MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENTSUPERIEUR ET DE LA RECHERCHESCIENTIFIQUE

REPUBLIQUE DE COTE D'IVOIRE UNION - DISCIPLINE - TRAVAIL



N°1995/19

Année: 2018 – 2019

THESE

Présentée en vue de l'obtention du

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Par

KOUAKOU KOUAME RAYMOND

FORMULATION ET EVALUATION IN VIVO DE LA TOXICITE AIGUE D'UN SOLUTE MASSIF A BASE DE GELATINE FLUIDE MODIFIEE

Soutenue publiquement le 21 Février 2019

COMPOSITION DU JURY:

Président: Madame KOUAKOU SIRANSY GISELE, Professeur Titulaire

Directeur de thèse : Monsieur DALLY LABA ISMAEL, Maître de conférences Agrégé

Assesseurs : Madame SANGARE-TIGORI BEATRICE, Maître de conférences Agrégé

: Madame ATTIA AKISSI REGINE Epse KONAN, Maître assistante

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

Page I

I. HONORARIAT

Directeurs/Doyens Honoraires Professeur RAMBAUD André

Professeur FOURASTE Isabelle

Professeur BAMBA Moriféré

Professeur YAPO Abbé †

Professeur MALAN KlaAnglade

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 KlaAnglade Chimie Analytique, Contrôle de Qualité

MENAN Eby Ignace Parasitologie - Mycologie

FORMULATION ET EVALUATION IN VIVO DE LA TOXICITE AIGUE D'UN SOLUTE MASSIF A BASE DE GELATINE FLUIDE MODIFIEE

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 LabaIsmael 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 NangaYessé Bactériologie-Virologie

3- MAITRES ASSISTANTS

MM. ADJAMBRI AdiaEusebé 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'DédeyAsher 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

FORMULATION ET EVALUATION IN VIVO DE LA TOXICITE AIGUE D'UN SOLUTE MASSIF A BASE DE GELATINE FLUIDE MODIFIEE

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 YekayoBenedicte Biochimie et Biologie Moléculaire

MM. KOUAHO AviKadio 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 DétoUrsul 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

FORMULATION ET EVALUATION IN VIVO DE LA TOXICITE AIGUE D'UN SOLUTE MASSIF 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'gnôhDjénéba Santé Publique

6- ATTACHE DE RECHERCHE

M. LIA Gnahoré José Arthur Pharmacie Galénique

7- IN MEMORIUM

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 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 NangaYessé Maître de Conférences Agrégé

Docteurs CABLAN Mian N'DédeyAsher Maître-Assistant

KOUASSI-AGBESSI Thérèse Maître-Assistante

APETE-TAHOU Sandrine Assistante

DJATCHI Richmond Anderson Assistant

DOTIA TiepordanAgathe Assistante

KRIZO Gouhonon Anne-Aymonde Assistante

LATHRO Joseph Serge Assistant

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 YekayoBenedicte 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. <u>CHIMIE ANALYTIQUE, CHIMIE MINERALE ET GENERALE, TECHNOLOGIE ALIMENTAIRE</u>

Professeur MALAN KlaAnglade 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. CHIMIE ORGANIQUE ET CHIMIE THERAPEUTIQUE

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 AviKadio Tanguy Assistant

N'GUESSAN DétoUrsul 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

FORMULATION ET EVALUATION IN VIVO DE LA TOXICITE AIGUE D'UN SOLUTE MASSIF A BASE DE GELATINE FLUIDE MODIFIEE

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'gnôhDjénéba Chargée de Recherche

BEDIAKON-GOKPEYA Mariette Assistante

KOFFI Kouamé Assistant

KOUAME Jérome Assistant

N'GBE Jean Verdier Assistant

DÉDICACES

Page XIV

A l'Eternel DIEU

Je t'exalte o ETERNEL

Car tu m'as relevé

Tu n'as pas voulu que mes ennemis se réjouissent à mon sujet

psaume 30:2

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 à Toi.

Que la gloire Te revienne!

Amen

A MON CHER PERE KOUADIO KOUAKOU VALENTIN

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.

A MA CHERE MERE KONAN ADJOUA CHARLOTTE

Merci de m'avoir donné la vie et la joie, merci pour ta présence et ton soutien. Ton courage et ta détermination ont fait de moi ce que je suis aujourd'hui.

Merci pour tous les conseils que tu m'as prodiguée!

Dieu te bénisse et te gardemaman.

A MON TUTEUR ET GRAND PERE NANAN KOUADIO

Je n'ai pas de mots pour exprimer toute ma reconnaissance à ton égard. Merci pour ton amour, tes sages conseils, merci de d'avoir été un père pour moi.

A FEU MON GRAND PERE KOUASSI KOUADIO

Tu as toujours voulu que je réussisse dans ma vie. Que j'aimerais que tu sois encore là pour me voir aujourd'hui. Merci papy.

A FEU MON ONCLE KOFFI KOUAKOU ANTOINE

Vos conseils m'ont servi et me serviront toujours tant sur le plan professionnel que sur le plan personnel. Votre souvenir restera gravé à jamais dans mon cœur. Merci pour tout, cher tonton.

A MES FRERES ET SŒURS,

Rosine, Evariste, Simon, Ghislaine, Simplice, Bertin, Julien, Pascale, Yves Puisse le Tout Puissant vous combler de tous vos désirs. Infiniment merci à vous de me supporter.

A TOUS LES AUTRES MEMBRES DE MA FAMILLE PATERNELLE ET MATERNELLE

Vous m'avez donnée 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.

A MES MEILLEURS AMIS,

Ceux que je considère comme des frères et sœurs, **Docteur N'guessanPascaline**, **Docteur Kouadio Anderson**, **Koffi Fukgence**, **KokoréSebastien**je bénie 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.

A MES GROUPES D'ETUDE

Docteur Kouadio Anderson, Docteur Siéné Constent, Kouakou Jannette, Adou

Philipe et Docteur Boka Arthur, Koffi Fulgence, Akaffou Thibault merci pour

ces moments de partage. Que le seigneur vous accorde santé, prospérité et bonheur.

A DR EBY EHOUNOU, DR EHOUNOU NADEGE, DR OUATTARA

YACOUBA MARIUS, DR AKA HERVE, DR MEDEBA, merci pour la

confiance que vous m'aviez accordée en m'ouvrant la porte de votre officine de

pharmacie. Tel un parent, vous m'avez guidé de par vos conseils. Que Dieu vous

garde plus longtemps auprès de nous.

A MES AMIS DE TRONC COMMUN

Antoine, Gildas, Baitran, Varemme, Votre amitié pour moi a été utile, merci pour

votre soutien. Je vous dédie cette thèse signe de ma reconnaissance et vous souhaite

une réussite totale.

A MES AMIS DE LA TRENTE QUATRIÈME (34ème) PROMOTION DE LA

FACULTE,

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

A l'ADEPHARM

AU GEEAD

A 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

A TOUT LE PERSONNEL DU DEPARTEMENT DE PHARMACOLOGIE

Je n'oublie pas de remercier les membres de l'équipe du laboratoire de Pharmacologie en l'occurrence Docteur **EFFO**, **Mr Clément** et de façon plus particulière Mr **KOUA Donald** pour son précieux apport au cours de la réalisation de ce travail.

A TOUT LE PERSONNEL DU LABORATOIRE DE L'HOPITAL GENERAL D'ANYAMA

Pour sa précieuse contribution à la réalisation de ce travail

A 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,

Mes sincères remerciements!

A NOS MAITRES ET JUGES

A NOTRE MAITRE ET PRESIDENTE DU JURY

Madame le Professeur KOUAKOU-SIRANSY GISELE

- Professeur Titulaire en pharmacologie ;
- Titulaire d'une thèse de doctorat unique en pharmacologie de l'université

 Félix Houphouët-Boigny;
- Titulaire d'un DEA en physiologie animale ;
- Membre de la Société Française de la Pharmacologie et de la thérapeutique ;
- Pharmacien hospitalier au CHU de COCODY;
- Ancien interne des hôpitaux ;
- Membre de la Société Française d'Ethnopharmacologie ;
- Membre de la Société de Pharmacologie et de Toxicologie du Burkina Faso ;
- Membre de la Société Ouest Africaine de Chimie.

Cher Maître,

Nous sommes très sensibles à l'honneur que vous nous avez fait en acceptant la présidence de notre jury de thèse et ce malgré vos nombreuses occupations.

Vos qualités scientifiques, pédagogiques et surtout humaines seront pour nous un exemple à suivre dans l'exercice de notre profession.

Veuillez trouver ici cher Maître, l'expression de notre infinie gratitude et surtout de notre profonde admiration.

A NOTRE MAITRE ET DIRECTEUR DE THESE

Monsieur le Professeur DALLY LABA ISMAEL

- 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.

A NOTRE MAÎTRE ET JUGE

Madame le Professeur SANGARE-TIGORI BEATRICE

- Professeur en Toxicologie (UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de l'Université Félix Houphouët-Boigny)
- Docteur en pharmacie
- Titulaire d'un Doctorat (PhD) en Toxicologie
- Experte en Toxicologie et Produits Pharmaceutiques près les Tribunaux de Côte d'Ivoire
- Pharmacien analyste au Laboratoire National de Santé Publique (LNSP)
- Titulaire du Diplôme d'Etudes Approfondies (DEA) de Valorisation de la Pharmacopée Africaine (UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de l'Université Félix Houphouët-Boigny)
- Titulaire du DESS de Toxicologie (UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de l'Université Félix Houphouët-Boigny)
- Membre de la Société Savante Pharmaceutique de Côte d'Ivoire (SOPHACI).
- Membre de la Société Ivoirienne de Toxicologie (SITOX)
- Membre de la Société Française de Toxicologie (SFI)
- ➤ Membre du Bureau National d'Ordre des Pharmaciens de Côte d'Ivoire (Conseil central 3)

Cher Maître,

Nous vous sommes très reconnaissants de l'honneur que vous nous faites en acceptant de juger ce travail. Vos qualités humaines et professionnelles jointes à votre compétence et votre disponibilité seront pour nous un exemple à suivre dans l'exercice de notre profession.

Veuillez accepter, cher Maître, l'assurance de notre estime et profond respect.

A NOTRE MAÎTRE ET JUGE

Madame le Docteur ATTIA-KONAN REGINE

- Ancien interne des Hôpitaux
- Maître-Assistant en Economie de la santé et du médicament au Département de Toxicologie, Hydrologie et Santé Publique
- DESS d'Hygiène Agro-alimentaire
- Maîtrise professionnalisée de Santé Publique
- > DEA de Santé Publique
- ➤ Membre de l'Association Africaine des politiques et Economie de la Santé (AfHEA)
- Membre de la Société Française de Santé Publique
- Chercheur au centre de recherche en population et politique des systèmes de santé (INSP)

Cher Maître,

Votre accord spontané à juger ce modeste travail nous ravit. 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	XXVII
LISTE DES TABLEAUX	XXIX
LISTE DES FIGURES	XXX
INTRODUCTION	1
PREMIERE PARTIE : REVUE DE LA LITTERATURE	5
CHAPITRE I : GÉNÉRALITÉS SUR LES SOLUTÉS INJECTABLES	6
CHAPITRE IV : GÉNÉRALITÉS SUR L'EFFET TOXIQUE D'UN MEDICAMEI	NT36
DEUXIEME PARTIE : ÉTUDE EXPÉRIMENTALE	42
CHAPITRE I : MATÉRIEL ET MÉTHODES	43
CHAPITRE II : RÉSULTATS	53
CHAPITRE III : DISCUSSION	72
CONCLUSION	77
RECOMMANDATIONS	79
RÉFÉRENCES	81
ANNEYES	٩n

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AMM : Autorisation de mise sur le marché

BPF : Bonnes pratiques de fabrications

CaCl₂ : Chlorure de calcium

Da : Dalton

EDTA : Ethylène Diamine Tétra Acétique.

