



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement Supérieure et de la Recherche Scientifique

Université de Djilali BOUNAMA

Faculté des sciences de la nature et de la vie et sciences de la terre

Département de biologie

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Spécialité: Analyses Biologiques et Biochimiques

THEME

**controle physico-chimique, microbiologique,
et toxicologique d'une solution injectable
clofenal 75mg/3ml**

Présenté par:

-M^{elle}: MERSELLAB Sabrina

-M^{elle}: ANGOUD Hayet

Jury :

-Président: Dr. Bouras H

-Promotrice: Dr. Guetarni H

-Examinateur: Dr. Mahi M

-Examinatrice : Dr. Mostefa Sari F

Promotion: 2014-2015

REMERCIEMENTS

*Nous tenons à remercier le Dieu tout puissant et
tous avoir donné la santé et la volonté, et tous
ceux qui ont contribué à la réalisation de ce travail*

en particulier à:

*Dr. Guetarni H, notre promotrice, pour son aide efficace,
ses conseils judicieux qui ont amélioré la réalisation de ce
mémoire.*

*Dr. Bouras H, maître assistant au département de
Biologie Khemis-Miliana, pour accepter de présider
ce jury.*

*Dr. Mahi M, maître assistant au département de biologie
Khemis-Miliana, pour accepter au jury, et examiner ce
travail.*

*Dr. Mostefa Sari F maître assistant au département de
biologie Khemis-Miliana, pour accepter au jury, et examiner
ce travail.*

Les personnels de laboratoire de Groupe SAJDAL

*Tous les enseignants de l'université de Khemis-
Miliana durant le cycle d'étude.*

﴿Sabrina & Hayet﴾



DEDICACE

*C'est avec toute l'ardeur de mes sentiments que
je dédie ce modeste travail qui est le fruit de ma
profonde reconnaissance à :*

Mes parents, que dieu les gardes et les protèges.

Mes chère frères et mon bon frère.

Mes chère sœurs et mes belles sœurs.

*Mes chères : Walid, Besma, Hanene, Wissal,
Achraf.*

Familles : Mersellab et Taïboune.

Ma binome : Hayet.

Ma très chère amie : Hafidha.

Mes enseignants et mes amis de l'étude.

Tous ceux que j'aime dans le monde.

Sabrina





DEDICACE

*Je dédie le fruit de ce modeste travail comme
un geste de gratitude à :*

*Mes très chers parents, qui m'ont soutenu,
encouragé pour que je puisse mener à bien mes
études, et qui attendu ce jour avec impatience.*

Mon frère et ma belle sœur.

Ma petite nièce : Maroua.

Les familles : Angoud et Kadi.

Ma très chère amie : Hafidha.

Ma binôme : Sabrina.

Mes enseignants et mes amies de l'étude.

*A tout ceux qui ont contribué à la réalisation de
ce travail*

Hayet

Résumé

Afin d'obtenir une action thérapeutique toujours identique avec un même produit pharmaceutique, ce dernier doit présenter des caractéristiques constantes et parfaitement définies.

L'objectif de cette étude consiste en le contrôle physico-chimique, microbiologique, et toxicologique du Clofenal injectable 75 mg/ 3ml.

Toutes les analyses effectuées sur chacun des paramètres du principe actif, u mélange final , et du produit fini, ont donné des valeurs conformes à la norme utilisé.

La DL₅₀ sur des souris correspond à une concentration de 136 mg/ kg.

La recherche des Endotoxines à donné des résultats négatifs.

Le médicament, Clofenal est donc considéré de bonne qualité pharmaceutique.

Mots clés :

Clofenal 75 mg /3ml, DL₅₀, Endotoxines.

Abstract

In order to obtain a therapeutical action which is always identical with the same pharmaceutical product, this one must display constant and perfectly defined characteristics. The objective of this study is physic-chemical, microbiological, and toxicological control of Clofenal 75 mg /3 ml.

All the analysis, done on every parameter of the active principal, finished mélange, and of the finished product has shown values that are true to the norm used.

The DL₅₀ on mice corresponds to a concentration of 136 mg / kg.

The search of the Endotoxines done negatives results.

The medicine Clofenal is thus considered to have good pharmaceutical quality.

Key words:

Clofenal 75 mg / 3ml, DL₅₀, Endotoxines.

ل الحصول على فعالية فس الدواء الصيدلي هذ الأخير يجب يعطي خصائص

الهدف من هذه الدراسة يقوم على المراقبة الفيزيوكيمائية الميكروبيولوجية التوكسينولوجية
3 / 75 .

كل التحاليل المطبقة على كل مقاييس المزيج النهائي و المنتج النهائي قيم
مماثلة للنموذج المعمول به.

DL₅₀ وافقت تركيز 136 / .

البحث عن السمات الداخلية نتائج سلبية.

كلوفنال يعتبر ذو نوعية صيدلانية جيدة.

:

DL₅₀ السمات الداخلية 3/ 75.

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction

I : Etude bibliographique

1- Généralités sur les médicaments.....	1
2- Définition d'un médicament	1
3- Mise en forme d'un médicament	1
3-1- Principe actif...	2
3-2- Excipient	2
3-3- Récipient	2
4- Contrôle pharmaceutique	2
4-1- Qualité dans l'industrie pharmaceutique.....	2
4-2- Définition de la qualité	3
4-3- Contrôle	3
4-4- But du contrôle de qualité	4
4-5- Contrôle de qualité d'un médicament	4
4-5-1- Physico-chimique	4
4-5-2- Microbiologique	4
4-5-3- Toxicologique	5
5- Les anti-inflammatoires	5
5-1- But de l'utilisation des anti-inflammatoires.....	5
5-2- Mécanisme d'action	5
5-3- Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS).....	6
5-3-1- Classification	7
5-3-2- Clofenal (Diclofénac) 75 mg /3ml ; solution injectable.....	7
5-3-3- Solutions ou préparations injectables.....	8
5-3-4- L'inflammation	9
5-4- Composition du Diclofénac	10

5-5- Procédure de fabrication de Clofenal (75 mg /3ml).....	13
5-5-1- Contrôle du Clofenal	13
5-5-2- Contrôle du Diclofénac sodique	15

II : Matériels et méthodes

1- Echantillonnage.....	17
1-1- Matière première (le principe actif)	17
1-2- Mélange final	17
1-3- Produit final	18
2- Contrôles physico-chimiques	18
2-1-Principeactif	18
2-1-1- Aspect	18
2-1-2- Solubilité	18
2-1-3- Identification D	19
2-1-4- Point de fusion	19
2-1-5- Métaux lourds	19
2-1-6- Identification par Spectrophotomètre UV.....	20
2-1-7- Perte à la dessiccation	20
2-1-8- Dosage potentiométrique	21
2-2- Mélange final	22
2-2-1- pH	22
2-2-2- Dosage au Spectrophotomètre UV.....	23
2-3- Produit final	24
2-3-1- Aspect	24
2-3-2- Volume moyen	24
2-3-3- pH	24
2-3-4- Identification par Spectrophotométrie.....	25
2-3-5- Dosage par UV	25
3- Contrôle microbiologique	26
3-1- Préparation des souches	26
3-2- Dilution	26
3-3- Ensemencement du milieu gélosé	27
3-4- Dénombrement	27
3-5- Etapes de contrôle	29

3-5-1- Contrôle de stérilité des milieux de culture.....	29
3-5-2- Contrôle de fertilité des milieux de culture.....	29
3-5-3- Test de stérilité du Clofenal	31
3-5-4- Test de fertilité (challenge test) de Clofenal.....	32
4- Contrôle toxicologique	32
4-1- Détermination de la DL ₅₀	32
4-2- Recherche des endotoxines	33

III : Résultats et discussion

1- Contrôles physico-chimiques	37
1-1- Principe actif	37
1-1-1- Aspect	37
1-1-2- Solubilité	37
1-1-3- Identification D	37
1-1-4- Point de fusion	38
1-1-5- Métaux lourds	38
1-1-6- Identification par Spectrophotomètre UV.....	38
1-1-7- Perte à la dessiccation	38
1-1-8- Dosage titrimétrique	39
1-2- Mélange final	39
1-2-1- pH	39
1-2-2- Dosage Spectrophotométrique	39
1-3- Produit fini	40
1-3-1- Aspect	40
1-3-2- Volume moyen	40
1-3-3- pH	40
1-3-4- Identification par UV	41
1-3-5- Dosage par UV	42
2- Contrôle microbiologique	42
2-1- Dénombrement	42
2-1-1- <i>Bacillus subtilis</i>	42
2-1-2- <i>Candida albicans</i>	42
2-1-3- <i>Staphylococcus aureus</i>	43

2-1-4- <i>Clostridium sporogens</i>	43
2-2- Etapes de contrôle	43
2-2-1- Contrôle de stérilité des milieux de culture.....	43
2-2-2- Contrôle de fertilité des milieux de culture.....	45
2-2-3- Contrôle de stérilité du Clofenal	47
2-2-4- Contrôle de fertilité du Clofenal	49
3- Contrôle toxicologique	50
3-1- Détermination de la DL ₅₀	50
3-2- Recherche des endotoxines	51

Conclusion

Références bibliographiques

Annexes

Liste des abréviations

A : Adulte

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

AINS : Anti-inflammatoires Non Stéroïdiens

AIS : Anti-inflammatoires Stéroïdiens

DL50 : Dose Létale

E : Enfant

Ech : Echantillon

EU : Unité d'Endotoxines

EPPI : Eau Pour Préparation Injectable

IM : Intramusculaire

ISO : Organisation Internationale de la Santé

LAL : Lysat d'Amoebocytes de Limule

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

ST: Soja Trypticase

STD: Standard

THIO: Thioglycolate

UFC : Unité Formant Colonie

liste des tableaux

Tableau 1	Différentes formes de diclofenac.....	8
Tableau 2	L'échelle exprimant la solubilité d'une substance.....	16
Tableau 3	Contrôle de fertilité des milieux de culture.....	33
Tableau 4	Test d'identification U.V à $\lambda = 440$ nm.....	44
Tableau 5	Test de la perte à la dessiccation.....	44
Tableau 6	Test de dosage Titrimétrique.....	45
Tableau 7	Dosage par Spectrophotométrie à $\lambda = 275$ nm.....	45
Tableau 8	Volume moyen du produit fini	46
Tableau 9	Identification par U.V du STD et Ech.....	47
Tableau 10	Dosage du principe actif dans le mélange 0 +275 nm.....	48
Tableau 11	Dénombrement des germes.....	48
Tableau 12	Contrôle de la fertilité après 07 jours d'incubation.....	50
Tableau 13	Test de stérilité du Clofenal après 14 jours d'incubation.....	52

liste des figures

Figure 1	Mise en forme d'un médicament.....	2
Figure 2	Mécanisme d'action des anti-inflammatoires.....	6
Figure 3	Structure Chimique Formule du Clofenal ou Diclofenac.....	7
Figure 5	Contrôle de fertilité des milieux de culture.....	34
Figure 6	Dilution des Endotoxines.....	37
Figure 7	Préparation et dilution des échantillons de Clofenal.....	39
Figure 8	Identification par U.V de Clofenal 75mg/3ml.....	47
Figure 9	Contrôle de fertilité des deux milieux de culture utilisés.....	51
Figure 10	Test de stérilité du Clofenal.....	53
Figure 11	Test de fertilité de Clofenal.....	54
Figure 12	DL ₅₀ de Clofenal 75 mg/ 3ml.....	55
Figure 13	Recherche des endotoxines.....	56

Introduction

Le marché du médicament ne cesse de connaître un essor grandissant et les industriels multiplient les gammes afin d'une part augmenter leur bénéfice et d'autre part, répondre à la demande des patients.

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.

Le clofenal, est un anti-inflammatoire non stéroïdien très utilisé à travers le monde pour traiter les réactions inflammatoires et les maladies rhumatismales.(Charpentier et al, 2004).

Il se présente 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 (Bourin et Jolliet, 1996).

La fabrication et le conditionnement de ce produit pharmaceutique nécessite des contrôles physico- chimiques et microbiologiques, à différentes étapes afin d'assurer une qualité ultérieure optimale.

Le contrôle toxicologique joue un rôle prépondérant dans la détermination de la toxicité et des effets secondaires éventuels.

Vu l'importance de ce médicament, nous avons entrepris cette étude afin de contrôler à différentes stades de sa fabrication, le paramètres physico-chimiques et microbiologiques pour déterminer sa conformité avec les normes en vigueur.

Un test toxicologique à été porté sur :

- La détermination de la DL_{50} effectué sur des souris en croissance.
- La recherche des endotoxines par l'essai LAL.

Partie théorique

Partie théorique

Etude bibliographique :

1- Généralités sur les médicaments :

Le marché pharmaceutique consiste à lui seul un enjeu majeur. En 2003, la consommation mondiale a pratiquement atteint 500 milliards de dollars U.S en progression de 9% par rapport à l'année précédente. Le développement s'inscrit dans une évolution logique de l'accès d'un plus grand nombre de population aux soins médicaux, alors que la croissance de l'économie et plus particulièrement celle des pays en voie de développement ne suit pas la même courbe de croissance. Cette contradiction tend à être corrigée par les politiques nationales de santé volontaires, qui favorisent de plus en plus l'utilisation des médicaments génériques (Baronas, 2006).

L'industrie pharmaceutique algérienne, est confortée à la nécessité de se mettre au diapason de l'évolution des exigences internationales en matière de recherche et de développement de leurs objectifs, la fabrication de médicament de dernière génération capable de prendre en compte les pathologies les plus fréquentes, et ce à moindre coût, tout en respectant les critères d'efficacité et de qualité, de sécurité et de tolérance (Le Hir, 2001). L'élaboration d'un médicament est une tâche très prolongée. 10 à 15 ans séparent sa conception de sa commercialisation. On admet que pour 10000 molécules synthétisées et subissant des tests élémentaires in-vitro et in-vivo chez un animal, une vingtaine entreront en préclinique (cinétique et toxicologique), 10 feront l'objet de premiers essais chez l'homme (phase 1), 5 seront testés dans des indications spécifiques (phase 2) (Marcel et Garnier, 1987).

2- Définition d'un médicament :

Un médicament c'est toute substance utilisée pour prévenir, atténuer, ou guérir une maladie ou ses symptômes (Gaignault, 1982).

« Toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales, ainsi que toute substance ou composition pouvant être utilisée chez l'homme ou chez l'animal, ou pouvant leur être administrée en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, corriger ou modifier leurs fonctions physiologiques en exerçant une action pharmacologique, immunologique ou métabolique » (Gouraud, 2012).

3- Mise en forme d'un médicament :

Un médicament se compose d'un ou de plusieurs principe actifs et d'excipients. L'ensemble étant contenu dans un récipient. (Talbert et al, 2001).

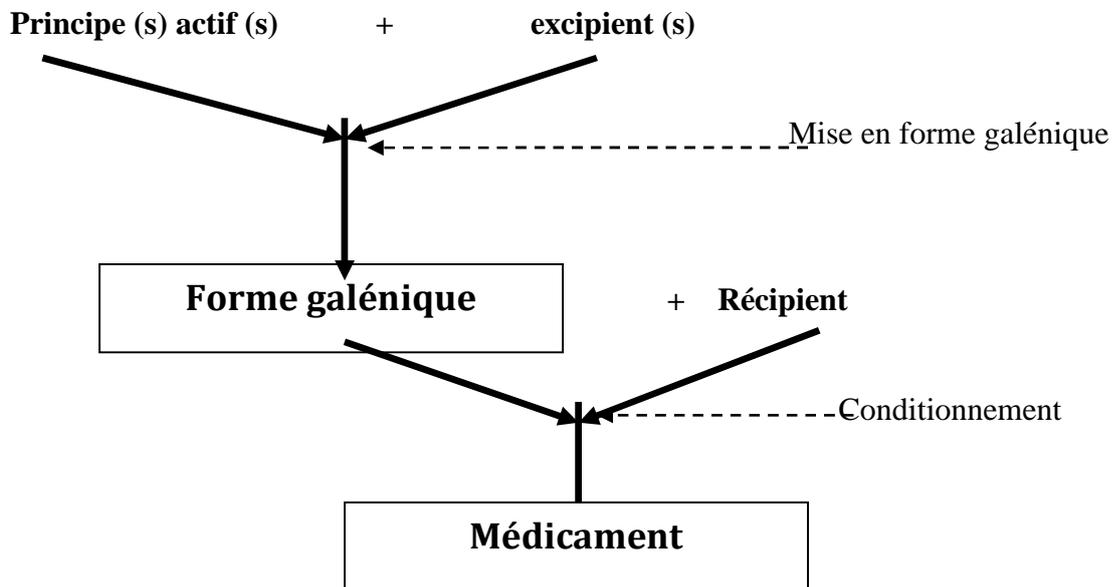


Figure 1 : Mise en forme d'un médicament (Talbert et al, 2001)

3-1- 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 (article L.5111-1).

