milieu gélosé comme suit :

- 0,1 ml de chaque dilution est introduire au fond des boites de pétri stériles
- introduire dans chacune de ces boites 10 à 12 ml de milieu gélose fondu (refroidie à 45°C) de façon à recouvrir toute la surface
- mélanger soigneusement et laisser refroidir sur une pailleasse, les boites incubées en position inversée, à des températures et duré proportionnelles à chaque germe.

Micro-organisme	Température	Durée d'incubation
E-coli et S. aureus	37°C	24h
C. albicans	25°C	2 jours-5jours

➤ **Lecture**

- Compter le nombre de colonies par boite de pétri se développant dans ou sur la gélose.
- En générale, éliminer les boites ayant moins de 30 et plus de 300 colonies.
- Le résultat est exprimé en nombre d'unités formant colonies bactériennes.

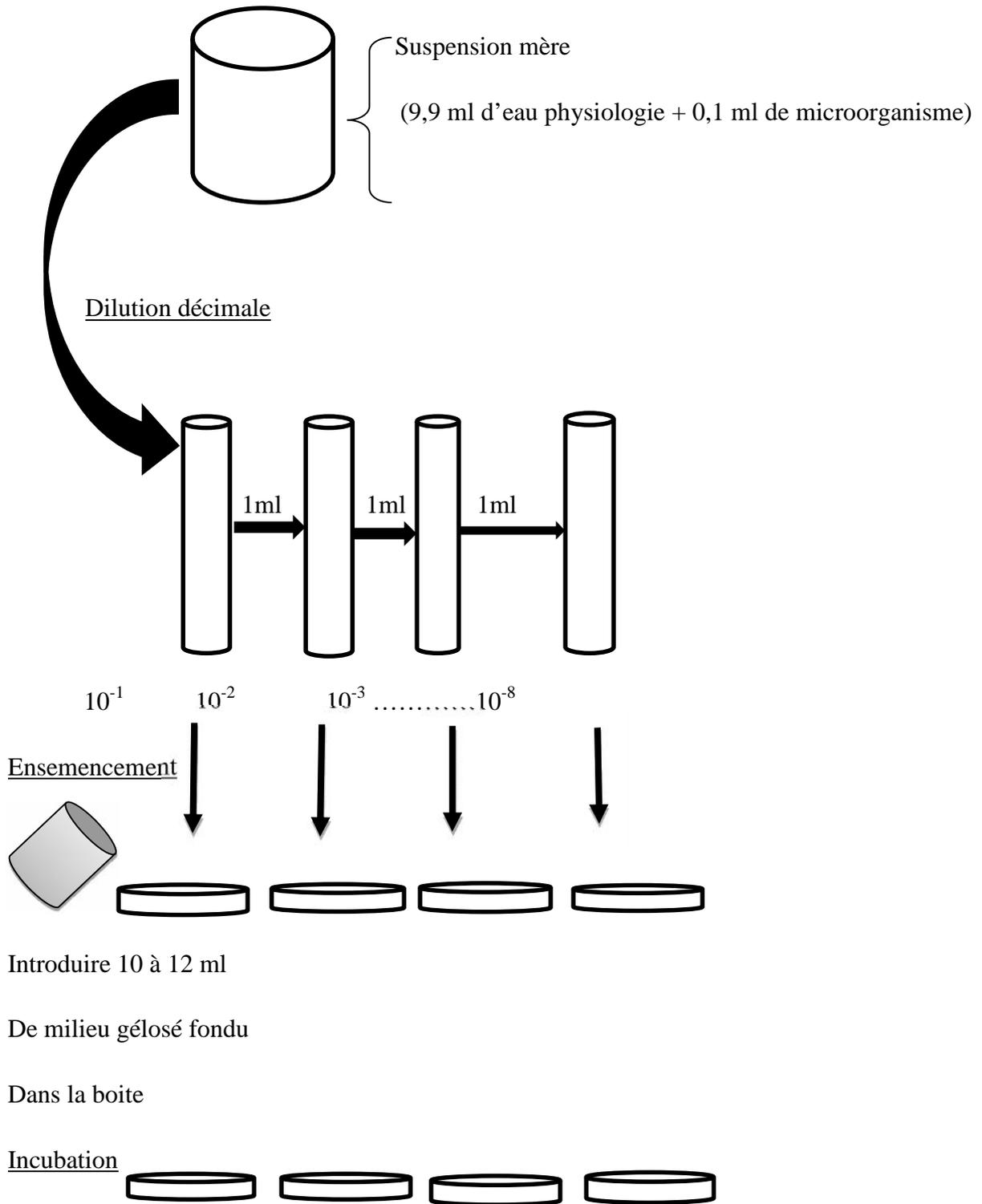


Figure III.3. Différentes étapes de dilution et de dénombrement

➤ Contamination de la pommade

Ensemencer une série des récipients du produit à examiner avec une suspension de l'un des micro-organismes d'essai afin d'obtenir un inoculum de 10^5 à 10^6 micro-organisme par millilitre ou par gramme de préparation :