GFM : Gélatine fluide modifiée

HCl : Chlorure d'hydrogène

HEA : Hydroxyéthylamidons

IM : Intra musculaire

IV : Intra veineuse

J1 à J28 : Jour 1 à jour 28

KCl : Chlorure de potassium

LAL : Limulus Amebocyte lysat

mg/kg : Milligramme par kilogramme

Mosmol : Milli-osmole

NaCl : Chlorure de sodium

NS : non significatif

OCDE : Organisation de Coopération et de Développement Economiques

pc : poids corporel

Pcal : P calculé

PM : Poids moléculaire

PVC : Polychlorure de vinyle

RL : Ringer lactate

SC : Sous cutané

SSH : Sérum salé hypertonique

FORMULATION ET EVALUATION IN VIVO DE LA TOXICITE AIGUE D'UN SOLUTE MASSIF A BASE DE GELATINE FLUIDE MODIFIEE

 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	12
Tableau II: Nombre d'acides aminés (×1000 résidus) présents dans les	deux
types de gélatine et dans le collagène	15
Tableau III: Tableau représentant les conditions de normalisation selo	n British
Standard	21
Tableau IV: Les formes d'intoxication	38
Tableau V: Contrôle préparations	54
Tableau VI: Détermination du pH de la GFM	55
Tableau VII: Résultat des observations	58
Tableau VIII : Dosage des globules blancs	59
Tableau IX : Dosage du taux de lymphocytes	60
Tableau X : Dosage des granulocytes	61
Tableau XI: Dosage du nombres de globules rouges	62
Tableau XII : Dosage de la concentration en hémoglobines	63
Tableau XIII : Dosage de l'urée	64
Tableau XIV : Dosage de la glycémie	65
Tableau XV : Dosage de la créatinine	66
Tableau XVI : Dosage de la bilirubine totale	67
Tableau XVII: Dosage des transaminases	68
Tableau XVIII : Dosage des lipides sanguins	

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Procédé de fabrication de la gélatine
Figure 2: Représentation chimique de la structure typique de la gélatine 18
Figure 3 : Variation de volume d'une cellule animale
Figure 4: Procédé de formulation injectable
Figure 5: Rat (Rattus norvegicus)
Figure 6 : Evolution de la température après administration des préparations 56
Figure 7 : Effet du soluté sur le poids des rats
Figure 8: Effet du soluté sur les globules blancs chez le rat Wistar
Figure 9: Effet du soluté sur les lymphocytes chez le rat Wistar
Figure 10: Effet du soluté sur les granulocytes chez le rat Wistar
Figure 11: Effet du soluté sur les globules rouges chez le rat Wistar
Figure 12: Effet du soluté sur la concentration en hémoglobine chez le rat 63
Figure 13: Effet du soluté sur l'urémie chez le rat Wistar
Figure 14: Effet du soluté sur la glycémie chez le rat Wistar
Figure 15: Effet du soluté sur la créatinémie chez le rat Wistar
Figure 16 : Effet du soluté sur la bilirubine totale chez le rat Wistar 67
Figure 17: Effet du soluté sur les transaminases chez le rat Wistar
Figure 18: Effet du soluté sur les lipides sanguins chez le rat Wistar71

INTRODUCTION

Page 1

La formulation est la réalisation d'une succession de choix selon un raisonnement scientifique. Les différents choix concernent le principe actif, les excipients, ainsi que le procédé de fabrication pour aboutir à la formule adéquate **[66].**

L'optimisation de la formulation quant à elle, est l'organisation et la planification de la démarche expérimentale pour aboutir à la formule optimale [53].

Ces différentes étapes permettent de garantir au patient un produit de qualité conforme aux règles de bonnes pratiques de fabrication [58].

Les tests de toxicité sont des études en laboratoire menées pour évaluer la possibilité que des substances externes aient des effets nocifs pour la santé d'organismes vivants. Il y a toxicité lorsque les voies physiologiques ou biochimiques normales des organismes sont perturbés [69].

Les formes injectables sont des médicaments administrés par voie parentérale et d'usage essentiellement hospitalier ayant un impact important en matière de sécurité sanitaire. Leur formulation utilise des méthodes visant à assurer leur stérilité et à empêcher l'introduction de contaminants, la présence de pyrogènes et la croissance de micro-organismes [27]. Les solutés de perfusion intraveineuse qui font partir des formes injectables ont été développés à partir de 1831 d'après les travaux de Thomas Latta [63].

Les solutés massifs, qui sont devenus dans la pharmacopée européenne de 1997 des préparations pour perfusion intraveineuse, sont des médicaments considérés comme simples, consommés principalement dans les structures de soins (environ 100 millions d'unités par an en France)[63]. Ces formes pharmaceutiques particulières 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 utilisées soit sous forme de perfusion lente au cours des interventions chirurgicales 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 substitues du plasma peuvent être produit 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[14,65].

En Côte d'Ivoire, la production des solutés massifs injectables ne couvre que 25% des besoins nationaux. Les coûts de transport à l'importation des solutés sont élevés or, l'approvisionnement national du marché en solutés massifs à des coûts accessibles dans les établissements sanitaires publics et privés reste une priorité pour le Ministère de la santé [5]. Une production locale de gélatine fluide modifiée contribuerait à les rendre accessible tant physiquement qu'économiquement.

C'est ainsi que nous nous sommes proposés comme objectif général dans cette étude de formuler un soluté massif à base de gélatine fluide modifiée et d'évaluer in vivo la toxicité aigüe.

Les objectifs spécifiques ont été de :

- Formuler un soluté massif à partir de gélatine.

- Réaliser les contrôles galéniques sur le soluté massif à base de gélatine.
- Etudier sa toxicité aigüe afin d'assurer sa sécurité d'emploi.

Dans une première partie, nous aborderons les généralités sur les solutés massifs, la gélatine, la formulation des formes injectables et l'évaluation de la toxicité d'un médicament. La deuxième partie consacrée à l'étude expérimentale, décrira les objectifs, le cadre et le type d'étude, puis le matériel et les méthodes utilisés. Nous y présenterons ensuite les résultats obtenus ainsi que la discussion qui en découle, et avant de formuler les quelques recommandations, nous allons conclure.

Première partie REVUE DE LA LITTÉRATURE

Chapitre I GÉNÉRALITÉS SUR LES SOLUTÉS INJECTABLES

I. DEFINITIONS

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 [63].

II. <u>DIFFERENTS TYPES DE SOLUTES</u>

II.1. Cristalloïdes

Les cristalloïdes se répartissent entre les compartiments cellulaires et extracellulaires selon leur osmolalité :

- Si leur osmolarité est inférieure à 300 mosmol/kg, 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 aux dépens 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 parce transfert d'eau [19].

Exemple de Cristalloïdes

Ringer lactate et sérum salé isotonique (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 [16]. 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 osmolalité 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 [19], 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. Colloïdes

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. 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) [19].

II.2.1. Albumine

L'albumine : Colloïde naturel d'origine humaine (plasmatique), elle est obtenue par fractionnement 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 de400 ml [19]. 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 [21].

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 ayant une autorisation de mise sur le marché (AMM).

II.2.2. Dextrans

Les dextrans : Ce 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) et 70 (PM = 70000kDa). 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 [11]. Ils améliorent la microcirculation par réduction de la viscosité sanguine, augmentation du temps de formation des rouleaux érythrocytaires et diminution de l'agrégation plaquettaire [11]. 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 : Ce sont des polypeptides d'origine animale. On distingue les gélatines fluides modifiées (Plasmion®, Gélofusine® et Plamagel® 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. Quel que 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 [19]. Les effets secondaires sont dominés par le risque anaphylactique, risque plus fréquent avec les gélatines à pont d'urée [33]

II.2.4. Hydroxyéthylamidons

Les hydroxyéthylamidons (HEA): Les 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 [19]. 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 moléculaires [7].

Tableau I: Indications des solutés massifs [38]

Indications 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 synthèses 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		
Brulures	-cristalloïdes			
Donneur d'organe	Colloïdes sauf dextran 40	vasopresseurs		
Femme enceinte	-cristalloïdes -albumine si hypovolémie sévère colloïdes de synthèses contre indiqué			

Chapitre II GÉNERALITÉS SUR LA GÉLATINE

I. **DEFINITION**

La gélatine est une substance protéique pure. Elle est obtenue généralement par hydrolyse acide partielle (type A) ou hydrolyse alcaline partielle (type B) des fibres du collagène 63, elle peut être constituée par un mélange des deux types. La gélatine peut couvrir une gamme de produits possédant des propriétés différentes [30, 38, 68].

II. COMPOSITION CHIMIQUE DE LA GELATINE

Les analyses montrent que la gélatine contient des pourcentages massiques de ; 26,4 à 30,5% de glycine ; 14,8 à 18% de proline ; 13,3 à 14,5% d'hydroxyproline ; 11,1 à 11,7% d'acide glutamique ; et 8,6 à 11,3% d'alanine. Les autres acides aminés sont en faibles pourcentages comme la tyrosine avec un pourcentage de 0,2% seulement [30].Le tableau suivant donne les valeurs des acides aminés pour les deux types de gélatine et pour le collagène.

<u>Tableau II</u>: Nombre d'acides aminés (×1000 résidus) présents dans les deux types de gélatine et dans le collagène [24]

L'acide aminé	Gélatine type A	Gélatine type B	Collagène
Alanine	112	117	114
Arginine	49	48	51
Aspartine	16	00	16
Acide aspartique	29	46	29
Cistéine	00	00	00
Acide glutamique	48	72	48
Glutamine	25	00	25
Lycine	330	335	332
Histidine	4,0	4,2	4,4
Hydroxyproline	91	93	104
Hydroxylysine	6,4	4,3	5,4
Isoleucine	10	11	11
Leucine	24	24.3	24
Lysine	27	28	28
Méthionine	3,6	3,9	5,7
Phénylalanine	14	14	13
Proline	132	124	115
Sérine	35	33	35
Thréonine	18	18	17
Tryptophane	00	00	00
Tyrosine	2,6	1,2	4,4
Valine	26	22	22

III. TRANSFORMATION DU COLLAGENE EN GELATINE

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 tropocollagènes. Les chaînes se dissocient et adoptent alors une configuration pelote statistique [24].

La fabrication industrielle de la gélatine consiste principalement à contrôler l'hydrolyse du collagène et à convertir le produit en un matériel soluble avec des propriétés physicochimiques souhaitées, telles que la force en gel, la viscosité, le point isoélectrique, Le procédé de fabrication de la gélatine est présenté dans la **Figure 1** et comprend plusieurs étapes.

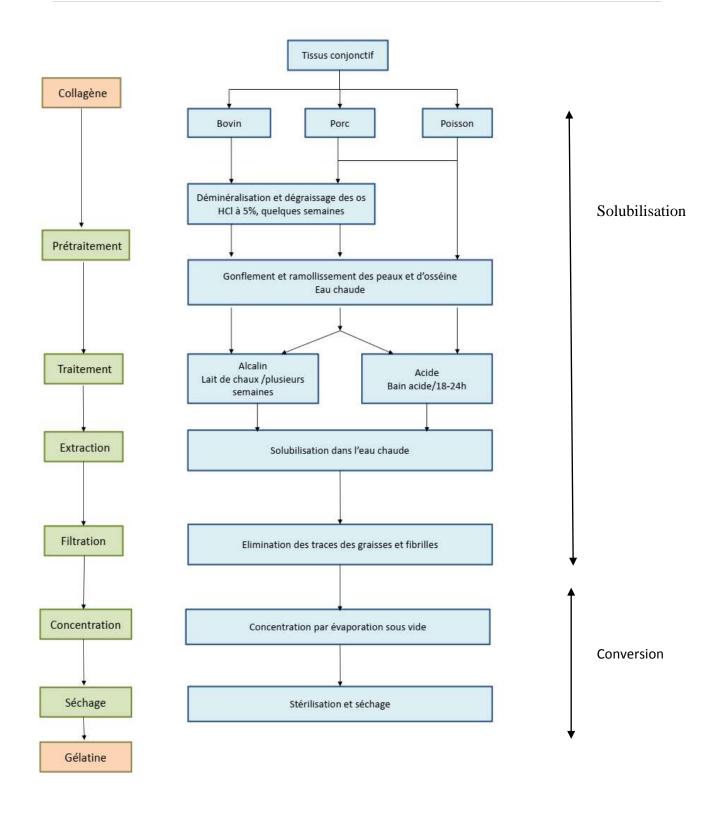


Figure 1: Procédé de fabrication de la gélatine [24]

IV. STRUCTURE MOLECULAIRE DE LA GELATINE

La molécule de gélatine peut contenir entre 300 et 4000 unités d'acides aminés [24]. La séquence de ces derniers se présente de la manière suivante - Ala-Gly-Pro-Arg-Gly-Glu-4Hyp-Gly-Pro- comme le représente le schéma

suivant:

V. PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DE LA GELATINE

Les propriétés de la gélatine, comme composé à poids moléculaire élevé et à chaînes rigides, sont similaires à celles des polymères synthétiques à chaînes rigides. La gélatine, dans des solutions aqueuses, prend des conformations

<u>Figure 2</u>: Représentation chimique de la structure typique de la gélatine [40]

«coil» ou « pelote » à des températures élevées [57].

Sous des conditions spécifiques de température, solvant et pH, la gélatine peut avoir une flexibilité suffisante lui permettant de prendre plusieurs conformations.

Ceci lui permet de varier toutes ses caractéristiques fonctionnelles dépendant de la structure moléculaire [47, 69]. En plus, la gélatine qui est similaire à des hauts polymères synthétiques, montre une large distribution de poids moléculaire [57].