Est une substance active douée de propriétés pharmacologiques, et est donc à la base de l'effet thérapeutique (Talbert et al, 2001).

3-2- Excipient :

L'excipient est une substance d'origine chimique ou naturelle qui facilitent l'utilisation du médicament mais ne présentent pas d'effet curatif ou préventif (article L.5111-1).

La fonction d'un excipient est de servir de vecteur (véhicule ou base) au principe actif ou d'entrer dans la composition du vecteur contribuant ainsi à certaines propriétés du produit telles que la stabilité, le profil biopharmaceutique, l'aspect et l'acceptabilité pour le patient et la facilité de fabrication (Le Hir, 2001).

3-3- Récipient :

Le récipient est destiné au conditionnement, le protégeant ainsi de l'environnement extérieur. L'ensemble est regroupé dans un emballage accompagné d'une notice explicative (Talbert et al, 2001).

4- Contrôle pharmaceutique :

4-1- Qualité dans l'industrie d'un médicament :

L'industrie pharmaceutique doit fabriquer et fournir des médicaments adaptés à l'emploi, répondant aux exigences du dossier d'autorisation de mise sur le marché (AMM) et n'exposant les utilisations à aucun risque lié à des carences en matière de sécurité, de qualité, ou d'efficacité. La réalisation de cet objectif de qualité engage la responsabilité de la direction. De l'entreprise et le pharmacien responsable. Elle requiert la participation et l'engagement du personnel dans les différents départements et à tout les niveaux de l'entreprise, de ses fournisseurs et des distributeurs. Pour atteindre plus sûrement cet objectif, l'entreprise doit posséder un système d'assurance qualité, bien conçu, correctement mis en œuvre et effectivement contrôlé, système qui inclut le concept des pratiques de fabrication et ses règles de fonctionnement constitue le moteur de la qualité dans l'industrie pharmaceutique (Anonyme,2001).

4-2- Définition de la qualité :

Selon la norme ISO, la qualité est : « l'ensemble des caractéristiques d'une entité qui lui confèrent l'aptitude à satisfaire des besoins exprimés et implicites (Willya, 1996).

4-3- Contrôle :

Selon le Hir (2001) ; le mot contrôle peut être utilisé dans le sens de vérification ou dans celui de maîtrise. Le contrôle à mesurer une ou plusieurs caractéristiques d'une entité et à comparer les résultats obtenus à des spécifications préétablies.

Le contrôle de qualité constitue donc ,qui permet de détecter les différents types d'erreurs qui existent lors des déterminations d'analyses quantitatives

Effectuées dans un laboratoire (Sussland,1996).

-L'erreur peut être grossière, lorsqu'elle est due au non respect du protocole expérimental, à une confusion de réactif, de matériel, à une faute de calcul ou de transcription du résultat, c'est le type d'erreur qui peut être évité.

Sa fréquence dépend essentiellement du manipulateur (niveau de formation, cadence de son travail, etc.).

-l'erreur est aléatoire, lorsqu'elle se produit de façon fortuite ou accidentelle, elle est due à l'impression d'une mesure consécutive à la défaillance momentanée du manipulateur ou d'un appareil.

-l'erreur systématique, lorsque elle est due à un appareil déréglé ou réactif de mauvaise

4-4- But du contrôle de la qualité :

Le contrôle de qualité consiste à déceler les erreurs dépassant les limites jugées raisonnables, de manière à en corriger les causes ou à les prévenir. En général dans tout laboratoire de biologie, le contrôle de vérifier le fonctionnement des appareils, la manipulation ainsi que la précision et l'exactitude d'une technique (Vadeville, 1983).

Le contrôle effectué à des points clés (points critiques) évite d'engager inopportunément des frais coûteux dans la suite des opérations. Le contrôle final détermine la conformité du produit aux objectifs et le contrôle de la conformité ont pour finalité de confirmer que le produit fabriqué localement ou importé répond aux normes homologuées et /ou aux spécifications légales et réglementaires qui le concernent, et en particulier aux prescriptions de l'article 3 de la loi n° 89 - 09 du 07 février 1989 (analyses de qualité, contrôle de conformité) : Décret exécutif n° 92 - 65 du 12 février 1992 relatif au contrôle de la conformité des produits fabriqués localement ou importés (Anonyme, 1997).

4-5- Contrôle de qualité d'un médicament :

L'OMS s'occupe non seulement des aspects pharmaceutiques de la qualité des médicaments mais encore de l'innocuité et de l'efficacité intrinsèque de leurs principes actifs (Anonyme, 1998).

4-5-1- Physico-chimique :

Il aura pour rôle de vérifier la structure de la molécule et d'établir les propriétés physiques et chimiques. Il a pour but ainsi de vérifier de la substance annoncée (analyses qualitatives, réaction d'identification les plus sélectives possibles) et s'assurer de son bon usage (Albert et al, 1974).

4-5-2- Microbiologique :

Les contrôles microbiologiques doivent permettre de garantir une bonne qualité hygiénique et marchande du produit fabriqué, et minimisent les pertes dues aux mauvaises conditions de fabrication (Scriban, 1999).

4-5-3- Toxicologique :

Les molécules destinées à la thérapeutique humaine doivent subir avant tout essai clinique des tests de toxicité aiguë et chronique sur les animaux (Schorderet, 1989).

Les études toxicologiques permettent d'éliminer de très nombreuses molécules dont les risques outrepassent les avantages (Marcel et Garnier, 1987).

5- Anti-inflammatoires :

Ce sont des médicaments qui peuvent réduire la douleur, l'inflammation, et dans certains cas, la fièvre. Une inflammation est une rougeur, une sensation de chaleur, une enflure et un afflux de sang accru qui se produisent en raison d'une infection, d'une maladie ou d'une blessure. Il existe deux principaux types d'anti-inflammatoires : Les stéroïdiens AIS et les non stéroïdiens AINS (Garnier et al, 1995).

5-1- 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 (Gazengel et Orecchioni, 1999).

5-2- Mécanisme d'action :

Leur mécanisme d'action est commun à tous : Ils inhibent la cyclo-oxygénase (Ganzel et Orecchioni, 1999).

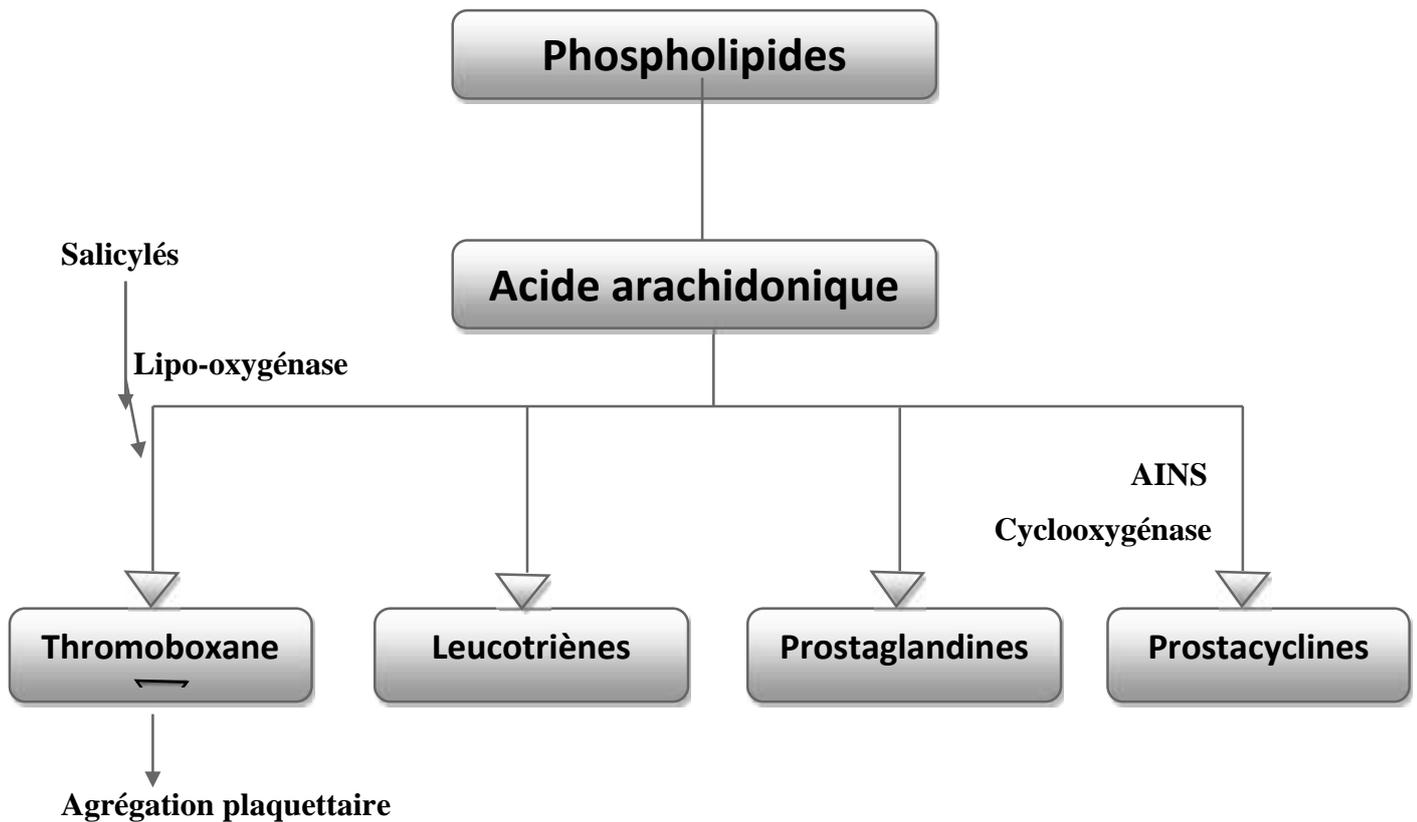


Figure 2 : Mécanisme d'action des anti-inflammatoires
(Gazengel et Orecchioni, 1999).

5-3- Anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) :

Les AINS sont parmi les médicaments les plus fréquemment prescrits dans le monde (4.5% de la consommation médicamenteuse des pays industrialisés) Prescriptions auxquelles vient s'ajouter l'automédication (Anonyme, 2000).

Les AINS forment un groupe de médicaments destinés à traiter la réaction inflammatoire et les maladies rhumatismales. Tous les AINS possèdent à des degrés divers les propriétés anti-inflammatoires ; analgésiques et antipyrétiques quelle que soit la voie d'administration.

Ils s'agissent sur la phase vasculaire de l'inflammation. Ils réduisent la vasodilatation, la perméabilité capillaire mais aussi la migration des leucocytes et perturbent les réactions énergétiques nécessaires au processus inflammatoire (Charpentier et al, 2004).

Ils comprennent les pyrazolés et les salicylés qui vont avoir une action sur la phase initiale de l'inflammation et l'indométacine (Cohen, 1997).

Les AINS bloquent la biosynthèse des prostaglandines par inhibition de l'enzyme cyclooxygénase (Schorderet, 1989).

Le blocage de cette voie du métabolisme de l'acide aminé favoriserait en contrepartie la voie de la lipooxygénase et la synthèse des leucotriènes (Mamas, 1997).

Les AINS sont utilisés que lorsque la réaction inflammatoire devient chronique (la fièvre...), exagérée ou associée à des phénomènes immuno- logiques (Elghozi et Duval, 1989).

5-3-1- Classification :

Plusieurs classifications sont proposées, basées soit sur la structure des AINS, soit sur leur puissance, soit encore sur leur modalités d'action et/ ou sur leurs sélectivités anti-cyclooxygénases. Les classifications basées sur la structure n'ont qu'un intérêt relatif pour la pratique préopératoire, dans la mesure où peu d'AINS sont employés, essentiellement par voie parentérale.

Quatre grands groupes sont décrits :

- _ Les oxicams (Tenoxicam, Piroxicam).
- _ Les pyrazolés.
- _ Les dérivés de l'acide carboxylique qui comprennent : Les salicylés (aspirine), les propioniques (Ibuprofène, Kétotifène...), les anthraniliques (acide nifuniqué).
- _ Les dérivés de l'acide acétique qui regroupent les pyrrolacétique (kétorolac) les indolacétiques (indométhacine) et les phénylacétiques (diclofenac) (Anonyme, 2000).

5-3-2- Clofenal (Diclofenac) 75mg/3ml ; solution injectable :

Est un dérivé phénylacétique (Giroud et al, 1988), approuvé pour plusieurs usages à travers le monde (Tillement et al, 1998).

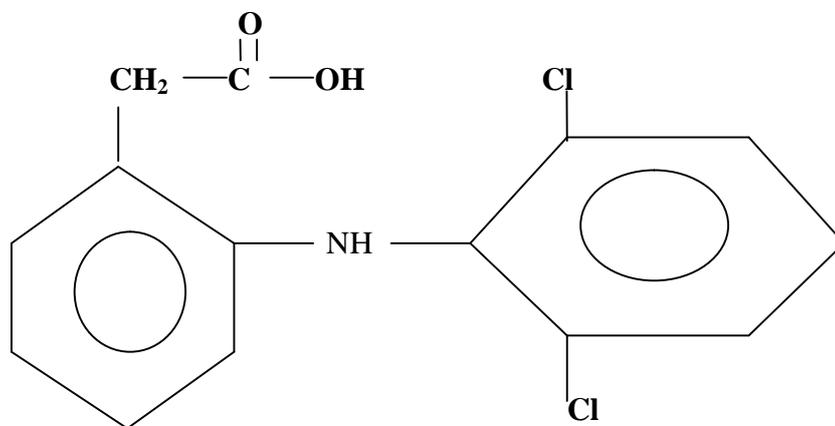


Figure 3 : Structure Chimique
Formule du Clofenal ou Diclofenac (Schorderet, 1989).

Le Diclofenac est commercialisé sous différentes formes et appellations.

Tableau 1 : Différentes formes de diclofenac (Doroz, 2005).

FORME		POSOLOGIE
Diclofenac ; Voltarène ; Voldal ; Xenid	30 cp .25 mg ou 50 mg	-Adultes (A) 75mg/jour. (En 2 à 3 prises aux repas). -Enfants (E) : >170kg (cp à 25 mg). 2 à 3 mg/ kg/ jour. En 2 à 3 prises aux repas.
Voltarène LP 75mg	30cp.100 mg à libération prolongée	A : 75 à 150 mg/ jour. En 1 prise aux repas.
Voltarène LP 100mg	15cp. 100 mg à libération prolongée	A : 100mg/ jour. En 1 prise aux repas.
-Diclofenac 100mg suppos -Voltarène 100mg suppos -Voldal 100mg suppos -Xenid 100mg suppos	10 sup.100 mg pour adultes	A: 100mg/ jour. Le soir
-Diclofenac 25 mg suppos -Voltarène 25 mg suppos -Voldal 25 mg suppos	10 sup. 25 mg pour enfants	E :>17 kg 2 à 3 mg/kg/jour En 2 à 3 fois
-Flector 50mg -Diclofenac épolamine	21 sac. 50 mg à action rapide	A : 150mg/jour En 3 prises aux repas
-Diclofenac injectable -Voltarène injectable -Voldal injectable	2 amp. 3 ml = 75mg Contenant des sulfites	Par voie IM stricte A : 1 amp/ jour pendant 2 jour au maximum.

5-3-3- Solutions ou préparations injectables :

Il existe plusieurs voies d'administration des médicaments tels que la voie orale, parentérale,..... (Fouteneau et al. 1999).

Les préparations parentérales sont des préparations stériles destinées à être injectées, perfusées ou implantées dans le corps humain. (Gouraud, 2012).

➤ **Préparation injectable :**

Ce sont des solutions, émulsions, ou dispersions de principes actifs dans l'eau ou un liquide non aqueux ou un mélange des deux (le Hir, 1991).

➤ **Propriétés des préparations injectables :**

Les préparations injectables doivent répondre à un certain nombre d'exigences (Le Hir, 2000).

