

N° d'ordre :

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE MOULOUD MAMMERI DE TIZI-OUZOU

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE CHIMIE



DOMAINE : SCIENCES DE LA MATIERE
FILIERE : CHIMIE

MEMOIRE DE MASTER
SPECIALITE : *CHIMIE PHARMACETIQUE*

THEME

**Extraction, identification et mise en évidence de l'activité
antimicrobienne des excipients contenus dans le sirop
MAXILASE**

Présenté par :

- *Mansour Nacéra .*
- *Chabane Dalila.*

Soutenu publiquement, le 15 juillet 2021 devant le Jury composé de :

<i>Nom et Prénom</i>	<i>Grade</i>	<i>Affiliation</i>	<i>Qualité</i>
<i>Mme HIKEM Djamila</i>	<i>Maitre de conférences A (MCA)</i>	<i>UMMTO</i>	<i>Présidente</i>
<i>Mr BENCHOUAK Mounir</i>	<i>Maitre assistant classe A (MAA)</i>	<i>UMMTO</i>	<i>Examineur</i>
<i>Dr.TOUBAL Lamia</i>	<i>Pharmacienne spécialiste en chimie analytique</i>	<i>CLCC Tizi-Ouzou</i>	<i>Promotrice</i>

Remerciement

Nous remercions tout d'abord le bon dieu le tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail, et qui nous a orientées sur le chemin du savoir et aux portes de la réussite.

Nous tenons à signifier notre reconnaissance à l'ensemble de la personne physique ou morale qui a contribué de près ou de loin à faciliter nos tâches dans le cadre de cette étude et nos remerciements vont :

A notre promotrice

Madame TOUBAL.Lamia , pharmacienne spécialiste en chimie analytique à CLCC Tizi-Ouzou, de nous avoir permis de réaliser ce modeste travail.

A notre présidente de jury

Madame HIKAME.Djamila

Nous vous remercions pour l'honneur que vous nous accordez de bien vouloir présider le jury de notre soutenance.

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

A notre membre du jury

Monsieur Benchoulak .Mounir

Nous vous remercions pour l'honneur que vous nous accordez en acceptant d'examiner notre travail et de participer à ce jury.

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

Nous exprimons nos vifs remerciements pour tout le personnel du laboratoire microbiologique de l'hôpital CHU DE TIZI-OUZOU ainsi que le personnel du laboratoire de chimie analytique pour leur soutien et disponibilité, qui nous ont permis d'effectuer notre travail.

Dédicace



Louange à  de nous avoir guidé dans le bon chemin pour
Réaliser ce travail

C'est avec un très grand honneur que je dédie ce modeste travail à :
A la lumière de mes yeux, l'ombre de mes pas et le bonheur de ma vie, mes
parents qui m'ont apportés leurs appuis durant toutes mes années d'étude, pour
leurs sacrifices et soutiens qui m'ont donné confiance et courage.

A mes chers frères Ghiles et Hassan et ma chère sœur Lynda pour leurs
soutiens et encouragements tout au long de la réalisation de ce travail.

A ma chère partenaire de travail Nacéra, A mes copines qui me soutiennent et
particulièrement : Malha ; Dihia..

A toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de
ce travail.

DALILA

Dédicace



C'est avec un très grand honneur que je dédie ce modeste travail à mes chers parents qui ont été toujours présents pour me soutenir et m'encourager.

Je dédie aussi ce travail à :

Mes chères frères et sœurs que j'estime beaucoup

A toutes ma famille

A tout mes amis(es)

A ma binôme Dalila et toute sa famille

NACERA



Merci

Liste des abréviations

AINS : Anti inflammatoire non stéroïdien.

AIS : Anti inflammatoire stéroïdien.

AA : Acide arachidonique.

APHB : Acide parahydroxybenzoïque.

ANSM : Agence Nationale de sécurité du médicament.

Anti-H₂ : Antihistaminique H₂.

BCP : Poupree de bromocrésol.

CCM : Chromatographie sur couche mince.

C_{max} : Concentration maximale.

DFG : Débit de filtration glomérulaire.

EFSA : L'autorité européenne de sécurité des aliments.

EI: Effet indésirable

E110 : Jaune orangé S

E214 : Ethyle parabène.

E215 : Ethyle parabène et son sel de sodium.

E217 :Parahydroxybenzoate de propyle sodé

E218 : Méthyle parabène.

E219 :Parahydroxybenzoate de méthyle sodé.

IEC : Enzyme de conversion.

IPP : Inhibiteur de la pompe proton

MICI : Maladies inflammatoires chroniques intestinales.