V.1. <u>Point isoélectrique</u>

Les transformations de gélatine ne sont pas tout à fait identiques en milieu alcalin et en milieu acide. La différence essentielle se situe dans la valeur du point isoélectrique de la gélatine obtenue. Le point isoélectrique de la gélatine A se trouve entre 8,5 et 9 du fait que le traitement acide conserve les groupements aminés de la glutamine ainsi que ceux des restes aspartiques. Le point isoélectrique de la gélatine B est de l'ordre de 4,8-5 du fait de l'élimination de ces groupements aminés par traitement alcalin. Cela a son importance d'une part parce qu'au point isoélectrique la solvatation des molécules est à son minimum et qu'il y a alors risque de floculation, et d'autre part parce qu'on ne peut mélanger deux polymères de charges différentes sans risque de précipitation.

- La gélatine A n'est utilisable qu'en milieu acide (tartrique par exemple)
- La gélatine B est utilisable à un pH voisin de la neutralité [34].

V.2. <u>Solubilité et gonflement</u>

La gélatine est relativement insoluble dans l'eau froide. Lorsque ses grains sont ajoutés à l'eau froide (température ambiante), ils absorbent de l'eau jusqu'à 100 fois leur poids initial et se gonflent rapidement mais elle devient rapidement soluble dans l'eau chaude [47].

A une température 40°C, les grains se solubilisent jusqu'à la formation d'une solution homogène. La vitesse de solubilisation dépend de la température, de la concentration et de la taille des particules [8].

La gélatine est aussi soluble dans l'acide acétique, le trifuoroéthanol, le glycérol, l'éthane-1,2- diol et quelques autres solvants organiques [68].

V.3. Viscosité

La viscosité de la gélatine en solution augmente avec la concentration et diminue avec la température. La présence des sels libres dans la solution diminue la viscosité. Si le pH est le point isoélectrique de la gélatine, la viscosité passe par un minimum, et quel que soit la concentration de la solution utilisée[57]. La nature macromoléculaire et la viscosité de la solution à différentes températureset concentrations exhibent des propriétés rhéologiques de natureNewtonienne qui sont initialement relatives à la distribution du poids moléculaire [34].

V.4. Pouvoir gélifiant ou force de gel

La gélatine présente des propriétés gélifiantes lorsque ces particules sont capables de s'assembler pour former un réseau tridimensionnel poreux au sein duquel le liquide de dispersion est immobilisé. Pour former ce réseau, les molécules interagissent fortement entre elles dans des zones limitées appelées zones de fixation ou zones de jonction. La solidité et le nombre de zones de fixation déterminent les caractères rigides et réversibles d'un gel [8], parmi les critères les plus importants qui déterminent la qualité de la gélatine ; le degré de bloom qui se trouve généralement entre 50 et 300. Il caractérise le filmogène et le pouvoir gélifiant de la gélatine (degré de bloom élevé implique pouvoir gélifiant élevé). Ce pouvoir dépend de la concentration et de la force intrinsèque de la gélatine qui a la capacité de former des gels thermoréversibles en fonction

de la température. Cette propriété est très importante pour étudier les applications de la gélatine [57].

V.5. <u>Signification du degré de bloom</u>

C'est la force maximale mesurée lors de la pénétration d'un cylindre standardisé de ½ pouces de diamètre à une profondeur de 4 mm avec une vitesse de 1 mm/seconde pour un gel de 6,67% naturel pendant 18 heures à 10°C dans un flacon spécifique de gélatine. C'est l'essai préconisé par la pharmacopée mais on peut aussi faire des solutions de concentrations croissantes de la gélatine à étudier et noter à partir de quelle concentration il y a prise en gel [34]. Cette définition et ces conditions sont normalisées sous référence BS757 du British Standard, la gélatine est alors graduée et marquée en grades ou force de bloom décrit par le tableau suivant :

<u>Tableau III</u>: Tableau représentant les conditions de normalisation selon BritishStandard [22]

	Gélatine type A	Gélatine type B					
Bloom ou rigidité	100-120	125- 140	150-170	175-190	200-220	225- 240	250- 270
Viscosité (m Pa)	19-23	20-27	30-38	39-41	41-48	42-50	42-50
рН	5,4-6,2	5,4-6,2	5,4-6,2	5,4-6,2	5,4-6,2	5,4-6,2	5,4-6,2
Humidité(%)	12 max	12 max	12 max	12 max	12 max	12 max	12 max
Clarté	>94	>94	>94	>94	>94	>94	>94
Pointisoélectrique	7-9,0	4,7-5,1	4,7-5,1	4,7-5,1	4,7-5,1	4,7-5,1	4,7-5,1

V.6. Exemples des applications pharmaceutiques

V.6.1. Capsules de gélatine

Presque 90% de la gélatine pharmaceutique se dirige 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 [68]. 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) [28]

V.6.2. Substituts du plasma

Les substituts du plasma sont 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 amine de la lysine avec les succinates, et le phényldiisocyanate suite à une réticulation des peptides avec la formation des structures uréiques [36].

Chapitre III FORMULATION DES PREPARATIONS INJECTABLES

I. 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 [10,38].

II. PROPRIETES DES PREPARATIONS PARENTERALES

Les préparations injectables étant destinées à franchir à la suite d'une effraction les barrières protectrices que constituent la peau et les muqueuses, doivent répondre à un certain nombre d'exigence. Elles doivent être : limpides, neutres, isotoniques, stériles, apyrogènes.

II.1. <u>Limpidité</u>

Les solutés injectables ne doivent pas contenir de particules en suspension [55]. Il existe trois sources principales de contamination :

- Les particules issues de la solution et de ses composants: (Substances actives et excipients)
- Les particules issues des procèdes de fabrication :(le personnel, l'habillement du personnel, les procédures de nettoyage, contamination particulaire et micro-particulaire des eaux PPI).
- Les particules issues des matériaux pour le conditionnement

II.2. <u>Neutralité</u>

Le pH des liquides de l'organisme (sang, LCR, lymphe) étant au voisinage de la neutralité (7.35-7.40), les préparations injectables devraient avoir ce pH, ce qui les rendrait mieux tolérées et plus stables [55].

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.

II.2.1. Relation pH-stabilité des principes actifs

On sait que certains principes actifs en solution ne sont pas stables à certaines valeurs de pH, ce qui les rend moins bien tolérés et moins efficaces. Il faut donc opter pour un compromis qui tienne compte de la stabilité et de l'efficacité de la préparation, dans certaines situations par exemple les solutions d'adrénaline, d'insuline et de vitamine C ne se conservent bien qu'à pH acide; il ne faut donc pas les neutraliser d'autant plus que l'organisme supporte assez facilement des variations de pH allant de 4 à 10 [55].

I.1.1. Tolérance de l'organisme aux variations de pH

Cette tolérance est fonction de la présence ou de l'absence de substances tampons dans la préparation [55].

- Les préparations injectables non-tamponnées: L'organisme supporte mieux des préparations non additionnées de substances tampons, possédant lui-même son propre système tampon capable de ramener à la neutralité le pH de la préparation sans trop de douleur et sans risque de lésion des tissus.
- Les préparations injectables tamponnées: Quand la solution est tamponnée, les deux systèmes tampons (physiologique, et médicamenteux) entrent en compétition et le rétablissement de la neutralisation dans l'organisme sera plus lent, la douleur plus durable, et le risque de lésion du tissu est accru.

I.1.2. Ajustement de pH

Lorsqu'il est nécessaire d'ajuster le pH, deux cas sont à envisager :

➤ Si la stabilité de la substance active exige un pH non physiologique, il est préférable de ne pas tamponner, le titre sera ajusté au moyen d'HCl ou de NaOH. Si toutefois, il est indispensable de tamponner parce que la zone de pH de stabilité est très étroite on optera pour un mélange tampon à faible pouvoir tampon utilisé en faible concentration. Si ce compromis n'est pas applicable, on peut présenter la préparation sous forme de poudre sèche stérile à reconstituer [55].

➤ Si l'optimum de stabilité du principe actif en solution se trouve dans une zone de pH étroite au voisinage de la neutralité, il y a intérêt à ajuster le pH avec une solution tampon. La compétition entre le système tampon du sang et la substance tampon de la solution sera de courte durée et la douleur éventuellement induite aussi.

I.2. Isotonicité:

Les préparations injectables doivent avoir la même pression osmotique que le sang c'est-à-dire la même concentration moléculaire que lui pour que les hématies y soient en équilibre [55].

Un milieu isotonique : 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 : 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 : 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.

Equilibre hydrique dans les cellules animales

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.

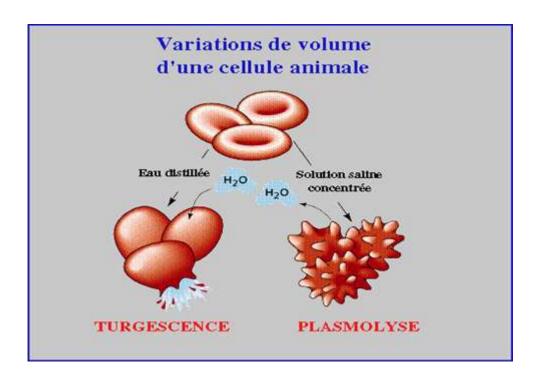


Figure 3: Variation de volume d'une cellule animale

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

I.3. Stérilité

Les préparations injectables doivent être préparées dans des conditions qui garantissent leur stérilité : locaux d'une propreté « absolue » (salles stériles, salles blanches), solvant et conditionnement stériles. Ces précautions doivent être suivies d'une méthode de stérilisation adaptée : chaque fois qu'il sera possible, on utilisera la stérilisation à l'autoclave (20 minutes à 120°C) [55].

En pratique on a recours :

- Préparations liquides thermostables: stérilisation à la chaleur humide à 121°C pendant 20 minutes, on peut diminuer cette température si nécessaire.
- Préparation liquides thermolabiles : filtration stérilisante suivie d'une répartition aseptique (addition d'un bactériostatique utile).

I.4. Apyrogénicité

Les préparations injectables ne doivent pas contenir de substances pyrogènes susceptibles de provoquer des symptômes après injections dont le plus caractéristique est une élévation brusque et importante de température [49].

Les substances pyrogènes sont d'origine naturelle produites par des champignons, des levures ou des bactéries notamment les bactéries gram négatif. Ce sont des endotoxines thermostables qui résistent à la stérilisation à l'autoclave et passent à travers la plupart des filtres. Elles sont détruites par la chaleur sèche élevée (180°C- 200°C). Leur provenance est le solvant, les substances dissoutes ou le matériel souillé par des microorganismes.[26]

II. FABRICATION DES PREPARATIONS INJECTABLES

Des précautions particulières doivent être prises lors de la fabrication des préparations injectables, dispositions plus strictes que pour les autres formes.

II.1. Locaux

Les locaux où se pratique la fabrication doivent être stériles. Ce sont des enceintes stériles. Ces salles doivent être en surpression par rapport à l'extérieur.

La fabrication de médicaments stériles doit obligatoirement se faire dans des zones à atmosphère contrôlée ZAC [27].

- > 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 contrôlée 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.

II.2. Personnel

Le personnel doit être correctement formé et on doit s'assurer régulièrement de sa qualification et de sa motivation. L'uniforme est conçu pour confiner les contaminants rejetés par le corps de l'opérateur, empêchant ainsi leur entrée dans l'environnement de production [27]. Le personnel doit être propre, en bon ordre, et fiable. Il doit être en bonne santé et exempt de conditions dermatologiques qui pourraient augmenter la charge microbienne.

II.3. Les matières premières et les objets de conditionnement

Stérilisés séparément, sont introduits par la suite dans les ateliers par l'intermédiaire d'un sas, lui-même rendu stérile (principes actifs, excipients, solvants, flacons, bouchons.

Le solvant le plus souvent est l'eau distillée ou bidistillée utilisée moins de 3 heures après sa fabrication (pour empêcher le développement de pyrogènes) sinon la conserver, moins de 24 heures dans des citernes en acier inoxydable chauffées à 70 - 80°C.

Lorsqu'il n'est pas possible d'utiliser l'eau (principe actif insoluble ou instable dans l'eau, avoir un effet prolongé), on peut faire appel à d'autres solvants :

Huiles végétales (olive, arachide), minérales (de vaseline) (jamais administrées en IV risque d'accidents graves)

- Alcools : éthanol

- Polyols : glycols, éthylène glycol

- Esters : acétate d'éthyle, benzoate de benzyle

- Ethers : polyoxyoéthylène glycols (PEG 200, 300, 400)

Les excipients les plus utilisés sont les solubilisants, les isophisants (ajustement de pH), les isotonisants, les antioxydants, les conservateurs antimicrobiens pour les multidoses.

II.4. <u>Techniques de fabrication des préparations injectable</u>

Les différentes étapes de la fabrication varient en fonction du type de préparation injectable à réaliser.

Solutions qui peuvent être stérilisées dans leur récipient final .la stérilisation dans le récipient final est plus utilisée pour les solutions, chaque fois que le ou les principes actifs sont stables en solution et à la chaleur.