Les principaux contrôles concernent : La stérilité (absence de germe), l'apyrogénicité (Absence de pyrogènes = toxines), la neutralité (pH le plus proche du pH sanguin), l'isotonicité (même pression osmotique/plasma), la limpidité (absence de particules en suspension « solutions seulement ») (Gouraud, 2012).

➤ **Avantages et limites de la voie injectable :**

Avantages :

- Action rapide du PA/ forme orale (urgence)
- Traitement patient inconscient, coma
- Biodisponibilité optimale.
- Pas de destructions du PA par sucs digestifs (Gouraud, 2012).
- Absorption totale.
- Pas d'action néfaste des principes actifs sur l'appareil digestif
- (Fouteneau et al, 1999).

Limites :

- Douleur à l'injection
- Risque infectieux
- Coût élevé (exp paracétamol 500 mg cp: 1,68€ Perfalgan 40€)
- Peu adapté à traitement ambulatoire
- Nécessite de varier les points d'injection.
- Le matériel utilisé (seringue) doit être stérile
- Le malade ne peut que rarement pratiquer lui-même les injections (Bourin et Jolliet, 1999).

5-3-4- Inflammation :

Une inflammation est une réaction de défense immunitaire du corps à une agression : infection, brûlure, allergie, etc. L'inflammation chronique est désormais reconnue comme une réponse à de nombreuses transformations de l'environnement et du comportement modernes (sédentarité, malbouffe, pollution, altérations du microbiote humain) et un facteur important dans le développement de maladies de civilisation telles que la résistance à l'insuline, l'obésité, les maladies cardiovasculaires, les maladies immunitaires, et même les troubles de l'humeur et du comportement (Prescott, 2013).

De nombreux médiateurs de nature très variée (produit provenant de l'activation du complément, l'histamine, cytokines d'origine monomacrophagique) interviennent dans la réaction inflammatoire (Gazengel et Orecchioni, 1999). Les signes cliniques de l'inflammation dépendent du type de l'inflammation rougeur, œdème, chaleur, et douleur (Anonyme, 1996).

Rôle de l'inflammation :

❖ Son rôle bénéfique est du au fait que la réaction inflammatoire agit comme un signal d'alerte permettant à l'organisme de mobiliser très rapidement les cellules phagocytaires.

Elles détruisent rapidement les bactéries éventuellement présentes au niveau de la lésion et empêchent ainsi leur dissémination et l'extension de l'infection. Elles éliminent également les cellules lésées et préparent le processus de cicatrisation.

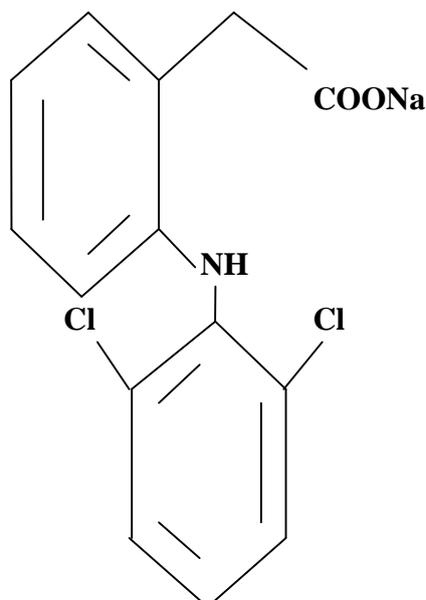
❖ Son rôle néfaste se traduit par une destruction tissulaire locale.

L'expulsion dans le milieu extracellulaire du contenu très acide et riche en enzyme des vacuoles de digestion entraîne la destruction des phagocytes eux même, et environnantes avec formation de « pus » et d'une lésion tissulaire importante, pouvant aller jusqu'à la nécrose. (Gazengel et Orecchioni, 1999).

5-4- Composition du Diclofenac :**✓ Principe actif :**

Diclofenac sodique (75mg) « Diclofenacum-natricum »

Structure chimique :



Mr=318.1

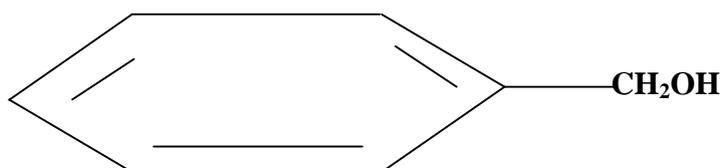
Caractères : Poudre cristalline, blanche à faiblement jaunâtre, faiblement hygroscopique, assez soluble dans l'eau, facilement soluble dans le méthanol, soluble dans l'alcool, peu soluble dans l'acétone, pratiquement insoluble dans l'éther et il fond en se décomposant vers 280°C.

✓ **Excipients :**

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

→ **L'alcool benzylique : « Alcool benzylicus »**

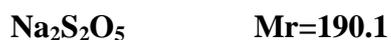
Structure chimique :



Mr=108.1

Caractères : 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.

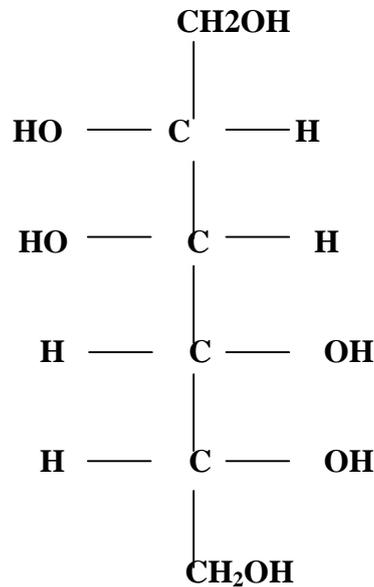
→ **Metabisulfite de sodium :**



Caractères : Poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche ou cristaux incolores, facilement solubles dans l'eau, peu solubles dans l'alcool.

→ **Mannitol : « monnitolum »**

Structure chimique :



$\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_6$

$\text{Mr}=182.2$

Caractères : Poudre cristalline blanche, facilement soluble dans l'eau, très peu soluble dans l'alcool, pratiquement insoluble dans l'éther (Anonyme, 1997).

→ **Propylène glycol :**

Structure chimique :



$\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_2$

$\text{Mr}=76.1$

Le propylène glycol est le (RS) — propane — 1.2-diol.

Caractères : 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) (Le Hir, 2000).

→ **Hydroxyde de sodium : « Natrii hydroxymum »**

NaOH

$\text{Mr}=40.00$

Caractères : 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.

→ **Eau pour préparation injectable « EPPI »**

H₂O **Mr=18.02**

Caractères : Elle est destinée à la préparation de médicament administrés par voie parentérale, dont le véhicule est aqueux (EPPI en vrac), à la dissolution ou à la dilution des substances ou préparations parentérales ou moment de l'emploi (Anonyme, 1997).

5-5- Procédure de fabrication de clofenal (75mg/3ml) :

« Solution injectable » :

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).

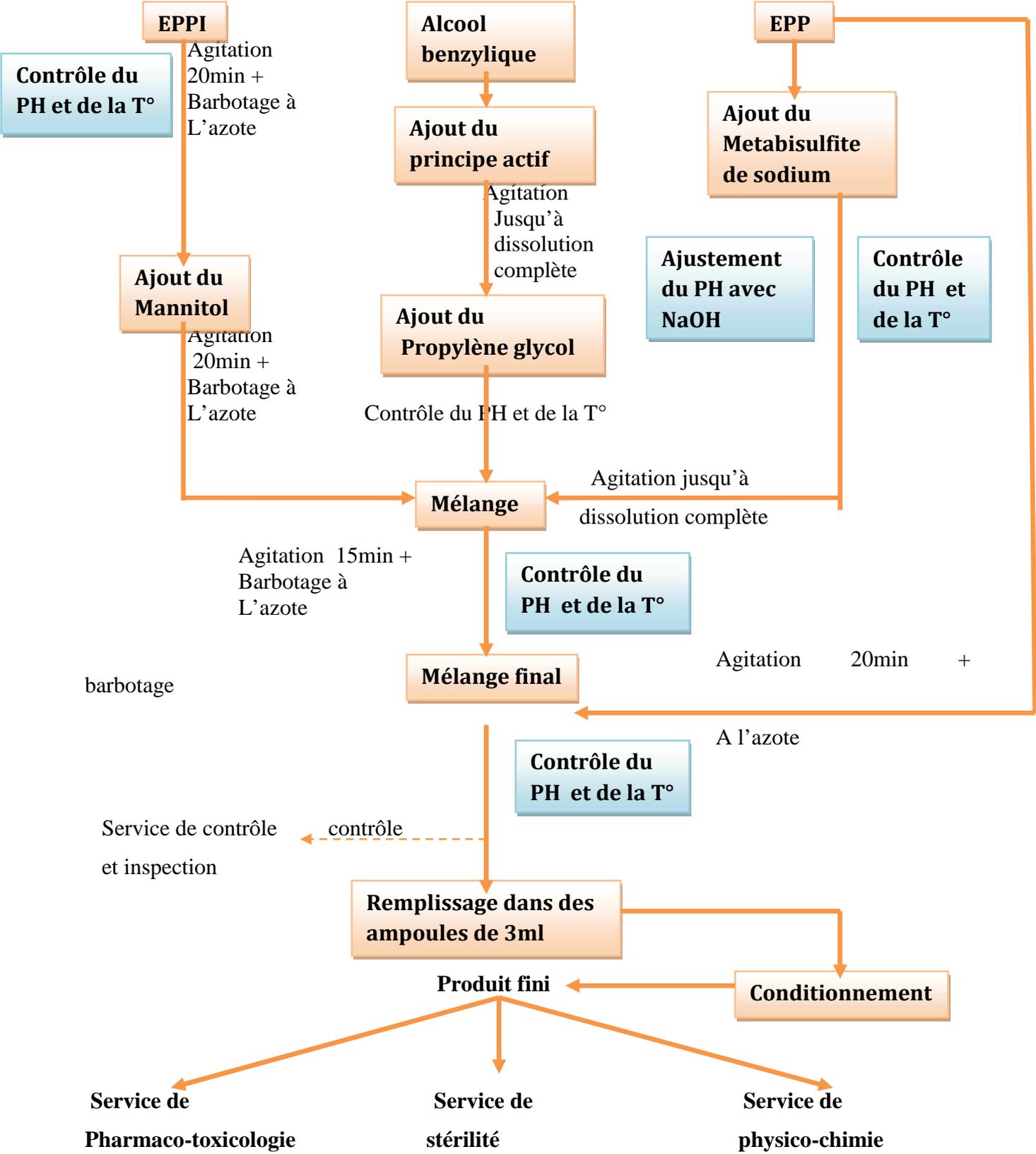


Schéma 1 : Les différentes étapes de production du Clofenal (75mg/3ml) « Solution injectable ».

5-5-1- Contrôle du Clofenal :

✓ 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 à la longueur d'onde $\lambda = 275\text{nm}$ (Anonyme).
- 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 vigueur.
- 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.

✓ Stérilité :

Les préparations pharmaceutiques ne sont de qualité que, s'ils sont conformes aux normes microbiologiques (pharmacopée européenne, 1997).

Le contrôle microbiologique du Clofenal comme toutes les solutions injectables nécessite un test de stérilité qui a pour but de vérifier l'absence de contamination bactérienne et/ou fongique dans les préparations obligatoirement stériles (Anonyme, 1997).

✓ Toxicologique :

- Détermination de la DL_{50} : c'est la dose létale pour 50% des animaux.
- La recherche des endotoxines : qui est effectuée par l'essai Lysat d'amœbocytes de limule (LAL) ou appelé encore méthode de gel point final.

5-5-2- Contrôle du Diclofenac sodique :

✓ Physico-chimique : voir 5-4.

✓ La solubilité :

Le Diclofenac sodique est assez soluble dans l'eau, facilement soluble dans le méthanol, soluble dans l'alcool, peu soluble dans l'acétone et pratiquement insoluble dans l'éther. Le volume du solvant à prendre est décrit dans le tableau 2.

Tableau 2 : L'échelle exprimant la solubilité d'une substance (Anonyme, 1997).

Termes descriptifs	Volumes approximatifs de solvant en ml/g de substance
- Très soluble	< 1
- Facilement soluble	De 1 à 10
- Soluble	De 10 à 30
- Assez soluble	De 30 à 100
- Peu soluble	De 100 à 1000
- Très peu soluble	De 1000 à 10000
- Pratiquement insoluble	>10000

- ✓ Identification D ;
- ✓ Point de fusion ;
- ✓ Identification par spectrophotomètre U.V ;
- ✓ La recherche des métaux lourds ;
- ✓ Perte à la dessiccation ;
- ✓ Dosage (Titrimétrie).

Partie pratique

I-Matériel et Méthode :

Notre étude a été réalisée à l'unité ANTIBIOTICAL de SAIDAL (Médéa), entre le mois de mars et avril 2015.

Cette unité fabrique et contrôle environ 71 produits pharmaceutiques sous différentes formes, telles que :gélules, comprimés ,sirops, solutions et suspension buvables, poudre pour solutions injectables, pommades dermiques et ophtalmique et les solutions injectables.

Pour ces derniers, on a effectué le contrôle du clofenal qui est l'un des 15nouveauxproduits de l'unitéANTIBIOTICAL.Le matériel utilisé pour notre étude est un matériel de routine, qu'on rencontre dans tous les laboratoires de biologie(balance ,centrifugeuse ,etc...) ainsi que tous les méthodes utilisées sont décrites dans la Pharmacopée Européenne 1997.

1-Echantillonnage :

1-1-Matière première (le principe actif) :

Notre étude a porté sur une seule production de Diclofenac sodique, où on a prélevé les échantillons à partir d'un seul lot, A l'aide d'une sonde métallique de 30 cm, on fait notre prélèvement de principe actif (Diclofenac sodique) d'une manière aléatoire dans différents points à partir des sachets en double emballage de papier aluminium contenant 5kg. Ces Sachets sont présentés dans un fût en carton solide de 25kg. On rassemble les différentes prélèvement dans des flacons en verre de 100ml et on met dans chacun environ 10g.on remplit 20 flacons de poudre de Diclofenac sodique, puis on les étiquette. Ces flacons sont acheminés vers le service de contrôle physico-chimique seulement. L'échantillonnage se fait au niveau du service contrôle et inspection

1-2-Mélange final :

Après l'agitation du mélange final dans le réacteur et filtration ,on ouvre le robinet de purge du réacteur et on laisse le mélange final couler jusqu'au remplissage d'un flacon de 100ml. Puis, on ferme ce flacon avec bouchon en caoutchouc et on note sur l'étiquette :le Nom du mélange finale,le N° du lot et la date du prélèvement.

1-3 Produit fini (clofenal) :

Les prélèvements ont été effectués à partir de deux lots :

N°004/1 et 004/2.

On a prélevé 100 ampoules de clofenal au cours de la chaîne 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 vers le service contrôle et inspection et réparties comme suit : 20 ampoules au service de contrôle physico-chimique.

20 ampoules au service de stérilité.

20 ampoules restent dans le service de contrôle et inspection.

20 ampoules au service de pharmacotoxicologie.

20 au service de l'échantillonnage. (c'est un service où l'on stocke toutes les espèces de produits pharmaceutiques fabriqués à SAIDAL).

2- Contrôles physico-chimiques :

2-1-Principe actif (Diclofenac sodique) :

2-1-1-Aspect :

L'aspect de la poudre de Diclofenac sodique est estimé visuellement.

2-1-2-Solubilité :

○ Principe :

La solubilité est la capacité d'une substance à être en solution et être dissoute pour obtenir un liquide homogène (Anonyme, 2005).

○ Mode opératoire :

A l'aide d'une balance de précision (SARTORIUS), on pèse des quantités différentes de Diclofenac sodique et on met dans :-Le tube 1 : 100mg de principe actif dans 10ml d'eau distillé.-Le tube 2 : 1g de principe actif dans 10 ml de Méthanol.

-Le tube 3 : 100mg de principe actif dans 3 ml d'alcool.

- Le tube 4 : 10mg de principe actif dans 10 ml d'acétone. On agite les 4 tubes pendant 2 à 3 minutes.

2-1-3-Identification D :

○ Principe :

L'identification D est une étape importante ,qui consiste à analyser le principe actif par la réaction (b) de sodium (virage de la couleur bleue de la flamme du bec bunsen au jaune)

○ Mode opératoire :

Dans un tube, on met 60 mg de Diclofenac sodique et 0.5 ml de méthanol. on mélange la solution obtenue et on introduit une anse en platine dans le tube puis on la met sur la flamme bleu du Bec Bunsen.si cette dernière vire au jaune cela veut dire que la poudre de Diclofenac sodiquecontient du sodium(Na).

