MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

REPUBLIQUE DE COTE D'IVOIRE UNION - DISCIPLINE - TRAVAIL





N°1994./19

Année: 2018 - 2019

THESE

Présentée en vue de l'obtention du

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Par

KOFFI KONAN KOUASSI FULGENCE

DEVELOPPEMENT ET EVALUATION D'UNE FORMULATION INJECTABLE A LIBERATION IMMEDIATE A BASE DE GELATINE FLUIDE MODIFIEE

Soutenue publiquement le 08 Fevrier 2019

COMPOSITION DU JURY:

Président : Monsieur MALAN KLA ANGLADE, Professeur Titulaire

Directeur de thèse : Monsieur DALLY LABA ISMAEL, Maître de conférences Agrégé **Assesseurs** : Monsieur OUASSA TIMOTHEE, Maître de conférences Agrégé

: Monsieur LIA GNAHORE JOSE ARTHUR, Attaché de Recherche

ADMINISTRATION ET PERSONNEL ENSEIGNANT DE L'UFR DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES

I. HONORARIAT

Directeurs/Doyens Honoraires Professeur RAMBAUD André

Professeur FOURASTE Isabelle

Professeur BAMBA Moriféré

Professeur YAPO Abbé †

Professeur MALAN Kla Anglade

Professeur KONE Moussa †

Professeur ATINDEHOU Eugène

II. ADMINISTRATION

Directeur Professeur KONE-BAMBA Diénéba

Sous-Directeur Chargé de la Pédagogie Professeur Ag IRIE-N'GUESSAN Amenan

Sous-Directeur Chargé de la Recherche Professeur Ag DEMBELE Bamory

Secrétaire Principal Madame NADO-AKPRO Marie Josette

Documentaliste Monsieur N'GNIMMIEN Koffi Lambert

Intendant Monsieur GAHE Alphonse

Responsable de la Scolarité Madame DJEDJE Yolande

III. PERSONNEL ENSEIGNANT PERMANENT

1- PROFESSEURS TITULAIRES

M. ABROGOUA Danho Pascal Pharmacie Clinique

Mmes AKE Michèle Chimie Analytique, Bromatologie

ATTOUNGBRE HAUHOUOT M.L. Biochimie et Biologie Moléculaire

MM. DANO Djédjé Sébastien Toxicologie

GBASSI K. Gildas Chimie Physique Générale

INWOLEY Kokou André Immunologie

Mme KONE BAMBA Diéneba Pharmacognosie

M. KOUADIO Kouakou Luc Hydrologie, Santé Publique

Mme KOUAKOU-SIRANSY Gisèle Pharmacologie

MM. MALAN Kla Anglade Chimie Analytique, Contrôle de Qualité

MENAN Eby Ignace Parasitologie - Mycologie

MONNET Dagui Biochimie et Biologie Moléculaire

Mme SAWADOGO Duni Hématologie

M. YAVO William Parasitologie-Mycologie

2- MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

M. AHIBOH Hugues Biochimie et Biologie Moléculaire

Mme AKE-EDJEME N'guessan Angèle Biochimie et Biologie Moléculaire

MM. AMARI Antoine Serge G. Législation

AMIN N'Cho Christophe Chimie Analytique

Mme BARRO-KIKI Pulchérie Parasitologie – Mycologie

BONY François Nicaise Chimie Analytique

DALLY Laba Ismael Pharmacie Galénique

DEMBELE Bamory Immunologie

Mme DIAKITE Aïssata Toxicologie

M. DJOHAN Vincent Parasitologie – Mycologie

Mmes FOFIE N'Guessan Bra Yvette Pharmacognosie

IRIE-N'GUESSAN Amenan Pharmacologie

MM. KASSI Kondo Fulgence Parasitologie-Mycologie

KOFFI Angely Armand Pharmacie Galénique

Mme KOUAKOU-SACKOU Julie Santé Publique

MM. KOUASSI Dinard Hématologie

LOUKOU Yao Guillaume Bactériologie-Virologie

MANDA Pierre Toxicologie

OGA Agbaya Stéphane Santé Publique et Economie de la Santé

OUASSA Timothée Bactériologie-Virologie

OUATTARA Mahama Chimie Organique, Chimie Thérapeutique

Mme SANGARE TIGORI Béatrice Toxicologie

MM. YAPI Ange Désiré Chimie Organique, Chimie Thérapeutique

YAYO Sagou Eric Biochimie et Biologie Moléculaire

ZINZENDORF Nanga Yessé Bactériologie-Virologie

3- MAITRES ASSISTANTS

MM. ADJAMBRI Adia Eusebé Hématologie

ADJOUNGOUA Attoli Léopold Pharmacognosie

Mmes ABOLI-AFFI Mihessé Roseline Immunologie

AKA ANY-GRAH Armelle Adjoua S. Pharmacie Galénique

ALLA-HOUNSA Annita Emeline Santé Publique

M. ANGORA Kpongbo Etienne Parasitologie-Mycologie

Mmes AYE-YAYO Mireille Hématologie

BAMBA-SANGARE Mahawa Biologie Générale

BLAO-N'GUESSAN Amoin Rebecca J. Hématologie

MM. CABLAN Mian N'Dédey Asher Bactériologie-Virologie

CLAON Jean Stéphane Santé Publique

Mme DONOU-N'DRAMAN Aha Emma Hématologie

MM. EFFO Kouakou Etienne Pharmacologie

KABRAN Tano Kouadio Mathieu Immunologie

Mme KONAN-ATTIA Akissi Régine Santé Publique

M. KONAN Konan Jean Louis Biochimie et Biologie Moléculaire

Mme KONATE Abibatou Parasitologie-Mycologie

M. KOUAME Dénis Rodrigue Immunologie

Mme KOUASSI-AGBESSI Thérèse Bactériologie-Virologie

MM. KPAIBE Sawa André Philippe Chimie Analytique

N'GUESSAN Alain Pharmacie Galénique

Mme VANGA-BOSSON Henriette Parasitologie-Mycologie

4- ASSISTANTS

MM. ADIKO Aimé Cézaire Immunologie

AMICHIA Attoumou Magloire Pharmacologie

Mmes AKOUBET-OUAYOGODE Aminata Pharmacognosie

ALLOUKOU-BOKA Paule-Mireille Législation

APETE-TAHOU Sandrine Bactériologie-Virologie

BEDIAKON-GOKPEYA Mariette Santé Publique

MM. BROU Amani Germain Chimie Analytique

BROU N'Guessan Aimé Pharmacie clinique et thérapeutique

COULIBALY Songuigama Chimie organique, Chimie Thérapeutique

DJADJI Ayoman Thierry Lenoir Pharmacologie

DJATCHI Richmond Anderson Bactériologie-Virologie

DOFFOU Oriadje Elisée Pharmacie clinique et thérapeutique

Mmes. DOTIA Tiepordan Agathe Bactériologie-Virologie

HE-KOUAME Linda Isabelle Chimie Minérale

KABLAN-KASSI Hermance Hématologie

M. KACOU Alain Chimie Organique, Chimie Thérapeutique

Mme KAMAGATE Tairatou Hématologie

MM. KAMENAN Boua Alexis Thierry Pharmacie clinique et thérapeutique

KOFFI Kouamé Santé Publique

KONAN Jean Fréjus Biophysique

Mmes KONE Fatoumata Biochimie et Biologie Moléculaire

KONE-DAKOURI Yekayo Benedicte Biochimie et Biologie Moléculaire

MM. KOUAHO Avi Kadio Tanguy Chimie Organique, Chimie thérapeutique

KOUAKOU Sylvain Landry Pharmacologie

KOUAME Jérôme Santé Publique

Mme KRIZO Gouhonon Anne-Aymonde Bactériologie-Virologie

MM. LATHRO Joseph Serge Bactériologie-Virologie

MIEZAN Jean Sébastien Parasitologie-Mycologie

N'GBE Jean Verdier Toxicologie

N'GUESSAN Déto Ursul Jean-Paul Chimie Organique, Chimie Thérapeutique

Mmes N'GUESSAN Kakwokpo Clémence Pharmacie Galénique

N'GUESSAN-AMONKOU Anne C. Législation

ODOH Alida Edwige Pharmacognosie

SIBLI-KOFFI Akissi Joëlle Biochimie et Biologie moléculaire

SICA-DIAKITE Amelanh Chimie Organique, Chimie Thérapeutique

TANOH-BEDIA Valérie Parasitologie-Mycologie

M. TE BONLE Leynouin Franck-Olivier Pharmacie hospitalière

DEVELOPPEMENT ET EVALUATION D'UNE FORMULATION INJECTABLE A LIBERATION IMMEDIATE A BASE DE GELATINE FLUIDE MODIFIEE

Mme TIADE-TRA BI Marie Laure Santé publique - Biostatistiques

M. TRE Eric Serge Chimie Analytique

Mmes TUO-KOUASSI Awa Pharmacie Galénique

YAO Adjoa Marcelle Chimie Analytique

MM. YAO Jean Simon N'Ghorand Chimie Générale

YAPO Assi Vincent De Paul Biologie Générale

Mmes YAPO-YAO Carine Mireille Biochimie

YEHE Desiree Mariette Chimie Générale

ZABA Flore Sandrine Bactériologie-Virologie

5- CHARGEES DE RECHERCHE

Mmes ADIKO N'dri Marcelline Pharmacognosie

OUATTARA N'gnôh Djénéba Santé Publique

6- ATTACHE DE RECHERCHE

M. LIA Gnahoré José Arthur Pharmacie Galénique

7- <u>IN MEMORIUM</u>

Feu KONE Moussa Professeur Titulaire

Feu YAPO Abbé Etienne Professeur Titulaire

Feu OUATTARA Lassina Professeur Titulaire

Feu COMOE Léopold Maître de Conférences Agrégé

Feue POLNEAU-VALLEE Sandrine Maître de Conférences Agrégé

Feu GUEU Kaman Maître-Assistant

Feu ALLADOUM Nambelbaye Assistant

Feu COULIBALY Sabali Assistant

Feu TRAORE Moussa Assistant

Feu YAPO Achou Pascal Assistant

IV. ENSEIGNANTS VACATAIRES

1- PROFESSEURS

MM. DIAINE Charles Biophysique

OYETOLA Samuel Chimie Minérale

2- MAITRES DE CONFERENCES

MM. KOUAKOU Tanoh Hilaire Botanique et Cryptogamie

YAO N'Dri Athanase Pathologie Médicale

3- MAITRE-ASSISTANT

M. KONKON N'Dri Gilles Botanique, Cryptogamie

4- **NON UNIVERSITAIRES**

MM. AHOUSSI Daniel Ferdinand Secourisme

COULIBALY Gon Activité sportive

DEMPAH Anoh Joseph Zoologie

GOUEPO Evariste Techniques officinales

Mme KEI-BOGUINARD Isabelle Gestion

MM KOFFI ALEXIS Anglais

KOUA Amian Hygiène

KOUASSI Ambroise Management

N'GOZAN Marc Secourisme

KONAN Kouacou Diététique

Mme PAYNE Marie Santé Publique

COMPOSITION
DES DÉPARTEMENTS
DE L'UFR DES SCIENCES
PHARMACEUTIQUES
ET BIOLOGIQUES

I. <u>BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE</u>

Professeur LOUKOU Yao Guillaume Maître de Conférences Agrégé

Chef de Département

Professeurs OUASSA Timothée Maître de Conférences Agrégé

ZINZENDORF Nanga Yessé Maître de Conférences Agrégé

Docteurs CABLAN Mian N'Dédey Asher Maître-Assistant

KOUASSI-AGBESSI Thérèse Maître-Assistante

APETE-TAHOU Sandrine Assistante

DJATCHI Richmond Anderson Assistant

DOTIA Tiepordan Agathe Assistante

KRIZO Gouhonon Anne-Aymonde Assistante

LATHRO Joseph Serge Assistante

ZABA Flore Sandrine Assistante

II. <u>BIOCHIMIE, BIOLOGIE MOLECULAIRE, BIOLOGIE DE LA</u> REPRODUCTION ET PATHOLOGIE MEDICALE

Professeur MONNET Dagui Professeur Titulaire

Chef de Département

Professeurs HAUHOUOT-ATTOUNGBRE M.L. Professeur Titulaire

AHIBOH Hugues Maître de Conférences Agrégé

AKE-EDJEME N'Guessan Angèle Maître de Conférences Agrégé

YAYO Sagou Eric Maître de Conférences Agrégé

Docteurs KONAN Konan Jean Louis Maître-Assistant

KONE-DAKOURI Yekayo Benedicte Assistante
KONE Fatoumata Assistante
SIBLI-KOFFI Akissi Joëlle Assistante