II.5. 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. C'est les verres de type I et II qui 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. Seringues et cartouches pré remplies sont souvent en matière plastique.

III. CONTROLES

III.1. <u>Contrôles préliminaires</u>

- Contrôle des matières premières: contrôle analytique, chimique, biologique visant à vérifier l'identité, l'activité, et la pureté de tout produit entrant dans la composition et la fabrication d'un médicament.
- Contrôle des matériaux de conditionnement: contrôle analytique du type de verre (I, II, III), contrôle de la transparence, la neutralité, et recherche des pyrogènes et essai de toxicité des récipients en matière plastique.
- Contrôle du milieu de travail: la désinfection des locaux, les conditions climatiques, essais microbiologiques.

III.2. Contrôle de la limpidité

Deux aspects principalement [55]:

- 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 de les éliminer tout au moins en grande partie et pour 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.

- 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

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 un 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 [49].

III.3. <u>Contrôle de la neutralité</u>

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 [55].

- ✓ Mesure du pH par les méthodes classiques
- ✓ Mesure du pouvoir tampon
- ✓ Essais de conservation à différentes température en fonction du pH et en fonction des agents utilisés pour l'ajustement du pH.

III.4. Apyrogénicité

Deux méthodes permettent de mettre en évidence la présence ou l'absence de substances pyrogènes [55]:

- Méthode basée sur l'élévation de la température chez le lapin à qui on a injecté dans la veine marginale de l'oreille un volume précis de la solution à tester. L'élévation, éventuelle, de la température constatée ne doit pas dépasser certaines limites pour conclure à l'absence de substances pyrogènes. La mesure de la température se fait en plaçant des sondes thermiques dans le rectum des lapins d'expérience.
- ❖ Méthode basée sur la coagulation d'un lysat de protéines d'amébocytes d'un crabe d'Amérique (LAL : Limulus Amebocyte Lysat).

La préparation injectable est mise en contact du lysat de protéines : en cas de présence d'endotoxines issues de substances pyrogènes, le mélange des deux liquides donne naissance à un gel ferme [49].

III.5. <u>Isotonie</u>

Il se fait sur les globules rouges humain. Deux méthodes utilisables :

III.5.1. <u>Méthode par hémolyse</u>

Le soluté à étudier est mis en contact avec le sang humain défibriné suivi d'agitation. Après un temps, le mélange est centrifugé et la couleur du surnageant mesurée par calorimètre. La coloration du surnageant est fonction du degré d'hémolyse et peut être comparée à une gamme étalon obtenue avec le même sang mélangé avec des concentrations croissantes de NaCl : de 3,2 à 5,2‰.

Surnageant limpide : pas d'hémolyse.

Surnageant coloré en rouge (par Hb) : hémolyse, donc soluté hypotonique.

III.5.2. Méthode à l'hématocrite

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.

Si le volume est le même dans les deux tubes : la solution injectable est isotonique au plasma.

Si le volume des hématies dans le tube contenant la solution injectable est plus important : la solution est hypotonique au plasma.

Si le volume des hématies dans le tube contenant la solution injectable est moins important : la solution est hypertonique.

Chapitre IV GÉNÉRALITÉS SUR L'EFFET TOXIQUE D'UN MEDICAMENT

I. DEFINITION DE LA TOXICOLOGIE

La toxicologie provient des termes **toxicon** et **logos**. Le premier signifie arc et le second, étude, discours. La toxicologie est la discipline scientifique qui s'occupe des toxiques, leurs propriétés, de leur devenir dans l'organisme, de leur mode d'action, de leur recherche dans différents milieux (biologiques ou non) et des moyens préventifs et curatifs permettant de combattre leur nocivité **[60]**.

On dit qu'une substances est **toxique** lorsque, après pénétration dans l'organisme par quelque voie que ce soit, à une dose relativement élevée, une ou plusieurs fois très rapprochées ou par petites dose longtemps répétées, elle provoque, immédiatement ou à terme, de façon passagère ou durable, des troubles d'une ou de plusieurs fonctions de l'organisme pouvant aller jusqu'à leur suppression complète et amener la mort [17].

II. EVALUATION DES EFFETS TOXIOUES

L'évaluation de la toxicité s'appuie sur des études qualitatives ou quantitatives adéquates. Il existe plusieurs types d'études qui nous permettent d'évaluer les effets d'un toxique. On peut les classer dans quatre catégories [32] :

- les études épidémiologiques, qui comparent plusieurs groupes d'individus ou les études de cas;
- les études expérimentales in vivo, qui utilisent des animaux ;
- les études *in vitro*, effectuées sur des cultures de tissus ou des cellules et ;

On utilise fréquemment une terminologie pratique mais arbitraire pour désigner les diverses formes d'intoxication selon la fréquence et la durée de l'exposition (tableau IV).

Tableau IV: Les formes d'intoxication [40]

Forme	Fréquence	Durée de l'exposition
d'intoxication	d'administration	(Rongeurs)
Aiguë	Unique	< 24 heures
Répétée à court terme	Répétée	= 1 mois
Subchronique	Répétée	De 1 à 3 mois
Chronique	Répétée	> 3 mois

II.1. Toxicité aigue

La toxicité aiguë est habituellement définie comme l'ensemble des effets néfastes se produisant immédiatement ou peu de temps après une exposition unique ou répétée sur une période de moins de 24 heures à une ou plusieurs substances [67]. Le terme toxicité orale aiguë est plus souvent utilisé en liaison avec les déterminations de la létalité et de la DL₅₀. La DL₅₀est un terme qui a été introduit et développé par Trevan en 1927. Elle est définie comme la dose déterminée statistiquement qui, lorsqu'elle est administrée dans un test de toxicité aiguë, est susceptible de causer la mort de 50% des animaux traités sur une période donnée [48].

La méthode classique d'étude de la toxicité orale aiguë d'une substance consiste en une administration de ladite substance à différentes doses, par voie orale, à plusieurs groupes d'animaux d'expérience (généralement des rats ou des souris des deux sexes), à raison d'une dose par groupe [52]. Les animaux traités sont observés de près durant les premières 24 heures et ensuite quotidiennement pendant 2 semaines et les éventuels changements de l'apparence et du comportement, ainsi que la létalité (DL₅₀) sont notés.

Des questions se posent encore concernant l'utilisation de l'évaluation pathologique élargie en tant que partie d'une étude de toxicité aiguë. Cependant, l'autopsie macroscopique est le minimum requis par la plupart des corps de régulations gouvernementaux, comme le sont les déterminations du poids corporel peu de temps avant le traitement et après une, puis deux semaines [67].

La valeur absolue de la DL₅₀d'un composé varie beaucoup entre les laboratoires, et ces variations ont été attribuées aux différences, par exemple, dans les détails protocolaires, les souches animales, La mise en cage, et la source de la substance chimique d'essai.

La DL₅₀et des méthodes alternatives pour l'évaluation de la toxicité aiguë ont été considérablement discutées dans différents forum internationaux au cours des années 80 et 90 [9, 18, 35, 59]. Le résultat de ces discussions intensives est qu'aujourd'hui les autorités ne demandent habituellement pas des tests de DL₅₀ classiques impliquant un grand nombre d'animaux. Au contraire, les lignes directrices n° 420 [41], 423 [42], et 425 [44] de l'OCDE décrivent des méthodes alternatives bien établies et validées qui réduisent les souffrances des animaux et/ou utilisent beaucoup moins d'animaux que la méthode classique de Trevan. Cette dernière a été officiellement abrogée en décembre 2002 par l'OCDE, l'Union Européenne et les États-Unis d'Amérique [56].

II.2. <u>Toxicité à court terme avec administration de doses répétées et toxicité subchronique</u>

Alors que la toxicité aiguë concerne les effets nocifs dus à des doses uniques, une forme plus commune de l'exposition humaine à de nombreux produits chimiques se fait par la répétition de doses qui ne produisent pas d'effets toxiques immédiats.

Des effets tardifs peuvent survenir à cause de l'accumulation du produit dans les tissus ou à cause d'autres mécanismes, et il est important d'identifier toute possibilité de ce genre par des études subchroniques. La limite distinguant les régimes subchroniques et chroniques d'administration des doses est souvent prise comme égale à 10% de la durée de vie des animaux d'expérience. Des périodes d'administration de doses s'étendant entre une simple dose et 10% de la durée de vie sont souvent qualifiées de mode d'administration subaiguë. Ce terme est considéré comme sémantiquement incorrect et par conséquent, pour distinguer de telles périodes des périodes décrites classiquement comme subchroniques on doit les décrire comme « études à court terme avec administration de doses répétées ».

Ceci s'applique aux études portant sur 14, 21 et 28 jours. Les durées d'étude réalisées ont été principalement de 14, 28 et 90 jours. D'autres durées d'étude ont été utilisées en Toxicologie, mais on considère que le choix de ces trois durées principales qui ont le soutien de l'expérience ou pour lesquelles il existe des prescriptions en matière de réglementation, représente une approche raisonnable [43].

La substance à tester est administrée quotidiennement à différents niveaux de dose à plusieurs groupes d'animaux, à raison d'un niveau de dose par groupe. De manière générale, au moins trois groupes d'essai et un groupe témoin doivent être utilisés. La dose la plus élevée doit provoquer des effets toxiques, sans être létale ou causer de sévères souffrances. Une séquence de doses décroissantes doit ensuite être sélectionnée en vue de mettre en évidence tout effet lié à la dose ainsi qu'une concentration sans effet nocif observé à la dose la plus faible [45].

II.3. <u>Toxicité chronique</u>

Le but d'une étude de toxicité chronique est de déterminer les effets d'une substance d'essai, chez une espèce de Mammifère donnée, à la suite d'une exposition prolongée et répétée [40].

La substance d'essai est administrée quotidiennement à plusieurs groupes d'animaux d'expérience à des doses progressives, en général pendant une période de 12 mois, bien que des durées plus longues ou plus courtes puissent aussi être choisies, en fonction des exigences réglementaires. Cette durée est assez longue pour permettre aux effets de toxicité cumulée de se manifester, tout en évitant les effets perturbateurs des changements liés au vieillissement. Il convient d'utiliser au moins trois doses et un groupe témoin.

À moins de contraintes dues à la nature physico-chimique ou aux effets biologiques de la substance d'essai, le niveau de dose le plus élevé est choisi de manière à permettre d'identifier les principaux organes cibles et les effets toxiques de la substance, tout en évitant la souffrance, une toxicité sévère ou une forte morbidité ou létalité chez les animaux testés [43].

II.4. <u>Méthodes substitutives à l'expérimentation animale</u>

Des progrès scientifiques considérables ont permis le développement de modèles *in vitro* pertinents pour évaluer les effets toxiques des médicaments ou produits chimiques sur la santé humaine et la qualité de l'environnement. Cependant, dans l'état actuel de nos connaissances, les méthodes alternatives ne peuvent pas se substituer à l'animal lorsque les études portent sur l'organisme entier [18].

Deuxième partie ÉTUDE EXPÉRIMENTALE

Chapitre I MATÉRIEL ET MÉTHODES

I. CADRE ET TYPE D'ETUDE

I.1. Cadre de l'étude

Nos travaux ont été effectués dans deux différents lieux :

- UFR Sciences pharmaceutiques et Biologiques d'Abidjan (Université Félix Houphouët Boigny) précisément au laboratoire de pharmacie galénique pour la formulation et au laboratoire de pharmacologie pour l'évaluation de la toxicité.
- Laboratoire de l'hôpital général d'ANYAMA pour le dosage de quelques paramètres biochimiques et hématologiques.

I.2. Type et durée de l'étude

L'étude, de type expérimental, s'est déroulée sur une période de 4 mois, de février à mai 2018.

II. MATERIEL ET METHODE

II.1. Formulation

II.1.1. Matières premières

- Gélatine gold, Reinst, 180 bloom art-Nr4274-3laboratoire 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

II.1.2. Appareils

- Papier pH MERCK n°1.09535.0001
- Bain marie (fungilab constitucio, 64-08980 santfellu de liobregat (Barcelona) spain
- Balance de précision [ohaus précision (0,0001)].
- pH mètre type EUTECH
- Agitateur (VELP SCIENTIFICA made in Europe)
- Etuve MEMMERT type INB 400 n°E412.1330;
- Autoclave (systec)
- Béchers 400ml
- Spatules
- Verres de montre
- Tubes à hémolyses
- Flacon de 250ml (pyrex)
- Entonnoir;
- Papier filtre et Portoir

II.1.3. Matériel animal

Le modèle animal utilisé pour la réalisation du test d'apyrogénicité était des lapins de race blanche, type néo-zélandais, et de poids compris entre 2 et 3 Kg.