2-1-4-Point de fusion :

○ Principe :

Les substances pures ont des points de fusion dont on peut déterminer les valeurs avec une exactitude (± 0.012).des petites quantités d'impuretés dans la substance diminuent considérablement son point de fusion :on constate alors un intervalle de fusion encore plus grand (>1 °C) (Baghdadi et khitous,2005).

Le point de fusion consiste à dissoudre de Diclofenac sodique dans un fusiomètre à une température d'environ 280 °C.

○ Mode opératoire :

Dans le flacon contenant la poudre de Diclofenac sodique, on laisse tomber le tube capillaire à point de fusion pour le remplissage jusqu'à environ 4mm de sa hauteur, puis ,on introduit ce tube dans le fusiomètre (culatti) .On chauffe ce fusiomètre jusqu'à 10 °C au dessus de la température de fusion attendue, puis on augmente la T° de 1-2 °C pour assurer son bon équilibre. On détermine la T° à la quelle le Diclofenac sodique passe de l'état solide à l'état liquide c'est -à-dire la T° de début de fusion.

2-1-5-Métaux lourds :○ **Principe :**

Les métaux lourds sont ceux qui précipitent à $\text{pH}=3.5$ sous forme de sulfures colorés par l'action des ions sulfures ou des réactifs capable de les engendrer (Thio acétamide hydrolysé en milieu alcalin). la concentration des métaux lourds doit être 10 ppm.

○ **Mode opératoire :**

Dans un creuset, on met 2,0g de Diclofenac sodique et on effectue une calcination jusqu'à la disparition totale de la poudre de Diclofenac sodique. On rince le creuset avec un certain volume d'eau distillée et on met dans un tube à essai, puis on complète ce volume à 12ml avec l'eau distillée, et on ajoute :

-2ml d'une solution tampon acétate de $\text{pH}=3,5$

-1,2 ml de réactif 1. ce réactif doit être récemment préparé et chauffé au bain marie pendant 2 minutes. Ce tube est nommé : échantillon. Tube témoin :2ml de solution de plomb (pb) à 10 ppm sont mis dans un tube à essai. on ajoute : 12 ml d'eau de réactif et 2 ml de solution tampon acétate. on agite ces 2 tubes à l'agitateur (VORTEX) pendant 2 minutes, et on fait leur comparaison visuellement.

2-1-6-Identification par spectrophotomètre U.V :○ **Principe :**

La solution (Diclofenac sodique + Méthanol) est limpide, son absorbance mesurée dans l'U.V à 440 nm n'est pas supérieure à 0.05.

○ **Mode opératoire :**

Dans un tube à essai, on introduit 1,25 g de Diclofenac sodique ,on ajoute un volume de méthanol pour dissoudre la poudre et on complète le volume à 25 ml avec le même solvant. on introduit une cuve contenant le blanc (méthanol) dans un spectrophotomètre U.V (PERKIN ELMER) et dans l'autre cuve l'eau distillée. On détermine l'absorbance à 440 nm, puis on retire la cuve de l'eau distillée, on jette cette eau et on la remplit de la solution échantillon ,puis on détermine son absorbance à 440nm.

2-1-7-Perte à la dessiccation :○ **Principe :**

Cet essai permet de déterminer la proportion de tous les produits volatils susceptibles d'être éliminés dans des conditions spécifiques :

- ✓ Eau (le plus souvent) ;
- ✓ Eau humidité de proportion variables,
- ✓ Eau d'hydratation,
- ✓ Des solvants organiques.
- ✓ La limite d'acceptation de la perte à la dessiccation est 0.5 %.

○ **Mode opératoire :**

On pèse 1g de Diclofenac sodique dans un verre à montre, qu'on met dans un dessiccateur.

On sort le verre à montre et on le pose dans l'étuve réglée à 105°C pendant 3h. Après, on le récupère dans le dessiccateur et on effectue la pesée.

La perte à la dessiccation est calculée selon la formule suivante :

$$PP = \frac{V_v - V_a}{p} \times 100$$

PP : Pertes à la dessiccation (en %).

V_v : Poids du verre à montre + échantillon avant dessiccation (en g).

V_a : Poids du verre à montre + échantillon après dessiccation (en g).

P : La pesée de Diclofenac sodique avant dessiccation (en g).

2-1-8-Dosage potentiométrique (Titrimétrie) :○ **Principe :**

La mesure des potentiels au cours d'une réaction permet de doser les solutions, on peut également calculer la concentration des espèces.

○ **Mode opératoire :**

On pèse 0,250g de principe actif qu'on met dans un bécher puis on ajoute 30ml d'acide acétique glacial. On met ce bécher dans un potentiographe (Metrohm Herison E536) et on laisse sous agitation. Lorsqu'on observe que la poudre est complètement dissoute on appuie sur un bouton qui laisse couler l'acide perchlorique (0,1M) goutte à goutte.

A la première goutte de l'acide perchlorique, le potentiographe commence à tracer le graphe de tirage.

On détermine le point de tirage de Diclofenac sodique graphiquement à l'aide d'une règle de potentiographe à la fin du tirage. On calcule le titre selon la formule suivante :

$$\text{Titre (\%)} = \frac{D_v \cdot \text{Eq.G.F.} \cdot 100}{p}$$

Titre sur tel quel (Tstq) (sans base d'anhydre)

D_v : volume consommé – volume blanc (en ml)

Masse Molaire

Eq.G : équivalent gramme = $\frac{\text{Masse Molaire}}{\text{Nombre de mole}}$ × Normalité

Nombre de mole = 1

F = facteur de solution titrant $\text{HClO}_4 = 0,1 \text{ N} = 1,0047$.

P = la pesée de Diclofenac sodique. (en mg).

Titre sur base anhydre (Tsba) :

$$T_{sba} = T_{stq} \times \frac{100}{100 - \text{perte en poids}}$$

Perte en poids = perte à la dessiccation (en %)

Pour le Diclofenac sodique, la pharmacopée européenne 1997 demande le titre sur base anhydre.

2-2-Mélange final :

2-2-1-pH :

○ Principe :

Le pH d'une solution aqueuse est le cologarithme décimal de l'activité de la solution en ions hydronium. Sa détermination est effectuée par mesure de la différence de potentiel entre 2 électrodes judicieusement choisies plongent dans la solution à examiner (Gavrilovic,1996).

○ Mode opératoire :

On prend un certain volume du mélange finale et on introduit l'électrode pour déterminer directement le pH

2-2-2-Dosage au spectrophotomètre U.V :

Dosage du principe actif dans le mélange est comparé avec les normes en vigueur (Anonyme,1985).

○ Mode opératoire :

La solution standard est préparée comme suit :

120mg de Diclofenac sodique (standard de référence) sont mis dans une fiole jaugée et on ajoute 100ml d'eau distillée.

On met un barreau magnétique et on laisse la fiole sous agitation pendant quelques minutes. après, on prélève 1ml de cette solution qu'on met dans une fiole jaugée de 20ml et on complète le volume à 200ml avec NaOH (0,01N).on l'agite et on la nomme : standard.

La solution échantillon :

On prend 5 ml du mélange final et on les introduit dans une fiole, puis on complète avec 100 ml d'eau distillée. On agit et on prélève 1ml de cette solution qu'on met dans une fiole jaugée de 200ml avec une solution de NaOH(0,01N) et on agite aussi pendant quelques minutes. On note sur cette fiole : échantillon. On prend les 2 cuves pour spectrophotomètre. On remplit une avec du blanc NaOH (0,01N) et l'autre avec de l'eau distillée et on détermine l'absorbance du blanc à 275 nm. puis, on jette l'eau distillée de la cuve et on la remplace par la solution échantillon et on détermine l'absorbance du Diclofenac sodique dans le mélange. le titre est donnée par la formule :

$$\text{Titre (mg/3ml)} = \frac{DO_{\text{Ech}} \cdot P_{\text{STD}} \cdot P_i \cdot V_i}{DO_{\text{STD}} \cdot 5}$$

DO_{Ech} : absorbance de l'échantillon.

DO_{STD} : absorbance du standard.

P_{STD} : poids du standard.

P_i : puissance ou dureté ou titre ou potentiel.

V_i : volume total d'une ampoule du clofenal : 3ml. 5: 5ml volume d'échantillon équivalent à son poids.

2-3-Produit fini (Clofenal) :

2-3-1-Aspect :

L'aspect du clofenal est estimé par un simple contrôle visuel des ampoules et de leur contenu (clofenal).

2-3-2-Volume moyen :

On prend 10 ampoules de clofenal et à l'aide d'une seringue stérile, on transfère le contenu des ampoules dans un cylindre gradué, puis on détermine le volume moyen selon la formule suivante :

$$V_m = \frac{V_c}{n}$$

V_m : volume moyen (en ml)

V_c : volume contenu dans le cylindre (en ml).

n : nombre d'ampoule utilisée.

2-3-3-pH :

○ Principe :

Même principe que le mélange final. Dans un Becher on met un volume de 15 ml de clofenal, on plonge l'électrode et on lit la valeur du pH de ce produit.

2-3-4-Identification par spectrophotométrie :

120mg de Diclofenac sodique de référence (puissance 99,44%) sont mis dans une fiole jaugée. on ajoute d'eau distillée et on agit. puis, on prélève 1ml de cette solution qu'on met dans une autre fiole et on complète le volume à 20ml avec du NaOH (0,01 N) et on agite. On indique sur la fiole : standard .la concentration du standard est donnée par la formule suivante :

$$\text{Concentration STD (}\mu\text{g/ml)} = \frac{\text{Pesée STD (mg)}}{\text{Volume d'eau (ml)}} \times \frac{1}{\text{volume (NaOH)}}$$

On obtient une solution standard de concentration 6 μ g/ml.

Echantillon : on prend 5ml de Clofenal des ampoules et on opère de la même manière que pour le standard. La concentration de l'échantillon est donnée par la formule suivante :

Volume_{Ech} (equivalent à 120mg)	1
Concentration_{Ech} = X _____	
(µg/ml) Volume d'eau	volume (NaOH) à 0,01N

On obtient une solution de Clofenal d'échantillon 6µg/ml. dans deux cuves, on met dans l'une le standard et dans l'autre l'échantillon. on règle le spectrophotomètre U.V à chaque fois à une longueur d'onde =210, 220, 230, 240, 250, 260, 270 , 275, 280, 290, 300 et 310nm.

On détermine l'absorbance du standard et de l'échantillon, pour toutes ces longueurs d'onde, on trace ensuite les 2 graphes DO f().

2-3-5-Dosage par U.V :

Après l'identification des deux standard et de l'échantillon par spectro-photométrie, on prend l'absorbance maximale des solutions à la longueur d'onde de 275 nm. puis on calcule le titre du principe actif dans le même mélange :

DO_{Ech} P_{STD}

Titre (mg/3ml) = _____ **X** _____ **X Puissance_{STD}**

DO_{STD} V_{Ech}

DO_{Ech}: absorbance de l'échantillon.

DO_{STD} : absorbance du standard.

P_{STD} : poids du standard (mg).

V_{Ech} : volume de l'échantillon (ml).

Puissance_{STD} : puissance du standard.

3-Contrôle microbiologique :**Produit fini :****3-1-Préparation des souches :**

Nous avons effectué la réactivation des souches pures suivantes :

<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC	6538
<i>Candida albicans</i>	ATCC	2091
<i>Bacillus subtil us</i>	ATCC	6633
<i>Clostridiumsporogens</i>	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.

3-2-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 dilutionprécédente.

3-3-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 boîte de Petri (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

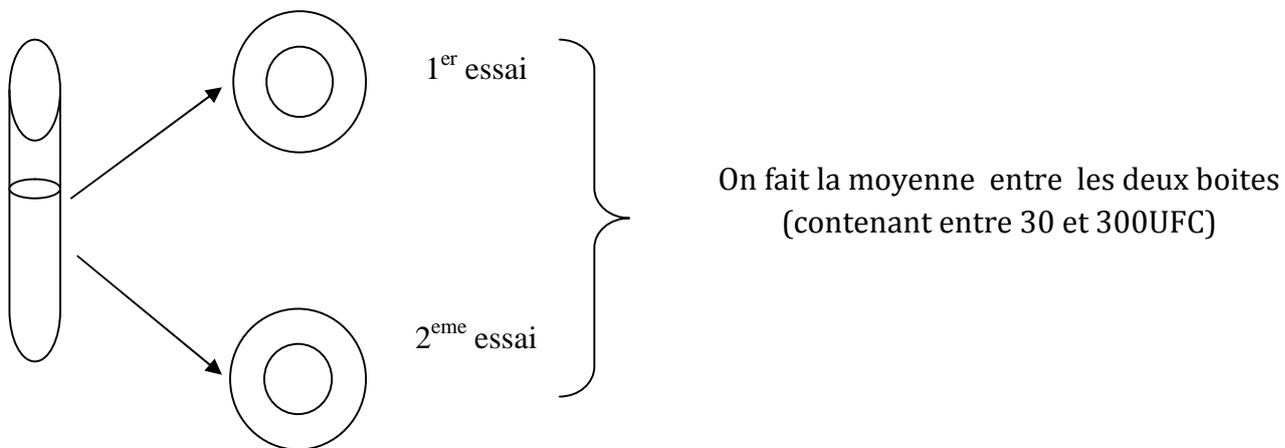
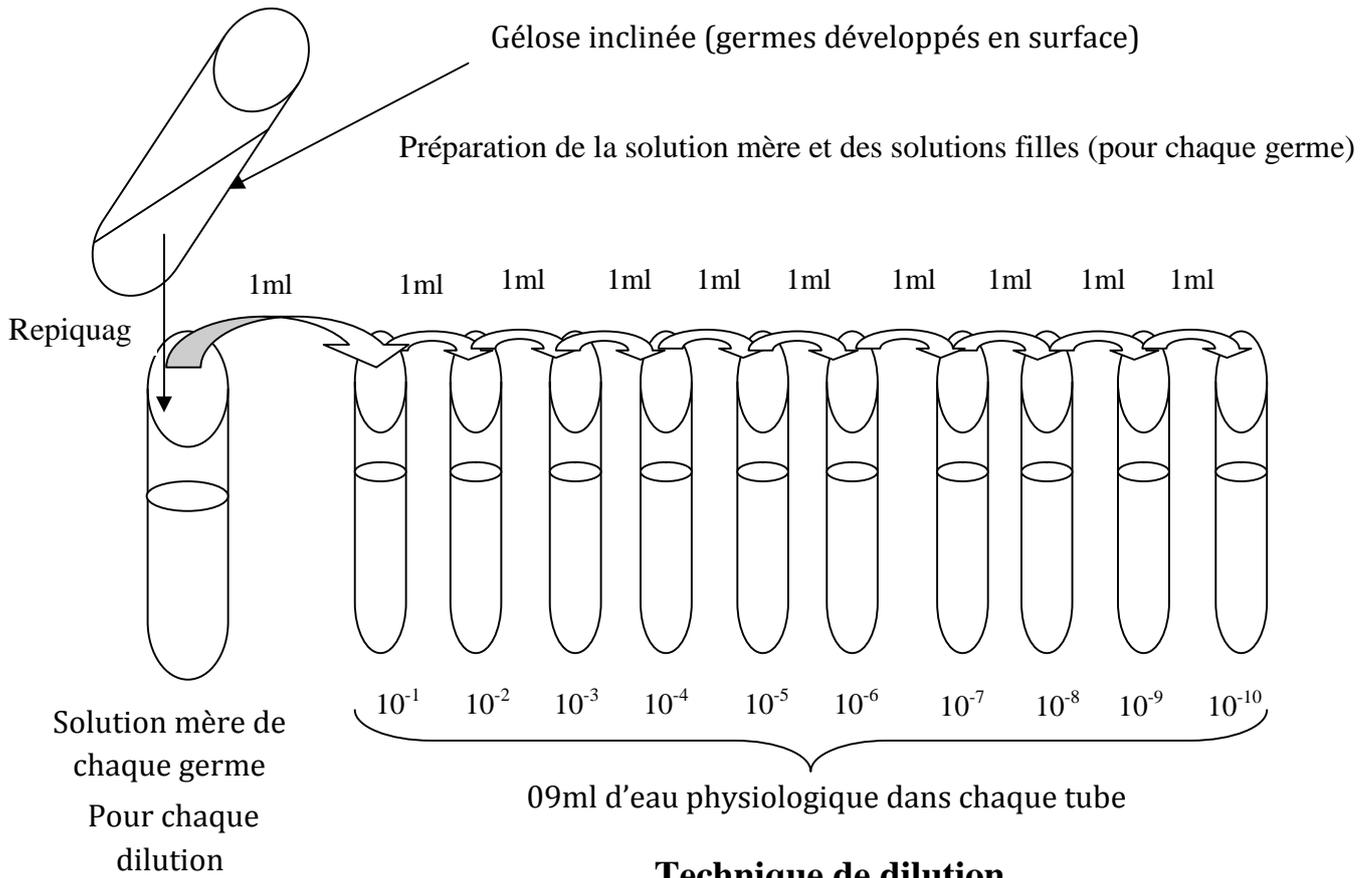
Sabouraud : pour *C. albicans*.