YAPO-YAO Carine Mireille Assistante

III. BIOLOGIE GENERALE, HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE

Professeur SAWADOGO Duni Professeur Titulaire

Chef de Département

Professeurs INWOLEY Kokou André Professeur Titulaire

DEMBELE Bamory Maître de Conférences Agrégé

KOUASSI Dinard Maître de Conférences Agrégé

Docteurs ABOLI-AFFI Mihessé Roseline Maître-Assistante

ADJAMBRI Adia Eusèbe Maître-Assistant

AYE-YAYO Mireille Maître-Assistante

BAMBA-SANGARE Mahawa Maître-Assistante

BLAO-N'GUESSAN A. Rebecca S. Maître-Assistante

DONOU-N'DRAMAN Aha Emma Maître-Assistante

KABRAN Tano K. Mathieu Maître-Assistant

KOUAME Dénis Rodrigue Maître-Assistant

ADIKO Aimé Cézaire Assistant

KABLAN-KASSI Hermance Assistante

KAMAGATE Tairatou Assistant

YAPO Assi Vincent De Paul Assistant

IV. CHIMIE ANALYTIQUE, CHIMIE MINERALE ET GENERALE, TECHNOLOGIE ALIMENTAIRE

Professeur MALAN Kla Anglade Professeur Titulaire

Chef de Département

Professeurs AKE Michèle Professeur Titulaire

GBASSI Komenan Gildas Professeur Titulaire

AMIN N'Cho Christophe Maître de Conférences Agrégé

BONY Nicaise François Maître de Conférences Agrégé

Docteurs KPAIBE Sawa André Philippe Maître-Assistant

BROU Amani Germain Assistant

HE-KOUAME Linda Isabelle Assistante

TRE Eric Serge Assistant

YAO Adjoa Marcelle Assistante

YAO Jean Simon N'Ghorand Assistant

YEHE Desiree Mariette Assistante

V. <u>CHIMIE ORGANIQUE ET CHIMIE THERAPEUTIQUE</u>

Professeur OUATTARA Mahama Maître de Conférences Agrégé

Chef de Département

Professeur YAPI Ange Désiré Maître de Conférences Agrégé

Docteurs COULIBALY Songuigama Assistant

KACOU Alain Assistant

KOUAHO Avi Kadio Tanguy Assistant

N'GUESSAN Déto Ursul Jean-Paul Assistant

SICA-DIAKITE Amelanh Assistante

VI. PARASITOLOGIE, MYCOLOGIE, BIOLOGIE ANIMALE ET ZOOLOGIE

Professeur MENAN Eby Ignace H. Professeur Titulaire

Chef de Département

Professeurs YAVO William Professeur Titulaire

BARRO KIKI Pulchérie Maître de Conférences Agrégé

DJOHAN Vincent Maître de Conférences Agrégé

KASSI Kondo Fulgence Maître de Conférences Agrégé

Docteurs ANGORA Kpongbo Etienne Maître-Assistant

KONATE Abibatou Maître-Assistante

VANGA-BOSSON Henriette Maître-Assistante

MIEZAN Jean Sébastien Assistant

TANOH-BEDIA Valérie Assistante

VII. PHARMACIE GALENIQUE, BIOPHARMACIE, COSMETOLOGIE, GESTION ET LEGISLATION PHARMACEUTIQUE

Professeur KOFFI Armand A. Maître de Conférences Agrégé

Chef de Département

Professeurs AMARI Antoine Serge G. Maître de Conférences Agrégé

DALLY Laba Ismaël Maître de Conférences Agrégé

Docteurs AKA ANY-GRAH Armelle A.S. Maître-Assistante

N'GUESSAN Alain Maître-Assistant

ALLOUKOU-BOKA P.-Mireille Assistante

LIA Gnahoré José Arthur Attaché de recherche

N'GUESSAN Kakwokpo Clémence Assistante

N'GUESSAN-AMONKOU A. Cynthia Assistante

TUO-KOUASSI Awa Assistante

VIII. PHARMACOGNOSIE, BOTANIQUE, BIOLOGIE VEGETALE, CRYPTOGAMIE

Professeur KONE BAMBA Diénéba Professeur Titulaire

Chef de Département

Professeur FOFIE N'Guessan Bra Yvette Maître de Conférences Agrégé

Docteurs ADJOUGOUA Attoli Léopold Maître-Assistant

ADIKO N'dri Marcelline Chargée de recherche

AKOUBET-OUAYOGODE Aminata Assistante

ODOH Alida Edwige Assistante

IX. PHARMACOLOGIE, PHARMACIE CLINIQUE ET THERAPEUTIQUE ET PHYSIOLOGIE HUMAINE

Professeur ABROGOUA Danho Pascal Professeur Titulaire

Chef de Département

Professeurs KOUAKOU SIRANSY N'Doua G. Professeur Titulaire

IRIE N'GUESSAN Amenan G. Maître de Conférences Agrégé

Docteurs EFFO Kouakou Etienne Maître-Assistant

AMICHIA Attoumou M. Assistant

BROU N'Guessan Aimé Assistant

DJADJI Ayoman Thierry Lenoir Assistant

DOFFOU Oriadje Elisée Assistant

KAMENAN Boua Alexis Assistant

KOUAKOU Sylvain Landry Assistant

TE BONLE Leynouin Franck-Olivier Assistant

X. PHYSIQUE, BIOPHYSIQUE, MATHEMATIQUES, STATISTIQUES ET INFORMATIQUE

Professeur GBASSI Komenan Gildas Professeur Titulaire

Chef de Département

Docteur KONAN Jean-Fréjus Assistant

TIADE-TRA BI Marie Laure Assistante

XI. SANTE PUBLIQUE, HYDROLOGIE ET TOXICOLOGIE

Professeur KOUADIO Kouakou Luc Professeur Titulaire

Chef de département

Professeurs DANO Djédjé Sébastien Professeur Titulaire

DIAKITE Aissata Maître de Conférences Agrégé

KOUAKOU-SACKOU J. Maître de Conférences Agrégé

MANDA Pierre Maître de Conférences Agrégé

OGA Agbaya Stéphane Maître de Conférences Agrégé

SANGARE-TIGORI Béatrice Maître de Conférences Agrégé

Docteurs CLAON Jean Stéphane Maître-Assistant

HOUNSA-ALLA Annita Emeline Maître-Assistante

KONAN-ATTIA Akissi Régine Maître-Assistante

OUATTARA N'gnôh Djénéba Chargée de Recherche

BEDIAKON-GOKPEYA Mariette Assistante

KOFFI Kouamé Assistant

KOUAME Jérome Assistant

N'GBE Jean Verdier Assistant

DÉDICACES

À l'Eternel DIEU

Tu n'as cessé

De me surprendre agréablement

Me faisant aller

De victoire en victoire

Tout ce que j'ai

Et tout ce que je peux espérer avoir

je Te le dois

Que la gloire Te revienne!

Amen

À MON CHER PÈRE FEU KOFFI N'ZUE

Je ne pouvais espérer meilleur appui et meilleur soutien que ce dont tu m'as gratifié toute ma vie.

Ce travail est le fruit de tous tes sacrifices pour moi et je ne peux que te le dédier Que Dieu te bénisse pour tout.

À MA CHERE MÈRE KONAN AFFOUE

Chère maman que de sacrifices pour moi ton fils. Tu t'es toujours montrée disponible à toutes mes demandes. Les mots ne sauraient exprimer exactement mes sentiments à ton égard. Malgré les difficultés, ton amour et ton soutien ne m'ont jamais manqué. Tu es pour moi le symbole de la patience et de la tolérance. Retrouve à travers ce travail la lumière et le calme auquel tu t'attendais depuis longtemps.

Que Dieu te garde longtemps à nos côtés.

À MA GRANDE SOEUR AMANY AHOU ARMANDE

Chère sœur, je te remercie pour ton indéfectible soutien et la protection que tu m'as toujours apportée. Je t'en serai toujours reconnaissant

À MES TRES CHERS BEAUX-PARENTS,

Pour l'amour que vous me procurez combien de fois gagné par la tristesse, votre sourire candide m'a communiqué votre joie, me donnant la force de continuer. Vous êtes mon plus grand bonheur et ma plus grande joie. Je vous aime d'un amour inconditionnel.

À MA CHERE ET TENDRE EPOUSE MADAME KOFFI NÉE YAO NADEGE

Merci ma bien aimée pour ton soutien.je ne pourrai te rendre à la juste valeur tes efforts, car DIEU seul te récompensera.

À MON ONCLE KOUAME KOUAKOU VINCENT DEPAUL

Merci pour tout. Ce travail est le vôtre. Vous qui n'avez ménagé aucun effort pour m'aider à atteindre le niveau que j'ai aujourd'hui.

À MES FRÈRES ET SŒURS,

Daniel, Danielle, Rosette, Ezéchiel, Viviane, André, Marceline, Herman, Ariane Sylvain, Amos, Olivier, Baudouin. Puisse le Tout Puissant vous combler de tous vos désirs. Infiniment merci à vous de me supporter.

À MES ONCLES ET TANTES

Vous m'avez donné le courage d'avancer et de réussir dans la vie.

Je prie pour que le Seigneur vous accorde santé, longue vie et bonheur. Je vous dédie, à vous aussi, le fruit de ce travail, avec toute ma reconnaissance.

À MES MEILLEURS AMIS,

Ceux que je considère comme des frères, à vous: Kouadio Narcisse, N'guessan Gérard, N'guessan Joseph, N'dri Philipe et Foua bi Francis, je bénis le Seigneur pour que cette amitié dure toute la vie et le prie pour qu'il ne cesse de vous bénir. Je vous dédie ce travail, fruit de votre soutien.

À MON GROUPE D'ETUDE

Boka Arthur, Kouakou Raymond, Akaffou Thibault, merci pour ces moments de partage. Que le seigneur vous accorde santé, prospérité et bonheur.

À MES AMIS DE LA TRENTE QUATRIÈME (34ème) PROMOTION DE LA FACULTE,

Je vous dédie ce travail en souvenir des bons moments passés ensemble.

À TOUS CEUX QUI ME SONT CHERS ET QUE JE N'AI PU CITER

Que ce travail soit pour vous un vrai motif de fierté.

Que Dieu vous bénisse.

REMERCIEMENTS

AU DR TRE EMMANNUELLE BOLOU (Pharmivoire Nouvelle)

Pour sa précieuse contribution à la réalisation de ce travail

À TOUT LE PERSONNEL DE LA PHARMACIE SAINT RAPHAEL ARCHANGE (Palmeraie),

Avec à sa tête le DR GABLA LILIANE, je vous dis merci pour tout ce que vous m'avez appris et que vous continuez de m'apprendre.

À TOUT LE PERSONNEL DE LA GRANDE PHARMACIE DU DOKUI,

Avec à sa tête le DR DOUMBIA, je vous dis merci pour tout ce que vous m'avez appris et que vous continuez de m'apprendre.

À TOUS LES ENSEIGNANTS DE L'UFR DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES

Merci pour m'avoir fait bénéficier de votre savoir durant toutes ces années

Aux agents du laboratoire de galénique Mr Dje Bi et Mr Adi, merci pour vos prières, vos conseils et surtout vos encouragements.

Au personnel de l'administration de l'UFR sciences pharmaceutiques et biologiques d'Abidjan,

Au personnel de la bibliothèque de l'UFR sciences pharmaceutiques et biologiques d'Abidjan,

Mes sincères remerciements!

À NOS MAÎTRES ET JUGES

À NOTRE MAÎTRE ET PRÉSIDENT DE JURY Monsieur le Professeur MALAN KLA ANGLADE

- Professeur Titulaire de chimie analytique à l'UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques
- Doyen honoraire à l'UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques
- Directeur du Laboratoire National de la Santé Publique
- Responsable du Master de contrôle de qualité des médicaments, aliments, et produits cosmétiques
- Membre de l'Académie Nationale de Pharmacie de France ;
- ➤ Membre de l'Académie des Sciences, des Cultures, des Arts et de la Diaspora (ASCAD)
- Membre de la Société des Experts Chimistes de France ;
- > Officier dans l'ordre du mérite de l'enseignement Supérieur ;
- > Commandeur de l'ordre du merite de l'enseignement supérieur
- > Commandeur de l'ordre du merite de la fonction publique
- Chevalier dans l'ordre du merite de la Santé Publique
- > Expert de l'OMS.

Cher Maître.

Malgré vos charges, vous avez accepté spontanément de présider notre jury de thèse. Vous êtes un exemple et une source de motivation qui nous pousse à vouloir être des pharmaciens aussi brillants que vous. Nous avons eu la chance et le plaisir de profiter de vos enseignements limpides, ainsi que de vos conseils avisés. Nous en sommes à la fois honorés et reconnaissants. Qu'il nous soit permis de vous exprimer ici notre vive gratitude et notre profond respect.

Que la grâce de Dieu soit sur vous.

À NOTRE MAÎTRE ET DIRECTEUR DE THÈSE Monsieur le Professeur DALLY LABA ISMAËL

- Docteur en Sciences Pharmaceutiques de l'Université Félix Houphouët-Boigny d'Abidjan
- Maitre de Conférences Agrégé de Pharmacie galénique et Industrielle
- Pharmacien des Hôpitaux
- ➤ Chercheur au laboratoire de Pharmacie galénique et Législation pharmaceutique de l'UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de l'Université Félix Houphouët-Boigny d'Abidjan
- ➤ DEA de Conception, Réalisation et Evaluation de médicaments d'origine traditionnelle, option Pharmacotechnie
- DESS de Contrôle qualité des médicaments, aliments et produits cosmétiques
- Responsable des expertises Pharmacotechniques du Laboratoire de Contrôle des Médicaments du Laboratoire National de la Santé Publique d'Abidjan
- > Membre de la Société Ouest Africaine de Chimie (SOACHIM)
- ➤ Membre de la Société Pharmaceutique de Côte d'Ivoire (SOPHACI)
- > Membre de la Société Ouest Africaine de Pharmacie Galénique (SOAPGI)

Cher Maître,

Nous vous reconnaissons la gentillesse et la spontanéité avec lesquelles vous avez bien voulu diriger ce travail. Vous vous y êtes grandement impliqués par vos directives, vos remarques et suggestions.

Nous tenons à vous remercier aussi pour cette liberté que vous avez permis, votre manière de penser et de procéder, votre manière d'être, bref toute votre personnalité.

À NOTRE MAÎTRE ET JUGE Monsieur le Professeur OUASSA TIMOTHÉE

- ➤ Maître de conférences agrégé au département de Bactériologie-Virologie UFR SPB,
- Responsable des unités de Bactériologie et de mycobactériologie du Centre de Diagnostic et de Recherche sur le SIDA (CeDRes),
- ➤ Membre de l'American Society for Microbiology (ASM),
- Membre de l'European Respiratory Society (ERS),
- Membre de l'Observatoire pour la Surveillance de la Résistance des Microorganismes en Côte d'Ivoire (ORMICI),
- Membre du Côte d'Ivoire's Fulbright Alumni Association (CIFA),
- > Ancien interne des hôpitaux d'Abidjan.

Cher Maître,

Votre rigueur et votre amour pour le travail bien fait nous ont amené à porter notre choix sur votre personne.

Merci pour la promptitude avec laquelle vous avez accepté de juger notre travail. Cela confirme votre humilité, votre disponibilité et votre simplicité.

Veuillez trouver ici l'expression de notre reconnaissance et de notre profond respect.

À NOTRE MAÎTRE ET JUGE Monsieur le Docteur LIA GNAHORE JOSÉ ARTHUR

- > Pharmacien, Attaché de recherche
- > Diplôme d'Etat de Docteur en pharmacie
- ➤ Master en Sciences, Technologie, Santé à finalité recherche et professionnelle, <u>Spécialité</u>: formulation et production de médicaments et autre produits de santé. <u>Parcours</u>: Systèmes dispersés d'intérêt industriel
- > Diplôme d'Études Approfondies de Conception Réalisation et Évaluation de médicaments issus de la pharmacopée traditionnelle
- Ancien pharmacien responsable de production à Pharmivoire Nouvelle
- > Ancien pharmacien responsable de laboratoire S-Terre.
- Membre de la Société Ouest Africaine de Pharmacie Galénique (SOAPGI)

Cher Maître,

Votre accord spontané à juger ce modeste travail nous ravi. Nous sommes honoré de vous compter parmi les membres de notre jury. Votre amabilité, votre disponibilité et votre rigueur dans le travail méritent toute admiration.

Veuillez recevoir, cher maitre, l'expression de notre sincère gratitude.

SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS	2
LISTE DES TABLEAUX	3
LISTE DES FIGURES	4
INTRODUCTION	5
PREMIERE PARTIE : REVUE DE LA LITTERATURE	9
CHAPITRE I : GENERALITES SUR LES SOLUTES INJECTABLES	10
CHAPITRE II : GENERALITES SUR LA GELATINE	18
CHAPITRE III : FORMULATION INJECTABLE	32
CHAPITRE IV : CONTRÔLES DES PRÉPARATIONS INJECTABLES	40
DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE	51
CHAPITRE I : MATÉRIEL ET MÉTHODES	52
CHAPITRE II : RÉSULTATS	64
CHAPITRE III : DISCUSSION	71
CONCLUSION	76
RÉFÉRENCES	80
ANNEXES	86

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AMM : Autorisation de mise sur le marché

BPF : Bonnes pratiques de fabrication

BPP : Bonnes pratiques de préparation

CaCl₂ : Chlorure de calcium

Da : Dalton

GFM : Gélatine fluide modifiée

HCl : Chlorure d'hydrogène

HEA : Hydroxyéthylamidons

IM : Intra musculaire

IV : Intra veineuse

KCl : Chlorure de potassium

LAL : Limulus Amebocyte lysat

Mosmol : Milli-osmole

NaCl : Chlorure de sodium

PA : Principe actif

PEG : Polyéthylène glycol

PM : Poids moléculaire

PVC : Polychlorure de vinyle

RL : Ringer lactate

SC : Sous cutané

SSH : Sérum salé hypertonique

T° : Température

UFR : Unité de formation et de recherche

VVC : Voie veineuse centrale

VVP : Voie veineuse périphérique

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Indications des solutés massifs
Tableau II: Comparaison des compositions types en acides aminés des
gélatines de type A, de type B et du collagène; exprimées en résidus
pour 1000 résidus d'acides aminés25
Tableau III: Propriétés physiques de la gélatine en fonction de
1'origine
Tableau IV: Opérations réalisables suivant les classes d'atmosphère
contrôlée38
Tableau V: Micro-organismes d'essai recommandés par la
Pharmacopée européenne46
Tableau VI: Formule 1 méthodes d'ajout des excipients57
Tableau VII: Formule 2 méthodes d'ajout des excipients57
Tableau VIII: Formule 3 méthodes d'ajout des excipients
Tableau IX: Formule 4 méthodes d'ajout des excipients59
Tableau X: Contrôles des préparations65
Tableau XI: Mesure du pH66
Tableau XII: Test d'apyrogénicité67
Tableau XIII: Contrôles des préparations GFM
Tableau XIV: Détermination du pH de la GFM69

LISTE DES FIGURES

Figure 1: La triple hélice de collagène Erreur! Signet non défini.
Figure 2: Procédé de fabrication de la gélatine23
Figure 3: Structure moléculaire de la gélatine24
Figure 4: Représentation du phénomène d'osmose48
Figure 5: Effet de l'osmolarité d'une solution sur le volume cellulaire
50
Figure 6 : Les différentes étapes du développement d'un médicament
55
Figure 7 : Procédé de formulation d'un soluté injectable62
Figure 8 : Evolution de la température après administration des
préparations72

INTRODUCTION

Le développement d'un médicament est l'ensemble des travaux de la mise au point d'une molécule candidate pour la transformer en un médicament consommable et commercialisable. Ce développement se déroule selon des étapes bien définies que sont la pré-formulation, la formulation et l'optimisation [53].