- Le volume de la suspension de l'inoculum ne dépasse pas 1 de la quantité de produit
- Ainsi le calcul de la réduction logarithmique par la relation suivante :

$$R_x = \log N_0 - \log N_x$$

N_0 : Nombre des micro-organismes viables, exprimé en UFC par g, retrouvé après Contamination du BETASONE.

N_x : Nombres des micro-organismes viables, exprimé en UFC par g, retrouvé après 2, 7, 14 et 28 jour de contamination.

Après l'introduction de la suspension bactérienne dans la quantité du produit approprié, on effectue les étapes suivantes :

- Mélanger soigneusement le flacon contenant la suspension pour assurer une répartition homogène.
- Met le produit ensemencé à la température adéquate de 20°C à 25°C à l'abri de la lumière.
- Prendre 1 g de chaque flacon de produit.
- Dans le cas de notre étude, on a une pommade d'application locale, les échantillons, ont été pris dans différents temps (0, 2, 7, 14, à 28 jours).

III.3. Méthode physico-chimique

Cette étude a pour but de réaliser des analyses physico-chimiques du conservateur et du produit fini selon la monographie interne de SAIDAL

III.3.1 Dosage de parabène par HPLC

L'échantillon à analyser est poussé par un liquide (appelé phase mobile) dans une colonne remplie d'une phase stationnaire de fine granulométrie (les « grains » sont de très petite taille). Le débit d'écoulement de la phase mobile est élevé ce qui entraîne une augmentation de la pression dans le système. Ce débit élevé diminue le temps nécessaire pour

séparer les composants le long de la phase stationnaire. La fine granulométrie de la phase stationnaire permet une meilleure séparation des composants. En effet, pour un même volume de phase stationnaire la surface d'échange augmente si les « grains » qui la composent sont de diamètre plus petit. Les pics obtenus (via un détecteur à UV (les protéines absorbent à 275-280nm) relié à un système d'intégration et de calcul) sont plus étroits donc la résolution est améliorée (les pics sont bien séparés, on peut donc bien les différencier), le seuil de détection est également plus bas (des pics étroits et hauts sont plus faciles à isoler du bruit de fond que des pics larges et bas). La combinaison de ces attributs - rapidité et résolution élevées - conduit à l'appellation « haute performance ».

Les phases mobiles utilisées sont des mélanges d'eau et d'un solvant organique miscible (acétonitrile, méthanol) ou des combinaisons de solvants organiques (alcools, hexane, dichlorométhane, etc.) miscibles entre eux. Les conditions chromatographiques optimales appliquées pour le dosage des parabènes sont: une colonne Cyano de longueur 250 mm, de diamètre 4 mm et d'épaisseur 5 µm. la phase stationnaire est de gel de silice greffée avec une chaîne alkyle appelée Cyano.

- Débit de la phase mobile : 1 ml/min.
- Longueur d'onde du détecteur UV : 265 nm.
- Température : Ambiante.
- Volume injecté : 20 µl.

❖ Mode opératoire

❖ Préparation de l'échantillon

Peser exactement 4 g de la pommade dans un bécher de 50 ml, ajoute 10 ml de échantillon chauffé à 70°C jusqu'à dissolution complet refroidir et centrifuger, prélever 3 ml de la partie liquide (éthanolique). Dans une fiole 5 ml d'éthanol.

❖ Préparation de Standard

Pèse 100 mg de parahydroxy benzoate de méthyle parabène dans 50 ml éthanol, prélaver 3 ml de cette solution dans une fiole de 5 ml d'éthanol.