On mélange l'inoculum ,les boîtes 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 boîte. on laisse refroidir, puis on incube les boîtes en position inversée (le couvercle vers le bas). On incube les boîtes de petri

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.

3-4-Dénombrement :

On retire les boîtes de pétri de l'incubateur puis on sélectionne celles contenant 30 à 300 UFC (unité formant colonies). on dénombre les colonies en surface des boîtes. 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.



Méthode d'ensemencement des germes

Planche 4 : Technique de dilution et d'ensemencement des germes

(Bourdon et Marchal, 1973)

3-5-Etapes de contrôle :

3-5-1-Contrôle de stérilité des milieux de culture :

A fin de vérifier la stérilité des milieux de culture qui utilisés dans notre expérimentation, nous procédons à leur incubation pendant 7jours. Après 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.

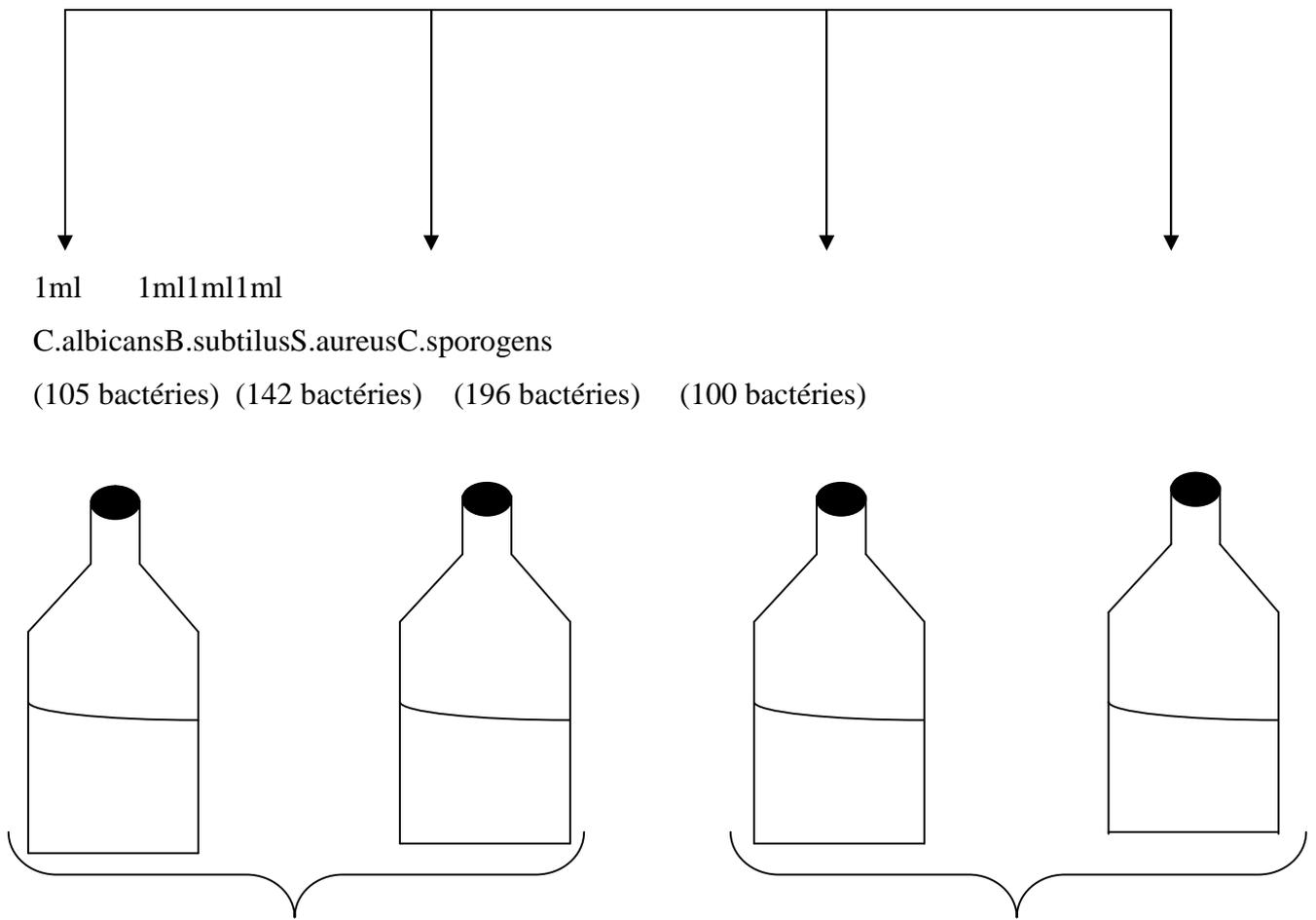
3-5-2-Contrôle de fertilité des milieux de culture :

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.leur incubations durent 07 jours .
On ensemence 1 ml de dilution différente en fonction des souches.

Tableau 3 : Contrôle de fertilité des milieux de culture :

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

Inoculum test



Incubation des deux flacons de soja incubation des deux flacons de

Trypticase à 25° C pendant 07 jours

Thioglycolate à 35° C pendant 07 jours

(Chaque flacon contient 100 ml de milieu de culture)

Figure 5 : Contrôle de fertilité des milieux de culture (Anonyme, 2001).

3-5-3-Teste de stérilité du Clofenal :

On a effectué l'essai de stérilité du Clofenal dans une chambre stérile 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. On allume la hotte, puis on place les dispositifs de filtration ou encore appelé steritest (contient un filtre d'une porosité 0,45 μ m) dans la pompe péristaltique. après, on casse l'ampoule à l'aide d'une lime (casse ampoule de la pompe péristaltique) puis on aspire le contenu par la pompe péristaltique qui va le faire passer à travers les filtres millipore (0,45 μ m) de l'unité steritest.

Ensuite, on rince les filtres avec un flacon de 400ml d'eau peptonée stérile 0,1% à l'aide de la pompe péristaltique. on place les bouchons en dessous de l'unité steritest (milieu trypticase soja dans un vase et le milieu Thioglycolate dans l'autre vase), puis on coupe les tubulures à l'aide d'un ciseau et on fixe ces tubulures dans les filtres event. En fin, on 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 aéro-anaérobies facultatifs.

Lecture :

Au 14^{eme} 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'ya 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 utilisés 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.

3-5-4-Test de fertilité du Clofenal (challenge test) :

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

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

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

4-Contrôle toxicologique :

On a effectué 2 tests pour le Clofenal : **4-1-Détermination de la DL₅₀ :**

On a déterminé la dose létale (DL₅₀) du Clofenal qui est mortelle pour 50% des animaux d'expérience.

On a utilisé des souris blanches Albinos, Race Swiss (NMRI), de poids variant entre 19-21g, d'origine d'élevage (complexe ANTIBIOTICAL de Médéa), du sexe male et femelle.

La température ambiante de l'animalerie est 21-22°C. Le régime alimentaire : les souris sont nourries avec un composant constitué de : Blé, Mais, Mélasse, son de blé, tourteau de soja dépelliculé de coprah et composé minéral vitaminé (Anonyme, 1983).

On a travaillé sur 60 souris, réparties en 12 lots de 5 par cage. on utilise la voie intraveineuse dans la queue pour injecter à chacune 0,5 ml de produit.

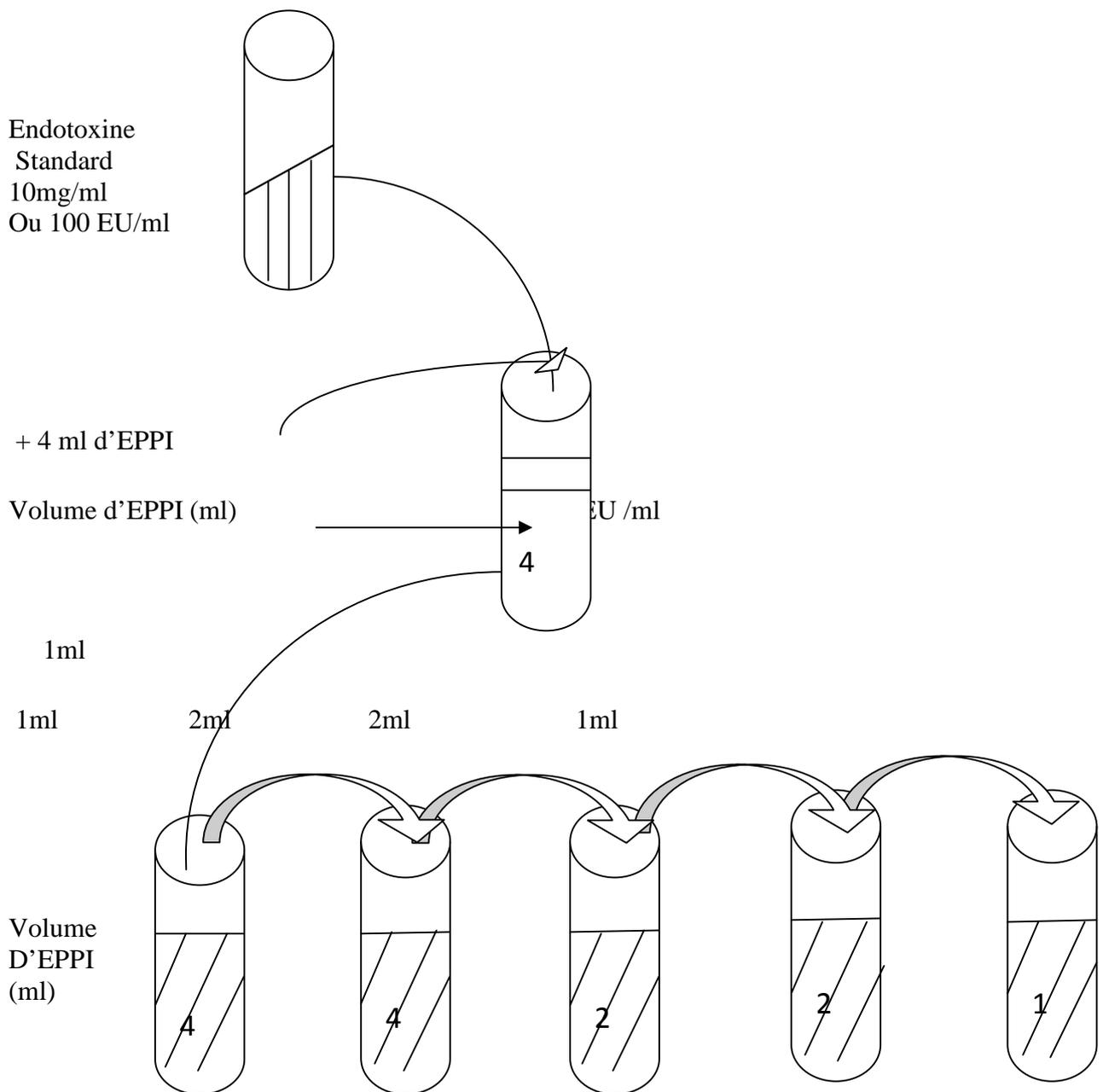
On prépare une gamme de différentes doses : 0,5 ; 1,0 ; 1,25 ; 1,5 ; 1,75 ; 2,00 ; 2,25 ; 2,5 ; 2,75 ; 3,00 ; 3,25 ; 3 et 3,5 mg/ml dans des fioles jaugées en présence du témoin. Les 5 souris de chaque cage reçoivent la même dose, donc 1 dose / 5 souris (même cage) × 12 doses. Les souris sont mise en observation pendant 24-48h dans les conditions habituelles.

4-2-Recherche des Endotoxines :

La recherche des Endotoxines est effectuée par l'essai lysat d'amœbocytes de limule (LAL) ou appelé encore méthode de gel point final. Une certaine quantité d'endotoxines est nécessaire pour activer l'enzyme gélifiante et former un gel (0,125 EU/ml). Le LAL permet de détecter les Endotoxines de bactéries Gram(-).

- Dilution d'Endotoxines :

Dans un flacon Endotoxines standard, il y a 10mg/ml et chaque mg est équivalent à 100 EU. on prépare 5 tubes numérotés de 1 à 5 pour effectuer des dilutions jusqu'à 0,125 EU/ml



EU/ml	5	1	0,5	0,25	0,125
-------	---	---	-----	------	-------

Figure 6 : Dilution des Endotoxines

- **Préparation du témoin :**

Dans un tube à hémolyse, on mélange 1ml du réactif LAL(0.125 EU /ml)avec 1ml du contenu du tube N° :5(0,125 EU /ml) de la dilution d'Endo- toxines standard. on a utilisé le même lot pour le réactif LAL et l' Endo- toxines standard (aex41892).

- **Préparation de l'échantillon :**

Dilution de Clofenal :

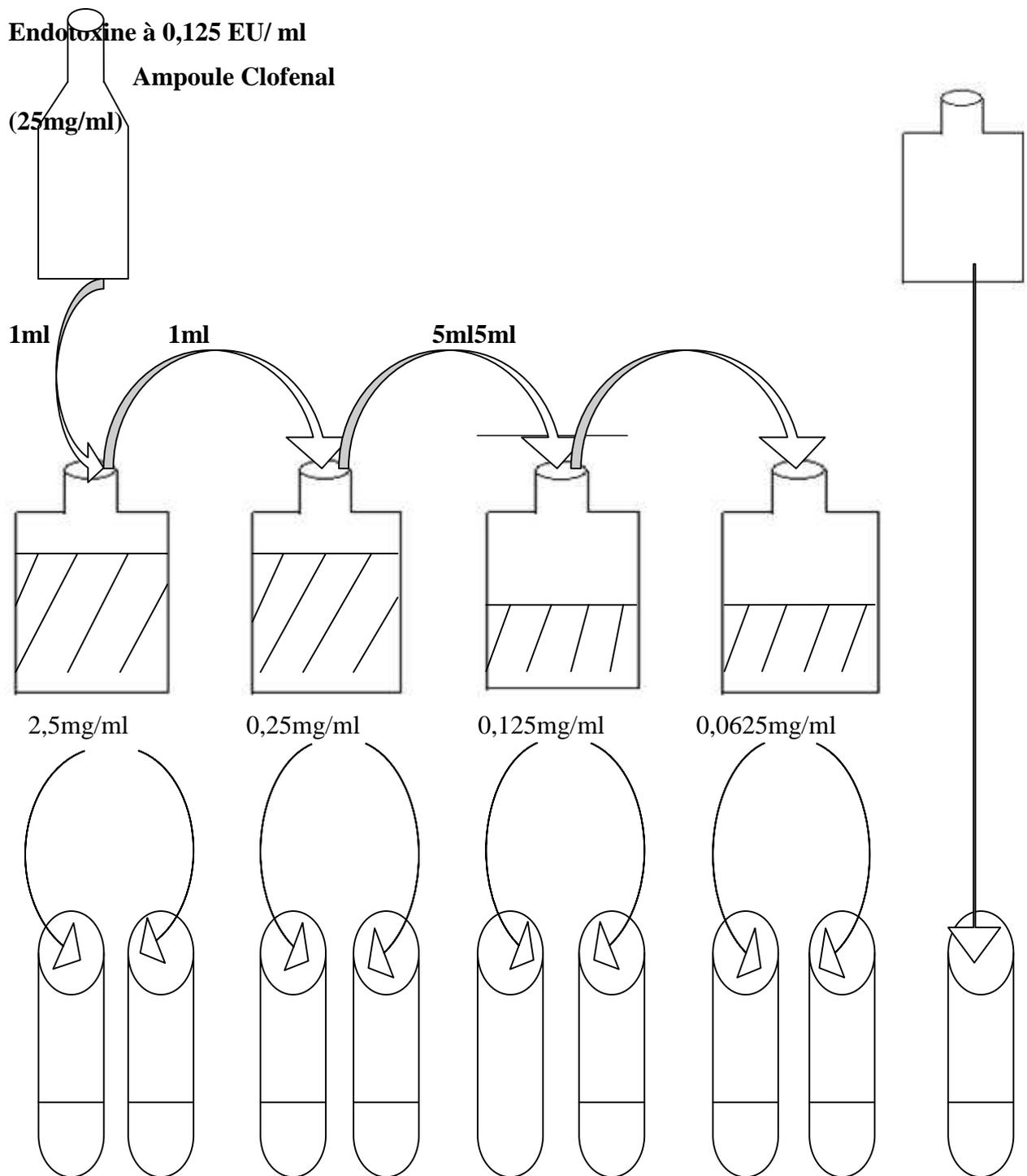
A partir d'une ampoule de Clofenal(25mg/ml)nous effectuons des dilutions comme l'indique la figure 07.on agit les 04 fioles à l'aide d'un agitateur (vortex) après on prépare les échantillons du Clofenal. on agite les 9 tubes à hémolyse à l'aide d'un agitateur vortex puis on les ferme avec du papier aluminium.

on met les tubes dans l'incubateur à 37°C pendant 1h.