La pré-formulation correspond à l'étape de recherche et de développement des conditions nécessaires pour conduire une bonne formulation. Elle est définie comme étant l'étape de développement qui consiste à optimiser la matière première (principes actifs ou excipients) à travers la détermination des propriétés physiques et chimiques en vue de la formulation d'une forme plus stable, efficace et sure [54].

La formulation est la réalisation d'une succession de choix selon un raisonnement scientifique, sachant que les différents choix concernent le principe actif, les excipients, ainsi que le procédé de fabrication pour aboutir à la formule adéquate [59].

L'optimisation de la formulation quant à elle, est l'organisation et la planification de la démarche expérimentale pour aboutir à la formule optimale [47].

Ces différentes étapes permettent de garantir au patient un produit de qualité conforme aux règles de bonnes pratiques de fabrication [51].

Les formes injectables sont des médicaments administrés par voie parentérale et d'usage essentiellement hospitalier. Les solutés massifs qui font partie des formes injectables ont été développés à partir de 1831 d'après les travaux de Thomas Latta [16]. Ils sont en outre devenus des préparations pour perfusion intraveineuse dans la Pharmacopée Européenne 3^{ième} édition et sont des médicaments considérés comme simples. Ainsi, les solutés massifs sont utilisés

dans les soins et la prise en charge des patients sont d'une importance primordiale (voire vitale) [37].

Ces formes pharmaceutiques de remplissage se répartissent en deux (02) grandes catégories, que sont les cristalloïdes et les colloïdes, parmi lesquels se trouvent les solutions synthétiques désignées sous le nom de "soluté de substitution du plasma sanguin".

Les substituts du plasma sont actuellement très utilisés soit sous forme de perfusion lente en cours d'intervention chirurgicale afin de compenser les pertes liquidiennes d'exsudation, soit en quantité plus importante chaque fois qu'une hémorragie grave ne peut être compensée par un apport de sang ou de plasma [5].

Ces substituts du plasma peuvent être produits à partir de la gélatine qui est un mélange de protéines obtenu par hydrolyse partielle du collagène extrait de la peau, des os, et des cartilages d'animaux (principalement porc, bœuf, poisson). Ses nombreuses propriétés pour l'organisme humain justifient son utilisation croissante qui a suscité de nombreuses recherches en industrie pharmaceutique dont celle de la gélatine fluide modifiée (GFM) utilisée comme substitut du plasma depuis 1954 [20,58].

Selon Agence national de sécurités du médicament et des produits de santé, en France en 2013 les formes injectables représentaient 63% des formes pharmaceutiques consommées à l'hôpital [3].

Benjilali en 2013 au Maroc a dans une étude montré que les formes injectables représentent 51% des formes pharmaceutiques commandé soit 80% du budget des médicaments à l'hôpital d'Alghassani [6].

Les formes injectables ont donc un impact important en matière de sécurité sanitaire.

En Côte d'Ivoire, la production des solutés massifs injectables couvre 25% des besoins nationaux du secteur privé mais ne couvre que très partiellement la demande du secteur public. Les coûts de transport à l'importation des solutés sont élevés, alors que pour le Ministère de la santé, l'approvisionnement national du marché en solutés massifs à des coûts accessibles dans les établissements sanitaires publics et privés reste une priorité. Une production locale de gélatine fluide modifiée contribuerait donc à les rendre accessible tant physiquement qu'économiquement [4].

C'est ainsi que nous nous sommes proposés comme objectif général dans notre étude, de développer une formulation de soluté injectable à libération immédiate à base de gélatine fluide modifiée.

Les objectifs spécifiques étaient les suivants :

- Préparer la gélatine fluide modifiée
- Formuler des solutés de gélatine fluide modifiée
- Contrôler la qualité des solutés de gélatine fluide modifiée formulés.

La première partie de notre travail va porter sur des généralités concernant les solutés injectables, la gélatine, la formulation d'une préparation injectable, et les contrôles des préparations injectables. La deuxième partie qui est expérimentale, présentera le matériel et les méthodes utilisés, les résultats et leurs interprétations, puis les discussions.

Nous terminerons par une conclusion suivie de recommandations.

Première partie REVUE DE LA LITTÉRATURE

Chapitre I GÉNÉRALITÉS SUR SOLUTÉS INJECTABLES

I. Définitions

Les solutés injectables sont des solutions aqueuses ou émulsions en phase externe aqueuse, stériles, exemptes de pyrogènes et normalement isotoniques au sang. Elles sont principalement destinées à être administrées en grand volume et ne sont pas additionnées de conservateur antimicrobien [16].

Elles sont formulées par des méthodes visant à assurer :

- leur limpidité (qui doivent pouvoir être vérifiée par transparence au niveau du récipient)
- leur stérilité (absence de microorganismes)
- leur apyrogénicité (absence de substances susceptibles de provoquer par injection une brusque élévation de la température (T°), substance produite par des bactéries (endotoxines), des champignons, des levures), l'absence de contaminants.
- leur pH aussi proche que possible de la neutralité et une pression osmotique qui doit se rapprocher de celle du plasma (isotonicité) [26]. Les préparations pour usage parentéral peuvent se présenter sous forme de préparation injectable, de préparation pour perfusion, préparation à diluer pour injection ou perfusion et de poudre pour injection ou perfusion [12].

II. Différents types de solutés injectables

II.1. <u>Les cristalloïdes</u>

Les cristalloïdes sont des solutions aqueuses de substances ionisées de haut poids moléculaire avec ou sans glucose et utilisés pour le remplissage vasculaire. Les cristalloïdes se répartissent entre les compartiments cellulaires et extracellulaires selon leur osmolarité :

- Si leur osmolarité est inférieure à 300 mosmol.kg⁻¹, ils se répartissent dans les deux secteurs extracellulaires et intracellulaires.
- Si l'osmolarité est égale à 300 mosmol/kg, ils ne se répartissent que dans le secteur extracellulaire sans modifier l'espace cellulaire.

Si l'osmolarité est supérieure à 300 mosmol/kg, la répartition se fait exclusivement dans le secteur extracellulaire au dépend du secteur intracellulaire puisqu'il y a une réduction de ce secteur avec appel d'eau vers l'extérieur des cellules, le gradient osmotique étant corrigé par ce transfert d'eau [26].

Exemples de cristalloïdes

Le Ringer lactate et le sérum salé isotonique (0,9 g/l de NaCl) : Leur volume de diffusion est l'ensemble du compartiment extracellulaire, ce qui explique leur faible pouvoir d'expansion volémique. En moins d'une heure, 20 à 25% des volumes perfusés resteront dans le secteur vasculaire et 75 à 80% iront dans le secteur interstitiel [43]. Il semble cependant que cette diffusion extracellulaire soit ralentie chez le sujet hypovolémique. Néanmoins, en cas de pertes sanguines, le volume de cristalloïdes nécessaire au maintien de la volémie est très supérieur au volume à compenser. Le Ringer lactate est contre-indiqué en cas de traumatisme crânien ou médullaire grave en raison de son hypotonicité (risque d'œdème), d'insuffisance hépatique (risque d'acidose lactique) et d'hyperkaliémie.

Les solutés hypertoniques possèdent une osmolarité supérieure à celle du plasma (300 mosmol/kg) et leur espace de diffusion est limité au compartiment extracellulaire. Ces solutions peuvent être salées ou non [17]. Le chlorure de sodium hypertonique à 7,5% étant le soluté de référence (75 g/l de NaCl). Le pouvoir d'expansion immédiat du sérum salé hypertoniques à 7,5% est élevé (environ huit fois plus important que celui du sérum salé isotonique) mais est transitoire.

II.2. Les colloïdes

Les colloïdes sont des solutions aqueuses de substances ionisées de haut poids moléculaire avec ou sans glucose. Les colloïdes augmentent préférentiellement le volume du secteur vasculaire au moins pendant leur temps de présence dans ce secteur. Une augmentation pathologique de la perméabilité vasculaire modifie leur efficacité et leur durée d'action en facilitant le transfert extravasculaire des molécules contenues dans ces solutions [26].

La pression colloïde exercée par ces solutions est fonction du nombre de molécules ne franchissant pas la barrière capillaire, du fait de l'importance de leur taille (reflétée par le poids moléculaire). Leur efficacité dépend également de leur devenir métabolique et de l'élimination rénale. On distingue les colloïdes naturels (albumine) et les colloïdes de synthèse (dextrans, gélatines et hydroxyéthylamidons).

II.2.1. L'albumine

L'albumine est un colloïde naturel d'origine humaine (plasmatique) et présentée en solution à 4% ou à 20%. Son pouvoir d'expansion volémique est de 18 à 20 mL.g⁻¹. La solution à 4% possède une pression colloïde légèrement inférieure à celle du plasma et de ce fait, l'expansion volémique représente seulement 80% du volume d'albumine perfusé. La solution à 20%, en créant un transfert d'eau du secteur interstitiel vers le secteur vasculaire, détermine une expansion volémique égale à environ 4 fois le volume perfusé. Ainsi, 500 ml d'albumine à 4% ou 100 ml d'albumine à 20% entraîneront une augmentation du compartiment vasculaire identique de 400 ml [22].

La durée d'action des perfusions d'albumine est conditionnée par la perméabilité capillaire. Chez un sujet sain, le taux de transfert d'albumine à travers le capillaire vers le secteur interstitiel est de 5% par heure, mais il peut augmenter dans les états pathologiques induisant une réponse inflammatoire d'origine

systémique importante. Des recommandations pour la pratique clinique ont été précisées en 1997 [43].

La pasteurisation appliquée à l'albumine a été validée pour inactiver les virus enveloppés et non enveloppés potentiellement présents dans le plasma. L'albumine peut être prescrite en première intention, chez la femme enceinte, l'enfant, et en cas d'allergies aux colloïdes de synthèse.

II.2.2. Les dextrans

Les dextrans sont des polymères glucidiques d'origine bactérienne. En fonction de leur poids moléculaire (PM en kDa), on distingue les dextrans :

- -40 (PM = 40000 kDa),
- -60 (PM = 60000 kDa)
- 70 (PM = 70000 kDa)

Le pouvoir d'expansion volémique varie selon les solutions. Un gramme de dextran 40 retient 30 ml d'eau dans le compartiment intravasculaire contre environ 25 ml pour les dextrans 70.

La voie d'élimination principale est le rein par filtration glomérulaire, les voies secondaires sont lymphatique et digestive sous forme de sécrétions intestinales et pancréatiques. La durée d'action des dextrans est ainsi prolongée chez l'insuffisant rénal [43]. Ils améliorent la microcirculation par réduction de la viscosité sanguine, augmentation du temps de formation des rouleaux érythrocytaires et diminution de l'agrégation plaquettaire [17]. Ces solutés sont contre-indiqués chez la femme enceinte et sont à éviter si le patient présente des troubles de l'hémostase ou une thrombopénie. En raison de leurs effets secondaires potentiels et de la commercialisation d'autres colloïdes possédant un fort pouvoir d'expansion volémique, les dextrans ne sont guère utilisés.

II.2.3. Gélatines

Les gélatines sont des polypeptides d'origine animale. On distingue les gélatines fluides modifiées (Plasmion®, Gélofusine® et Plasmagel® contenant du calcium en plus grande quantité) et les gélatines à pont d'urée (Hæmacel®). Leur point de gélification se situe entre 0 et 4°C. Quelque soit la solution de gélatine, l'augmentation de la volémie est légèrement inférieure au volume perfusé, 20 à 30% passant rapidement dans le secteur interstitiel. L'élimination est essentiellement rénale par filtration [22]. Les effets secondaires sont dominés par le risque anaphylactique, risque plus fréquent avec les gélatines à pont d'urée [9].

II.2.4. <u>Hydroxyéthylamidons</u>

Les hydroxyéthylamidons (HEA) sont des polysaccharides naturels (extraits de l'amidon de maïs) dont les unités de glucose ont subi une hydroxyéthylation au niveau des atomes de carbone en position C2 et C6, retardant ainsi l'hydrolyse par l'α-amylase plasmatique et augmentant l'hydrophilie des molécules. La pharmacocinétique des HEA tient compte du poids moléculaire moyen (PMm), du taux de substitution molaire (TSM) qui reflète le taux d'hydroxyéthylation de la molécule et du rapport entre le taux d'hydroxyéthylation en C2 et C6 (rapport C2/C6). Ainsi, les molécules à TSM élevé (supérieur à 0,6) et à rapport C2/C6 supérieur à 8 ont un métabolisme ralenti et une durée de vie longue. Par contre, les solutions ayant un TSM inférieur à 0,5 et un ratio C2/C6 inférieur à 8 ont un métabolisme plus rapide et une durée de vie plus brève [11].

L'élimination des molécules PM inférieur à 50-60 kDa s'effectue rapidement par filtration rénale. Les molécules de PM élevé sont hydrolysées par l'α-amylase plasmatique en molécules de plus petites tailles qui sont ensuite éliminées lentement par le système réticulo-endothélial et par le rein.

Un gramme d'HEA retient environ 30 ml d'eau dans le compartiment vasculaire. Le pouvoir d'expansion volémique est de 100 à 140 % par rapport au volume perfusé [22]. Les effets secondaires sont dominés par les troubles de l'hémostase, ces effets étant plus fréquents et plus marqués avec les molécules de haut poids moléculaire.

III. Quelques indications des solutés injectables

Le choix entre cristalloïde et colloïde dépend principalement du contexte clinique, du pouvoir d'expansion volémique recherché et de la durée d'action du soluté. Le tableau ci-dessous (**tableau I**) donne quelques indications des solutés massifs.

Tableau I: Indications des solutés massifs [32]

Indication des solutés				
Contexte	Solutés	Adjuvants		
Hémorragie	 Si perte <20%: cristalloïde (RL) Si perte > 20% ou si PAM 80mmH: colloïde de synthèse, SSH-colloïdes 	Gestes d'hémostase locale -pantalon antichoc -dérivés sanguins -vasopresseur		
Déshydratation	Cristalloïdes Colloïdes de synthèse si collapsus			
Choc septique	Colloïdes (le plus souvent HEA)	Vasopresseur ; noradrénaline		
Choc anaphylactique	Cristalloïdes			
Vasoplegie (exemple d'intoxication médicamenteuse)	-cristalloïdes de synthèse			
Traumatisme crânien et/ou médullaire	-cristalloïdes -colloïdes de synthèse	Si hypotension persistante -dérivés sanguin		
Brûlures	-cristalloïdes			
Donneur d'organe	Colloïdes sauf dextran 40	Vasopresseurs		
Femme enceinte	-cristalloïdes -albumine si hypovolémie sévère colloïdes de synthèses contre indiqué			
Enfant (0 à 14 ans)	Cristalloïdes, colloïdes			

Chapitre II GÉNÉRALITÉS SUR LA GÉLATINE

I. Introduction

La gélatine est obtenue par dégradation du collagène qui est la protéine la plus répandue chez les mammifères. Le collagène est le constituant majeur des tissus conjonctifs et des matrices des os. On la retrouve également chez les poissons et les oiseaux. Nous développons, dans ce qui suit, quelques notions sur les propriétés structurales du collagène avant d'exposer les caractéristiques de la gélatine.

II. Le collagène

Représentant un tiers des protéines totales chez les mammifères, le collagène est une protéine fibrillaire, son rôle est primordial dans le développement des tissus. Il se présente sous la forme de fibres caractérisées par une forte résistance mécanique, protégeant ainsi les muscles contre de trop fortes tensions. La composition chimique du collagène varie avec son origine. Cependant, on retrouve chez toutes les espèces des similitudes qui expliquent sa fonction de tissu conjonctif et le maintien de sa structure tridimensionnelle. L'unité de base du collagène est le tropocollagène, triple hélice droite de 300 nm de longueur (**Figure 1**). Le tropocollagène comprend 3 chaînes polypeptidiques α de 100 000 g.mol⁻¹, organisées en hélice avec environ 3 acides aminés par tour.