Injecter la solution standard et l'échantillon dans un chromatographe (HPLC) et enregistrer les chromatogrammes. La teneur en méthyleparabène est obtenue par l'équation suivante :

$$T_{methyl} = \frac{A_{echantillon}}{A_{standard}} \times \frac{P_{standard}}{P_{echantillon}} \times 99.74$$

Où :

T_{methyl} : titre du méthyle

$A_{echantillon}$: surface de l'échantillon

$A_{standard}$: surface du standard

$P_{standard}$: pèse du standard

$P_{echantillon}$: pèse d'échantillon

99.74 : constante

$$T_{BETASONE} = \frac{A_{echantillon}}{A_{standard}} \times \frac{P_{standard}}{P_{echantillon}} \times 99.74$$

Où :

$T_{BETASONE}$: titre du méthyle

$A_{echantillon}$: surface de l'échantillon

$A_{standard}$: surface du standard

$P_{standard}$: pèse du standard

$P_{echantillon}$: pèse de l'échantillon

99.74 : constante



Chapitre VII



Résultats et Discussions

IV.1. Introduction

Dans ce chapitre, nous résumons nos résultats expérimentaux ainsi que leurs interprétations. Nous analyserons les résultats relatif aux analyses microbiologiques et physicochimique du conservateur méthyle parabène et produit fini (BETASONE).

IV .2. Résultats des analyses microbiologiques

a. Test de propreté de BETASONE

Le tableau ci-dessous résume les résultats de test de propreté de produit fini (BETASONE)

Tableau IV.1. Résultats du test de propreté de produit fini

Germes	Résultats	Normes selon la PhE 2011
Germes aérobie viable totaux	Absence	200 U.F.C/g.
Levures et moisissures	Absence	20 U.F.C/g.
<i>Staphylococcus aureus</i>	Absence	10 U.F.C/g.
<i>Escherichia coli</i>	Absence	00 U.F.C/g.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Absence	00 U.F.C/g.
<i>Candida albicans</i>	Absence	00 U.F.C/g.

Ces résultats sont conformes aux exigences requises par la pharmacopée européenne 2011 (Absence totale de : germes viables totaux, levures et moisissures, *Escherichia. Coli*, *Pseudomonas*). Ces résultats sont dus aux :

- Respects de exigence de BPF(bonne pratique de fabrication) et de BPH (bonne pratique de l'hygiène) qui stipulent une multiplication dans des conditions opératoires aseptiques (prélèvement et l'analyse ont été fait, dans des conditions strictes) et une hygiène

rigoureuse des locaux de fabrication et de stockage qui contribuent en grand partie à l'asepsie du produit fini.

- Bonne préparation de produit en utilisant des matières premières de bonne qualité, bonne désinfection et stérilisation de la chaîne de fabrication
- L'inhibition de la croissance microbienne est par l'utilisation de conservateur méthyle parabène.

b. Essai de l'efficacité de la conservation antimicrobienne de méthyle parabène

Les quatre germes étudiés sont représentés dans le tableau suivant avant de faire la contamination artificielle.

Tableau IV.2. Dénombrement des quatre souches après incubation 24 heures

Souches de référence	Nombre de germes (UFC)	Nombre de germes (UFC/ml)
<i>E. coli</i>	40	$40 \cdot 10^{-13} / 0.1 \text{ ml} = 40 \cdot 10^8$
<i>S.aureus</i>	60	$60 \cdot 10^{-10} / 0.1 \text{ ml} = 60 \cdot 10^8$
<i>P. aeruginosa</i>	11,1	$111 \cdot 10^{-7} / 0.1 \text{ ml} = 11,1 \cdot 10^8$
<i>C.albicans</i>	1,48	$1,48 \cdot 10^{-6} / 0,1 \text{ ml} = 1,48 \cdot 10^8$

Ces résultats sont conformes aux exigences de la pharmacopée européenne 2011.

Pour mettre en évidence l'efficacité de la conservation antimicrobienne de parabène, on doit calculer la réduction logarithmique du nombre de cellules viables dans 2, 7, 14 et 28 jours.

Pour les préparations à application locale, les critères recommandés d'efficacité du conservateur sont donnés le tableau ci-dessous en termes de réduction logarithmiques du nombre de microorganismes viables par rapport à la valeur obtenue pour inoculum de départ.

Tableau IV. 3. Critère représentant l'efficacité de conservateur

Micro-organismes	Réduction logarithmique			
	2 jours	7 jours	14 jours	28 jours
Bactérie	2 log	3 log	PAU	PAU
Champignon	ND	ND	2 log	PAU

PAU : Pas d'augmentation

ND : Non déterminé

Calcul de la réduction logarithmique pour chaque souche :

$$\text{Réduction logarithmique} = \text{Log } N_0 - \text{Log } N_x \dots\dots\dots (IV)$$

N_0 : Nombre des micro-organismes viables, exprimé en UFC par g, retrouvé après Contamination du BETASONE.