OMS : Organisation mondiale de la santé.

ORL : L'oto-rhino-laryngologie.

P : Para

PA : Principe actif

PG : Prostaglandine.

PS : Phase stationnaire.

R : Radicale.

RF : rapport frontal.

S164 : Huile essentiel de mandarine.

T : solution témoins.

Tmax : Temps nécessaire pour obtenir une concentration maximal.

UV : Ultra-violet.

VD : Volume de distribution.

Liste des figures

Figure 01:Structure développée des parabènes.....	22
Figure 02: dépôt des substances.	33
Figure 03:Devloppement de la plaque dans la cuve de migration	34
Figure 04: Développement bidimensionnel.....	35
Figure 05:Sirop MAXILASE	42
Figure 06:protocole de l'extraction.	45
Figure 07:protocole de séchage	46
Figure 08:solution témoin T1et T2	48
Figure 09:protocole de préparation de chambre de développement	49
Figure 10:traçage de la plaque et dépôt des solutions.....	50
Figure 11:Le protocole de migration des composantes.....	51
Figure 12:Révélation des spots.....	52
Figure 13:Les milieux de cultures	53
Figure 14:ensemencement des différents milieux de culture	54
Figure 15:l'étuve du laboratoire de Microbiologie du CHU Tizi-Ouzou	55
Figure 16:la jarre du laboratoire de microbiologie du CHU TIZI OUZO.....	55
Figure 17:résultats de migration des composantes par CCM	58
Figure 18:résultats de 1er ensemencement.....	60
Figure 19:résultats de 2 éme ensemencement.....	61

Liste des tableaux

Tableau I: classification pharmacologique des AINS.....	6
Tableau II: la posologie des principaux anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)	11
Tableau III: formule semi développés des parabènes.....	23
Tableau IV: caractéristiques physico-chimique des parabènes	24
Tableau V: Les couches minces utilisées.	32
Tableau VI : appareillage et verreries utilisés dans extraction des parabènes à partir du MAXILASE®	43
Tableau VII: appareillage et verreries utilisé dans l'identification des excipients (parabènes)	47
Tableau VIII: Les résultats des rapport frontaux des substances	59

Table des matières

Introduction	2
---------------------------	----------

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I : les anti –inflammatoires

1-Définition	5
2-Classification des anti- inflammatoires.....	5
2.1. Les anti inflammatoires stéroïdiens (AIS).	5
2.2. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS).	5
2.2.1. Définition.	6
2.2.2. Classification des AINS.....	6
2.2.3 Mécanisme d'action des AINS.....	8
2.2.4 Propriétés thérapeutiques des AINS (pharmacodynamie).	8
2.2.5 Pharmacocinétiques des AINS	9
2.2.6. Posologie.....	10
2.2.7. Indication thérapeutiques des AINS	11
2.2.8. Effets indésirables d' AINS.	12
2.2.9. Contre-indication.....	13

Chapitre II : Les sirops

1-définition d'un sirop	16
2-composition d'un sirop.	16
2-1 Principes actifs.....	16
2-2 Excipients	16
3- classification des sirops.....	16

3-1 les sirops simples à base de sucre.	16
3-2 les sirops simples médicamenteux	17
3-3 les sirops composés.....	17
4- préparation des sirops.	17
4 - 1 Principe des méthodes de préparation.....	17
4-2 matériels nécessaires pour la préparation	17
5- conservation et altération des sirops.	18
5-1-Conservations	18
5-2-Altérations	18
6- Stabilité des sirops.	19
6-1 Aspect chimique.	19
6-2- Aspect physique.....	19
6.3. Aspect microbiologique.....	19
7- Avantages et inconvénients des sirops.....	19
7- 1-Les avantages	19
7-2 –Les inconvénients.....	20

Chapitre III : Les parabènes

1-Présentation.	22
2-Propriétés physico-chimiques	23
3-Synthèse des parabènes.	24
3-1-Synthèse chimique.....	24
3-2-Synthèse naturelle.....	24
4-Mécanismes et spectre d'action.....	25
5-Domaine d'utilisation.	25
5.1Alimentaire	26
5.2 .Cosmétique	26
5.3. Pharmaceutique.....	26
6. Exposition de la population aux parabènes.	26
7-Toxicité des parabènes.....	27
8-Les avantages des parabènes	28
9-Limites des parabènes.....	28

Chapitre IV: la chromatographie sur couche mince(CCM).