Il existe plusieurs types de chaines α différants par leur composition en acides aminés dont les combinaisons sont à l'origine des différents types de collagènes.

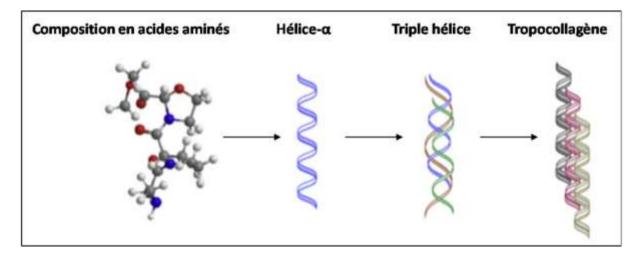


Figure 1: La triple hélice de collagène [34]

III. Du collagène à la gélatine

La conversion du collagène en gélatine se réalise en deux étapes: la solubilisation du collagène (soit en milieu acide, soit en milieu basique) et sa conversion en gélatine. Cette dernière est le résultat de la dénaturation de la structure tertiaire de la triple hélice de tropocollagène. Les chaînes se dissocient et adoptent alors une configuration pelote statique [34].

La fabrication industrielle de la gélatine consiste principalement à contrôler l'hydrolyse du collagène et à convertir le produit en un matériel soluble avec les propriétés physicochimiques souhaitées, telles que la force du gel, la viscosité et le point isoélectrique. Le procédé de fabrication de la gélatine est présenté dans la **Figure 2** et comprend les étapes ci-dessous.

III.1. Prétraitement

Les matières premières sont d'abord dégraissées et déminéralisées. Cette étape intervient surtout dans le cas de l'utilisation des os comme matière première. Elle concerne surtout la gélatine d'origine bovine, et parfois du porc sur lequels des tests (TSE) ont été realisés pour évaluer le rique de transmission de l'encephalopathie spogiforme bovine et le maladie de Creutzfeldt Jakob. Les os dégraissés sont trempés dans un bain de chlorure d'hydrogène (HCl) à 5% pendant plusieurs semaines afin de les débarrasser de leur support minéral et de former l'osséine. Ensuite une étape de gonflement et de ramollissement des peaux et d'osséine, dans un bain d'eau chaude, est nécessaire pour toutes les origines de gélatine comme étape préparatrice pour les procédés d'extraction.

III.2. <u>Traitement</u>

Il existe deux variantes majeures du prétraitement: le procédé alcalin (chaulage) et le procédé acide.

Procédé alcalin

Le tissu conjonctif des bovins étant fortement réticulé, les peaux ou os macèrent dans un lait de chaux pendant plusieurs semaines. Ce traitement permet de transformer délicatement la structure du collagène pour le rendre soluble dans l'eau chaude et pouvoir ainsi l'extraire du reste de la matière première. Les gélatines issues d'un traitement alcalin sont couramment désignées sous l'appellation « gélatine type B ». Ce procédé permet de fabriquer de la gélatine principalement utilisées dans l'industrie pharmaceutique (capsules), photographique (films) et alimentaire.

Procédé acide

Le tissu conjonctif des poissons et de la couenne de porc n'étant pas autant réticulé, un traitement d'une journée dans un bain acide est suffisant. Un lavage intensif permet ensuite de neutraliser la matière première avant d'en extraire le collagène. Les gélatines issues d'un traitement acide sont appelées « gélatine type A ».

En règle générale, la nature de la matière première du collagène (espèce animale) ainsi que les procédés de prétraitement et d'extraction, ont un effet majeur sur les propriétés physiques des films de gélatine [27].

III.3. <u>Extraction</u>

Le produit est alors mélangé à de l'eau chaude et extrait en plusieurs étapes. La température de l'eau est un paramètre qui détermine le pouvoir gélifiant de la gélatine. Plus la température de l'eau est basse, plus la force du gel de la gélatine est élevée.

L'étape d'extraction est suivie d'une étape de filtration afin de débarrasser de toutes traces des graisses et de fibrilles. Enfin des étapes de concentration et de séchage sont appliquées pour permettre la conservation de la gélatine.

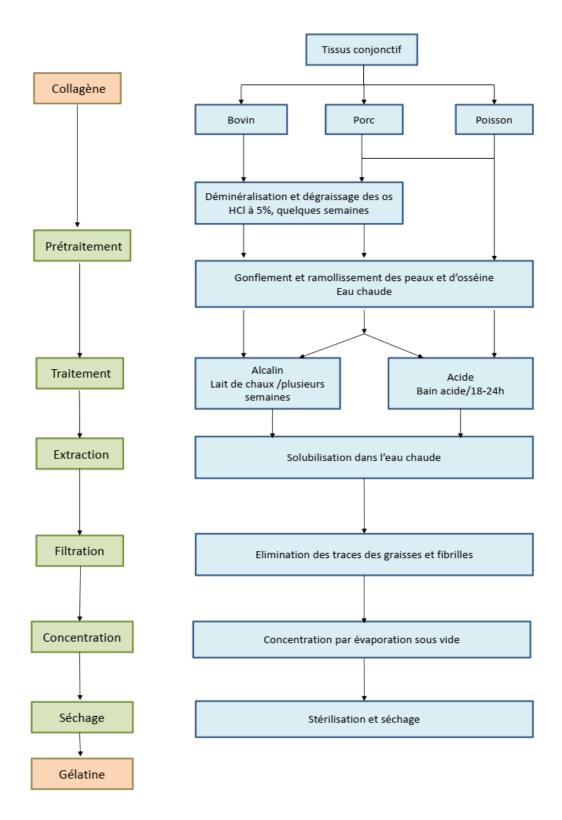


Figure 2: Procédé de fabrication de la gélatine [25]

IV. La gélatine

IV.1. Structure et composition

IV.1.1. <u>Structure primaire</u>

La structure primaire est semblable à celle du collagène.

Figure 3: Structure moléculaire de la gélatine [25]

L'analyse de la composition en acides aminés des gélatines en fonction du prétraitement (**Tableau II**) montre que, le prétraitement acide modifie peu la composition en acides aminés de la gélatine alors que le prétraitement alcalin transforme les résidus asparagine et glutamine en acides aspartique et glutamique. La gélatine est composée d'acides aminés hydrophobes (proline, leucine) et hydrophiles (sérine, arginine, etc.), qui lui confèrent un caractère amphiphile. La composition de la gélatine en acides aminés influe largement sur les propriétés mécaniques des films issus à partir ce bio polymère.

Tableau II: Comparaison des compositions types en acides aminés des gélatines de type A, de type B et du collagène; exprimées en résidus pour 1000 résidus d'acides aminés [48]

Classe d'acides aminés	Acides	Gélatine	Gélatine	Collagène
	aminés	type A	type B	(type I)
		(acide)	(alcalin)	
R hydrophobe	Alanine	112	117	114
	Hydroxyproline	91	93	104
	Isoleucine	10	11	11
	Leucine	24	2, .3	24
	Méthionine	3,6	3.9	5,7
	Phénylalanine	14	14	13
	proline	133	124	115
	tryptophane	-	-	-
	valine	26	22	22
R polaires non chargé	glycine	330	335	332
	asparagine	16	0	16
	Glutamine	25	0	25
	sérine	35	33	35
	Thréonine	18	18	17
	Cystéine	-	-	-
	Tyrosine	2,6	1,2	4,4
R chargé positivement	Arginine	49	48	51
	Histidine	4	4,2	4,4
	Hydroxylysine	6,4	4,3	5,4
	lysine	27	28	28
R chargé négativement	Acide asparatique	29	46	29
	Acide glutamique	48	72	48

IV.1.2. Structure secondaire

Selon l'origine de la matière première et le type de traitement qui lui est appliqué, la dénaturation du tropocollagène en gélatine peut fournir trois types de molécules. Les chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 2$, les chaînes β qui sont issues de l'association entre une chaîne $\alpha 1$ et une chaîne $\alpha 2$; et des chaînes γ , oligomères de 3 chaînes α . Les chaînes α , β et γ se différencient par leurs masses moléculaires moyennes respectives de 100 000, 200 000 et 300 000 g.mol⁻¹. Ceci donne lieu à un mélange de fragments de différents poids moléculaires.

Dans le cas des gélatines de type B, issues d'une hydrolyse alcaline, la majeur partie des fractions est située dans la zone de 100 000 g.mol⁻¹, correspondant ainsi à une majorité de chaines α. Dans le cas des gélatines de type A, issues de l'hydrolyse acide, la distribution en masses moléculaire est plus hétérogène. Ces différences sont plus imputables au prétraitement et à la source de collagène [48].

Comme la gélatine est un produit de dégradation du collagène, elle est par essence hétérogène et se compose donc d'une large gamme d'espèces moléculaires. D'une manière générale, les gélatines ont une masse moléculaire moyenne en nombre (Mn) comprise entre 50 et 100 000 g. mol⁻¹, et une masse moléculaire moyenne en masse (Mw) comprise entre 100 et 1 000 000 g. mol⁻¹, avec un indice de polydispersité Ip (Mw/Mn) souvent supérieur à 2, dû à l'hétérogénéité même de la gélatine [60].

IV.2. <u>La gélatine en solution</u>

La gélatine se présente sous forme de grains, qui une fois mis dans l'eau se mettent à gonfler. Pour que la gélatine soit solubilisée, il est nécessaire de la chauffer à des températures supérieures à 40°C.

Pour des températures supérieures à 40° C, la gélatine présente une structure dite désordonnée, dans laquelle on retrouve en solution, un mélange de différentes fractions α , β , γ en conformation de pelotes statiques. Le système ainsi obtenu est une solution de gélatine, on dira également que la gélatine est à l'état sol [48].

-Si l'on refroidit la solution de gélatine, un phénomène de gélification se met alors en place qui traduit une transition conformationnelle, c'est-à-dire le passage de l'état désordonné (pelote statistique) à l'état ordonné (hélice gauche). Il peut être suivi par la mesure du pouvoir rotatoire qui détecte l'apparition ou la disparition des hélices gauches.

IV.3. Propriétés physicochimique et caractéristiques de la gélatine

Le comportement physicochimique de la gélatine est principalement déterminé par la séquence en acides aminés de la molécule, par sa structure spatiale, sa distribution en masses moléculaires, ainsi que par les conditions du milieu (pH, force ionique et la réaction avec d'autres composés). Les propriétés de la gélatine peuvent être divisées en deux groupes. Le premier associé aux propriétés gélifiantes de la gélatine (force du gel, viscosité, etc.) et le second plutôt lié aux propriétés de surface de la gélatine.

- Les propriétés associées à la gélification sont principalement la formation du gel, la texturation, et l'effet épaississant, sont dépendantes de la viscosité, de la structure, de la masse moléculaire et de la température du système. Le refroidissement d'une solution de gélatine conduit à la formation d'un gel réversible, théoriquement illimité.
- Les propriétés de surface sont basées sur le fait que les chaînes latérales de la gélatine, comme celles de toutes les protéines, ont des groupements chargés des acides aminés hydrophiles ou hydrophobes. Les parties

hydrophiles et hydrophobes ont tendance à migrer vers la surface, ce qui réduit la tension superficielle de la solution aqueuse. Cette propriété est utilisée dans la production et la stabilisation des mousses et émulsions.

Les différentes propriétés technologiques de la gélatine dépendent fortement du type de gélatine et du procédé d'extraction. Le Tableau III, présente quelques propriétés physiques en fonction de l'origine de la gélatine.

Tableau III: Propriétés physiques de la gélatine en fonction de l'origine [31,50]

	Bovine	Porc	Poisson
	(type B)	(types A et B)	(type A)
Température de gélification (°C)	24-25	19-23,9	11-19
Point de fusion (°C)	29-33	31-36	14-27
Point isoélectrique (pH)	4-5	7-9	7-9
Force de gel (g)	210-239	216-295	56-323

V. Applications de la gélatine

La propriété gélifiante de la gélatine est la plus connue et la plus utilisée. Le marché de la gélatine est axé principalement vers les industires pharmaceutique, l'alimentaire et le photographique.

V.1. <u>Critères de choix de la gélatine en chimie pharmaceutique</u>

Quelques critères justifient le caractère presqu' indispensable de l'utilisation de la gélatine dans la composition des médicaments.

V.1.1. Pouvoir épaississant

La gélatine présente des propriétés épaississantes lorsque ses molécules ne peuvent pas s'associer fortement entre elle. Leur simple présence gêne la mobilité du liquide dans lequel elles sont dispersées et conduit à une augmentation de la viscosité de la solution. Ainsi ses molécules peu déformables rigides forment au repos des édifices stabilisés par des interactions faibles (liaisons hydrogène, forces de Van der Waals). En dessous de la concentration critique (0,8 %), la gélatine peut être utilisée comme agent épaississant [13].

V.1.2. Pouvoir filmogène

Lorsqu'une solution de gélatine est étalée en fine couche sur une surface et passe de l'état sol à l'état gel, elle forme un film. Cette propriété est mise à profit dans la fabrication de capsules dures et molles et en micro encapsulation des principes actifs [25].

V.1.3. Pouvoir émulsifiant

En tant que protéine, la gélatine s'adsorbe à l'interface des gouttelettes d'huiles et ainsi stabilise l'émulsion de type huile/eau. Cette stabilisation est accentuée par la propriété de gélification à l'interface. Ce pouvoir émulsifiant de la gélatine lui permet d'obtenir, par brassage, une dispersion homogène dans un mélange de constituants naturellement non miscibles [56].

V.1.4. Pouvoir foisonnant

Le pouvoir foisonnant de la gélatine permet d'augmenter, dans de fortes proportions, le volume d'un mélange d'ingrédients, à condition qu'il comporte de l'eau. La phase gazeuse ou les bulles d'air créées par battage du mélange sont

capturés dans des microbilles de gélatine et maintenues dans un état de dispersion stable [25].

V.1.5.Pouvoir stabilisant

La prise en gel permet la stabilisation et la protection des solutions colloïdales et des émulsions. Le pouvoir stabilisant de la gélatine est souvent supérieur à celui des autres polymères naturels [25].

V.1.6.Pouvoir moussant

La gélatine possède également des propriétés tensioactives qui vont la conduire à s'adsorber à l'interface gaz/ eau, puis à stabiliser la mousse par gélification en surface [25].

V.2. Applications pharmaceutiques

A cause de ses propriétés technologiques et biologiques, la gélatine est considérée comme un très bon excipient pharmaceutique pour la synthèse des capsules, des suppositoires, comme épaississant pour les formes liquides, comme agent collant pour l'augmentation de l'adhésion et de la viscosité, pour l'enrobage des tablettes en combinaison avec les sucres, comme excipient pour les préparations dentaires, dans la préparation des gels de protection des membranes de la muqueuse buccale, pour l'encapsulation des vitamines, pour la synthèse industrielle des éponges hémostatiques [51] et grâce à sa biodégradabilité et sa biocompatibilité avec les milieux physiologiques. Elle peut être utilisée en cas d'urgence et en opérations chirurgicales pour la préparation du sérum sanguin et elle peut être utilisée aussi en photographie médicale (scanner). Jusqu'à présent aucun bio polymère qui n'a remplacé la gélatine dans ses applications pharmaceutiques et médicamenteuses.

Exemples d'application

V.2.1. Les capsules de gélatine

Presque 90% de la gélatine pharmaceutique est dirigé vers la fabrication des capsules et des gélules. D'une part, elle protège les médicaments des effets néfastes de la lumière et de l'oxygène atmosphérique, la contamination et le développement microbien [25]. D'autre part, la gélatine permet de lier les principes actifs du médicament et de prolonger leur durée de conservation. Grâce à une sélection et un dosage rigoureux, la gélatine peut même contrôler la vitesse de libération des principes actifs, soit en l'accélérant, soit en la ralentissant (effet retard) [29,38].