N_x : Nombres des micro-organismes viables, exprimé en UFC par g, retrouvé après 2, 7,14 et 28 jour de contamination.

Le tableau ci- dessous résume les résultats de dénombrement après la contamination artificielle de la pommade dermique BETASONE avec les quatre souches bactériennes

Tableau IV.4. Résultats expérimentaux de calcul de dénombrement et de la réduction logarithmique des germes en présence du parabène dans le produit

Micro-organismes	Dénombrement (UFC/g)					Réduction logarithmique			
	Jours								
	0	2	7	14	28	2	7	14	28
<i>E. coli</i>	6.10^7	3.10^5	76.10^4	98.10^3	76.10^2	4,12	3,72	4,061	4,72
<i>S.aureus</i>	7.10^7	5.10^5	96.10^4	88.10^4	97.10^3	4,07	3,83	3,79	4,78
<i>P. aeruginosa</i>	8.10^7	4.10^5	2.10^5	49.10^4	88.10^3	3,44	3,74	3,35	4,10
<i>C.albicans</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

j_0 : jour d'initiation du dénombrement de l'inoculum de départ (24h après la contamination artificielle de produit BETASONE).

ND : Non déterminé.

➤ **Pour les trois bactéries *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, on remarque :**

- Diminution de nombre de bactéries dans le produit au bout de 2^{ème} jour
- La réduction logarithmique de nombre de cellule viable par g réponds à l'exigence de la pharmacopée européenne 2011, ce qui signifie que 'il ya une activité antimicrobienne exercé sur ces souches, ce qui bloque la reproduction et la prolifération des cellules bactériennes dans un l'intervalle de temps de 2 jours a 28 jours.

➤ **Pour le champignon (*candida albicans*), on remarque :**

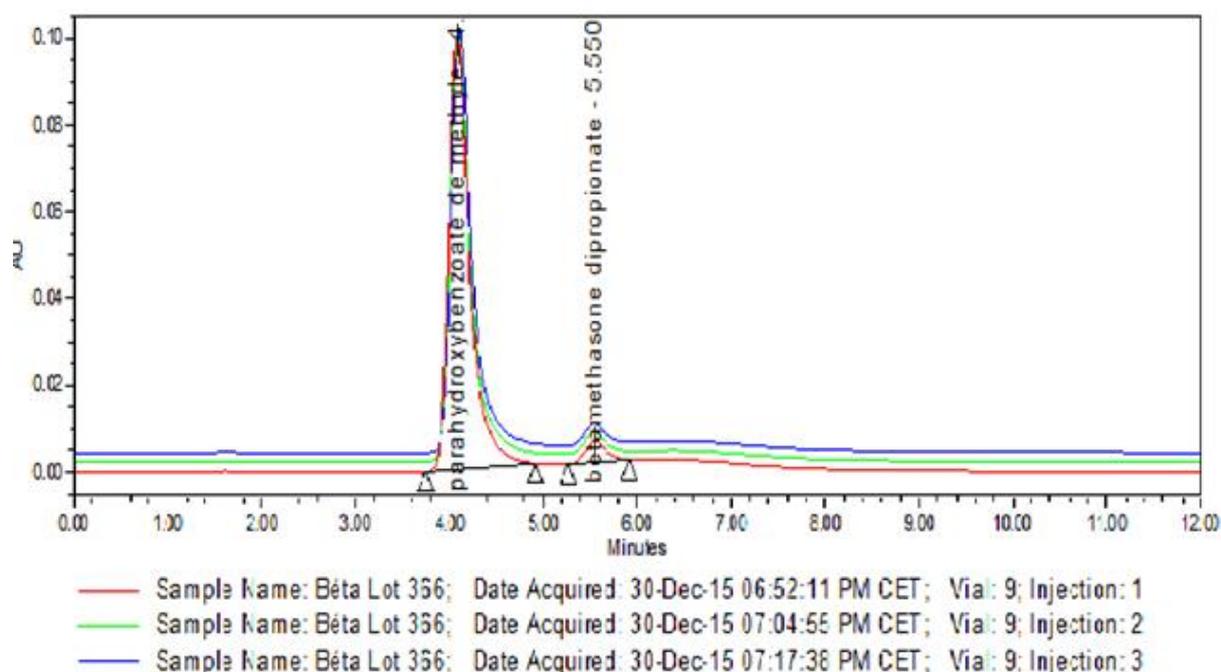
- Une absence totale de germe aux cours de la contamination artificielle de pommade BETASONE, ceci est expliqué par l'action fongicide exercée par le parabène sur cette levure.
- Ce résultat répond aux critères recommandés par la pharmacopée européenne 2011.