Après une heure,on retire les tubes un par un,et on les incline pour observer s'il ya :

-Formation de gel —————→ résultat positif donc présence d'Endotoxines.

-Absence de gel (liquide)—————→ résultat négatif donc absence d'Endotoxines.



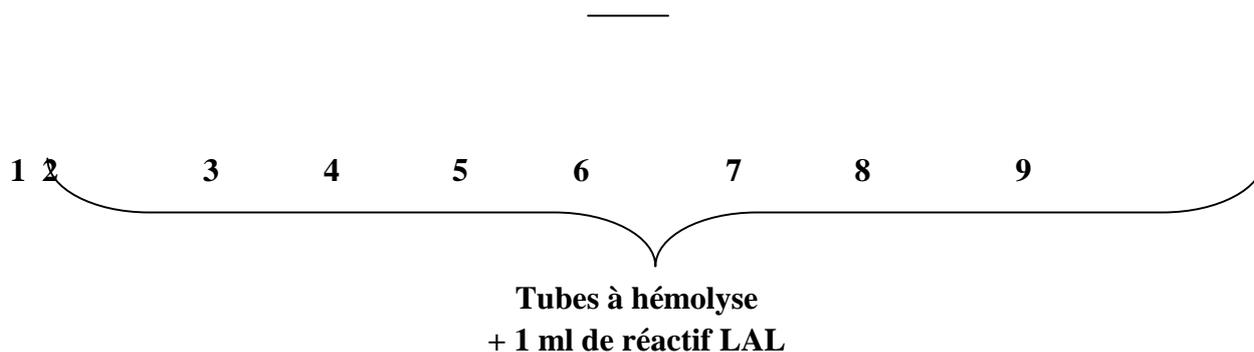


Figure 7 : Préparation et dilution des échantillons de Clofenal.

II-Résultats et discussion

1-Contrôles physico-chimiques :

La comparaison de tous nos résultats s'est faite avec la norme pharmacopée de 1997.

1-1-Principe actif :

1-1-1-Aspect :

L'observation visuelle de l'aspect de Diclofenac Sodique ,a montré que la poudre est cristalline blanche à faiblement jaunâtre.

Cela veut dire que notre principe actif est propre parce qu'il garde son aspect intact.

1-1-2- Solubilité:

Les résultats de test de solubilité sont comme suit dans :

- Eau : assez soluble.
- Méthanol : facilement soluble.
- Alcool : soluble.
- Acétone : peu soluble.

On peut dire que la solubilité de Diclofenac Sodique diffère d'un solvant à un autre car, lorsqu'on met ensemble un soluté et un solvant, un certain nombre de molécules du soluté sont attirées chacune par une molécule du solvant en fonction de leurs charges électriques, réalisant ainsi une dissolution jusqu'à la saturation. La quantité de soluté

dissout dépend de l'affinité de chaque solvant vis à vis du soluté :c'est pour cela, qu'un produit est plus soluble dans un solvant plutôt que dans un autre.

1-1-3-Identification D :

La couleur bleu de la flamme du bec Bunsen devient jaune. Ceci nous permet de dire que le principe actif contient du sodium, car cette couleur est caractéristique de la présence du sodium. En fournissant une énergie supplémentaire (sous forme de chaleur), on arrive à changer le niveau d'énergie des électrons, en modifiant leur position dans le nuage électronique. comme cette nouvelle position est instable, l'électron revient très vite à sa position initiale en restituant l'énergie absorbée sous forme d'émission lumineuse.

L'énergie émise du sodium correspond à la longueur d'onde de la lumière monochromatique jaune.

1-1-4-Point de fusion :

Le Diclofenac Sodique commence à se décomposer vers 279°C.

C'est la température à la quelle notre substance passe de l'état solide à l'états liquide (norme : $280 \pm 1^\circ\text{C}$).

1-1-5-Métaux lourds :

Notre solution est moins colorée que la solution témoin qui est 10 ppm (Norme).

Vue que cette couleur est moins intense que celle de la solution témoin, on peut conclure que le taux de métaux lourds du principe actif est 10 ppm.

1-1-6-Identification par spectrophotomètre U.V :

Tableau 4 : Test d'identification U.V à $\lambda = 440$ nm.

DO			Norme
Méthanol	Mélange	Principe actif	
0,09	0,018	0,009	0,05

On peut conclure que l'absorbance du Clofenal est nettement acceptable.

1-1-7-Perte à la Dessiccation :

Tableau 5 : Test de la perte à la dessiccation.

V_V (g)	V_A (g)	P(g)	PP(%)	Norme (%)
10,1417	10,1394	1,003	0,23	0,5

V_V = Poids du verre à montre+ échantillon avant dessiccation.

V_A = Poids du verre à montre+ échantillon après dessiccation.

P = Pesée de Diclofenac Sodique avant dessiccation.

PP =Perte de poids. On peut dire que la perte à la dessiccation du principe actif est acceptable, vu qu'elle est largement inférieure au pourcentage de perte recommandé.

1-1-8-Dosage Titrimétrique :

Tableau 6 : Test de dosage Titrimétrique :

D_V (ml)	Eq /g	F	P(mg)	PP(%)	T%	Norme (%)
7,85	31,81	1,0047	250,7	0,23	100,30	99-101

D_V : Volume consommé.

Eq: équivalent gramme.

F: Facteur de solution titrant. Pesée de Diclofenac Sodique.

P:Perte en poids.

T:Titre sur base anhydre.

Le résultat est de 100,3 % .il est conforme à la norme et acceptable. Ainsi on peut conclure que la poudre de Diclofenac Sodique est pure et de bonne qualité.

1-2-Mélange final :

1-2-1-pH :

Le pH du mélange est de 8,37 (norme : 8,0-9,0). Il se pourrait que ce pH basique intervient directement en neutralisant, du moins partiellement, l'acidité provoquée par l'inflammation elle-même.

1-2-2-Dosage Spectrophotométrique :

Tableau 7 : Dosage par Spectrophotométrie à $\lambda = 275$ nm.

DO					P _i	P _{STD}	Titre (mg/3ml)	Norme (mg/3ml)
Blanc	Mélange 01	Mélange 02	Ech	STD				
0,037	0,247	0,243	0,206	0,206	119,9	0,9949	71,57	67,5-82,5

P_i: Puissance ou dureté ou titre ou potentiel.

P_{STD}: Poids du standard.

Mélange 1 : Ech+ Blanc.

Mélange 2 : STD + Blanc.

Le titre du mélange final est dans la fourchette 67,5-82,5mg/3ml exigée par la norme.

Il est donc acceptable. On peut donc avancer que notre mélange final est préparé dans des conditions adéquates.

1-3-Produit fini :

1-3-1-Aspect :

L'observation visuelle des ampoules de Clofenal a montré que la solution est incolore, cela veut dire que la solution est propre.

1-3-2-Volume moyen :

Tableau 8 : Volume moyen du produit fini :

V _C (ml)	N	V _m (ml)
30,2	10	3,02

V_C = Volume contenu dans le cylindre.

N = Nombre des ampoules utilisées.

V_m = Volume moyen. Le volume moyen que peut contenir une ampoule de Clofenal est acceptable, vue que la norme est comprise entre 3,0 et 3,3 ml.

1-3-3-pH :

Le pH du produit fini est de 8,40. cette valeur est acceptable car, elle est en concordance avec la norme (8,0-9,0)

1-3-4-Identification par U.V :

Tableau 9 : Identification par U.V du STD et Ech

		(nm)											
		210	220	230	240	250	260	270	275	280	290	300	310
STD													
(DO)		0,588	0,418	0,241	0,147	0,121	0,163	0,206	0,213	0,203	0,150	0,081	0,030
Ech													
(DO)		1,130	0,481	0,243	0,145	0,125	0,170	0,201	0,207	0,198	0,144	0,074	0,024

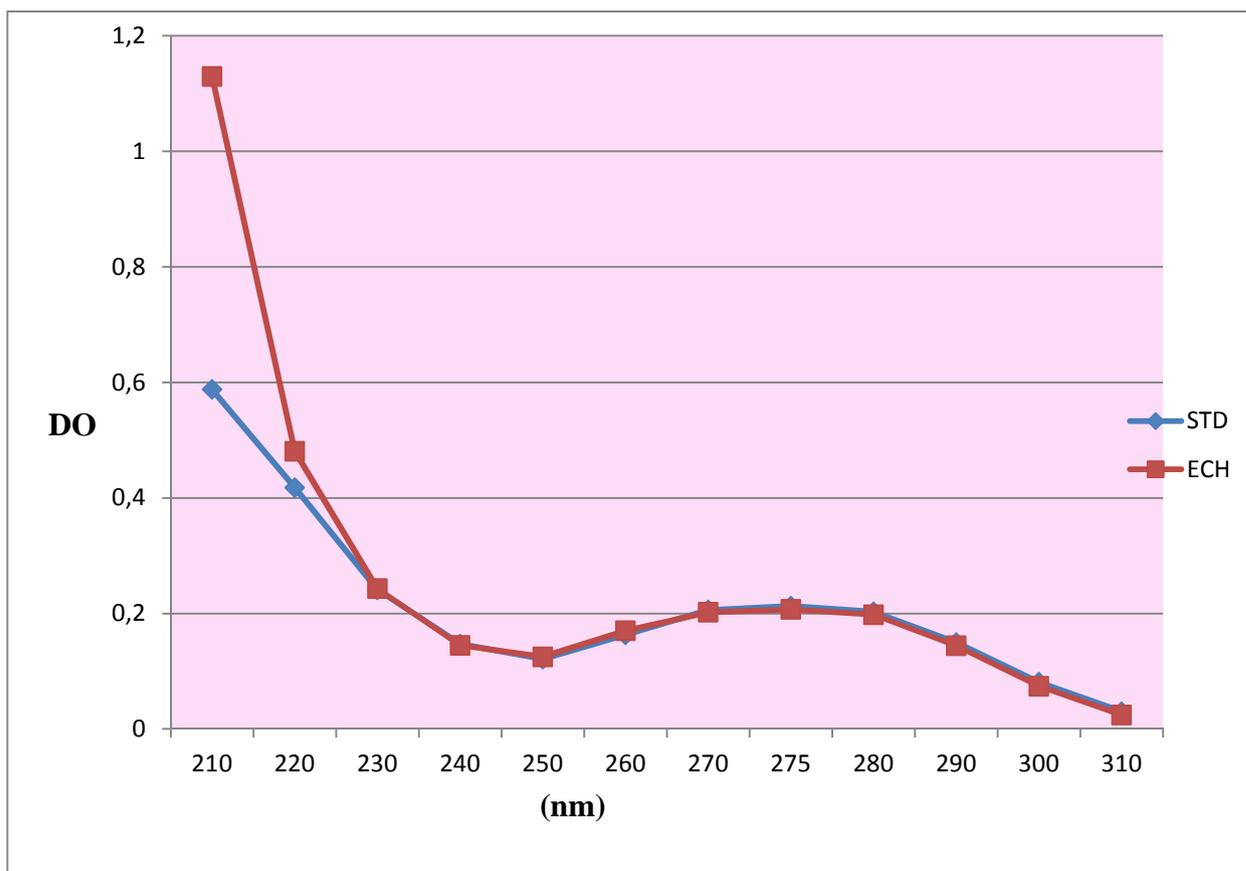


Figure8 : Identification par U.V de Clofenal 75mg/3ml

D'après La courbe obtenue, on constate qu'à partir de la longueur d'onde 230 nm les deux courbes se superposent.

L'absorbance de l'échantillon et du standard donne le même maximum à 275 nm. Ainsi, on peut conclure que l'identification U.V est positive.

1-3-5-Dosage par U.V

Tableau 10 : Dosage du principe actif dans le mélange 0 +275 nm.

Ech (DO)	STD (DO)	P_{STD} (mg)	Puissance STD	V_{Ech} (ml)	Titre (mg/3ml)	Norme (mg/3ml)
0,207	0,213	120,8	0,9944	5	70,04	67,5-82,5

On peut dire que le titre de notre produit est acceptable. Le titre obtenue pour le principe actif dans le mélange correspond parfaitement au milieu des limites de la norme.

On peut dire que le produit fini est fabriqué dans de bonnes conditions.

2-Contrôle microbiologique :

2-1-Dénombrement des germes :

On a dénombré les colonies après la sélection des boîtes qui présentent entre 30 et 300 colonies (colonies dénombrées en surface).

Tableau 11 : Dénombrement des germes.

Germes	Dilutions décimales	Essais (UFC/ml)			Nombre de bactéries /ml d'inoculum
		1	2	Moyenne	
<i>B. subtilus</i>	10^{-3}	150	134	142	$142 \cdot 10^3$
<i>C. albicans</i>	10^{-6}	112	98	105	$105 \cdot 10^6$
<i>S. aureus</i>	10^{-7}	188	204	196	$196 \cdot 10^7$
<i>C. sporogens</i>	10^{-5}	109	143	126	$126 \cdot 10^5$

2-1-1- *Bacillus subtilus* :

Résultats obtenue avec la dilution 10^3 .

La dilution 10^{-3} présente un nombre de colonies compris entre 30 et 300. Les boîtes de 10^{-1} et 10^{-2} sont indénombrables (> 300 colonies) et celles de 10^{-4} à 10^{-10} contiennent peu ou pas de germes.

2-1-2- *Candida albicans* :

Résultats obtenus avec la dilution 10^{-6} .

La dilutin 10^{-6} présente un nombre de colonies compris entre 30 et 300.

Les boîtes de 10^{-1} à 10^{-5} sont indénombrables (> 300 colonies) et celles de 10^{-7} à 10^{-10}

2-1-3- *Staphylococcus aureus* :

Résultats obtenus avec la dilution 10^{-7} .

La dilution 10^{-7} présente un nombre de colonies compris entre 30 et 300. Les boîtes de 10^{-1}

à 10^{-6} sont indénombrables (> 300 colonies) et celles de 10^{-8} à 10^{-10} contiennent peu ou pas de germes.

2-1-4- *Clostridium sporogens* :

Résultats obtenus avec la dilution 10-5.

La dilution 10-5 présente un nombre de colonies compris entre 30 et 300. Les boîtes de 10-1 à 10-4 sont indénombrable (> 300 colonies) et celles de 10^{-6} à 10^{-10} contiennent peu ou pas de germes.

2-2- Etapes de contrôle :

2-2-1- Contrôle de stérilité des milieux de cultures :

Après 07 jours d'incubation, les milieux Thioglycolate et trypticase soja pour le témoin se sont révélés stériles. Aucun croissance microbienne, changement de couleur, ni un milieu trouble, ne sont décelés.

2-2-2-Contrôle de Fertilité des milieux de cultures :

Tableau 12 : Contrôle de la fertilité après 07 jours d'incubation

Germes	Nombre de germes ensemencés (UFC/ml)	Milieu de culture	observation
<i>B. subtilus</i>	142	Trypticasesoja	Trouble dans tous les Flacons. Ce qui nous indique une croissance microbienne abondante
<i>C. albicans</i>	105	Trypticasesoja	
<i>S. aureus</i>	196	Thioglycolate	
<i>C. sporogens</i>	126	Thioglycolate	

Le contrôle des propriétés nutritives des milieux de cultures utilisées, montre que tous les flacon sont troubles et changent de couleur par rapport au témoin stérile. A partir du 2^{ème} jour d'incubation. Ceci nous permet de dire que les milieux sont de bonne qualité nutritive.