V.2.2. <u>Les substituants du plasma</u>

Les substituants du plasma ont été utilisés en urgence médicale pour le remplacement du sang perdu, jusqu'à ce que le corps puisse lui-même régénérer le sang. Cette gélatine utilisée est de bloom élevé, d'un poids moléculaire de 160 à 180000 g.mol⁻¹. Elle subit un traitement thermique, puis plusieurs modifications en utilisant différents réactifs chimiques comme le glyoxal qui réagit avec l'amine terminale de la lysine, l'acide succinique anhydride qui conduit à la formation de l'acide carboxylique des amides par la réaction du groupement amino de la lysine avec les succinates, et le phényldiisocyanate suite à une réticulation des peptides avec la formation des structures uréiques [33,55].

Chapitre III FORMULATION D'UNE PREPARATION INJECTABLE

I. Définitions des préparations parentérales

Les préparations parentérales sont des préparations stériles destinées à être injectées, perfusées ou implantées dans le corps humain ou animal. Elles sont préparées par des méthodes visant à assurer leur stérilité et à empêcher l'introduction de contaminants, la présence de pyrogènes et la croissance de micro-organismes. Elles peuvent nécessiter l'emploi d'excipients, par exemple pour assurer l'isotonie au sang, ajuster le pH, augmenter la solubilité, permettre la conservation d'un principe actif, assurer une action antimicrobienne. Les récipients doivent être constitués, dans la mesure du possible, d'un matériau suffisamment transparent pour permettre la vérification visuelle de l'aspect du contenu et doivent répondre aux exigences de la pharmacopée [33].

Plusieurs catégories de préparations parentérales peuvent être distinguées :

- les préparations injectables,
- les préparations pour perfusion,
- les préparations à diluer pour injection ou pour perfusion,
- les poudres pour injection ou pour perfusion,
- les gels injectables,
- les implants.

I.1. Les préparations injectables

Les préparations injectables sont des solutions, émulsions ou dispersions de principes actifs dans de l'eau ou un liquide non aqueux, ou un mélange des deux. Les préparations injectables sont en général unidoses et le volume du contenu doit être tel qu'il permette le prélèvement de la dose nominale par une technique normale. Lorsqu'il est nécessaire de présenter une préparation parentérale dans des récipients multi doses ils doivent contenir un ou plusieurs

conservateurs antimicrobiens, dont l'efficacité doit être démontrée, choisis de manière à couvrir un large spectre antimicrobien, à moins que la préparation ait des propriétés antimicrobiennes adéquates. Les précautions à prendre pour l'administration et pour la conservation entre les prélèvements doivent être précisées [33].

I.2. Les préparations pour perfusion

Les préparations pour perfusion sont des solutions aqueuses ou émulsions en phase aqueuse externe stériles, normalement isotoniques au sang. Elles sont principalement destinées à être administrées en grand volume [33].

I.3. Les préparations à diluer pour injection ou pour perfusion

Les préparations à diluer pour injection ou perfusion sont des solutions stériles destinées à être injectées ou administrées par perfusion après dilution. Elles sont diluées au volume prescrit avec un liquide spécifié, avant l'administration [33].

I.4. Les poudres pour injection ou pour perfusion

Les poudres pour injection ou perfusion sont des substances solides stériles, réparties dans leurs récipients définitifs ; elles donnent rapidement, après agitation avec le volume prescrit d'un liquide stérile spécifié, une solution limpide ou une suspension uniforme. Les lyophilisats pour usage parentéral sont classés dans cette catégorie. Après dilution, ces deux dernières catégories doivent répondre aux exigences des préparations injectables ou des préparations pour perfusion intraveineuse [33].

I.5. Les gels injectables

Les gels sont des préparations dont la viscosité permet de garantir une libération modifiée des substances actives au lieu d'injection [33].

I.6. Les implants

Les implants sont des préparations solides stériles d'une taille et d'une forme appropriées à l'implantation parentérale. Ils assurent la libération des principes actifs sur une période étendue. Ils sont conditionnés en récipients stériles individuels [33].

II. Les voies d'administration

Les trois principales voies d'introduction des préparations injectables sont la voie sous-cutanée (SC), la voie intraveineuse (IV) et la voie intramusculaire (IM). Les autres voies sont moins fréquemment utilisées : voie intradermique, voie intrarachidienne (surtout péridurale), voie intra-artérielle, voie intracardiaque, voie intraoculaire [36,55].

III. Propriétés des préparations parentérales

Les préparations injectables étant destinées à franchir à la suite d'une effraction les barrières protectrices que constituent la peau et les muqueuses, elles doivent répondre à un certain nombre d'exigences. Les principaux contrôles concernent la limpidité pour les solutions, le pH qui doit être aussi voisin que possible de la neutralité, la pression osmotique qui doit se rapprocher de celle du plasma, la recherche des substances pyrogènes et enfin la stérilité qui concerne toutes les préparations parentérales. Ces exigences ne s'appliquent pas intégralement aux produits dérivés du sang humain, aux préparations immunologiques et aux préparations radiopharmaceutiques [33].

IV. Qualité des préparations injectables

IV.1. Qualités obligatoires

- La stérilité: une préparation injectable ne doit pas contenir de microorganisme vivant qui provoquerait une infection lors de l'injection.
- **L'absence de pyrogène** : une préparation injectable ne doit pas contenir de substance pyrogène qui provoquerait des excès de fièvre.
- L'aspect macroscopique correct : les solutions doivent être limpides et ne pas renfermer de particules visibles à l'œil nu. Les émulsions doivent avoir un aspect homogène et ne pas présenter de séparation de phase. Les suspensions peuvent présenter une sédimentation mais une légère agitation doit redonner une suspension suffisamment stable pour permettre des prélèvements homogènes [31].

IV.2. Qualités facultatives

L'isotonie : une préparation injectable doit avoir une pression osmotique aussi proche que possible de celle du sang afin de ne pas risquer de détruire les hématies. La pression osmotique dépend de la quantité de produit dissous dans l'eau. L'isotonie est surtout importante pour les solutés massifs. En cas d'hypertonie, il faudra faire une injection lente, en cas d'hypotonie il faudra faire une injection très lente.

V. Procédé de fabrication des préparations injectables

Des précautions particulières doivent être prises lors de la fabrication des préparations injectables, des dispositions plus strictes que pour les autres formes. Ces précautions concernent : les locaux, le personnel, les matières premières, les matériaux de conditionnement.

V.1. Les locaux

Les bonnes pratiques de fabrication (BPF) et bonnes pratiques de préparation (BPP) définissent quatre classes de zones d'atmosphère contrôlés où sont fabriqués de médicaments stériles :

- > classe A : les points où sont réalisées des opérations à haut risque.
- > classe B : dans le cas d'opérations de préparation et de remplissage aseptiques, environnement immédiat d'une zone de travail de classe A
- ➤ classes C et D : zones à atmosphère contrôlé destinées aux étapes moins critiques de la fabrication des médicaments stériles, ce sont des enceintes stériles ou des salles blanches : celles-ci sont des salles stériles dans lesquelles circule un air stérilisé par filtration, possédant une humidité et une température confortables pour les manipulateurs, à flux vertical ou horizontal. Ces salles doivent être en surpression par rapport à l'extérieur.

A l'entrée de ces salles, comme à celles des gaines où s'opère la filtration de l'air, sont disposées des baguettes de lumière ultraviolette germicide à titre de précaution supplémentaire [33].

Les techniciens qui manipulent à l'intérieur de ces salles doivent porter des blouses de protection stériles. Leur tête et leurs chaussures doivent être recouvertes également. Le **tableau IV** montre les opérations réalisables suivant les classes d'atmosphère contrôlée.

<u>Tableau IV</u>: Opérations réalisables suivant les classes d'atmosphère contrôlée [33].

Classes	Opérations sur des produits stérilisés dans leur récipient final	
A	Remplissage de produits, si l'opération présente des risques inhabituels	
С	Préparation de solutions, si l'opération présente des risques inhabituels.	
D	Préparation de solutions et d'accessoires aux fins de remplissage	
Classe	Opérations sur des préparations aseptiques	
A	Préparation et remplissage aseptiques	
C	Préparation de solutions destinées à être filtrées	
D	Manipulation d'accessoires après nettoyage	

Dans tous les cas, la préparation des produits destinés à être stérilisés doit être réalisée en atmosphère classée. Tous les liquides subissent une succession de filtrations clarifiantes puis stérilisante même en cas de stérilisation dans leur récipient final.

V.2. <u>Le personnel</u>

Le personnel doit être correctement formé, suivi afin de s'assurer régulièrement de sa qualification et de sa motivation. Son comportement dans l'atelier, ne doit entraîner aucun risque de contamination pour les produits [33].

V.3. <u>Techniques de fabrication des préparations injectables</u>

Les différentes étapes de la fabrication varient en fonction du type de préparation injectable à réaliser. Les solutions peuvent être stérilisées dans leur récipient final. Ainsi la stérilisation dans le récipient final est la plus utilisée pour les solutions toute fois que le ou les principes actifs sont stables en solution et à la chaleur.

V.4. Conditionnement des préparations injectables

C'est essentiellement le verre qui est utilisé pour la confection des flacons et des ampoules pour ses qualités de transparence, de dureté et de stabilité. Les verres de type I et II sont utilisés pour contenir les préparations injectables aqueuses. Le verre de type III est réservé aux préparations à solvant non aqueux ou sert à contenir les poudres pour préparations injectables qui seront mises en solution ou en suspension au moment de l'emploi.

Les matières plastiques, souples et plus légères sont de plus en plus utilisées dans le conditionnement des préparations injectables. Les poches en PVC ont supplanté les flacons en verre pour perfusion. Les seringues et cartouches pré remplies sont souvent en matière plastique.

Chapitre IV CONTRÔLES DES PRÉPARATIONS INJECTABLES

I. Introduction

Les contrôles font partie des BPF et BPP. Ils garantissent que les analyses nécessaires et appropriées ont réellement été effectuées pour que toutes les matières premières, tous les articles de conditionnement et toutes les préparations soient libérés pour l'utilisation dès lors que leur qualité a été jugée satisfaisante.

II. Limpidité

La limpidité a deux aspects principaux :

D'une part, les solutés injectables ne doivent pas contenir des particules en suspension. Celles-ci peuvent être des débris de verre, des particules charbonneuses, des fibres de filtres, des graisses et des microorganismes. Une opération de filtration bien conduite permet d'éliminer les plus grosses. S'il en reste, à condition qu'elles ne soient pas en trop grande quantité et qu'il ne s'agisse pas de particules en verre acérées, il n'y a pas de danger. D'autre part, les préparations injectables ne doivent pas voir leur aspect initial modifié au cours du temps ; ni apparition d'un trouble ni changement de couleur.

* Méthodes de contrôle de la limpidité

Le contrôle optique d'une préparation injectable comprend d'une part le contrôle de son aspect, de sa coloration en particulier, et d'autre part le contrôle de sa limpidité. Seul est exigé actuellement un examen visuel dans les meilleures conditions d'observation, ce qui signifie que la solution à examiner doit être éclairée de telle sorte qu'il y ait une différence de brillance suffisante d'une part entre les particules en suspension et la solution et d'autre part entre les particules et le fond sur lequel sont observées les ampoules ou flacons. Ceci doit être

réalisé en évitant l'éblouissement de l'observateur. L'éclairage est placé derrière une plaque de verre dépolie qui forme un fond sur lequel se détachent les particules plus sombres. Il peut aussi être latéral : les particules plus brillantes sont alors plus visibles sur un fond noir. Cet examen visuel était fait sur tous les flacons de chaque fabrication [1,41].

La limite de taille des particules ainsi détectées est de l'ordre de 50 à 100 nm (angle visuel de 1 min à 33 cm). La technique utilisée est de type très classique l'ampoule observée à travers une loupe se détache sur un fond de verre dépoli derrière lequel se trouve l'éclairage. Dans un autre le faisceau lumineux pénètre par le fond de l'ampoule qui est observée latéralement sur un fond noir.

III. Contrôle de la neutralité

Le pH des solutés injectables peut être modifié au cours de la filtration ou de la stérilisation par la chaleur, d'où l'intérêt du contrôle du pH avant et après stérilisation. Le pH peut être mesuré en utilisant un pH-mètre ou des papiers indicateurs. La mesure du pouvoir tampon consiste à mesurer la quantité de soude ou d'acide chlorhydrique à ajouter au soluté pour faire virer la couleur d'un indicateur coloré [33].

IV. Contrôle de la stérilité des préparations pharmaceutiques

La stérilité et l'apyrogénicité, définies comme les absences respectives de micro-organismes viables et de substances pyrogènes, constituent des critères de qualité microbiologique et de sécurité pour l'administration des médicaments ou l'utilisation des dispositifs médicaux chez l'homme.

Le contrôle de ces paramètres, en termes d'objectif, de conditions opératoires et d'interprétation des résultats, est fixé par les réglementations ou normalisations européennes et américaines pour les médicaments et normes pour les dispositifs médicaux [22].

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 [33].

Cependant des méthodes alternatives rapides ou directes sont aujourd'hui disponibles. Parmi elles, la cytométrie en phase solide associée à la technologie de marquage fluorescent des micro-organismes viables présente l'intérêt majeur d'un résultat en quelques heures pour une sensibilité extrême jusqu'à 1 micro-organisme par unité de volume testé. Ainsi le stockage des produits dans l'attente des résultats microbiologiques peut être réduit de 14 jours à moins de

24 heures avec une réduction très significative des coûts de stockage. De plus, le marquage fluorescent utilisé n'est pas spécifique de telle ou telle espèce microbienne et permet la détection de l'ensemble des micro-organismes, bactéries, levures, moisissures, que ce soit sous forme végétative ou sous forme de spore que l'organisme soit aérobie ou anaérobie. Le marquage reposant sur une activité enzymatique et l'intégrité membranaire, seuls les micro-organismes viables sont marqués et détectés [31].

IV.1. <u>Intérêt de l'essai de stérilité</u>

L'intérêt du contrôle de la stérilité dépend du mode d'obtention des produits stériles. Il existe trois stratégies de préparations de ces médicaments. La plus courante est réalisée en première intention c'est la stérilisation dans le conditionnement définitif ou encore stérilisation terminale. Dans ce cas, le principe actif, les excipients et le récipient ne sont pas obligatoirement stériles mais d'un niveau de contamination le plus bas possible, lorsque la stérilisation terminale n'est pas envisageable (produit hygro- ou thermosensible), il est possible de réaliser une filtration stérilisante, la répartition se faisant dans un récipient stérile en zone d'atmosphère contrôlée. Les matières premières ne sont pas nécessairement stériles [28].

Lorsque le produit n'est pas filtrable, la troisième solution consiste en une préparation aseptique qui nécessite une stérilité des matières premières, des récipients et de la zone de conditionnement [28].

Technique : La recherche de micro-organismes proposée par la pharmacopée est basée sur la mise en culture en milieu liquide soit de l'échantillon lui-même (ensemencement direct), soit d'une membrane sur laquelle les microorganismes ont été recueillis par filtration préalable du produit (filtration sur membrane).

La présence d'un éventuel micro-organisme se matérialise par l'apparition, après incubation à une température et pendant une durée déterminées, d'un trouble du milieu de culture lié à sa multiplication, confirmé par comparaison avec un témoin négatif.

■ Ensemencement direct : Cette technique a l'avantage d'être simple à réaliser puisqu'elle ne nécessite pas de traitement préalable de l'échantillon ni de matériel particulier. L'exigence principale concerne le volume maximal de produit pouvant être ensemencé correspondant à 10 % maximum du volume total de milieu. Ce procédé est à réserver en pratique à des produits non filtrables [42]. L'essai de stérilité proprement dit pendant toute la durée de la manipulation, des témoins négatifs constitués de flacons ouverts de milieux de culture sont présents à proximité. Ils servent à détecter la présence éventuelle de micro-organismes dans l'atmosphère du lieu de travail. Ils remettent en cause le caractère valable de l'essai lorsqu'un trouble est observé simultanément sur les bouillons et les témoins. Ces flacons témoins sont incubés au même titre que les essais sur les produits pendant une période de 14 jours [23].