En résumant, les dénombrements effectués ont montré une diminution des bactéries et une absence totale de champignon dans la préparation de BETASONE de 2^{ème} jours à 28^{ème} jours. Ces résultats ont été témoignés par une activité bactériostatique vis-à-vis des bactéries et une activité fongicide vis-à-vis de champignon.

IV.2.2. Résultats d'analyses physico-chimiques par HPLC

Les résultats de dosage de méthyle parabène et de BETASONE par HPLC sont représentés sur les figures IV.1 et IV.2.

L'analyse a été répétée trois fois dans le but d'évaluer l'erreur qui est restée dans l'intervalle de $\pm 1\%$ autour de la valeur moyenne.



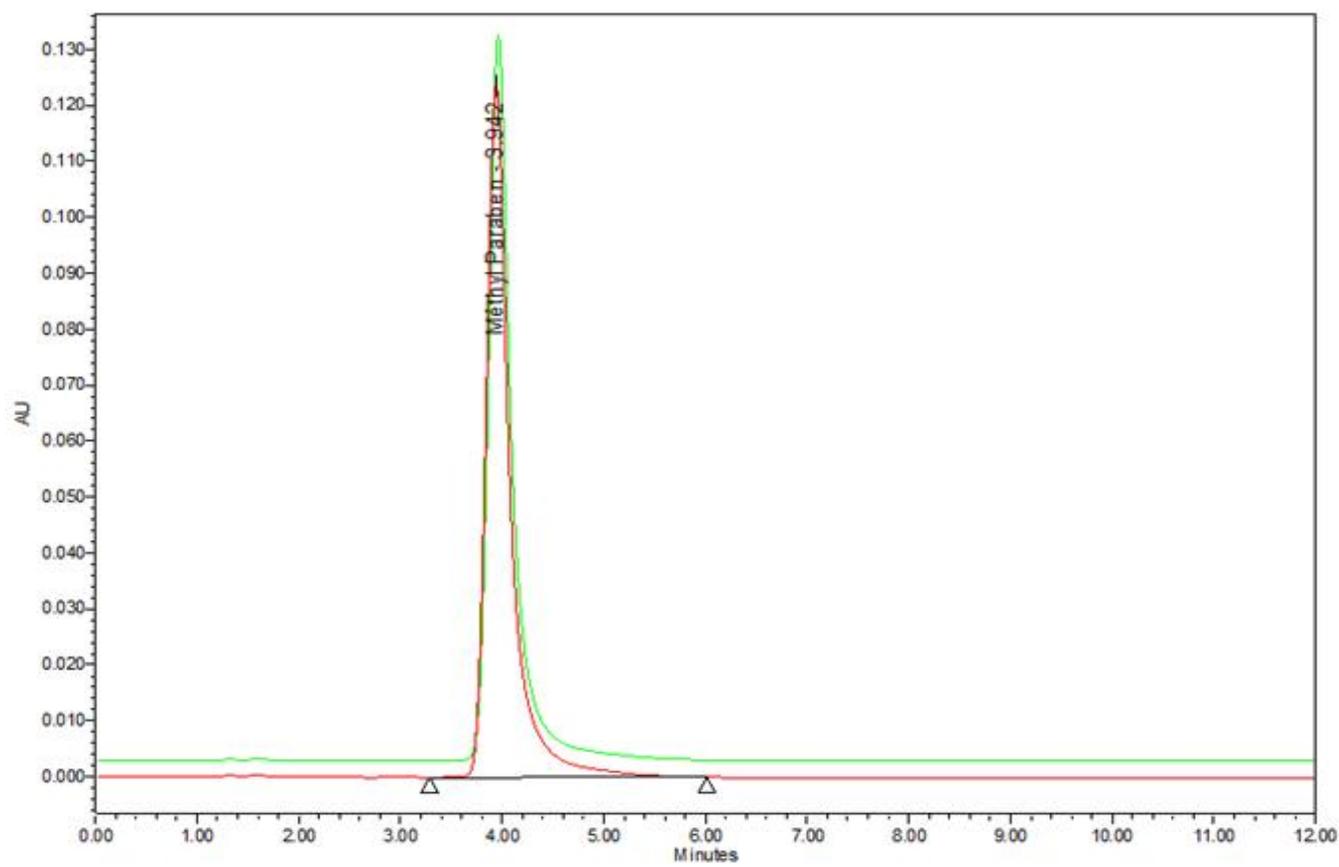
Peak Summary with Statistics
Name: betamethasone dipropionate