**Témoin stérile
flacons de Thio. (Troubles dans les flacons)**

Développement des germes dans les deux

après 07 jours d'incubation.

Témoin stérile Développement des germes dans les deux
flacons de ST. (Trouble dans les flacons)

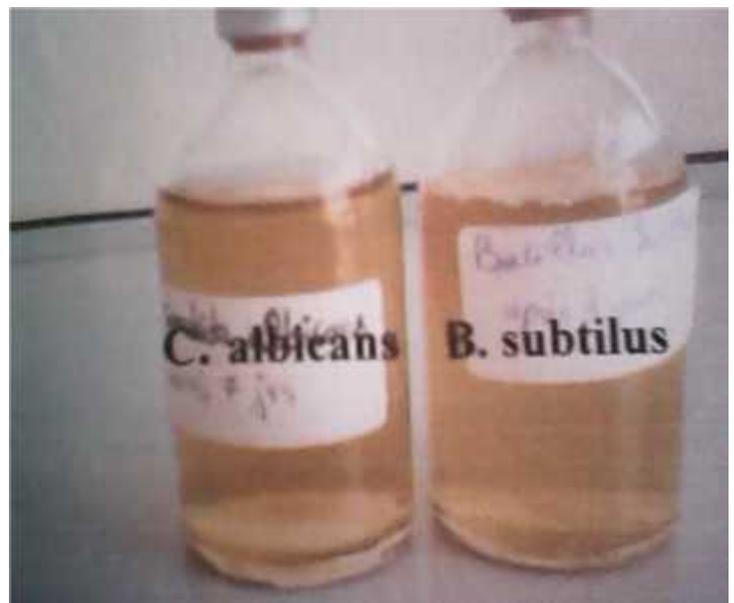
après 07 jours d'incubation.

Figure 9 : Contrôle de fertilité des deux milieux de culture utilisés.

2-2-3- Contrôle de stérilité du Clofenal :

Tableau 13 : Test de stérilité du Clofenal après 14 jours d'incubation :

Milieu de culture	Témoin	Observation
Thioglycolate	Stérile	Absence de croissance microbienne
Trypticase soja	Stérile	



Dans ce test de stérilité, on a obtenu un résultat satisfaisant : absence de croissance microbienne dans les deux unités stériles.

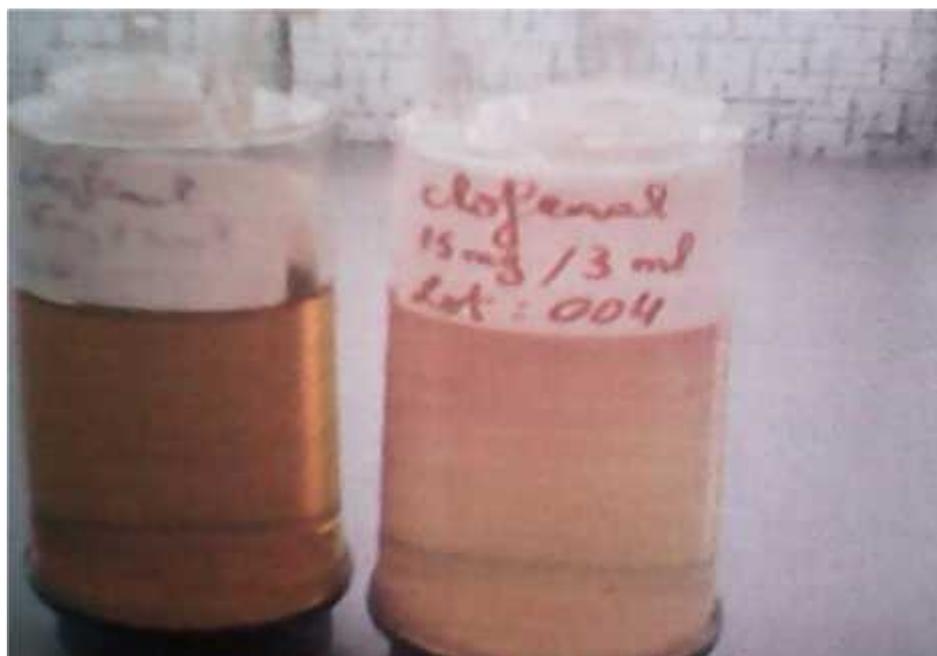
Les deux milieux sont homogènes, pas de changement de couleur.

Ce qui explique que le contrôle de stérilité du Clofenal est bien fait. Ces résultats sont

conformes à la norme, ceci nous permet de dire que le Clofenal est de bonne qualité (stérile) .



Clofenal fraîchement préparé



: Flacon contenant Thioglycolate

: Flacon contenant Soja Trypticase

Aucun développement microbien n'apparaît après 14 jours d'incubation

Figure 10 : Test de stérilité du Clofenal

2-2-4-Contrôle de fertilité du Clofenal :

Afin de vérifier la stérilité du clofenal dans les deux unités stérilisées, nous avons ensemencé les deux milieux de culture contenant dans ces unités chacun avec deux souches différentes :

-Milieu de culture :Trypticase Soja =B. subtilus + C. albicans.

-Milieu de culture Thioglycolate = S. aureus + C. sporogens.

L'incubation a été observée sur une période de 07 jours.

Après seulement 2 jours d'incubation, on a constaté un trouble dans les deux unités stérilisées ensemencées par rapport aux témoins.

Ce résultat nous permet de dire que le clofenal a totalement disparu avec les rinçages dans l'unité stérilisée.

Il ne reste donc aucune trace.



F : Fertilité de milieu

Apparition d'un trouble dans les deux unités stérilisées après seulement 02 jours d'incubation.

Figure 11 : Test de fertilité de Clofenal.

3- Contrôle toxicologique :

Il consiste à la détermination de la DL_{50} ainsi que la recherche des Endotoxines.

3-1-Détermination de la DL_{50} :

la détermination du % de mortalité est calculée comme suit : somme des souris vivantes (pour des doses supérieures à la dose qu'on lit, colonne F, colonne G) et somme des mortes (de la dose lue jus qu'a la plus faible).

Mortalité % = Valeur en G /valeur H \times 100.

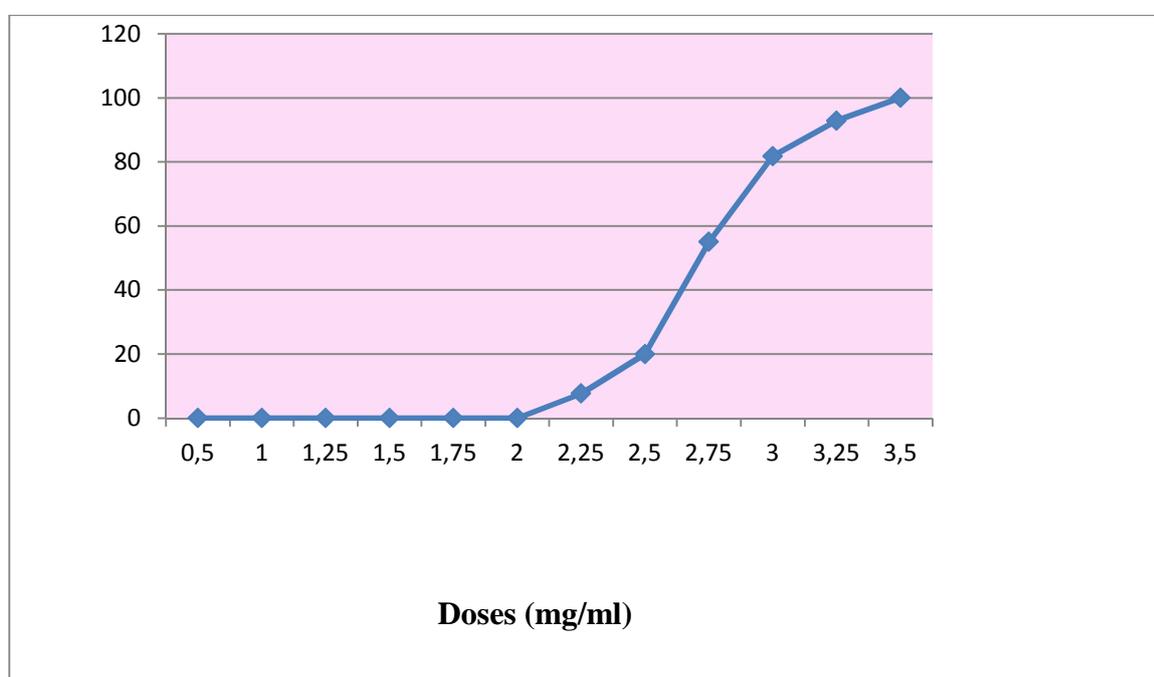


Figure 12 : DL_{50} de Clofenal 75 mg/ 3ml

La valeur de la DL_{50} obtenue à partir du graphe est 2,72 mg/ml/souris.

Ce qui équivalent à la mort de 50% des souris.

Le poids moyen de chaque souris est de 20g . la DL_{50} est donc :

2,75 mg/ml /souris d'où /g :2,72 /20 /ml/ g,0,136 mg / g soit 136 mg/kg.

3-2- Recherche des Endotoxines :

Après 1h d'incubation des 9 tubes à hémolyses, on a prélevé et tourné chacun de ces tubes d'une façon inclinée d'où on a observé que :

dans les tubes à hémolyse numérotés de 1 à 8 : il n'y a pas formation de gel alors : résultats négatifs ce qui nous indique qu'il y a absence d'Endotoxines. Le tube n°9 : il y a formation de gel alors résultat positif ce qui explique la présence d'Endotoxines.



Résultat positif : Formation de gel



Résultat négatif : Absence de gel

Figure 13 : Recherche des endotoxines.

Discussion :

Selon l'organisation mondiale de la santé « La stabilité d'un médicament peut être définie comme son aptitude à conserver ses propriétés chimiques, physiques, microbiologiques et biopharmaceutiques dans des limites spécifiées pendant toute sa durée de validité ». La stabilité des préparations pharmaceutiques dépend de paramètres extrinsèques (température, humidité et lumière) et intrinsèques. Parmi ces derniers, il faut différencier les facteurs liés aux matières premières, à la forme pharmaceutique et au conditionnement.

Selon Gouraud 2012, les principaux contrôles physico- chimiques concernent : la neutralité (pH le plus proche du pH sanguin), l'isotonicité (même pression osmotique/plasma), la limpidité (absence de particules en suspension « solutions seulement »).

Selon Baghdadi et khitous 2005 des petites quantités d'impuretés dans la substance diminuent considérablement son point de fusion.

Selon Akers MJ 1984, 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. Ces produits stériles doivent être libérés sur la base d'un contrôle de qualité microbiologique incluant un test de stérilité sur chacun des lots. Les textes normatifs décrivent précisément les procédures à mettre en place au sein du laboratoire de contrôle qualité pour prouver que le produit est stérile avant sa libération. L'objectif du contrôle de stérilité des injectables est de vérifier l'absence de micro-organismes dans un échantillon représentatif d'un lot de médicaments. La méthode culturale est la méthode de référence utilisée depuis quelques dizaines d'années ; Elle présente l'inconvénient d'un résultat différé rendant la libération d'un lot impossible avant 14 jours après production.

Selon Greff-Mirguet.2002, la détection d'endotoxines témoigne de la présence antérieure de bactéries responsables de chocs fébriles si elles sont injectées directement dans le sang.

Références

Références

Références

- Akers MJ, 1984, « pyrogen testing in parenteral quality control sterility, pyrogen, particule and package integrity testing ».Third Edition.
- Anonyme 1983 : LAB Aliment SANDERS, (Aliment composé vitaminisé complet), Fiche.
- Anonyme 1995 : IBN SINA, Dictionnaire thérapeutique 2^{ème} Edition, Alger, pp : 316.
- Anonyme 1997 : Pharmacie, Documentation juridique 2^{ème} Edition, Alger, pp : 258.
- Anonyme 1997 : Pharmacopée européenne, 3^{ème} Edition, Strasbourg, Cedex France, Conseil de l'Europe, pp : 856-913-1874-1902.
- Anonyme 1998 : Assurance de qualité des produits pharmaceutiques, volume 1.Genève : OMS, pp : 1-2.
- Anonyme 2000 : Conférences d'actualisation 2000. Edition scientifique et médicale, Paris, Elsevier : SAS et SFAR, pp : 323-334.
- Anonyme 2001 : Pharmacopée européenne, 4^{ème} Edition, Strasbourg, Cedex France, Conseil de l'Europe, pp : 54890-57204-62584-65431.
- Anonyme 2003 : Vidal le dictionnaire, Paris, pp : 2066.
- Anonyme 2005 : Dictionnaire des médicaments SAIDAL, Alger, pp : 209-210.
- Anonyme 2005 : Encyclopédie Encarta, 2005.
- Albert L.- Cœur A.- Lespagnol C. et Lesieur D.1974, Chimie des médicaments, Tome 1, Edition Maloine, Paris, pp : 234-324-403.
- Baghdadi A.et Khitous S. 2005, Contrôle de qualité d'un produit pharmaceutique RINASTINE 5%, Thèse d'Ingénieur d'Etat en Biologie, Option : C.Q.A, Université de Blida.
- Baronas Ph. 2006, Guide de l'Ultra propreté, 400 activités analysées, référence détaillées, 1000 entreprises contacts clés (France- Belgique –Suisse), 5[®] Edition, France, pp : 16.
- Bourdon (J.- L.) et Marchal N. 1973, Techniques bactériologiques, Edition Masson, Paris, pp : 210-212.
- Bourin M. et Jolliet P. 1999, Pharmacologie générale et pratique, Edition Ellipses, Paris, pp : 98-119.
- Charpentier B.- Hamon F.- Lorleac H. – Harlay A. – Huard A. – Ridoux L. et Chansallé S. 2004. Guide du préparateur en pharmacie, 2^{ème} Edition, Paris, Malione, pp : 40.

- Cohen Y. 1997, pharmacologie 4[®]Edition révisée, Paris, Masson, pp : 339.
- Dorosz Ph. 2005, Guide pratique de médicaments, 25[®]Edition, Paris, Maloine, pp : 40.
- Elghozi (J.- L.) et Duval D. 1989, Aide mémoire de pharmacologie, Flammarion médecine – science, Paris, pp : 150.
- Fouteneau (J.-M.) – Orecchioni (A.- M.) et PAIN j. 1999, Galénique, préparateur en pharmacie. Edition Paris, pp : 48.
- Gagnault (G.-A.). 1982, Principe de la recherche du médicament, Edition Masson, Paris, pp : 75.
- Garnier M.- Delamare V. – Delamare J. Delamare Th.- Delamare F.- Delamare L.et Malville E. 1995, Dictionnaire des termes de médecine, 24^{ème} Edition, Paris Edition Maloine, pp : 264-485.
- Gavrilovie M. – Magonot (M.- J)- Schwartz H. – Gavrilovie C et Walach J. 1996, Manipulation d'analyse biochimique, 3^{ème}Edition, Doin Editeur, Genève, pp : 59-354.
- Gazengel (J.- M) et Orecchioni (A.-M.), 1999, Le préparateur en pharmacie, Guide théorique et pratique 2^{ème}Tirage, Edition Tec et doc, Paris, pp : 332-333-689.
- Giroud (J.-P.) – Mathé G. et Meyniel G. 1988, Pharmacologie clinique, bases de la thérapeutique 2^{ème} Edition, Paris, Expansion scientifique française, pp : 720.
- Gouraud A. 2012, Généralité sur la pharmacologie et les médicaments, pp :8-42-43-48
- Greff-Mirguet.G, 2002, Echantillonnage et analyse des endotoxines dans l'air. Cahier de notes documentaires- hygiène et sécurité du travail- N°187. INRS, p.73-83.
- Le Hir, 1999, Abrége, Pharmacie galénique, 6[®]Edition, Edition Masson, Paris, pp : 156-231-302.
- Le Hir, 2000, Abrége, Pharmacie galénique, bonne pratique de fabrication des médicaments, 7^{ème} Edition, Masson, Paris, pp : 290.
- Le Hir, 2001, Pharmacie galénique, bonne pratique de fabrication des médicaments, 7^{ème} Edition, Masson, Paris, pp : 120-269.
- Mamas S. 1997, Prostaglandine et thromboxanes, Application clinique et pharmacologique, Masson, Paris, pp : 236.
- Manuila A.- Manuila L.- Lewalle P.- Nicoulin M. et Pap T. 2004, Dictionnaire Médical Manuila, 10[®]Edition, Masson, Paris, pp : 29-152-253.