II.1.4. <u>Méthodes</u>

La phase de pré-formulation a permis de déterminer les caractéristiques importantes du principe actif tel que la solubilité, la stabilité également tenant compte de ces propriétés, les excipients ont été choisis non seulement à cause de leurs propriétés intéressantes et de leur rôle dans la formule mais également 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 **figure4.**

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 au 150ml d'eau osmosée puis agiter jusqu'à ce que la solution de gélatine devienne liquide
- 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 filtré 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 partie 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

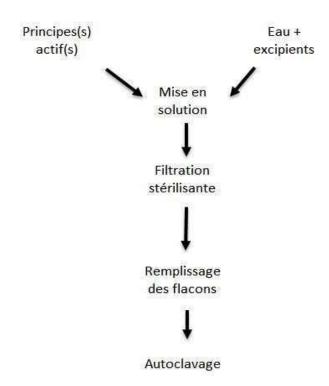


Figure 4: Procédé de formulation injectable [1]

II.2. Contrôles

Limpidité

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

Détermination du pH

Elle a consisté à mesurer le pH de la GFM à l'aide d'un pH-mètre.

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 la turbidité 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 microorganismes dans la GFM

Apyrogénicité

Ce test a été réalisé sur des lapins (Néo-Zélandais de poids compris entre 2 et 3 kg) 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)

II.3. Evaluation de la toxicité

La toxicité orale aiguë du soluté massif à base de gélatine fluide modifiée a été évaluée chez le rat conformément à la ligne directrice n° 423 de l'OCDE pour les essais des substances chimiques adoptée le 17 décembre 2001.

II.3.1. Matériel

- Balance OHAUS
- Automate SYSMEX-POCH 100 i.
- Automate KENZA MAX
- Hotte model kottermann
- Ether

II.3.2. Matériel animal

L'espèce animale choisie pour cette étude était le rat (*Rattus norvegicus*) albinos de la souche Wistar. Les rats étaient élevés au sein de l'animalerie du Laboratoire de pharmacologie de l'UFR sciences pharmaceutiques et biologiques. C'était des rats femelles ayant un poids compris entre 160 mg et 210 mg. Ils ont été répartis en fonction du poids dans les différents groupes témoins et essais. Ils sont hébergés dans des cages en plastique transparentes et nourris par des granulés IVOGRAIN avec accès libre à l'eau. Chaque cage est marquée d'un numéro de lot en fonction de la dose administrée : Lot 1 pour le témoin, lot 2 pour la dose 5mg/kg, lot 3 pour la dose 50mg/kg, lot 4 pour la dose 300mg/kg et lot 5 pour la dose 2000mg/kg.



Figure 5: Rat (Rattus norvegicus)

II.3.3. Principe de l'essai OCDE

Le principe de cet essai est qu'avec un processus séquentiel, utilisant un nombre minimum d'animaux par étape, des informations suffisantes sur la toxicité aiguë de la substance peuvent être obtenues pour permettre sa classification. Une dose déterminée de la substance est administrée par voie orale à un groupe d'animaux. La substance est testée dans un processus séquentiel dans lequel trois animaux d'un seul sexe (le plus sensible) sont utilisés à chaque étape. L'absence ou la manifestation de mortalité liée à la substance dans un groupe ayant reçu une dose à une étape donnée détermine l'étape suivante, c'est-à-dire :

- arrêt de l'essai,
- administration de la même dose à trois animaux supplémentaires,
- administration de la dose immédiatement supérieure ou inférieure à trois animaux supplémentaires.

Des détails concernant le mode opératoire pour la dose initiale de 5mg/kg choisie pour cette étude sont décrits en **Annexe 5**

II.3.4. Préparation des solutions d'essai

Pour les doses 5mg/kg, 50mg/kg, 300mg/kg, la solution de gélatine a été diluée dans de l'eau distillée puis le mélange a été homogénéisé par agitation (5-10mn) à l'aide d'un agitateur magnétique.

Le volume maximal de liquide qui pouvait être administré en une seule fois était $V_{max} = 1 ml/100 g$ de poids corporel [42]. Ainsi, la concentration minimale (C_{min}) des solutions qui pouvait être administrée aux animaux était calculée par la formule ci-après :

$$C = \frac{D}{10}$$

C:Concentration minimale

D:Dose

II.3.5. Mode opératoire

Dans le cadre de notre étude, 20 rats Wistar de sexe féminin ont servi d'animaux d'expérience. Les animaux ont été répartis en 5 lots de 3 animaux chacun :

- Lot 1 : constitué de rats ayant reçu de l'eau distillée
- Lot 2 : constitué de rats ayant reçu la solution à la dose 5mg/kg de pc
- Lot 3 : constitué de rats ayant reçu la solution à la dose 50mg/kg de pc
- Lot 4 : constitué de rats ayant reçu la solution à la dose 300mg/kg de pc
- Lot 5 : constitué de rats ayant reçu la solution à la dose 2000mg/kg de pc

Les bilans hématologiques (taux d'hémoglobine, taux de globules rouges, taux de globules blancs, nombre de plaquettes) et biochimiques (urée, créatinine, glycémie, ALAT, ASAT, cholestérol totale, cholestérol HDL, triglycéride, bilirubine total) ont été effectués sur un prélèvement réalisé à J14.

Par ailleurs, les poids des animaux ont été relevés le premier jour avant l'administration de la solution à J0, puis au cours de l'étude à J2, J3, J6, J10, J14. D'autres signes de toxicité ont été recherchés (apathie, excitation, trouble de respiration, refus de nourriture, refus de boisson, saignement buccal, saignement nasal, douleur abdominale, diarrhée, tremblement, coma, décès).

Les animaux ont été mis à jeun durant la nuit du 13^e jour. Les animaux ont été anesthésiés avec l'éther et le sang a été prélevé au niveau du sinus rétro orbitaire à l'aide d'une pipette pasteur stérile. Nous avons réparti dans un tube sec et un tube contenant l'anticoagulant éthylène diamine tétra acétique (EDTA).

A partir du sang contenu dans le tube EDTA, la numération globulaire et les constantes érythrocytaires ont été déterminées à l'aide de l'automate SYSMEX-POCH 100 i. Le sang des tubes secs a été centrifugé à 3000 trs/mn pendant 5 min. Les paramètres biochimiques ont été dosés sur le sérum obtenu grâce à l'automate KENZA MAX. Les transaminases glutamiques oxaloacétique et pyruvique (TGO et TGP) ont été dosées selon la méthode cinétique [25], tandis que l'urée, la glycémie, la créatinine [31], le cholestérol, les triglycérides [20]. Tous ces dosages ont été effectués à l'aide des kits BioSystems, Espagne.

II.4. Analyses statistiques

Les résultats expérimentaux sont exprimés sous forme de moyennes arithmétiques, accompagnées de l'erreur standard (m \pm SEM). La comparaison des moyennes est réalisée à l'aide du test non paramétrique de WILCOXON grâce au logiciel GraphPad. Les valeurs de p <0.05 sont considérées statistiquement significatives.

Chapitre II RÉSULTATS

I. FORMULATION

Les contrôles réalisés sur les solutés formulés nous ont permis d'obtenir les résultats présentés dans le tableau V

Tableau V: Contrôle préparations

	J1	J2	J3	J7	J14	J21	J28		
Limpidité				Limpid	le				
Neutralité (papier pH)		6-7							
Aspect		Gélatine fluide, légèrement jaunâtre							
Stérilité		oui							
Isotonie		oui							
Apyrogénicité	oui								

Conservée à la température du laboratoire 37°C, la GFM est restée stable de J1 à j 28 et nous avons constaté qu'il n'y a eu aucun trouble, ni de changement d'odeur et de couleur. Le test de stérilité n'a pas mis en évidence la présence de microorganismes.

I.1. <u>Determination du pH</u>

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

Tableau VI: Détermination du pH de la GFM

Jour(j)	Valeur pH	Température °C
J1	$6,7 \pm 2.05$	25
J2	$6,86 \pm 1.25$	25
Ј3	$6,86 \pm 0.75$	25
J7	$6,55 \pm 1.25$	25
J14	$6,75 \pm 2.1$	25
J21	$6,86 \pm 2.1$	25
J28	$6,80 \pm 0.95$	25

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

I.2. <u>Test d'apyrogénicité</u>

La figure 6 montre l'évolution de la température après administration des préparations.

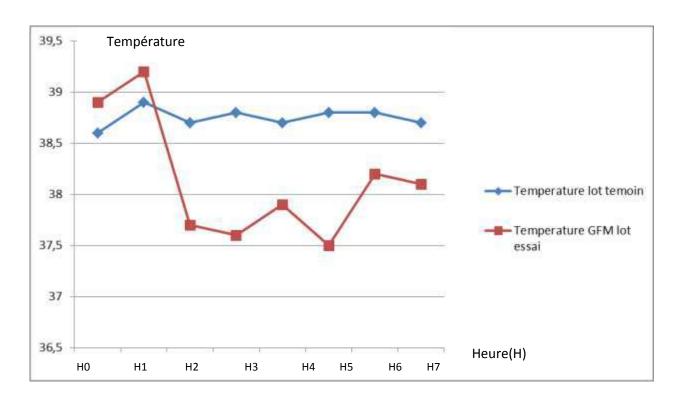


Figure 6 : Evolution de la température après administration des préparations

La GFM n'entraine pas une élévation de la température.

Mais elle entraine une baisse de la température des lapins.

RESULTATS D'ETUDE DE LA TOXICOLOGIE

I.1. <u>Effets du soluté massif à base de gélatine microbiologique sur le poids</u>

La figure 7 présente l'évolution du poids des animaux durant la période de 14 jours d'observation.

	Moyenne	Ecart type	pcal
Témoin	173,33	5,68	
5 mg/kg	174,67	7,42	1
50mg/kg	175,17	6,65	0,25
300mg/kg	174,17	5,78	0,75
2000mg/kg	176,00	6,51	0,25

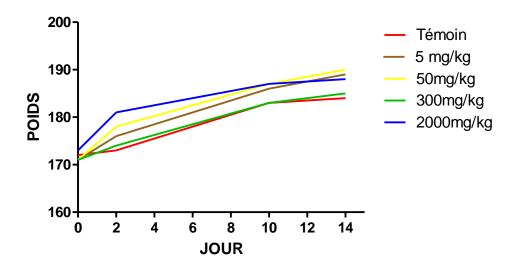


Figure 7: Effet du soluté sur le poids des rats

L'administration du soluté massif n'a pas modifié le poids des rats. Dans les différents lots qui ont reçu le soluté, aucune différence significative n'a été constatée comparativement au lot témoin.

I.2. Effets du soluté sur les autres signes du toxidrome

L'administration du soluté massif à base de gélatine microbiologique n'a occasionné aucune anomalie des paramètres du toxidrome. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau VII :

Tableau VII: Résultat des observations

Signes	Observations
Apathie	Absent
Excitation	Absent
Troubles de la respiration	Absent
Toilettage excessif	Absent
Douleur abdominale	Absent
Refus de nourriture	Absent
Saignement buccal	Absent
Coma	Absent
Diarrhée	Absent
Tremblement	Absent
Convulsion	Absent
Décès	Absent

I.3. Effets sur quelques paramètres hématologiques et biochimiques

- ✓ Effets du soluté massif à base de gélatine microbiologique sur les paramètres hématologiques
- ❖ La **figure 8**décrit le nombre de leucocytes après l'administration du soluté massif

Tableau VIII: Dosage des globules blancs

		Témoin	5mg/kg	50mg/kg	300mg/kg	2000mg/kg
Globules	Moyenne	15,0333	15,6333	11,0000	16,7667	9,1333
blancs						
(103/uL)	Ecart-	5,48574	9,22894	2,19317	5,18684	5,12478
	type					
	pcal		1	0,5	0,5	1

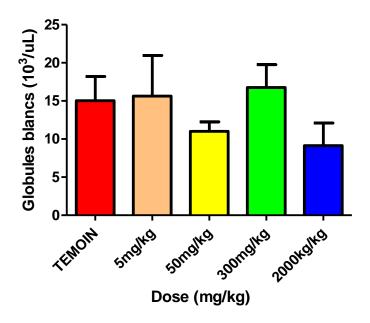


Figure 8: Effet du soluté sur les globules blancs chez le rat Wistar

L'administration du soluté massif à base de gélatine aux différentes doses, n'a pas influencée le nombre de globule blancs.

En effet nous avons observé une diminution non significative des lots ayant reçu les doses 50 mg/kg et 2000 mg/kg.

❖ La **figure 9**décrit le nombre de lymphocytes après l'administration du soluté massif.