	Sample Name	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height
1	Béta Lot 366	9	3	betamethasone dipropionate	5.540	72026	4.47	5035
2	Béta Lot 366	9	2	betamethasone dipropionate	5.540	71558	4.43	5008
3	Béta Lot 366	9	1	betamethasone dipropionate	5.550	73037	4.53	5091
Mean						72207.2		
Std. Dev.								
% RSD								

Peak Summary with Statistics
Name: parahydroxybenzoate de methyle

	Sample Name	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height
1	Béta Lot 366	9	1	parahydroxybenzoate de methyle	4.088	1539391	95.47	99422
2	Béta Lot 366	9	3	parahydroxybenzoate de methyle	4.110	1539153	95.53	97399
3	Béta Lot 366	9	2	parahydroxybenzoate de methyle	4.094	1544000	95.57	97086
Mean						1540848.2		
Std. Dev.								
% RSD								

Figure IV.1. Chromatogramme de l'échantillon de méthyle parabène dans BETAMETHASONE



Peak Summary with Statistics
Name : Méthyl Paraben

	Sample Name	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height
1	Standard Méthyl	6	3	Méthyl Paraben	3.962	2128539	100.00	129980
2	Standard Méthyl	6	2	Méthyl Paraben	3.942	2055054	100.00	123984
Mean						2091796.6		
Std. Dev.								
% RSD								

Figure IV .2. Chromatogramme standard de méthyle parabène

Les chromatogrammes indiquent la présence des pics de méthyle parabène situé à 4 min et de BETASONE situé à 5.5 min. Après comparaison des spectres obtenus de l'échantillon et de standard de méthyle parabène, les deux bandes sont identiques.

Ces deux figures, nous ont aidés de déterminer les surfaces des parabènes afin de calculer les titres de ces derniers

$$T_{\text{méthyle parabène}} = \frac{1540848,2}{2091796,6} \times \frac{100}{4 \times 10^3} \times 99,74$$

$$T_{\text{méthyle parabène}} = 1,83 \text{ mg/ml}$$

$$T_{\text{BETASONE}} = \frac{72207,2}{2091796,6} \times \frac{100}{4 \times 10^3} \times 99,74$$

$$T_{\text{BETASONE}} = 0,8 \text{ mg/ml}$$

Nous remarquons que les titres de méthyle parabène et BETASONE sont conforme selon les normes de la pharmacopée européennes et par conséquent, on conclut que le conservateur méthyle parabène possède une efficacité vis-à-vis des microorganismes même à faibles concentrations.

Conclusion générale

Conclusion générale

Après notre étude, nous avons remarqué l'influence du conservateur méthyle parabène sur l'activité bactérienne et fongique, ainsi que la qualité physico-chimique dans la préparation pharmaceutique de la (pommade BETHASONE).

L'analyse microbiologique nous a révélé que le produit fini contenant le conservateur est de très bonne qualité. En effet, nous n'avons pas observé la présence des micro-organismes (germes totaux, germes pathogènes et la flore fongique), ce qui signifie une bonne salubrité de la BETASONE et la conformité du produit aux exigences de la pharmacopée européenne 2011.

Les dénombrements effectués ont montré une diminution des bactéries et une absence totale de levure dans la préparation de BETASONE de 2^{ème} jours au 28^{ème} jours. Ces résultats sont témoins d'une activité bactériostatique vis-à-vis des bactéries et d'une activité fongicide vis-à-vis de champignon.

Le dosage physico-chimique de méthyle parabène et de BETASONE par HPLC, a mis en évidence la conformité aux exigences de la pharmacopée européenne. Cette analyse a confirmé que le conservateur possède une efficacité vis-à-vis des micro-organismes même à faibles concentrations.