IV.2. Tests de validation

Les résultats de l'essai de stérilité sur produit ne sont interprétables qu'à condition que des validations préalables aient été effectuées. Ces validations concernent les milieux de culture en eux-mêmes et les milieux de culture en présence des produits, des tests de fertilité et de stérilité permettent de prévenir respectivement les faux négatifs et les faux positifs lors des contrôles effectués en routine [42].

Pour tous les essais de validation, la Pharmacopée propose un certain nombre de souches de référence (**Tableau**V).

<u>Tableau V</u>: Micro-organismes d'essai recommandés par la Pharmacopée européenne [19]

Milieu	Micro-organismes	Incubation
Thioglycolate Milieu liquide	Espèces	Température (°C)
	Bactéries aérobies	
	Staphylococcus aureus	
	Pseudomonas aeruginosa	32,5 (± 2,5) 3 jours maximum
	Bactéries anaérobies	
	Clostridium sporogenes	
Hydrolysat de caséine de soja	Levures et moisissures	
	Candida albicans	22,5 (± 2,5) 5 jours maximum
	Aspergillus niger	
	Bactérie aérobies	22,5 (± 2,5) 3 jours
	Bacillus subtilis	maximum

IV.3. Limites de l'essai de stérilité

Le résultat favorable d'un essai de stérilité signifie seulement qu'aucun microorganisme contaminant n'a pu être décelé dans l'échantillon examiné dans les conditions de l'essai. L'extension du résultat à l'ensemble du lot est fonction de l'homogénéité du lot, de la validation du procédé de fabrication et du plan d'échantillonnage adopté. Pour des raisons statistiques l'essai de stérilité ne peut à lui seul apporter la preuve formelle de la stérilité d'un lot de produit. Il reste en revanche le seul moyen analytique à la disposition des instances pour effectuer des contrôles. [23]

V. L'Apyrogénicité

Un produit est dit apyrogène lorsqu'il n'engendre pas d'augmentation de température interne chez un animal à sang chaud ou chez l'humain in vivo. La stérilisation à l'autoclavage est insuffisante, en ce sens que des bactéries détruites peuvent subsister et larguer des endotoxines. Les produits apyrogènes sont demandés par les utilisateurs dans différents domaines, en particulier dans la culture de cellules et de tissus. En effet les substances pyrogènes peuvent avoir un effet cytotoxique. la méthode utilisée pour tester et certifier la non pyrogénicité des produits est le test LAL (*limulus Amebocyte lysat*) avec un taux maximum de 0,5 Unité d'Endotoxines/ml oule test d'apyrogenicité sur les lapins [31].

VI. <u>Isotonie</u>

VI.1. Phénomène d'osmose

Pour comprendre comment préparer les solutions utilisées en perfusion, il faut connaître la loi de l'osmose.

L'osmose est le transfert d'une quantité d'eau d'une solution diluée dit hypotonique, vers une solution concentrée dit hypotonique à travers une membrane semi-perméable. Le phénomène s'arrête lorsque les deux solutions sont isotoniques (pressions osmotiques égales) [46].

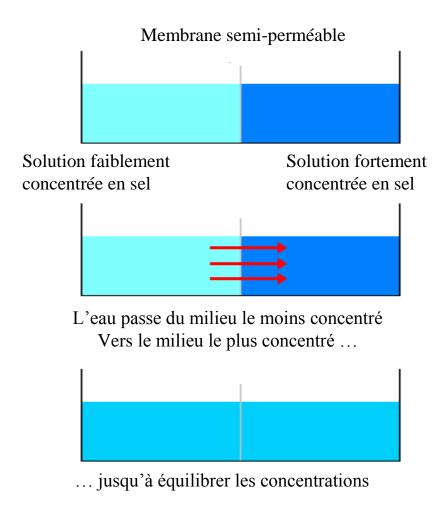


Figure 4: Représentation du phénomène d'osmose [46]

VI.2. Effet de l'osmolarité d'une solution sur le volume cellulaire

Dans le contexte d'une cellule, le milieu intracellulaire et extracellulaire sont séparés par une membrane plasmique, qui est semi-perméable. Pour les solutés qui ne peuvent traverser passivement la membrane plasmique, s'applique alors le phénomène d'osmose. L'eau va diffuser vers le compartiment (intracellulaire ou extracellulaire) qui est le plus concentré pour diluer le soluté qui ne peut traverser la membrane plasmique et pour remédier à la différence de concentrations en soluté qui existe de part et d'autre de la membrane un équilibre hydrique dans les cellules animales.

En fonction de ce qui précede, une cellule peut être placée dans :

- Un milieu isotonique : il s'agit d'un milieu de même pression osmotique que le milieu intracellulaire, donc pas de mouvement net d'eau au travers de la membrane plasmique.
- Un milieu hypotonique : il s'agit d'un milieu dont la pression osmotique est plus faible que la pression intracellulaire car la concentration totale en solutés est plus faible dans le milieu extracellulaire par rapport au milieu intracellulaire.
- Un milieu hypertonique : il s'agit d'un milieu de pression osmotique plus forte que la pression intracellulaire car la concentration totale en solutés est plus élevée dans le milieu extracellulaire par rapport au milieu intracellulaire.

Dans une solution isotonique les globules rouges demeurent inchangés.

Dans une solution hypotonique les globules rouges deviennent turgescents et finissent par éclater (hémolyse).

Dans une solution hypertonique les globules rouges se déshydratent et deviennent crénelés.

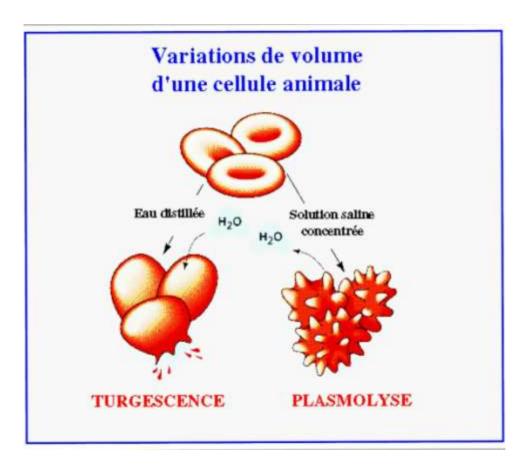


Figure 5: Effet de l'osmolarité d'une solution sur le volume cellulaire [36]

A partir de ce phénomène d'osmose l'on distinguons 3 types de solutés : solutés isotonique, hypertonique, hypotonique qui peuvent être administrés selon 2 types de voie : la voie veineuse périphérique (VVP) et la voie veineuse centrale (VVC).

Chez les humains et la plupart des autres mammifères, une solution isotonique correspond à 0,9 % en poids (ou 9 g/L) de chlorure de sodium en solution aqueuse. Cette solution, appelée solution ou sérum physiologique, est en général administrée par voie intraveineuse. Dans les perfusions par voie intraveineuse, les solutés doivent être isotoniques au plasma, pour éviter tout accident d'hémolyse (rupture de la paroi des cellules sanguines).

Deuxième partie ÉTUDE EXPÉRIMENTALE

Chapitre I MATÉRIEL ET MÉTHODES

I. Cadre et periode d'etude

Les travaux de cette étude ont été réalisés au laboratoire de pharmacie galénique, cosmetologie et legislation d'Abidjan conjointement avec les laboratoires de bactériologie virologie et de pharmacologie. Cette étude s'inscrit dans le cadre du développement des formes pharmaceutiques liquides injectables de gélatine fluide modifiée et s'étend de la période de Février à Juin 2018.

II. Matériel

II.1. <u>Matières premières</u>

- * Matières premières utilisées pour la préparation des solutés
- Gélatine gold, Reinst, 180 bloom art-Nr 4274-3 laboratoire CARL ROTH
- Chlorure de calcium (lot N°14 132 D) fourni par Pharmivoire Nouvelle
- Chlorure de sodium (lot N°17 004 A) fourni par Pharmivoire Nouvelle
- Chlorure de potassium (lot N°14 132 C) fourni par Pharmivoire Nouvelle
- Lactate de sodium (lot N°17 356 A) fourni par Pharmivoire Nouvelle
- Eau osmosée stérile préparée au laboratoire de galénique

* Modèle animal utilisé pour la réalisation des tests

Nous avons utilisé pour nos travaux des lapins de race blanche, type Néozélandais de poids compris entre 2kg et 3kg.

II.2. Appareils

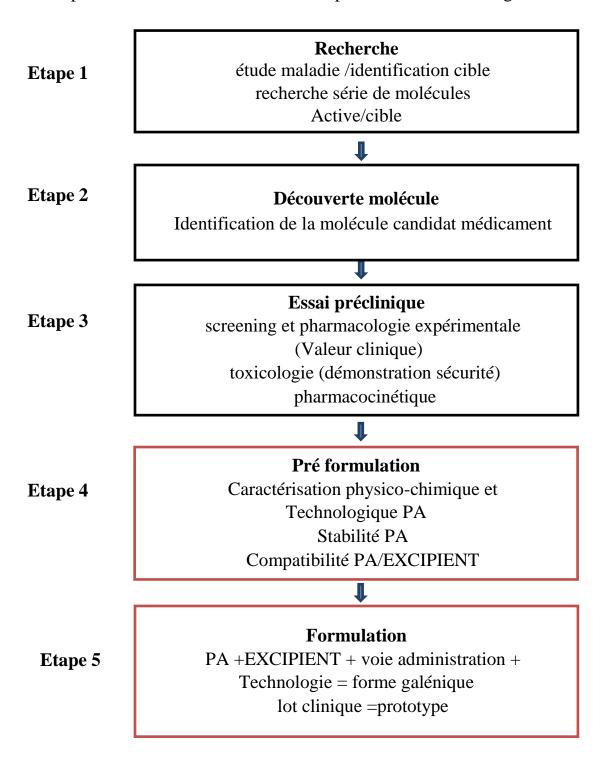
- Osmoseur Thermo scientific type MicroPure UV n° série 41420202 fabriqué en Hongrie qui permet d'obtenir de l'eau osmosée (débarrassée de matières
- Bain marie (fungilab constitucio, 64-08980 sant fellu de liobregat (Barcelona) Espagne (ANNEXE I)
- Papier pH MERCK n°1.09535.0001 France
- Balance de précision de marque Ohaus Pioneer PX précision 0,0001g France
- pH mètre type HI2210 HANNA instruments 465.045405.80 France (ANNEXE II)
- Agitateur à tige numérique 701574 VELP SCIENTIFICA made in Europe (ANNEXE III)
- Etuve MEMMERT type INB 400 n°E412.1330 réglée à 45°C, fabriqué en Allemagne
- Autoclave vertical systec VE-40 fabriqué en Allemagne (ANNEXE IV)
- Béchers de capacité 500 ml de type SIMAX, fabriqués en République Tchèque.

II.3. **Petit materiel**

- Spatules
- Verres de montres
- Tubes à hémolyses
- Flacon de 250ml en verre pyrex
- Entonnoir normalisé;
- Papier filtre;
- Portoir en acier inoxydable ;

III. <u>Méthodes</u>

Schématiquement la vie d'un médicament se fait en plusieurs étapes de la conception à la fabrication, toutes ces étapes se font selon les règles de BPF



Pour notre étude, nous n'avons fait que les étapes 4 et 5 (pré-formulation et formulation) parce que les connaissances scientifiques actuelles telles que la toxicologie et la pharmacologie sur la matière première montrent que la gélatine est utilisée en industrie pharmaceutique pour la production de médicaments administrés par voie parentérale.

III.1. La pré-formulation

La solubilité, la stabilité, et la biodisponibilité de la gélatine ont été des critères de choix qui ont permis d'opter pour la gélatine sous forme cristalline comme principe actif au cours de la pré-formulation de GFM.

Les excipients (NaCl, le KCl, le CaCl, le lactate de Na) représentent en termes de quantité la masse la plus importante d'un médicament administré par voie parentérale. Ils sont constitués des groupements susceptibles de réagir, induisant ainsi des transformations chimiques et physiques. Ces dernières peuvent être le résultat d'interactions pouvant avoir lieu entre un principe actif et les excipients qui lui sont associés. Le choix des excipients qui ont servi à la mise au point de la GFM s'est fait en tenant compte de leurs innocuités, inerties chimiques et de l'influence de ces excipients sur la biodisponibilité. Pour avoir le maximum de garantie nous avons utilisé des produits de composition chimique connue figurant dans la monographie de la pharmacopée européenne. La voie d'administration a été choisie en fonction de la biodisponibilité de la GFM, de la vitesse d'action désirée et de la situation clinique (alité ou hospitalisé).

Suivant les BPF la pré-formulation du soluté massif à base de gélatine a consisté à faire plusieurs préparations à partir de différentes formules en faisant varier chaque fois l'ordre d'ajout des excipients du soluté afin d'évaluer l'influence de la méthode d'ajout des excipients au cours de la formulation. Pour chaque condition expérimentale, trois échantillons ont été réalisés et analysés du jour 1 au jour 28.

Tableau VI: Formule 1 méthode d'ajout des excipients

	ORDRE D'AJOUT					
COMPOSITION	GFM1	GFM 2	GFM 3			
Lactate de Na	1	1	1			
KCl	2	4	3			
NaCl	3	2	4			
CaCl	4	3	2			

L'ajout du lactacte de Na en première position pendant la formulation de GFM ensuite les autres constituant tel que le KCl, le NaCl et le CaCl permettra d'apprécier son influence en fin de préparation de GFM 1, GFM 2 et GFM 3 pour la formule 1.

Tableau VII: Formule 2 méthodes d'ajout des excipients

	ORDRE D'AJOUT					
COMPOSITION	GFM1	GFM 2	GFM 3			
Lactate de Na	2	4	3			
KCl	1	1	1			
NaCl	3	2	4			
CaCl	4	3	2			

L'ajout du KCl en première position pendant la formulation de GFM, ensuite les autres constituants tels que le lactacte de Na, le NaCl et le CaCl permettra d'apprécier son influence en fin de préparation des GFM 1, GFM 2 et GFM 3 pour la formule 2.

Tableau VIII: Formule 3 méthodes d'ajout des excipients

	ORDRE D'AJOUT					
COMPOSITION	GFM1	GFM 2	GFM 3			
Lactate de Na	2	4	3			
KCl	3	2	4			
NaCl	1	1	1			
CaCl	4	3	2			

L'ajout du NaCl en première position pendant la formulation de la GFM ensuite les autres constituants tels que le lactacte de Na, le KCl et le CaCl permettra d'apprécier son influence en fin de préparation des GFM 1, GFM 2 et GFM 3 pour la formule 3.

Tableau IX: Formule 4 méthodes d'ajout des excipients

	ORDRE D'AJOUT					
COMPOSITION	GFM1	GFM 2	GFM 3			
Lactate de Na	2	4	3			
KC1	3	2	4			
NaCl	4	3	2			
CaCl	1	1	1			

L'ajout du CaCl en première position pendant la formulation de GFM, ensuite les autres constituants tels que le lactacte de Na, le KCl et le NaCl permettra d'apprécier son influence en fin de préparation des GFM 1, GFM 2 et GFM 3 pour la formule 4.

Ces différentes techniques avaient pour but de choisir la formule qui donnerait le meilleur résultat tout en variant l'ordre d'ajout des constituants dans la GFM. Nous avons choisi la formule 3 de la GFM 2 qui présentait une bonne solubilité dans la préparation comparativement aux formules 1, 2 et 4. Des contrôles sur la limpidité, la neutralité, l'aspect et la stérilité seront par la suite effectués.

DEVELOPPEMENT ET EVALUATION D'UNE FORMULATION INJECTABLE A LIBERATION IMMEDIATE A BASE DE GELATINE FLUIDE MODIFIEE

Formule 3 de la GFM 2

Gélatine mic	crobiologique	······	4,5 g
NaCl	:		0.9 g
KCl	i		0,06 g
CaCl	:		0,0405 g
Lactate de N	Na :		0,950 g
Eau osmosé	e stérile :		qsp 150 ml

III.2. Formulation

La phase de pré-formulation a permis de déterminer les caractéristiques importantes du principe actif telles que la solubilité et la stabilité. Les excipients ont été choisis non seulement à cause de leurs propriétés intéressantes et de leur rôle dans la formule mais également à cause de leur compatibilité avec la gélatine qui est le principe actif.