Tableau IX: Dosage du taux de lymphocytes

		Témoin	5mg/kg	50mg/kg	300mg/kg	2000mg/kg
Lymphocytes	Movenne	12 3667	14 1667	10,1333	14,1333	5,4333
(103/uL)	TVIOYEIME	12,3007	14,1007	10,1333	14,1333	3,4333
	Ecart-	4,80139	8,76945	2,45425	4,11866	,86217
	type					
	pcal		1	0,5	0,75	0,25

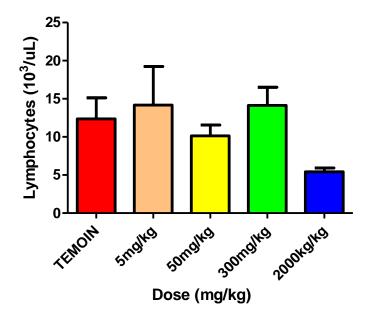


Figure 9: Effet du soluté sur les lymphocytes chez le rat Wistar

Nous avons observé une diminution non significative du taux de lymphocytes du lot 4, lot ayant reçu la dose 2000mg/kg pc, comparativement au lot témoin.

❖ La **figure 10**décrit le nombre de granulocytes après l'administration du soluté massif.

Tableau X: Dosage des granulocytes

		Témoin	5mg/kg	50mg/kg	300mg/kg	2000mg/kg
Granulocytes	Moyenne	726,0000	599,0000	892,0000	790,6667	381,6667
(103/uL)	J	·	·	·	·	·
	Ecart-type	413,09079	430,42886	200,15744	254,59838	351,17137
	pcal		1	0,5	0,75	0,25

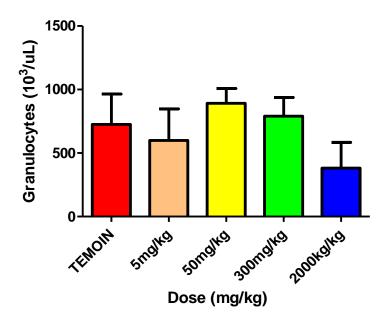


Figure 10: Effet du soluté sur les granulocytes chez le rat Wistar

Nous avons observé une diminution non significative du taux de granulocytes du lot 4, lot ayant reçu la dose 2000mg/kg pc, comparativement au lot témoin.

❖ La **figure 11**décrit le nombre globules rouges après l'administration du soluté massif.

<u>Tableau XI</u>: Dosage du nombre de globules rouges

		Témoin	5mg/kg	50mg/kg	300mg/kg	2000mg/kg
G1 1 1						
Globules rouges	Moyenne	6,3033	5,9467	6,2933	6,3967	6,1233
(106/uL)	Ecart- type	0,95443	0,73433	0,08145	0,33501	0,32593
	pcal		0,75	1	1	0,75

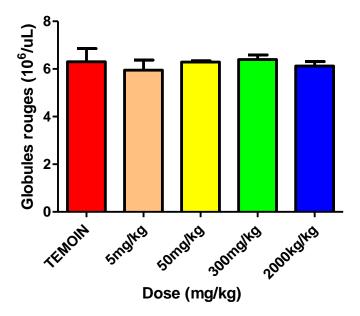


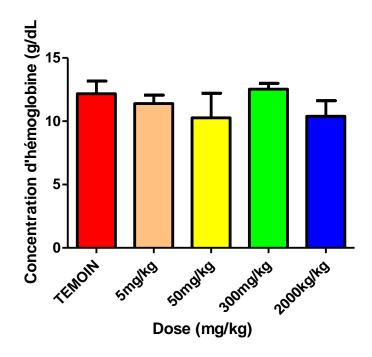
Figure 11: Effet du soluté sur les globules rouges chez le rat Wistar

Le taux de globules rouges chez les rats traité par le soluté massif à base de gélatine et ceux non traités était similaire : nous n'avons pas notéde différence significative.

❖ La **figure 12**décrit l'évolution de la concentration d'hémoglobine après l'administration du soluté massif.

Tableau XII : Dosage de la concentration en hémoglobines

		Témoin	5mg/kg	50mg/kg	300mg/kg	2000mg/kg
Concentration	Moyenne	12,1667	11,4000	10,2667	12,5333	10,4000
d'hémoglobine	-					
(g/dL	Ecart-	1,73877	1,13578	3,35012	0,80208	2,11660
(g/uL	type					
	pcal		0,75	0,50	1	0,25
	_					



<u>Figure 12</u>: Effet du soluté sur la concentration en hémoglobine chez le rat Wistar

Le taux d'hémoglobine chez les rats traité par le soluté massif à base de gélatine et ceux non traités était similaire : nous n'avons pas noté de différence significative.

- ✓ Effets du soluté massif à base de gélatine microbiologiquesur quelques paramètres biochimiques
- ❖ La figure 13décrit l'effet du soluté massif sur l'urée sanguine.

Tableau XIII : Dosage de l'urée

		Témoin	5mg/kg	50mg/kg	300mg/kg	2000mg/kg
	Moyenne	0,2833	0,3467	0,3100	0,3833	0,4067
Urée (mg/l)						
	Ecart type	0,2800	0,3500	0,3000	0,3800	0,3600
	pcal		1	0,50	1	1

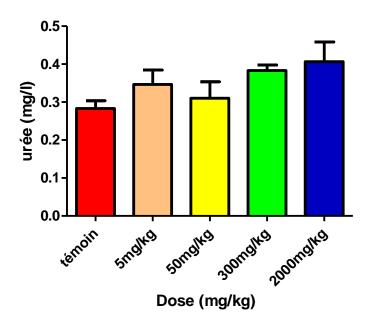


Figure 13: Effet du soluté sur l'urémie chez le rat Wistar

L'administration du soluté (5 mg/kg, 50 mg/kg, 300 mg/kg, 2000 mg/kg PC) a occasionné une augmentation non significative de l'urée, comparativement au lot témoin.

❖ La figure 14décrit l'effet du soluté massif sur la glycémie sanguine.

Tableau XIV : Dosage de la glycémie

		Témoin	5mg/kg	50mg/kg	300mg/kg	2000mg/kg
	Moyenne	0,9833	1,0667	1,2500	1,2267	1,3167
Glycémie						
(g/l)	Ecart type	0,8800	1,1400	1,2500	1,2400	1,3800
	pcal		0,5	1	1	1
	1		,			

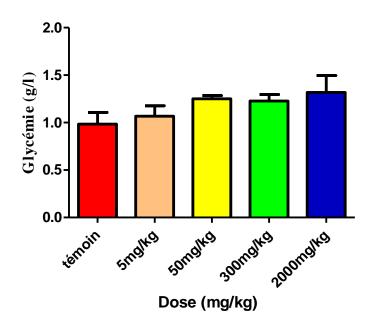


Figure 14: Effet du soluté sur la glycémie chez le rat Wistar

L'administration du soluté (5 mg/kg, 50 mg/kg, 300 mg/kg, 2000 mg/kg PC) a occasionné une augmentation non significative de la glycémie, comparativement au lot témoin.

❖ La **figure 15** décrit l'effet du soluté massif sur la concentration de créatinine.

Tableau XV : Dosage de la créatinine

		Témoin	5mg/kg	50mg/kg	300mg/kg	2000mg/kg
Créatinine	Moyenne	8,5333	9,8000	7,9000	8,4333	8,4533
(mg/l)	·					
	Ecart type	8,4000	9,3000	8,0000	8,2000	5,0000
	pcal		1	0,5	1	1
	_					

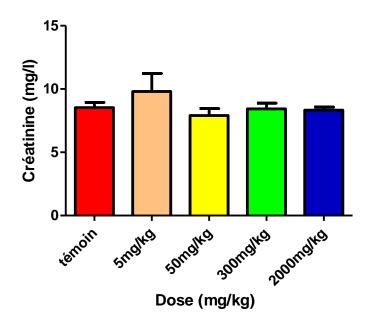


Figure 15: Effet du soluté sur la créatinémie chez le rat Wistar

Aucune variation significative de créatinine des lots traités n'a été observée, comparativement au lot témoin. Nous avons observé une légère augmentation non significative au niveau de la dose 5 mg/kg.

❖ La **figure 16**décrit l'effet du soluté massif sur la concentration de bilirubine totale.

<u>Tableau XVI</u>: Dosage de la bilirubine totale

		Témoin	5mg/kg	50mg/kg	300mg/kg	2000mg/kg
Bilirubine	Moyenne	1,5600	1,6667	1,3667	1,6067	1,7933
totale (mg/dl)	Ecart	1,5400	1,5000	1,5500	1,5400	1,7500
	type	1,5400	1,5000	1,5500	1,5400	1,7500
	pcal		0,75	0,5	0,25	1

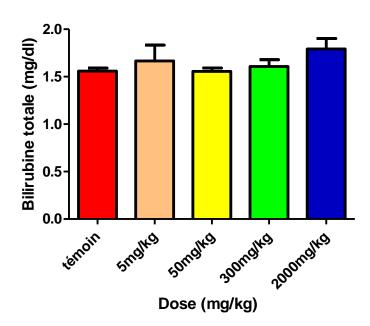


Figure 16: Effet du soluté sur la bilirubine totale chez le rat Wistar

Aucune variation significative de la bilirubine totale des lots traités n'a été observée, comparativement au lot témoin.

❖ La figure 17 décrit l'effet du soluté massif sur les transaminases.

<u>Tableau XVII</u>: Dosage des transaminases

ALAT		Témoin	5mg/kg	50mg/kg	300mg/kg	2000mg/kg
	Moyenne	95,5000	109,6667	88,0000	116,3333	138,0000
	Ecart type	95,5000	107,0000	90,0000	113,0000	138,0000
	pcal		0,75	0,5	1	1
ASAT		Témoin	5mg/kg	50mg/kg	300mg/kg	2000mg/kg
	Moyenne	178,0000	210,6667	192,3333	189,3333	186,0000
	Ecart type	177,0000	177,0000	182,0000	188,0000	146,0000
	pcal		0,75	0,5	0,25	0 ,25

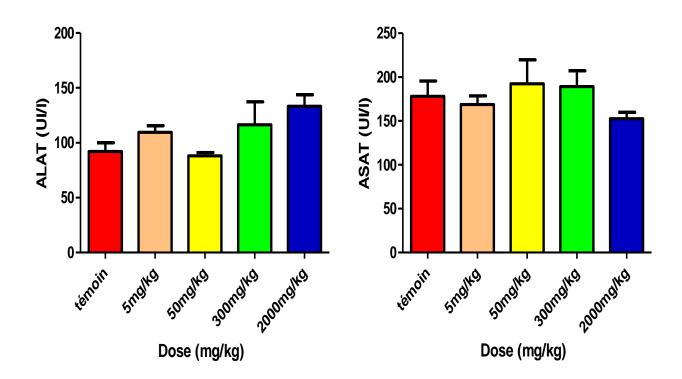


Figure 17: Effet du soluté sur les transaminases chez le rat Wistar

Le soluté massif à base de gélatine microbiologique n'a provoqué aucune modification significative des transaminases (ALAT, ASAT) des lots testé.

❖ La **figure 18**décrit l'effet du soluté massif sur les lipides sanguins.

<u>Tableau XVIII</u>: Dosage des lipides sanguins

		Témoin	5mg/kg	50mg/kg	300mg/kg	2000mg/kg
Chol HDL	Moyenne	0,3100	0,3400	0,3400	0,5967	0,5967
	Ecart- type	0,3000	0,3100	0,3100	0,6100	0,6100
	pcal		0,5	0,25	0,25	0,25
Chol Total		Témoin	5mg/kg	50mg/kg	300mg/kg	2000mg/kg
	Moyenne	0,5833	0,6333	0,5967	0,5867	0,6967
	Ecart- type	0,5900	0,6600	0,6100	0,6000	0,7100
	pcal		0,75	1	0,25	1
Triglycéride		Témoin	5mg/kg	50mg/kg	300mg/kg	2000mg/kg
	Moyenne	0,7667	1,3800	1,3467	1,1600	1,2767
	Ecart- type	0,7700	1,3700	1,5400	1,1000	1,4500
	pcal		1	1	1	1

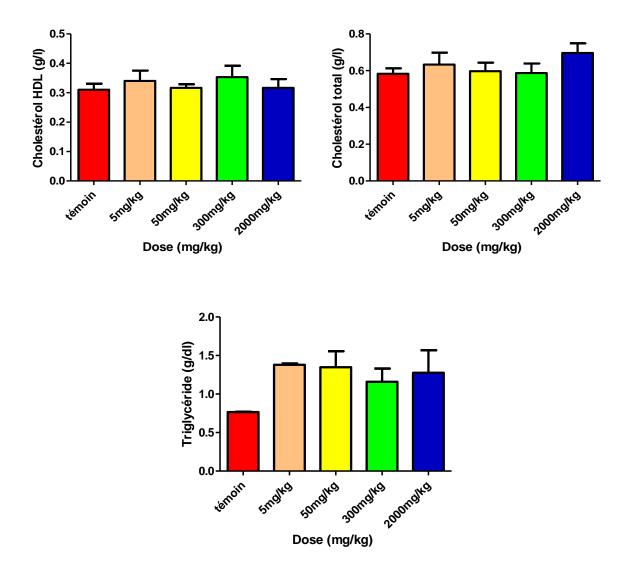


Figure 18: Effet du soluté sur les lipides sanguins chez le rat Wistar

L'administration du soluté (5 mg/kg, 50 mg/kg, 300 mg/kg, 2000 mg/kg PC) a occasionné une augmentation non significative des triglycérides. Ce qui n'était pas le cas des autres lipides (cholestérol total et cholestérol HDL).