De façon générale, on peut conclure que l'introduction des agents antimicrobiens dans les préparations pharmaceutiques, est indispensable pour assurer leur protection et leur conservation contre tout développement bactérien sur l'activité thérapeutique et la santé du malade.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- [1] M. Talbert, G. Willoquet, R. Gervais, «Guide Pharmaco Etudiants et Professionnels en soins infirmiers », 9^{ème} édition, France ,2011.
- [2] M. Smola, « Contribution à l'étude de la formulation et de l'analyse physicochimique de formulations pédiatriques Microémulsionnées », Thèse de doctorat, Faculté Sciences Pharmaceutiques, Université louis pasteur Strasbourg I, France, 2008.
- [3] D. Piettre, «Théorie et pratiques infirmiers. Pharmacologie », Vuibert, France, 2002.
- [4] J. Dangoumau, N. Moore, M. Molimard, A. Fourier-Reglat, K.Latry, F. Haramburu, G. Miremont-salame, K.Titire, «Pharmacologie générale » édition 2006, Bordeaux, France, 2006.
- [5] M. Talbert, G. Willoquet, R .Gervais, « Guide pharmaco pour Etudiants professionnels et Paramédicaux », 7^{ème} édition Lamarre, France, 2006.
- [6] P. Allain, «Pharmacologie, les médicaments », édition Estem, Paris, France, 1996.
- [7] H. Lullmann, M. Klaus, Z. Albrechit, «Atlas de poche de Pharmacologie», 2^{ème} édition, France, 2001.
- [8] Pharmacopée Européenne, 7^{ème} édition, 2011.
- [9] A. Hir, J.C.Chaumeil, Brossard, «pharmacie galénique », 8^{ème} édition Masson, Paris, 2001.
- [10] D. Vicchio, Pharmacoepial Forum, volume 29 (2012) 1428.
- [11] J.Mussard, «Les parabens, des conservateurs omniprésents : un risque pour la santé », Thèse doctorat, Faculté de pharmacie, Université de Nante, France, 2006.
- [12] M. Smola, « Contribution à l'étude de la formulation et de l'analyse physicochimique de formulations pédiatriques Microémulsionnées », Thèse de doctorat, Faculté Sciences Pharmaceutiques, Université louis pasteur Strasbourg I, France, 2008.
- [13] A. Manallah, «Activités antioxydant et anticoagulante des polyphénols de la pulpe d'olive », Mémoire de magister, Faculté des sciences de la nature et de la vie, Université Ferhat Abbas, Sétif, Algérie, 2012.
- [14] V. Maurus, «Les Parabens conservateurs controversés », Thèse de doctorat, Faculté de biologie, Université de Rennes 1, France, 2015.
- [15] C. Lagane, «Rôle de l'il-13 et des ligands de par - γ dans la réponse anti-infectieuse des macrophages murins et des monocytes humains vis-à-vis de candida albicans », Thèse de doctorat, Université Toulouse III-Paul Sabatier, France, 2007.

Références bibliographiques

- [15] C. Chenevoy, « Face à la polémique des parabens, la cosmétique bio est-elle la bonne alternative », Thèse de doctorat, Faculté de pharmacie, Université Joseph Fourier, France, 2011.
- [16] C. Lagane, « Rôle de l'IL-13 et des ligands de par γ dans la réponse anti-infectieuse des macrophages murins et des monocytes humains vis-à-vis de *Candida albicans* », Thèse de doctorat, Université Toulouse III-Paul Sabatier, France, 2007.
- [17] Benzercljb I3enaouda, « Intéret de l'antifongogramme dans le traitement des mycoses superficielles et profondes », Thèse de doctorat, Université ae3ou bekr beij, 2013.

Annexe
Annexe

Analyses microbiologiques

a. Matériels

- Pipettes
- Boîtes pétries
- L'anse
- Tubes d'essai
- Flacons
- Ecouvillons
- Filtres
- Agitateur magnétique
- Spatule
- Poire
- Bécher
- Fioles graduées
- Erlenmeyer
- Eprouvette
- Plaque chauffante sous agitation
- Pince en inox stérile
- Fiole conique stérile
- Pipette de 10 ml et 1 ml stérile

III.2.2. Equipements

- Hotte
- Autoclave et étuve pour stérilisation
- Incubateur de 25 °C, 35 °C
- Bain marie
- Bec benzène
- HPLC (waters. Instrument 6253)
- Balance analytique
- Hotte à flux laminaire
- Autoclave et étuve pour la stérilisation
- Incubateur de 25°C, 35°C et 42°C.

III.2.3. Produits

- Soja agar stériles
- Sabouraud stérile
- Soja bouillon stérile
- Myristat
- Eau physiologie
- Pommade BETASON
- Eau distillée
- Méthyle parabène
- Solution tampon (pH =6, 3, pH=7)
- Souches biologiques :
 - Bactéries (Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli) et du champignon (candida albicans).

b. Equipements

c. Milieux de cultures

➤ Soja gélose B : Gélosé trypto caséine soja

Pour les méthodes générales de bactériologie dans la détermination de réaction hémolytiques.