Pour la mise au point de notre forme galénique injectable de GFM nous avons choisi le procédé le plus simple à mettre en œuvre comme le présente la figure 6.

La formulation a été faite selon les étapes suivantes :

- Peser dans un bécher de 150 ml d'eau osmosée préalablement stérilisée à l'autoclave et portée au bain marie à 75°C.
- Peser respectivement la gélatine, le NaCl, le KCl, le CaCl, le lactate de Na.
- Ajouter la gélatine aux 150ml d' eau osmosée puis agiter jusqu'à ce que la solution de gélatine devienne fluide
- Délayer progressivement le NaCl, le KCl, le CaCl, le lactate de Na dans la solution de gélatine à intervalle de 5 minutes
- Agiter le mélange à 50 tours/mn pendant 30 mn.
- Filtrer la GFM sous une hotte à l'aide d'un papier filtre de cellulose
- Conditionner la GFM filtrée dans un flacon de 250 ml (PYREX)
- Stériliser à l'autoclave la GFM pendant 1 heure 30 minutes à 121°C.

Sur chaque échantillon de GFM, différents contrôles ont été effectués pour évaluer la stabilité du principe actif.

Formule

La formule de la préparation de GFM a été déterminée à partir de la formule du Plasmion[®] et du Ringer lactate[®] qui sont des spécialités pharmaceutiques.

Gélatine microbiologique	······	4,5 g
NaCl :		0.9 g
KC1 :		0,06 g
CaCl :		0,0405 g
Lactate de Na :		0,950 g
Eau osmosée stérile :		qsp 150 ml

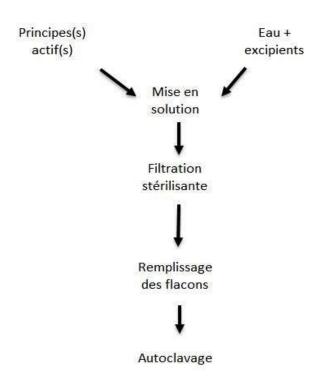


Figure 7 : Procédé de formulation d'un soluté injectable [1]

III.4. Les Contrôles

Limpidité

Elle se fait par mirage optique qui est un examen visuel sous éclairage de la GFM.

Détermination du pH

Le pH a été déterminé par la méthode potentiométrique, à l'aide d'un pH-mètre. L'électrode préalablement rincée à l'eau osmosée, a été plongée dans un échantillon de GFM, puis la valeur de pH affichée par l'écran du pH-mètre a été relevée. Les mesures ont été effectuées trois fois pour le même échantillon.

Contrôle organoleptique

Il a consisté à apprécier la couleur et l'aspect de la GFM sur 28 jours

Stérilité

Elle a consisté à ensemencer des milieux de cultures liquides et solides dans le but de rechercher d'éventuels micro-organismes dans la GFM

Apyrogénicité

Ce test a été réalisé sur des lapins en vue de déceler toute élévation brusque de la température après injection de la GFM

Isotonicité

Ce test a été réalisé pour déterminer si la GFM se trouve en équilibre avec le milieu interne des hématies (même pression osmotique).

1 ml de purée globulaire est mis dans un tube en présence de plasma.

1 ml de purée globulaire est mis dans un tube en présence d'un volume équivalent de la solution à étudier. On mesure, au bout d'un certain temps, le volume occupé par les hématies dans les deux tubes.

Chapitre II RÉSULTATS

I. PRE-FORMULATION

I.1. Contrôle des préparations des GFM

Le tableau X montre les résultats des contrôles réalisés sur les préparations de GFM des formules 1, 2, 3 et 4.

Tableau X: Contrôles des préparations

	Formule (F)	J1	J2	J3	J7	J14	J21	J28	
	F1	Trouble							
T :: 1:4 :	F2			r	Γroubl	e			
Limpidité	F3			I	impid	le			
	F4			r	Γroubl	e			
	F1				6-7				
Neutralité	F2				6-7				
(papier pH)	F3	6-7							
	F4	6-7							
	F1	Gélatine semi solide, légèrement blanchâtre				t			
Organoleptique	F2	Gélatine semi solide, légèrement blanchâtre				t			
g	F3	Gél	atine	fluide	, légèr	ement	jauná	àtre	
	F4	Gélatine semi solide, légèrement blanchâtre				t			
	F1	Croissances bactériennes							
C46mili46	F2			Croissances bactériennes					
Stermte	F3 Pas de croissances bactérien F4 Croissances bactériennes				rienne	es			
					nes				

Conservée à la température ambiante de 26°C du laboratoire, les GFM des formules 1, 2, et 3 étaient troubles dès j1 et le trouble s'est accentué jusqu'à j28 et une partie de la GFM est devenue semi-solide. Le test de stérilité a révélé la présence d'une seule colonie bactérienne d'*Escherichia coli*.

Cependant la GFM de la formule 3 est restée stable de J1 à j 28, aucun trouble ni changements d'odeur et de couleur n'ont été constatés. Le test de stérilité n'a pas mis en évidence la présence de micro-organismes. Ces résultats nous orientent à la méthode de formulation des GFM.

I.2. <u>Détermination du pH</u>

La mesure du pH de chaque préparation s'est faite en fonction de la température.

Tableau XI: Mesure du pH

Echantillon	Mesure	Valeur pH	moyenne		Température °C
	1	6,74			
GFM 1	2	6,73	6 ,74	\pm 0,01	26
	3	6,76			
	1	6,83			
GFM 2	2	6,86	6,87	$\pm 0,05$	26
	3	6,94			
	1	6,83			
GFM 3	2	6,86	6,84	\pm 0,01	26
	3	6,85			
	1	6,83			
GFM 4	2	6,86	6,84	\pm 0,01	26
	3	6,85			

Le pH est comparable à celui des préparations injectable commerciale de gélatine fluide modifiée.

I.3. Test d'apyrogénicité GFM de la formule 3

Tableau XII: Test d'apyrogénicité

Temps(t)	Température lot témoin	Température GFM1 lot 1	Température GFM2 lot 2	Température GFM3 lot 3
t_0	38,6	39,2	38,8	38,9
t_1	38,9	36,7	38	39,2
t_2	38,7	37,7	37,9	37,7
t_3	38,8	37,7	37,7	37,6
t_4	38,7	37,2	37,9	37,9
t_5	38,8	37,6	38,9	37,5
t_6	38,8	37,2	37,7	38,2
\mathbf{t}_7	38,7	38	38,3	38,1
total	310	301,3	305,2	305,1
moyenne	38,75	37,66	38,15	38,14
p-value	-	0,0176	0,0316	0,0628

L'injection d'un volume 2 ml, 2,5 ml, 3 ml de la préparation de GFM à tester à des lapins, suivi de l'évolution de la température rectale montre que les lapins selectionnés sont sensible à la variation de temperature, et la GFM lot 1,2 et 3 n'entraine pas une élévation de la température.

II. Formulation

II.1. Contrôles réalisés sur les préparations des GFM

Tableau XIII: Contrôles des préparations GFM

	J1	J2	J3	J7	J14	J21	J28
Limpidité				Limpid	le		
Neutralité (papier pH)	6-7						
Organoleptique	Gélatine fluide, légèrement jaunâtre						
Stérilité	Pas de croissance bactériennes ni de champignon						
Isotonie	Isotonique						
Apyrogénicité	Absence de substances pyrogènes						

Conservée à la température du laboratoire à 37°C, la GFM à base de gélatine est restée stable de j1 à j 28 et nous avons constaté qu'il n' y a eu aucun trouble, ni changements d'odeur et de couleur. Le test de stérilité n'a pas mis en évidence la présence de micro-organismes

II.2. <u>Determination du pH</u>

La mesure du pH de la préparation s'est faite en fonction de la température.

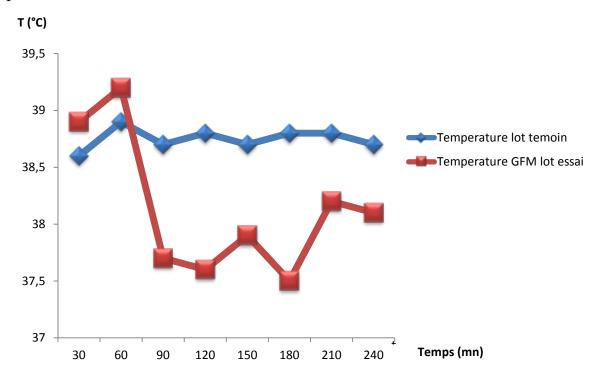
Tableau XIV: Détermination du pH de la GFM

Jour(j)	Valeur pH	Température °C
J1	$6,86 \pm 0,01$	26
J2	$6,86 \pm 0,01$	26
J3	$6,86 \pm 0,01$	26
J7	$6,86 \pm 0,01$	26
J14	$6,86 \pm 0,01$	26
J21	$6,86 \pm 0,01$	26
J28	$6,86 \pm 0,01$	26

Le pH de la GFM est comparable à celui des préparations injectables de gélatine fluide modifiée.

II.3. <u>Test d'apyrogénicité</u>

La figure 8 montre l'évolution de la température après administration des préparations.



EVOLUTION DE LA TEMPÉRATURE APRÈS ADMINISTRATION DE LA GFM

La GFM n'entraine pas une élévation de la température comparativement au lot témoin.

Chapitre III DISCUSSION

I. Pré formulation

L'objectif de notre pré-formulation était de préparer l'étape de formulation. L'ordre d'ajout des composants de la GFM est un facteur très utile pour comprendre et définir l'influence des différents facteurs; aussi, évaluer les interactions possibles entre les constituants afin de faire le bon choix pour une meilleure formulation. Les résultats de cette pré-formulation sont conformes à ceux de **SHANTANU** et al en 2018 [53] qui ont réalisé des études de pré-formulation de substances médicamenteuses de protéines et de peptides.

I.1. Limpidité

Au cours de notre étude, l'examen visuel des GFM pré-formulées a montré qu'elles étaient troubles avec les formules 1, 2 et 4, il y avait un précipité ainsi qu'une coloration blanchâtre, avec des particules en suspension, témoignant donc d'une instabilité physique de notre préparation.

Nos résultats des formules 1, 2 et 4 n'étaient par conséquent pas conformes aux bonnes pratiques de fabrication qui préconisent une absence de turbidité des préparations à administrer par voie parentérale [33]. Ces troubles pourraient être la conséquence d'une mauvaise filtration. Par contre avec la formule 3 la GFM était limpide, ce que recommande la Pharmacopée Européenne pour les préparations injectables.

I.2. Mesure du pH

Le pH de nos GFM pré-formulées était compris entre 6,73 et 6,94 à 26°C. Notre résultat était conforme au résumé des caractéristiques du produit qui recommande que le pH des GFM soit compris entre 5,8 et 7 [18,19].

I.3. Stérilité

La croissance microbienne dans les milieux de culture liquide et solide nous permet de dire que les GFM stérilisés ne sont pas exempts de micro-organismes pyrogènes.

La présence *d'Escherichia coli* dans les préparations de GFM montre que nos résultats ne sont pas en conformité avec la pharmacopée européenne et les règles de bonnes pratiques de fabrication des médicaments stériles qui recommandent que le processus et les techniques utilisées pour la fabrication de ces médicaments doivent limiter au maximum les risques de contamination [2,44]. Les GFM ont été préparées dans une salle non stérile, ce qui pourrait expliquer la croissance bactérienne dans nos préparations.

II. Formulation

Les résultats obtenus au cours de la pré-formulation montrent que l'ordre d'ajout des excipients influence la formulation et que les solutions de GFM des formules 1, 2, et 4 étaient troubles parce qu'elles n'avaient pas été réalisées dans une salle blanche et le remplissage des flacons ne s'est pas fait dans les conditions requises que recommande les normes de bonnes pratiques de fabrications des produits stériles. Les GFM 2 de la formule 3 sont restées stable jusqu'à j28, c'est pourquoi cette formule a été choisie pour continuer la formulation tout en limitant le risque de contamination; cela est en adéquation avec les études menées par **CHUNHUA** et al en 2006 [14] au sujet des aides à la décision intelligente pour le développement de produits pharmaceutiques.

II.1. Limpidité

L'absence de particules visibles à l'œil nu, et l'aspect macroscopique inchangé, notamment la couleur et la turbidité de la préparation de j1 à j28 permettent de confirmer la stabilité physique de nos GFM formulées.

Nos résultats sont d'une part conformes au résumé des caractéristiques du produit (RCP) [19,41]; d'autre part cela montre que le procédé de remplissage aseptique permettait d'avoir des GFM limpides. Ceci a été constaté par GARCIA et al 2010 [24] qui ont mis en place un test de remplissage aseptique pour la fabrication des mélanges de nutrition parentérale.

II.2. Mesure du pH

Le pH de 6,86 à 26°C de notre formulation de GFM est conforme au résumé des caractéristiques du produit qui recommande que le pH des GFM soit compris entre 5,8 et 7 [18,19]. De j1 à j28 les conditions de conservation n'ont donc pas influencé la stabilité du pH de notre formulation qui est demeuré compatible avec celui des GFM injectables [41]. D'un autre côté une stabilité du pH au cours du temps est un bon signe de non-prolifération microbienne. En effet dans la littérature, ROSSO et al, 1995 [48]. ont montré que la stabilité du pH au cours du temps est un marqueur qui pourrait être un indicateur de la contamination microbienne.

II.3. Stérilité

L'absence de croissance microbienne dans les milieux de culture liquide et solide nous permet de dire que le produit est satisfaisant à l'essai. Ce qui est en conformité avec la Pharmacopée Européenne et les règles de bonnes pratiques de fabrication des médicaments stériles qui recommandent que le processus et les techniques utilisées pour la fabrication de ces médicaments doivent limiter au maximum les risques de contamination [2,44].

Aussi, nos résultats sont conformes à ceux de **TALL** *et al* [52], en France en 2014 qui ont rapporté après observation macroscopique une absence de signes de prolifération microbienne dans leur étude sur la validation du procédé aseptique et étude de stabilité d'une préparation injectable de fructose (5%) glycérol (10%).

II.4. Apyrogénicité

L'administration de la GFM lot 3 n'entraine pas d'élévation de la température comparativement aux GFM des lots 1 et 2. Ainsi donc, l'apyrogénicité de la GFM lot 3 a été confirmée à l'issue de l'étude, garantissant une administration par voie parentérale en toute sécurité.

Nos résultats sont conformes à ceux de **BLOND** *et al* [8] en France en 2011 qui ont travaillé sur la validation de la qualité pharmaceutique de préparations de [6,6-2H2]-glucose en solution aqueuse administrée par voie parentérale.

De plus, cette propriété d'apyrogénicité de notre GFM lot 3 est conforme aux recommandations la pharmacopée européenne pour les préparations stériles injectables [19,41].



Notre travail a consisté à développer et évaluer une formulation injectable à libération immédiate à base de gélatine fluide modifiée. Nous avons ainsi réalisé des essais de pré-formulation de GFM qui nous ont montré du point de vue physico-chimique les interactions possibles entre le principe actif et les excipients dans le produit fini, et cela à la seule fin de nous guider dans le choix des excipients à incorporer à la gélatine en essayant de le caractériser le plus conformément possible à la pharmacopée européenne. À l'issue de cette préformulation, la formule 3 de la GFM2 a été choisie pour continuer la mise au point de la GFM parce qu'elle donnait une bonne solubilité et une meilleure stabilité pendant 28 jours.

Nous avons formulé notre GFM selon les règles de bonnes pratiques de fabrication tout en minimisant les risques de contamination par le port d'équipement de protection parce que la préparation de la GFM ne s'est pas faite dans une salle blanche. À j1, j2, j3, j7, j14 et j28 les contrôles physico-chimique, galénique et biologique réalisés nous ont montré que la préparation est stable avec une coloration légèrement jaunâtre, limpide et cela est conforme au résumé des caractéristiques des gélatines fluides modifiées. De plus, le test d'apyrogénicité sur des lapins et les tests de stérilité par ensemencent en milieux solide et liquide nous permettent de qualifier la GFM d'apyrogène et stérile. Après cette étape de mise en forme galénique il serait intéressant d'envisager de pratiquer des tests chez les animaux et d'observer l'activité thérapeutique invivo afin de récolter des informations nécessaires et indispensables pour une future possible administration à l'homme.