Chapitre III DISCUSSION

I. FORMULATION

Les résultats obtenus au cours de la pré-formulation montrent que l'ordre d'ajout n'influence pas la formulation. Les contrôles au cours de la pré formulation ont concouru à optimiser la formulation et limiter le risque de contamination, ceux qui nous a conduits à la formulation.

I.1. Limpidité

L'examen visuel des GFM montre qu'elles sont limpides et il n'y a pas de précipité, pas de changement de coloration, ni de particules en suspension. Ces résultats sont conformes au résumé des caractéristiques du produit (RCP) [13,49]. Cela montre que le procédé de remplissage aseptique permettait d'avoir des GFM limpides ceux-ci a été constaté par GARCIA et al 2010 [23] qui ont mis en place un test de remplissage aseptique pour la fabrication des mélanges de nutrition parentérale.

I.2. Mesure du pH

Le pH de 6,84 de la 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[13].

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 [24].D'un autre côté une stabilité du pH au cours du temps est un bon signe de non-prolifération microbienne. En effet selon la littérature, **ROSSO** et al, 1995[54] ont montré que la stabilité du pH au cours du temps est un marqueur qui pourrait être un indicateur de la contamination microbienne.

I.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 ses médicaments doivent limiter au maximum les risques de contamination [3,51].

Aussi, nos résultats sont conformes à ceux de **TALL** *et al* [62], en France en 2014 qui ont rapporté après observation macroscopique une absencede signes de prolifération microbienne dans leur étude.

I.4. Apyrogénicté

L'administration de la GFM lot 3 n'entraine pas une élévation de la température comparativement aux GFM des lots 1 et 2. Cette propriété d'apyrogénicité est celle que recommande la pharmacopée européenne pour les préparations stériles injectables [13,49].

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

De plus, cette propriété d'apyrogénicité de notre GFM lot 3 est conforme aux recommandations de la pharmacopée européenne pour les préparations stériles injectables [49].

II. EVALUATION DE LA TOXICITE

Les données obtenues après un essai de toxicité orale aiguë chez l'animal peuvent être utilisées pour satisfaire à des besoins de classification du danger par le biais de la DL₅₀, et pour l'évaluation des risques pour la santé humaine et/ou pour l'environnement [41]. C'est sur cette base qu'une évaluation de la toxicité orale aiguë chez le rat du soluté à base de gélatine a été réalisée. Une DL₅₀orale estimée supérieure à 2,5 g/kg a été obtenue. Cette valeur de la DL₅₀a permis de classer la toxicité de ce soluté dans la catégorie 5 du système de classification globalement harmonisé des substances chimiques, catégorie caractérisant les substances faiblement toxiques [46]. Les seuls changements liés au traitement ont été observés les 30 premières minutes après administration de l'extrait : Les animaux présentaient des manifestations de sommeil et de léthargie, mais ces symptômes étaient fugaces. Aucun autre changement lié au traitement n'a été observé sur tout le reste de la durée d'observation, ni aucune diminution de la prise de poids. Ces résultats suggèrent donc que ce soluté présente de très faibles risques pour la santé en administration unique.

Le système hématopoïétique est parmi les cibles les plus sensibles des toxiques, ce qui fait des affections de ce système un bon indice de toxicité d'une substance, comme l'est la diminution du poids corporel [46]. Le soluté n'a entrainé aucune modification significative des paramètres hématologiques évalués chez les animaux traités.

La toxicité hépatorénale a été étudiée par le dosage de quelques paramètres biochimiques. L'ALAT est une enzyme cytosolique secrétée dans les cellules hépatiques d'où elle est libérée dans le sang en cas de nécrose cellulaire hépatique [15,29]. C'est une enzyme spécifique au foie, ce qui en fait un important indicateur très sensible de l'hépatotoxicité [2,50]. L'ASAT est également un indicateur de la destruction des hépatocytes même si en plus du

foie on la retrouve dans le cœur, les muscles squelettiques, les poumons et les reins [15]. Les taux d'ALAT et d'ASAT s'élèvent rapidement lorsque le foie est endommagé pour diverses raisons incluant les nécroses cellulaires hépatiques, l'hépatite, les cirrhoses ainsi que l'hépatotoxicité de certaines drogues [15,50]. L'ALAT et L'ASAT n'ont pas subi une modification significative par rapport au lot témoin au cours de ce travail. Cela montre que le foie et à un degré moindre les muscles n'ont pas été atteints.

Le dosage de bilirubine totale n'a montré aucune variation significative par rapport aux témoins. Cela démontre une absence de cytolyse hépatique.

Par contre nous avons observé une augmentation de la glycémie au niveau des lots traités, sauf que la différence n'est pas significative. Les dosages de l'urée et de créatinine sérique n'ont montré aucune variation significative décès paramètres par rapport aux témoins. Ces résultats suggèrent que ce soluté n'a pas modifié la structure et les fonctions rénales. Les lipides n'ont pas subi de variations significatives au cours de ce travail.

Au regard donc des résultats obtenus, nous pouvons déduire que notre produit s'est avéré atoxique pour la majorité des paramètres testés, donc n'a pas d'influence sur la qualité et la fonction sanguine, puis sur les organes vitaux comme le foie et les reins. Nos résultats sont conformes à ceux de **Marie Thérèse VIE** qui a étudié l'interaction entre la gélatine fluide modifiée et le système [37]. Cela montre pratiquement l'innocuité du soluté massif.

CONCLUSION

Dans notre étude de type expérimentale notre objectif était de formuler un soluté massif de gélatine fluide modifiée et évaluer in vivo sa toxicité aigüe.

Les essais de pré-formulation de GFM réalisé nous ont guidés dans le choix des excipients à incorporer avec la gélatine en essayant de le caractériser le plus conformément possible à la pharmacopée européenne. Ainsi, 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 fait dans une salle blanche. A j1, j2, j3, j7, j14etj28 les contrôles physico-chimique, galénique et biologique réalisés nous montrent que la préparation est stable avec une coloration légèrement jaunâtre, limpide et cela est conforme au résumé des caractéristiques des gélatines fluides modifiées. Le test d'apyrogénicité sur des lapins et le test de stérilité par ensemencent en milieu solide et liquide nous permettre de qualifier la GFM d'apyrogène et de stérile

Le test de toxicité orale aiguë chez le rat a permis d'obtenir une $DL_{50} > 2,5$ g/kg, caractéristique des substances à très faible toxicité. Aucun signe d'intoxication majeur lié au traitement n'a été observé sur toute la durée d'observation. La solution semblait présenter aucune propriété anémiant, hépatotoxique, et nephrotoxique. Ces résultats suggèrent que l'utilisation du soluté dose thérapeutique présente de faibles risques pour la santé.

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.

Les préparations injectables: cours de pharmacie galénique. Master1 2015-2016.

Abidjan: Université Félix Houphouet Boigny, 2015.12-25.

2. Al-Habori M., Al-Aghbari A., Al-Mamary M., et al.

Toxicological evaluation of Catha edulis leaves: a long term feeding experiment in animals.

J. Ethnopharmacol. 2002; 83: 209-217.

3. ANSM. France

Bonnes pratiques de fabrication. BO n° 2015/12 bis du Ministère des affaires sociales et de la santé.

Paris: DFAS, 2016. 314

4. Assane C., Amor T.

Etude pour le développement des industries pharmaceutiques locales (IPL) en côte d'ivoire: rapport final 2014 déc .7-28

5. Auffret C., Nau A., Salle J., et al.

La gélatine fluide modifiée, nouveau succédané du plasma sanguin Communication au Vême In: Congrès International de Transfusion Sanguine. Paris. 13-19 Septembre 1954.953

6. Blond E., Diouf E., Tall M., 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;69:306-316

7. Cathala B.

Les solutés de remplissage vasculaire en médecine d'urgence. La Revue des SAMU.2002;(Hors-Série 200):178-87.

8. Chène C.

La Gélatine', J. de l'Adrianor, Agro-jonction N° 24, Septembre/Octobre 2000. 752-88

9. Clark D., Fielder R., Joseph C., et al.

The future for acute oral toxicitytesting.In: Balls M, Bridges J, Southee J.Animals and Alternatives in Toxicology.. London: Macmillan Academic and Professional, 1991.1-21.

10. Cuq J.

Les méthodes modernes d'analyse rapide en microbiologie Alimentaire. Agro-Alimentaire Information.1993;(3):133

11. Dewachter P., et al.

Effets rhéologiques in vivo des substituts plasmatiques. Ann. Fr. Anesth. Réan. 1992; 11:516-525.

12. Dictionnaire Widal

Règle de bonne pratique de fabrication des médicaments stérile.

13. Conseil Européen.

StrasbourgDirection européenne de la Qualité du Médicament et des Soins de Santé. PharmacopéeEuropéenne.7^{ème} éd.

Strasbourg: conseil européen, 2013.73

14. Duconseille A., Wien F., Audonnet F., et al.

The effect of the gelatine and ageing on the secondary structure and water dissolution Foof hydrocolloids. 2017;66:378-388

15. Dufour D., Lott J., Nolte F., et al.

Diagnosis and monitoring of hepatic injury II. Recommandation for use of laboratory tests in screening, diagnosis and monitoring. Clin.Chem.2000;46: 2050-2068.

16. Chast F.

Histoire contemporaine des médicaments.

Paris: Éditions La Découverte, 1995.

17. Fabre I.

Méthodes substitutives à l'expérimentation animale : aspects réglementaires, état de l'art et perspectives.

Bull Acad Vét. 2008; 5: 403-407µ

18. Fielder R.

The fixed dose procedure as an alternative to the classical LD50 test: acceptance by the EEC and OECD. In Alternative Methods in Toxicology and the Life Sciences. Vol 11

New York: Mary Ann Liebert, 1995. 269-274.

19. Forestier F., Janvier G.

Actualités sur les solutés de remplissage en anesthésie. In : SFAR.Paris. Conférences d'actualisation. 42e Congrès national d'anesthésie et réanimation.

Paris: Elsevier, 2000.151-163.

20. Fossati P., Prencipe L.

Serumtriglyceridesdeterminedcolorimetri-callywith an enzyme that produces hydrogen peroxide.

Clin.Chem.1982; 28: 2077-2080.

21. Gajdos V.

Recommandations pour la pratique clinique: remplissage vasculaire des hypovolémies relatives ou absolues.

Réan. Urg. 1997;6(3, bis):331-427.

22. Galaev I., Mattiasson B.

Smart Polymers Applications in Biotechnology and Biomedicin. 2007; Chap. 8, 2nd ed.

23. Garcia C., Diebold G., Abbara A., et al.

Mise en place du test de remplissage aseptique pour la fabrication des mélanges de nutrition parentérale (MNP) :de la théorie à la pratique. Paris:Elsevier-Masson,2010.203

24. Gélatin. In: Encyclopedia of Polymer Science and Engineering. Vol. 3ème.éd. USA:Willey and Sons, 1987.488

25. Gella F., Olivella T., Cruz P., et al.

A simple procedure for routine determination of aspartate aminotrans-ferase and alanine aminotransferasewith pyridoxal phosphate.

Clin Chim Acta. 1985; 153: 241-247.

26. Greff-Mirguet.G.

Echantillonnage et analyse des endotoxines dans l'air.

Cahier de Notes Documentaires-Hygiène et Sécurité du Travail.2002;187:73-83.

27. Hir A.

Pharmacie Galénique-Bonnes Pratiques de Fabrication des Médicaments, 8^{ème} éd. Paris: Masson; 2001.76-78

28. Hung R., Schawrtz J.

Microencapsulation of Chlorpheniramine Maleate-Resin Particles with Crosslinked Chitosan for Sustained Release. Pharmaceutic Development and Technology. 1999;4:107-115.

29. Kaneko J., Harvey J., Bruss M.

Clinical Biochemistry of Domestic Animals.5th ed.. San Diego: Academic Press; 1997.

30. Keenan T.

La macromolécule de gélatine.

Paris: Ellipse, 1998. 92-111

31. Kroll M., Roach N., Poe B., Elin R.

Mechanism of interference with the Jaffé reaction for creatinine. Clin. Chem. 1987;33: 1129-1132.

32. Lapointe G.

Notions de Toxicologie. Québec: Commission de la Santé et de la Sécurité du Travail du Québec, 2004.67:55.

33. Laxenaire M., 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;13:301-310.

34. Le H..

Pharmacie galénique: bonnes pratiques de fabrication des médicaments. 8^{ème} éd. Paris:Masson, 2001.76-78.