• Préparation :

Mettre en suspension 40 g du milieu dans un d'eau distillée, mélanger, chauffer en agitant fréquemment et faire bouillir une jusqu'à dissolution complète. Répartir et stériliser en autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

Si on doit préparer de grands volumes, augmenter le temps mais la température de stérilisation.

• Formule dans 1 litre d'eau distillée :

Bio-tryticase.....	15,0 g.
Bio-soyase.....	5.0 g
Chlorure de sodium.....	5.0 g
Gélose.....	15,0 g
pH = 7,3	

➤ Milieu gélose C : Gélose Sabouraud

Pour isolement, identification et culture des levures et moisissures.

• **Préparation :**

Dissolution 45 g de poudre de la gélose Sabouraud dans un litre d'eau distillée puis autoclave à une température 121°C pendant 15 minutes

➤ **Formule dans 1 litre d'eau distillée :**

Bio-thione.....	3 g
Bio-tricase.....	3g.
Bio-soyase.....	3 g
Extrait de levure	2g
Extrait de mait.....	1 g
Glucose.....	19 g
Phosphate monopotassique	0,5 g
Phosphate dissodique.....	0.5 g

➤ **Milieu liquide A :(milieu liquide aux peptones de caséine et de soja)**

Peptone pancréatique de caséine	17,0 g
Peptone papaique de soja	3,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Phosphate dipotassique	2,5 g
Glucose monohydraté.....	2,5 g
Eau purifiée.....	1000 ml

Ajustez le pH pour qu'il soit de $7,3 \pm 0,2$ à 25 °C après stérilisation. Stérilisez à l'autoclave selon un cycle validé.

Milieu gélosé H :(milieu gélosé de Mac Conkey)

Hydrolysats pancréatique de gélatine.....	17,0 g
Peptones de viande et de caséine.....	3,0 g
Lactose monohydraté	10,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Sels biliaires	1,5 g
Gélose.....	13,5 g
Rouge neutre.....	30,0 mg
Violet cristallisé	1 mg
Eau purifiée.....	1000 mL

Ajustez le pH pour qu'il soit de $7,1 \pm 0,2$ à 25 °C après stérilisation. Portez à ébullition pendant 1 min en agitant constamment, puis stérilisez à l'autoclave selon un cycle validé.

➤ **Milieu gélosé O:(milieu Baird-Parker) ou (Chapman)**

Hydrolysats pancréatique de gélatine.....	17,0 g
Peptones de viande et de caséine.....	3,0 g
Lactose monohydraté	10,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Sels biliaires	1,5 g
Gélose.....	13,5 g
Rouge neutre.....	30,0 mg
Violet cristallisé	1 mg
Eau purifiée.....	1000 mL

Ajustez le pH pour qu'il soit de $7,1 \pm 0,2$ à 25 °C après stérilisation. Portez à ébullition pendant 1 min en agitant constamment, puis stérilisez à l'autoclave selon un cycle validé.

➤ **Solution tampon peptonée au chlorure de sodium pH 7,0**

Phosphate monopotassique	3,6 g
Phosphate disodique dihydraté	7,2 g équivalent à 0,067 M de phosphate
Chlorure de sodium.....	4,3 g
Peptone de viande ou de caséine	1,0 g
Eau purifiée	1000 mL

Stérilisez à l'autoclave selon un cycle validé.

➤ **Eau physiologie**

Dissoudre 9 g de chlorure de sodium dans un litre d'eau distillée, puis autoclavage des flacons à température de 121°C pendant 15 minut

Matériels utilisés



Etuve



Appareil HPLC



Balance de précision



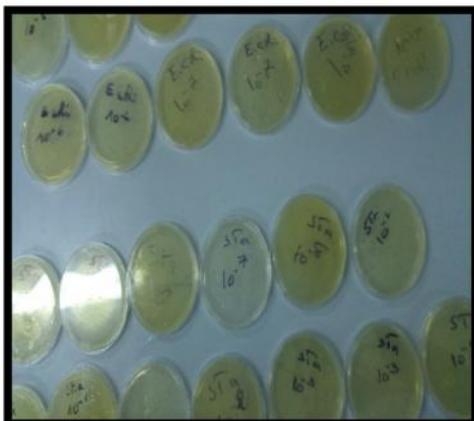
Hotte à flux laminaire



Milieu de culture SAB



Les souches Bacérienne



La contamination artificielle



le dénombrement



Le dénombrement des germes