RECOMMANDATIONS

À l'issue de ce travail se dégagent les recommandations suivantes :

Au laboratoire de pharmacie galénique

- ✓ Réaliser des contrôles microbiologiques en collaboration avec le laboratoire de bacteriologie virologie
- ✓ Effectuer des tests de toxicités en collaboration avec le laboratoire de toxicologie
- ✓ Construire une salle blanche en collaboration avec des partenaires
- ✓ Réaliser le dosage des minéraux en collaboration avec le laboratoire de chimie analytique

Au ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

- ✓ Encourager la mise au point des formulations injectables à base de substances naturelles
- ✓ Equiper les laboratoires de recherche en matériels adéquats

Aux industries pharmaceutiques

- ✓ Collaborer de manière étroite avec le laboratoire de pharmacie galénique
- ✓ Produire des médicaments stériles dont la technologie est disponible ou transférable.

RÉFÉRENCES

- **1. Aka A-G.** Les préparations injectables. Cours de pharmacie galénique Master 1. [Université Félix Houphouet Boigny-Abidjan]. Année 2015-2016. p8.
- **2. ANSM**. Bonnes pratiques de fabrication. BO n° 2015/12 bis du Ministère des affaires sociales et de la santé. Paris, France. Février 2016 ; p314
- **3. ANSM**. Analyse des ventes de medicaments en France en 2013. Juin 2014; p 12-27.
- **4. Assane.C, Amor.T** Etude pour le développement des industries Pharmaceutiques locales (IPL) en côte d'ivoire. Rapport final. Décembre 2014 ; p 7-28
- **5. Auffret C, Nau. A, Salle J, Zundel J**. La gélatine fluide modifiée, nouveau succédané du plasma sanguin. Communication au Vème Congrès International de Transfusion Sanguine. Paris. Septembre 1954; p953.
- **6. Benjilali**. **M** analyse de la gestion des medicaments et dispositifs medicaux auniveau de la pharmacie Hospitaliere cas du CHP de FES. Al ghassani, Maroc 2014.p13-24.
- **7. Bigi, A., Panzavolta, S, Rubini, K**. Relationship between triple-helix content and Biopolymers. Biomaterials. 2004; (25): p 523-28.
- **8. Blond E, Diouf E, Tall ML, et al**. Validation de la qualité pharmaceutique de préparations de [6,6-2H2]-glucose en solution aqueuse administrées par voie parentérale pour la mesure de l'insulino-résistance dans le cadre d'essais cliniques. Ann Phar Fr. 2011 ; p 306-16
- **9.** Calop J, Limat S et Fernandez C. Pharmacie clinique et thérapeutique. 3ème Edition; Volume n°10, Pathologie cardio-vasculaire: Traitement des états de choc. Edition Elsevier Masson; 2008. p1344.
- **10. Caractéristiques liées à la fonctionnalité des excipients**, in PHARMACOPEE EUROPEENNE. 2008, Conseil de l'Europe: Strasbourg. 3573-75.
- **11. Cathala B**. Les solutés de remplissage vasculaire en médecine d'urgence. La revue des SAMU Hors-Série 200 .p.178-87.
- **12. Charonnat R**. « Les origines de l'injection parentérale », Revue. Histoire. Pharmacie, 1952. 132 p 320-23.

- **13. Chène.** C. 'La Gélatine', J. de l'Adrianor, Agro-jonction N° 24, Septembre/Octobre 2000. p 752-88
- **14. Chunhua Z, Ankur J, Leaelef H, Pradeep S., Pavankumar**. Vers une aide à la décision intelligente pour le développement de produits pharmaceutiques. Journal of pharmaceutical innovation 2006 ; p 23-35
- **15. Cohen G**. Méthodologie des choix du galéniste : vers une optimisation de la formulation, in S.T.P. PHARMA. 1990. p.20-23.
- **16. Dauphin A, Cazalaa J-B, Pradeau D, Chaouky H, Saince-Viard D**. Les solutés de perfusion: histoire d'une forme pharmaceutique majeure née à l'hôpital. Rev Hist Pharm. 2003; 91 :p. 219–38.
- **17. Dewachter P, et al**. Effets rhéologiques in vivo des substituts plasmatiques. Ann. Fr. Anesth. Réan. 1992 ; 11 : p. 516-25.
- **18. Dictionnaire widal** et règle de bonne pratique de fabrication des médicaments stérile.
- **19. Direction européenne de la qualité du médicament et des soins de santé.** Pharmacopée Européenne 7iemeedition; strasbourg: conseil européen; 2013
- **20. Duconseille.A, wien.F, Audonnet.F, Traore .A Matthieu.** The effect of the gelatine and ageing on the secondary stucture and water dissolution foof hydrocolloids 2017; 66: p. 378-88
- **21. Farris.S, Schaich.K.M., Liuc.L.S, Piergiovanni. L, Yam K.** Development of polyion- complex hydrogels as an alternative approach for the production of bio-based polymers for food packaging applications: a review, Trends in Food Science & Technology, .2009; 20: p.316-32.
- **22. Forestier F, Janvier G** Actualités sur les solutés de remplissage en anesthésie. In : SFAR, éd. Conférences d'actualisation. 42e Congrès national d'anesthésie et réanimation. Paris : Elsevier ; 2000. p.151-63
- **23. Friberger .P. A** new method of endotoxin determination. American clin.Products, 1987 .p. 12-17
- **24. Garcia.C, Diebold.G, Abbara.A, Brunel.P** mise en place du test de remplissage aseptique pour la fabrication des mélanges de nutrition parentérale (MNP) :de la théoeie à la pratique Elsevier Masson, 2010. p.203

- **25. Gélatin in Encyclopedia** of Polymer Science and Engineering, Vol. 3.éd, Willey and sons 1987 .p 488
- **26. Generalites-injections-et-perfusions-**inf1-21-01-2013.pdf [Internet]. [cité 22 mai 2018]. Disponible sur: http://www.ecole-rockefeller.com/campus-numerique/inf1/cours/ue211/2013/generalites-injections-et-perfusions-inf1-21-01-2013.pdf
- **27. Gómez-Estaca. J, Montero. P, Ferna'ndez-Martı'n. F, Go'mezGuille'. M.**C. Physico- chemical and film forming properties of bovine-hide and tuna-skin gelatin: a comparative study. Journal of Food Engineering, 2009.90, p. 480-86.
- **28. Greff-Mirguet.G**, Echantillonnage et analyse des endotoxines dans l'air.Cahier de notes documentaires- hygiène et sécurité du travail- N°187. INRS, 2002 .p. 73-83.
- **29. Hung.R. G, Schawrtz .J. B and C. M.** Ofner III; 'Microencapsulation of Chlorpheniramine Maleate-Resin Particles with Crosslinked Chitosan for Sustained Release', Pharmaceutic Development and Technology, Vol.4, N1, 1999 p.107-15
- **30.** 'Kadis S, Weinenbaum .G, Ajl .S.J, Microbial toxins, bacterial endotoxins. Academic press, New York, 1971 p. 507.
- **31. Karim, A., Bhat A, Fish R.** Gelatin: properties, challenges and prospect as an alternative to mammalian gelatins. Food hydrocolloids 2009, 23,p 563-76.
- **32. Laxenaire MC, Charpentier C, Feldman L**. Réactions anaphylactoïdes aux substituts colloïdaux du plasma : incidence, facteurs de risque, mécanismes. Enquête prospective multicentrique française. Ann. Fr. Anesth. Réan. 1994 ; 13 .p. 301-10.
- **33.Lehir A**. Pharmacie Galénique- Bonnes Pratiques de Fabrication des Médicaments, 8ème éd. Masson, Paris, 2001.p .76- 78
- **34.Jones. B** .E In Hard Capsules Development and Technology, K. Ridgway, ed. The Pharmaceutical Press, London. (11) Stickley, F.L. 1987 .p .41-42,
- **35. Malzert A , Fréon.:** Groupe 40 L2 Pharmacie Galénique $N^{\circ}19$ 09/04/2014
- **36. Moulin M, Coqurel A** pharmacologie connaissance des médicaments, Masson, paris 2ed 2002. p .24

- **37. Negadi S, Rahmani FZ, Rouane FZ, Sadok S.** Etude rétrospective et descriptive des solutés massifs au sein du CHU de Tlemcen Durant les années: 2008, 2009 et 2010 [PhD Thesis]. 2012.
- **38. Norland R. E**; 'Coatings Technology Handbook', Vol. 65(Fish Gelatin and Fish Glue), Norland Products, Inc 3rd ed. 2006 .p. 345-21
- **39.** Norlyuki.T Jacob D.H Rolf CG Gallandat H,Plet W Boonstra Willem V L'utilisation de la gélatine altère l'adhésion des plaquettes lors d'une chirurgie cardiaque thrombose et hémostase 74(06),1995 .p. 1447-51
- **40. Pourcelot** .Y.R, Rochat. M. H, Excipient ou substance auxiliaire et développement pharmaceutique, in S.T.P. PHARMA. 1990. P. 190-193.
- **41. Pharmacopée européenne** 9.0 In : pharmacopée européenne
- **42. Ramond B, Gaillandre .A, Gibelin .N. et al** Guide de validation des méthodes de dosage biologique. STP Pharma Pratiques, 2002. p.2-19
- **43. Recommandations pour la pratique clinique**. Remplissage vasculaire des hypovolémies relatives ou absolues. -Réan. Urg. 1997; 6 p 331-427.
- **44. Rehel** .C. Gestion du risque de contamination croisée en industrie pharmaceutique [Thèse d'exercice]. Bordeaux, France : Université de Bordeaux . 2015.
- **45.Ritz P, Salle A, Simard G, Dumas JF, Foussard F, and Malthiery Y**. Effects of changes in water compartments on physiology and metabolism. Eur J Clin Nutr. 2003. p. 57.
- **46. Ritz P, Sallé A, Berrut G.** Variation de l'équilibre hydrique de la personne âgée. Nutr Clin Métabolisme. 2004; 18(4). P. 205–211.
- **47. Rodriguez .F, Michaud. P**, Méthodologie expérimentale et optimisation, in Formes Pharmaceutiques pour application locale. 1996: Paris.p. 236-73.
- **48. Rose, P.I.** Encyclopedia of Polymer Science and Engineering, 2nd edition, Volume 7 1987.p. 185
- **49.Rosso L., Lobry J-R, Bajard S., Flandrois J-P.** Description of the combined effect of temperature and pH on microbial growth by a convenient model. Applied and Environmental Microbiology, 1995 61.p. 610-16.

- **50. Saxena, A., Sachin, K., Bohidar, H.B., Verma, A.K.** Effect of molecular weight heterogeneity on drug encapsulation effeciency of gelatin nanoparticles. Colloids and surface biointerfaces .2005 45, p 42-48.
- **51. Schwegman .J .J, Hardwick L .M, Akers. J. M**. Pratical formulation and process developpement of freeze-dried products, pharma dev technol, vol 10 N°2 2005. p. 151-73
- **52. Schriebe. R, Gareis .H;** 'Gelatine Handbook: Theory and Industrial Practice', éd. Wiley-VCH Verlag &Co. KCaA, USA, 2006 .p.50-116
- **53. Shatanu.B, Nabamita.B Pran K.D Chhater**, éudes de pré-formulaion de substances médicamenteuses de protéines et de peptides : rôle dans la découverte de médicaments et les développements de produits pharmaceutiques considérations relatives à la forme posologique 2018 .p.401-33
- **54.Stead. J.A.**, Pre-formulation studies: the derived properties and the choice of excipients in S.T.P. PHARMA. 1990. p. 24-28.
- **55.Stroll.HR,Nitschmann H.S** succinylated gelatin as a plasma substitute modified gelatins as plasma substitues, karger(Basel) 1969.p.81-95
- **56.Surh. J , Decker .A .**Properties and Stability of Oil-in-Water Emulsions Stabilized by Fish Gelatin, J. of Food Hydrocolloids 20, 2006.p.596-06
- **57. Tall ML, Salmon D, Diouf E et al**. Validation du procédé aseptique et étude de stabilité d'une préparation injectable de fructose (5%) glycérol (10%) dans le cadre d'un programme hospitalier de recherche clinique portant sur le traitement curatif endoscopique des lésions néoplasiques épithéliales du tube digestif. Ann Phar Fr 2014. http://dx.doi.org/10.1016/j.pharma.2014.09.002
- **58.Ubeid M.** Les succédanés du Plasma "Les composés macromoléculaires 2ême sujet de thèse de Doctorat en Pharmacie» 1969
- **59. Veillard. M**, La formulation ou le choix des excipients, in S.T.P. PHARMA. 1990. p.29-36.
- **60. Wiles, J.L, Vergano P.J, Bunn F.H, Testin R.F**. Water vapor transmission rates and sorption behavior of chitosan films. Journal of Food Science, 2000; 65: p.1175-79.





ANNEXE I : Bain marie (fungilab constitucio,64-08980 sant fellu de liobregat(Barcelona) Spain



ANNEXE II: pH mètre type HAMA



ANNEXE III: Agitateur (VELP SCIENTIFICA made in Europe)



ANNEXE IV: Autoclave



ANNEXE V: Test de stérilité



ANNEXE VI: GFM formulés



ANNEXE VII: Test d'apyrogenicité

RECHERCHE DES PYROGENES

PRINCIPE : injection d'un certain volume de la préparation à tester à des lapins, suivi de l'évolution de la température rectale.

Lapin : animaux sensibles aux pyrogènes mais également à tout variation de température.

> CHOIX DE L'ANIMAL ET ACCLIMATION

Lapins mâles et femelles : 1,5kg

Cages individuelles : 1 semaine au moins ; régime complet et uniforme

Contrôle quotidien température rectale (T° normale du lapin 39°C)

Vérification : sensibilité normale à l'égard des pyrogènes par injection d'une quantité connue d'une solution pyrogénique.

Exclusion des lapins qui ne réagissent pas.

> TECHNIQUE

- 1) 4 heures avant l'essai et pendant la durée de celui-ci : maintenir les lapins dans une pièce où les conditions atmosphériques restent sensiblement constantes.
- 2) Ramener les liquides à tester à une température de 38,5°C.
- 3) Injecter lentement la préparation dans la veine marginale de l'oreille.
- 4) Noter la température toutes les 30 minutes.
- 5) Faire la différence entre la température maximale et la température initiale.

RÉSUMÉ

Justification

La gélatine est une substance protéique pure qui possède de nombreuses propriétés tant au plan pharmaceutique qu'alimentaire, ce qui justifie son utilisation dans l'industrie pharmaceutique. En Côte d'Ivoire, la production des solutés massifs injectables couvre 25% des besoins nationaux du secteur privé mais ne couvre que très partiellement la demande du secteur public. Une production locale de gélatine fluide modifiée contribuerait donc à les rendre accessible tant physiquement qu'économiquement.

Objectif

L'objectif de ce travail a été de développer et évaluer une formulation injectable à libération immédiate à base de gélatine fluide modifiée.

Matériel et Méthodes

Nous avons réalisé des pré-formulations à base de gélatine fluide modifiée, de NaCl, KCl, CaCl, et de lactate de Na. Les essais de stabilité préliminaires effectués nous ont permis de sélectionner la formule adéquate pour la mise au point de la GFM. Cette préparation injectable a été soumise à des essais galéniques, microbiologiques, et de stabilité de j1 à j28.

Résultats

Les essais de pré-formulation et de formulation effectués, nous ont permis d'identifier une formulation à base de la préparation injectable de gélatine fluide modifiée. Nous avons démontré que notre préparation injectable de gélatine fluide modifiée est limpide, stable, apyrogène et stérile. Le pH de notre formulation était de 6,84 à 26°C.

Enfin notre préparation injectable est restée stable pendant 28 jours de conservation.

Conclusion

Les résultats de ce travail sont encourageants et des évaluations plus approfondies devraient être effectuées pour en faire un médicament.

<u>Mots-clés</u>: Préparation injectable; gélatine; stabilité; stérilité; industrie pharmaceutique