- Marcel (G.- A.) et Garnier M. 1987, Le médicament de l'an 2000, Edition, Masson, Paris, pp : 5-33.
- Pebert F.1993, Anatomie Physiologie, pharmacologie générale, 3[®]Edition augmenté, Paris, pp : 192-193.
- Prescott SL, 2013 Early-life environmental determinants of allergic diseases and the wider pandemic of inflammatory non communicable diseases. , J Allergy Clin Immunol, vol. 131, no 1, p. 23-30.
- Schorderet M. 1989 ? Pharmacologie des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques, Genève, pp : 20-537.
- Scriban R. 1999 ? Biotechnologie Tec & Doc. 5^{ème}Edition, Paris, pp : 927.
- Sussland (W.- A.), 1996, Le manager, la qualité et les normes ISO, Press polytechniques et universitaires romandes, pp : 185.
- Talbert M.- Willoquet G. et Labayle D. 2001, Guide pharmaco, Edition Lamare, France, pp : 25-44.
- Tillement (J.-P.) – Allain P. – Houin G. et Vandiel B. 1998, Les bases pharmacologiques de l'utilisation des médicaments, 9[®]Edition, Edition MC. Graw – Hill, Belgique, pp : 644.
- Vadeville P. 1983, Gestion et contrôle de la qualité, Association Française de normalisation, Edition Masson, Paris, pp : 134.
- Willya S. 1996 le manager, la qualité et les normes ISO, Edition Masson, Paris, pp : 148.
- Site d'internet :
Anonyme 1996 : www. Anapath. Necher. Fr Copyright © 1996 ANAPATH WEB.

Annexes

Annexe 1 :

Tableau 14 : DL50 (méthode de BEHRENS) 48 h après injection.

Numéro d'essai	Dose de clofenal (mg/ml)	Nombre de souris /prise	Après 48h		Nombre de souris vivantes pour des doses	Nombre de souris mortes pour des doses	Total (F+G)	% de mortalité (G/H.100)
			Souris vivantes	Souris mortes				
1	0,5	5	5	0	42	0	42	0
2	1	5	5	0	37	0	37	0
3	1,25	5	5	0	32	0	32	0
4	1,5	5	5	0	27	0	27	0
5	1,75	5	5	0	22	0	22	0
6	2	5	5	0	17	0	17	0
7	2,25	5	4	1	12	1	13	7,69
8	2,5	5	4	1	8	2	10	20,00
9	2,75	5	2	3	4	5	9	55,00
10	3	5	1	4	2	9	11	81,81
11	3,25	5	1	4	1	13	14	92,85
12	3,5	5	0	5	0	18	18	100
					F	G	H	

Annexe 2:

1-Verreries et consommables:

- Anse en platine.
- Becher en inox et en plastique.
- Bouchon en verre, en plastique et en caoutchouc.
- Boîtes de Petri en polystyrène, boîtes à contention.
- Cuves en quartz.
- Creuset en plastique.
- Entonnoir.
- Désinfectant (benzalkonium, alcooléthylique).
- Fiols jaugées.
- Flacons en verre.
- Filtres milleux 0,2 M.
- Dispositifs de filtration (Steriset).
- Ciseau.
- Gants protecteurs en latex (à usage unique).
- Indicateur de stérilisation (ruban adhésif témoin de stérilisation à la vapeur, à rayures virant du blanc au brun à 121°C°).
- Bidon pour élimination des filtrats.
- Papier filtre.
- Portoir.
- Poire.
- Panier en fil d'acier.
- Pipettes graduées.
- Pipettes jaugées.
- Spatule.
- Seringues jetables de 5 ml et de 1 ml.
- Seringues en verre de 0,5 ml.
- Tube capillaire.
- Tubes à essai.
- Tubes à hémolyse.

2- Produits chimiques utilisés :

- Acétone.
- Acide acétique.
- Acide perchlorique.
- Alcool.
- Eau distillée.
- Ether.
- Glycérine.
- Hydroxyde de sodium « NaCL ».
- Méthanol.
- Tampon acétone à pH =3,5.
- Thioacétamide.
- Réactif1 : contenant thioacétamide 0,2 ml et 1 ml d'un mélange (3 ml NaOH ; 4 ml glycérine ; 1 ml d'eau distillée).

Annexe 3 :

Préparation des milieux de culture et solutions:

On prépare un lot de milieu de culture et solution pour réaliser toutes les étapes du contrôle (selon la pharmacopée Européenne 2001).

- **Milieu bouillon Thioglycolate :**

Ce milieu de culture est préparé pour l'ensemencement des souches aéro-anaérobies facultatives.

On pèse 29,8 g de poudre de thioglycolate puis on verse dans une marmite en inox contenant 1L d'eau purifiée. On mélange bien, puis on chauffe le contenu sous agitation et on laisse bouillir pendant 1 minute, de façon à la faire dissoudre parfaitement.

Al'aide d'un entonnoir, on verse 100 ml de bouillon thioglycolate dans des flacons en verre, puis on met à l'autoclave à 121°C pendant 20 minutes.

- **Milieu bouillon Soja-trypticase :**

Ce milieu de culture est utilisé pour l'ensemencement des levures et des bactéries.

On pèse 30 g de la poudre de Soja trypticase puis on la verse dans une marmite en inox contenant 1L d'eau purifiée. On le mélange bien, puis on chauffe légèrement afin de la dissoudre entièrement.

Al'aide d'un entonnoir on verse 100 ml de bouillon Soja trypticase dans chaque flacon, et on met à l'autoclave à 121°C pendant 20 minutes (les flacons sont fermés avec des bouchons en caoutchouc et en inox et sont étiquetés avec un papier indicateur de stérilité).

- **Eau peptonée :**

C'est une solution de rinçage, constituée de NaCL (9‰, P/V) qui peut garder en vie les germes lors du transfert d'un milieu de culture à un autre.

On pèse 1 g de poudre puis on verse dans une marmite en inox contenant 1 L d'eau purifiée. On le mélange bien.

Al'aide d'un entonnoir, on verse 100 ml d'eau peptonée dans des flacons, et on met à l'autoclave à 121°C pendant 20 minutes.

- **Solutions physiologique :**

On pèse 9 g de NaCL dans une marmite en inox. Contenant 1L d'eau purifiée et on mélange bien. On met dans chaque tube 9 ml de cette solution physiologique obtenue. On ferme avec des bouchons en inox. On autoclave le tout à 121° C pendant 20 minutes.

Annexe 4 :

Tableau 1 : Listes des médicaments fabriqués au niveau de la filiale ANTIBIOTICAL SAIDAL de Médéa :

COMPRIMES	
PHENOXYMETHYLPENICILLINE « PENI.V »(Orapen) 1 MUI Bte 12	ORAPEN 1 MUI
GELULES	
AMOXICILLINES (Amoxyphen) 500 mg Bte 12	AMOXYPEN 500MG
AMOXICILLINE (Ampiline) 100 mg Bte 12	AMPICILLINE 500MG
DOXYCYCLINE (Doxyline) 100 mg Bte 06	DOXYCYCLINE 100MG
OXACILLINE (Oxaline) 500 mg Bte 12	OXALINE 500 MG
OXYTETRACYCLINE (Oxymed) 250 mg Bte 16 MG	OXYTETRACYCLINE 250
POUDRE POUR SOLUTIONS INJECTABLES	
AMOXICILLINE (Amoxyphen) 1 g flacon 10 ml	AMOXYPEN 1 G
AMOXICILLINE (Amoxyphen) 500 mg flacon 10 ml	AMOXYPEN 500 MG
AMPICILLINE (Ampilline) 1 g flacon 10 ml	AMPICILLINE 1G
AMPICILLINE (Ampilline) 500 mg flacon 10 ml	AMPICILLINE 500 MG
BENZYL PENICILLINE « PENI. G» (Gectapen) 1 MUI FLACON 10 ML	GECTAPEN 1 000 000 UI
BENZYL PENICILLINE « PENI. G» (Gectapen) 0,5 MUI Flacon 10 ml	GECTAPEN 500 000 UI
OXACILLINE (Oxaline) 500 mg flacon 10 ml	OXACILLINE 1 G
OXACILLINE (Oxaline) 1 g flacon 10 ml	OXACILLINE 500 MG
SOLUTIONS INJECTABLES	
CEFAZOLINE (Bactisol) 1 g flacon 10 ml	BACTIZOL 1 G « hop » B/25
CYANOCOBALAMINE (VITAMINE B 12) (Cobamine) 1000 µg Bte 05	COBAMINE VIT B12 “B/5”
LIDOCAINE 2% flacon 05 ml LIDOCAINE 2%	
TIEMONIUM METHYLSULFATE (Timonal) 05 mg Bte 05	TIMONAL 5 MG B/50
Diazepam 5Valz2pam) 10 mg Bte 05	VALZEPAM 10 MG B/50
SIROPS	
CARBOCYSTEINE 2% (Rhinastine) flacon 125	CARBOCYSTEINE 2%
CARBOCYSTEINE 5% (Rhinastine) flacon 125 ml	CARBOCYSTEINE 5%
Alpha-amylase (Danilase)20 000 U CEIP flacon 125 ml	DANILASE
PARACETAMOL (Paralgan) 120 mg flacon 125 ml	PARALGAN 125 ML
SOLUTIONS BUVABLES	
KETOTIFENE (Alèrfène) 1 mg / 5 ml flacon 125 ml	ALERFENE 125 ML
SUSPENSIONS BUVABLES	
AMOXICILLINE (Amoxyphen) 250mg / 5 ml flacon 30 g	AMOXICILLINE 250 MG
PHENOXYMETHYLPENICILLINE “PENI. V”(Orapen)0,25MUI flacon50 g	ORAPEN 250 MG
POMMADES DERMIIQUES	
BETAMETHASONE (Betasone) 0,05 % Tube 15 g	BETAMETHASONE 0,05%
BETAMETHASONE (Betasone) 0,1 % Tube 15 g	BETAMETHASONE 0,1%
CHLORTETRACYCLINE (Clomycine) 3% tube 15 g	CLOMYCINE 3%
POMMADSE OPHTALMIQUES	
CHLORTETRACYCLINE (Clomycine) 1% tube 15 g	CLOMYCINER 1%

Annexe 5:

Produits pour hopitaux :

DCI	PRODUITS	REFERENCES
FLACONS INJECTABLES		
AMOXICILLINE SODIQUE	AMOXYPEN 1 g	CLAMOXYL
AMOXICILLINE SODIQUE	AMOXYPEN 500 mg	CLAMOXYL
AMPICILLINE SODIQUE	AMPICILLINE 1	TOTAPEN
AMPICILLINE SODIQUE	AMPICILLINE 500 mg	TOTAPEN
BENZYL PENICILLINE "PENI.G" SODIQUE	GECTAPEN 1 000 000UI	PENICILLINE G
BENZYL PENICILLINE "PENI.G" SODIQUE	GECTAPEN 500 000UI	PENICILLINE G
OXACILLINE SODIQUE	OXACILLINE 1 g	BRISTOPEN
OXACILLINE SODIQUE	OXACILLINE 500 mg	BRISTOPEN
CEFAZOLINE SODIQUE	BACTIZOL 1g	CEFACEDAL:KEFORAL
AMPOULES INJECTABLES		
LIDOCAINE Ampoules 10 ml	KIDOCAINE 2 %	XYLOCAINE
TIEMONIUM METHYLSULFATE	TIMONAL 5 %	VISCERALGINE
DIAZEPAM	VALZEPAM 10mg	VALIUM
POMMADES DERMIIQUES		
BETAMETHASONE	BETAMETHASONE 0,05%	CELESTENE
BETAMETHASONE	BETAMETHASONE 0,1%	CELESTENE
POMMADES OPHTALMIQUES		
CHLORTETRACYCLINE	CLOMYCINE 1%	AUREOMYCINE
GELULES		
FLUCONAZOLE 150mg	MYCOFLUCON	
AZITHROMYCINE 250 mg	AZITHROMYCINE 250 mg B/4	
POUDRE POUR SOLUTION INJECTABLE		
BENZATHINEBENZYL PENOCILLINE	RETACILLINE 600 000 UI	EXTENCILLINE
BENZATHINEBENZYL PENOCILLINE	RETACILLINE 1 200 000 UI	EXTENCILLINE
AMOXYCILLINE +ACIDE CLAVULANIQUE	CLAMOXYPEN 1G/200mg	AUGMENTIN
SOLUTIONS INJECTABLES		
DICLOFENAC 75 mg /3ml	CLOFENAL	VOLTARENE
TERBUTALINE SULFATE 0,5 mg/ml	ASMALINE 0,5mg/ml	BRICALNYL
HALOPERIDOL 5 mg /ml	HALUDOL 5mg/ml	HALDOL
FUROSEMIDE 20 mg/ml	FUROZAL 20mg/ml	LASILIX
METOCLOPRAMIDE	CLOPRAMID 0,1%	PRIMPERAN
PIROXICAM 20mg/ml	PRIXAM	FELDENE

Conclusion

Les résultats de cette étude ont permis de connaître avec exactitude la qualité du clofenal 75mg/3ml

Les paramètres physico-chimiques montrent que ce médicament répond aux normes et ne présente aucune insuffisance ou défaut et est très pur.

Sa solubilité dans trois excipients sur les quatre testés, permet de diversifier leur incorporation.

La teneur d'une ampoule en PA (70.04 mg/3ml), ne reflète pas la dénomination de ce produit (75 mg/ml), même si la norme est respectée (67.5-82.5 mg/ml). La quantité est beaucoup plus proche de la limite inférieure de la norme et bien loin de la supérieure. Ceci doit être signalé et rectifié car le patient doit recevoir la dose correcte pour une efficacité thérapeutique optimale.

Du point de vue microbiologique, la constatation qui dégage est la maîtrise de la situation par le personnel. Ceci s'explique par les milieux de culture utilisés pour les souches de contrôle (témoins) qui montrent une bonne qualité nutritive (donc non périmés), une bonne stérilisation des stritest, puisque aucune trace du principe actif n'est retrouvée (développement des souches révélé par le trouble des milieux).

La dose de 2.72 mg/ml/souris ou 136 mg/kg provoque une DL₅₀. Elle est loin du dosage conçu pour les patients et qui représente 1 mg/kg pour un adulte de 75 mg/ injection.

On peut conclure que le produit étudié présente une bonne qualité hygiénique et commerciale.

Résumé

Afin d'obtenir une action thérapeutique toujours identique avec un même produit pharmaceutique, ce dernier doit présenter des caractéristiques constantes et parfaitement définies.

L'objectif de cette étude consiste en le contrôle physico-chimique, microbiologique, et toxicologique du Clofenal injectable 75 mg/ 3ml. Toutes les analyses effectuées sur chacun des paramètres du principe actif, mélange final, et produit fini, ont donné des valeurs conformes à la norme utilisée.

La DL₅₀ sur des souris correspond à une concentration de 136 mg/ kg. La recherche des Endotoxines a donné des résultats négatifs.

Le médicament, Clofenal est donc considéré de bonne qualité pharmaceutique.

Mots clés :

Clofenal 75 mg /3ml, DL50, Endotoxines.

Abstract

To obtain an always identical therapeutic action with a same pharmaceutical product, it must have constant characteristics and perfectly defined.

The objective of this study is the physicochemical, microbiological and toxicological control of injectable Clofenal 75 mg / 3ml. All analyzes performed on each of the parameters of the active ingredient, the final mixture, and finished product, gave values consistent with the standard used.

The LD₅₀ in mice corresponds to a concentration of 136 mg / kg. Search for endotoxins produced negative results.

The drug, Clofenal is considered good pharmaceutical quality.

Key words:

Clofenal 75 mg / 3ml, DL50, Endotoxines.

للحصول على مفعول علاجي دائما متطابق مع منتج صيدلاني نفسه، فإنه يجب أن له
الهدف من هذه الدراسة هو السيطرة الفيزيائية، الميكروبيولوجي مية لكلوفنا 75مغ عن طريق الحقن
كل التحليلات التي أجريت على كل من المعلمات من العنصر النشط، وخليط النهائي، والمنتج النهائي، وقدم القيم متنسقة مع .
المعايير المستخدمة
DL₅₀ يتوافق مع تركيز 136 / .
6البحث عن السموم الداخلية أسفر عن نتائج سلبية.
لدواء Clofenal يعتبر ذو نوعية صيدلانية جيدة.
:
75 / .DL50. المسمات الداخلية.