35. Lindgren P., Thelestam M., Lindquist N.

First CFN symposium on LD50 and possible alternatives. Acta Pharmacol Toxicol.1983;52 (2): 22-27

36.Malzert A.

cours Pharmacie – Galénique L2 Université de Caen, 2014.

37. Marie T.

Etude pharmacocinétique et interaction avec le système réticuloendothélial d'un substitut du plasma: la gélatine fluide modifiée. 274Th Doctorat de l'Université de Montpellier: Faculté de Pharmacie de Montpellier. Université de Montpellier, 1993, n°465

38. Negadi S. et al

Etude rétrospective et descriptive des solutés massifs au sein du CHU de Telmcen durant les années : 2008,2009 et 2010.Université Abou Berk Belkaid, Juin 2012:9

39. Norland R..

Coatings Technology Handbook', Vol. 65(Fish Gelatin and Fish Glue), Norland Products, 2006 Inc 3rd ed. 345-421

40. OCDE.Paris.

Résumé des considérations du rapport des groupes d'experts de l'OCDE sur la toxicologie à court et à long terme.

Lignes Directrice de l'OCDE pour les Essais de Produits Chimiques.1979;11 (4):1-15.

41. OCDE. Paris

Toxicité orale aiguë : méthode de la dose prédéterminée.

Lignes Directrice de l'OCDE pour les Essais de Produits Chimiques.2001a;1 (4):1-15.

42. OCDE. Paris

Toxicité orale aiguë: méthode par classe de toxicité aiguë. Lignes Directrice de l'OCDE pour les Essais de Produits Chimiques.2001b; 1(4):1-14.

43. OCDE. Paris

Étude de toxicité orale à dose répétée pendant 28 jours sur les rongeurs. Lignes Directrice de l'OCDE pour les Essais de Produits Chimiques.2008a; 1(4):1-14.

44. OCDE. Paris

Toxicité orale aiguë: méthode de l'ajustement des doses. Lignes Directrice de l'OCDE pour les Essais de Produits Chimiques.2008b;1(4):1-29.

45. OCDE. Paris

Études de toxicité chronique.

Lignes Directrice de l'OCDE pour les Essais de Produits Chimiques. 2009;1(4):1-16.

46. OECD. Paris

Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and EnvironmentalEffects of Chemical Substances:Part 2.

Paris:OECD, 2001. 20-24.

47. Olive J., Mori F., Toda Y.

Influence of the Molecular-Weight Distribution of Gelatin on Emulsion Stability.

J.of Colloid and Interface Science.2001; 243:476-482

48. Oliver J.

Opportunities for using fewer animals in acute toxicity studies. In ChemicalsTesting andAnimalWelfare Solna:The National ChemicalsInspectorate,1986.119-142.

49. Pharmacopée européenne 9.0 In : pharmacopée européenne Source

50. Pratt D., Kaplan M.

2000. Evaluation of abnormal liver-enzyme results in asymptomatic patients.

N. Engl. J. Med.2000;342:1266-1271.

51. **Rehel C.**Gestion du risque de contamination croisée en industrie pharmaceutique. Th d'Exercice: Bordeaux. Université de Bordeaux, 2015

52. Rhodes, C., Thomas M., Athis J.

Principles of testing for acute toxiceffects. <u>In:</u>BallantyneB., MarrsT, TurnerP.General and Applied Toxicology. Vol. 1 New York: Stockton Press, 1993.49-87.

53. Rodriguez F., Michaud P.

Méthodologie expérimentale et optimisation, Formes Pharmaceutiques pour application locale. 1996: Paris. 236-73.

54. Rosso L., Lobry J., Bajard S., et al.

Description of the combined effect of temperature and pH on microbial growth by a convenient model. Applied and Environmental Microbiology.1995; 61: 610-616.

55.Sarra A.

PhD in Pharmaceutics, Département de Pharmacie, Algérie:Tlemcen(université Abu BekrBelkaid).55,

56. Schlede E., Genschow E.Spielmann H.et al

Oral acute toxic class method: a successful alternative to the oral LD50 test. Reg. Tox. and Pharm. 2005;42: 15-23.

57. Schriebe.R, Gareis .H.

Gelatine Handbook: Theory and Industrial Practice. USA: Wiley-VCH Verlag&Co. KCaA, 2006.50-116

58. Schwegman .J, Hardwick L., Akers J.

Pratical formulation and process developpement of freeze-dried products. Pharma Dev Technol.2005;10(2):151-173

59. Seibert H., Balls M., Fentem J., et al.

Acute toxicitytesting in vitro and the dassification and labelling of chemicals. ATLA.1996;24: 499-510

60. Silbergeld E.

La Toxicologie : Introduction. In Encyclopédie de Sécurité et de Santé au Travail.

Organisation Internationale du Travail, Genève. 2000;1:332-333.

61. Surh J., Decker E.

Properties and Stability of Oil-in-Water Emulsions Stabilized by Fish Gelatin.

J. of Food Hydrocolloids. 2006; 20:596-606

62. Tall M., 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. (consulté le 05 Novembre

2018)http://dx.doi.org/10.1016/j.pharma.2014.09.002

63. Thomas L.

The treatment of cholera by the copious of aqueous and saline fluids into veins In: Dauphin A., Cazalaa J., Pradeau D., et al.

Les solutés de perfusion: histoire d'une forme pharmaceutique majeure née à l'hôpital.

Rev Hist Pharm. 2003;91(338):219-238.

64. Trevan J.

The error of determination of toxicity. Proc. Roy. Soc. 1927;101B: 483-514.

65. Ubeid M.Les succédanés du plasma: les composés macromoléculaires.

Th. Pharm: VilleUniversité, 1969

66. Veillard M.

La formulation ou le choix des excipients. S.T.P. PHARMA. 1990.(2):29-36.

67. Walum E.

Acute Oral Toxicity. Env. Health Persp.1998;106: 497-503.

68. Ward A.

The Science and Technology of Gelatin London: Academic Press, 1997. 99; 159-207

69. **Welz M**.Examination of Self-Crosslinked Gelatin as a Hydrogel for Controlled Release.

Journal of Pharmaceutical Sciences. Jan 1992; 81(1):753-833.

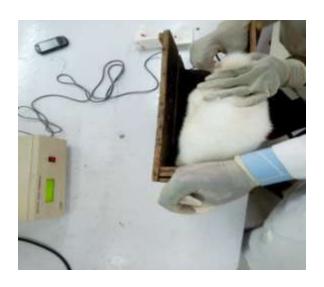
ANNEXES



1) Souris recevant le soluté



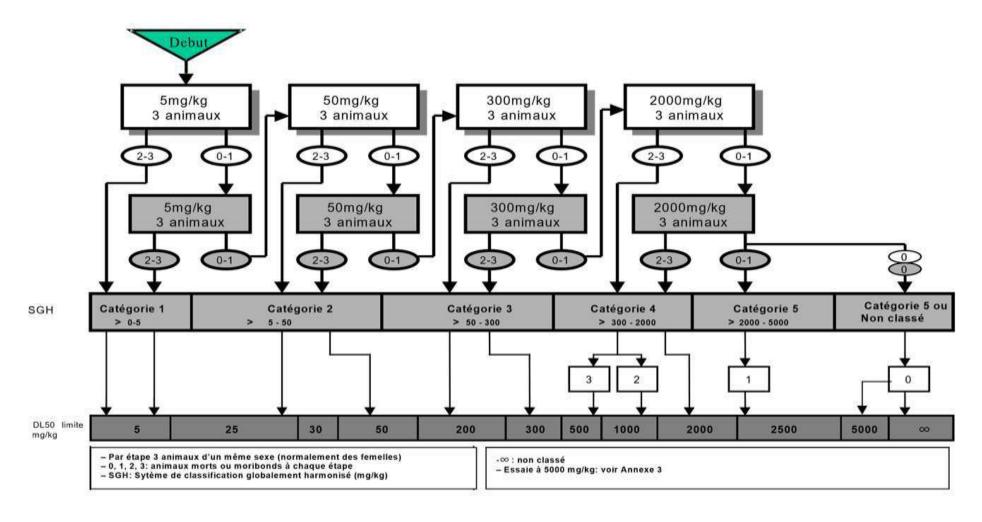
2) Test de stérilité



3)Test d'apyrogenicité



4)GFM formulés



5) Schémas d'essai avec une dose initiale de 5 mg/kg

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS	XXVII
LISTE DES TABLEAUX	XXIX
LISTE DES FIGURES	xxx
INTRODUCTION	1
PREMIERE PARTIE : REVUE DE LA LITTERATURE	5
CHAPITRE I : GÉNÉRALITÉS SUR LES SOLUTÉS INJECTABLES	6
I. DEFINITIONS	7
II. DIFFERENTS TYPES DE SOLUTESII.1. CristalloïdesII.2. Colloïdes	7
CHAPITRE II : GÉNERALITÉS SUR LA GÉLATINE	13
I. DEFINITION	14
II. COMPOSITION CHIMIQUE DE LA GELATINE	14
III. TRANSFORMATION DU COLLAGENE EN GELATINE	16
IV. STRUCTURE MOLECULAIRE DE LA GELATINE	18
V. PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DE LA GELATINE V.1. Point isoélectrique	
V.2. Solubilité et gonflement	
V.3. Viscosité	
V.4. Pouvoir gélifiant ou force de gel	20

V.5.	Signification du degré de bloom	21
V.6.	Exemples des applications pharmaceutiques	22
CHAPI ⁻	TRE III : FORMULATION DES PREPARATIONS INJECTABLES	23
I. VO	DIES D'ADMINISTRATION	24
II. PK	ROPRIETES DES PREPARATIONS PARENTERALES	24
II.1.	Limpidité	24
<i>II.2.</i>	Neutralité	25
<i>I.2.</i>	Isotonicité:	27
<i>I.3.</i>		
<i>I.4</i> .	Apyrogénicité	29
II. FA	ABRICATION DES PREPARATIONS INJECTABLES	29
	Locaux	
II.2.	Personnel	30
<i>II.3.</i>	Les matières premières et les objets de conditionnement	30
	Conditionnement des préparations injectables	
III. CO	ONTROLES	32
	. Contrôles préliminaires	
	Contrôle de la limpidité	
	Contrôle de la neutralité	
III.4	. Apyrogénicité	34
III.5	. Isotonie	34
CHAPI ⁻	TRE IV : GÉNÉRALITÉS SUR L'EFFET TOXIQUE D'UN MEDICAMENT	36
I. DI	EFINITION DE LA TOXICOLOGIE	37
II. EV	VALUATION DES EFFETS TOXIQUES	37
	Toxicité aigue	
	Toxicité à court terme avec administration de doses répétées et	
subc	hronique	39
II.3.	Toxicité chronique	41
II.4.	Méthodes substitutives à l'expérimentation animale	41
DFUXII	EME PARTIE : ÉTUDE EXPÉRIMENTALE	42
,		

CHAPITRE I : MATÉRIEL ET MÉTHODES		43
I. CA	DRE ET TYPE D'ETUDE	44
<i>I.1</i> .	Cadre de l'étude	44
<i>I.2.</i>	Type et durée de l'étude	44
II. MA	ATERIEL ET METHODE	44
II.1.	Formulation	44
<i>II.2.</i>	Contrôles	48
<i>II.3.</i>	Evaluation de la toxicité	49
II.4.	Analyses statistiques	52
CHAPIT	RE II : RÉSULTATS	53
I. FO	PRMULATION	54
<i>I.2.</i>	Test d'apyrogénicité	56
<i>I.1</i> .	Effets du soluté massif à base de gélatine microbiologique sur	57
CHAPIT	RE III : DISCUSSION	72
I. FO	PRMULATION	73
<i>I.1</i> .	Limpidité	73
<i>I.2.</i>	Mesure du pH	73
<i>I.3.</i>	Stérilité	74
<i>I.4</i> .	Apyrogénicté	74
II. EV	ALUATION DE LA TOXICITE	75
CONCL	USION	77
RECOM	1MANDATIONS	79
RÉFÉRE	NCES	81
ANNEX	ES	90

RESUME

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. 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 formuler et évaluer in vivo la toxicité aigüe d'un soluté massif à base de gélatine fluide modifiée.

Matériel et Méthodes

Nous avons réalisé des formulations à base de gélatine microbiologique de NaCl, KCl, CaCl, et de lactate de Na. Les essais de stabilité préliminaires effectués nous ont permis de sélectionner la formulation adéquate. Cette préparation injectable a été soumise à des essais galéniques, microbiologiques, et de stabilité de j1 à j28. Enfin nous avons réalisé la toxicité aigüe après administration unique.

Résultats

Les essais de formulation effectués, nous ont permis d'identifier une formulation de 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 à37°C. Enfin notre préparation injectable est restée stable pendant 28 jours de conservation.

Le test de toxicité orale aiguë chez le rat a permis d'obtenir une DL₅₀ > 2,5 g/kg

Conclusion

Les résultats de ce travail paraissent 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; toxicité