1-Historique.....	30
2-Principe de la CCM.	30
3-Technique de la CCM.....	31
3-1-Matériel utilisé.....	31
3-1-1-Plaque.	31
3-1-2-La phase stationnaire.	31
3-1-3-La phase mobile.....	32
3-1-4-Cuve ou enceinte de migration.	32
3-2-Mise en œuvre de la CCM.	33
3-2-1-Dépôt de l'échantillon.....	33
3-2-2-Développement de la plaque.....	34
3-2-2-1-Développement linéaire.....	34
3-2-2-2-Développement bidimensionnel.....	35
3-2-3-Révélation.	36
3-2-3-1-Développement par des réactifs.....	36
4-Grandeurs caractéristiques de la CCM.	38
5-Applications de la CCM.....	39
6-les avantages de la CCM.....	39

PARTIE PRATIQUE

Chapitre V : Matériels et méthodes.

1. Extraction des excipients (les parabènes) à partir du sirop (MAXILASE®).	42
1.1. Matériels.	42
1.1.1. La Matrice d'étude.....	42
1.1.2.Appareillage, verrerie et autre matériel.	43
1.1.3. Réactifs et solvants.	43
1.2. Méthode.....	43
1.2.1. L'extraction proprement dite.....	44

1.2.2.Traitement de la phase organique globale (les 2 extraits réunis).....	45
1-2-2-1-Lavage des extraits.....	45
1-2-2-2-Séchage des extraits	46
1.2.3. Obtention de la solution finale à analyser	46
2.Identification des excipients par Chromatographie sur couche mince (CCM).	47
2.1 matériels.....	47
2.1.1. Appareillage, verrerie et autre matériel.....	47
2.1.2 Réactifs.	47
2.2. Méthode.	48
2.2.1. Préparation de chambre de développement.....	48
2.2.2.Préparation du support chromatographique.	49
2.2.3.Migration des composés.	50
2.2.4. Révélation des spots.	52
3. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne des excipients (parabènes) dans le sirop MAXILASE®	52
3.1. Matériels.	52
3.2. Méthode.....	53

Chapitre IV : Résultats et discussions

1. Extraction des excipients (parabènes).	58
2. Identification des excipients (parabènes).	58
3. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne des parabènes.	60
3.1. Résultats du 1 ^{er} ensemencement après incubation.....	60
3.2 Résultats du 2 ^{ème} ensemencement réalisé après la conservation du sirop a température ambiante pendant 7 jours suivis d'incubation.....	61
Conclusion.....	63

Références bibliographiques

Résumé

Introduction générale

Introduction

Les médicaments anti-inflammatoires constituent une classe médicamenteuse à part entière en raison de leur forte fréquence d'utilisation, étant donné qu'ils présentent des propriétés antidouleur largement recherchées dans la majorité des états pathologiques.

Ces anti-inflammatoires existent sur le marché sous différentes formes pharmaceutiques notamment : les comprimés, suppositoires, patchs, gélules mais aussi sous forme de sirops.

Le MAXILASE est un anti-inflammatoire sous forme de sirop pédiatrique, indiqué pour les maux de gorge rencontrés chez les enfants.

Il est essentiellement composé de principe actif « le alpha amylase », de saccharose et de parabènes comme conservateurs antimicrobiens.

Les parabènes constituent une famille de conservateurs antimicrobiens à large spectre d'action, très largement utilisés dans de nombreux domaines (biologie, agroalimentaire...) notamment le domaine pharmaceutique.

Notre présent travail réalisé au laboratoire de chimie analytique du département de pharmacie de Tizi-Ouzou en collaboration avec le laboratoire de microbiologie du CHU NEDIR MOHAMMED de Tizi-Ouzou, a pour but de mettre en évidence l'activité antimicrobienne des excipients « PARABENES » dans le sirop MAXILASE, une fois extraits et identifiés à partir de cette même matrice.

Ainsi il comporte deux parties :

Une partie bibliographique qui porte sur des généralités relatives aux anti-inflammatoires et les sirops, une présentation complète des parabènes, ainsi que de la technique de chromatographie sur couche mince qui sera utilisée pour l'identification des parabènes.

Une partie pratique organisée en trois étapes : l'extraction des parabènes à partir du sirop pédiatrique MAXILASE, leurs identifications par chromatographie sur couche mince (CCM) et enfin la mise en évidence de leurs activités antimicrobiennes in vitro.

Partie bibliographique

Chapitre I

Les anti-inflammatoires

1. Définition

Les anti- inflammatoires sont des médicaments symptomatiques de structure très diverse , utilisés pour antagonisant les processus inflammatoires par inhibition de cyclo-oxygénase cox1 en particulier cox2 , ce processus peut être localisé ou généralisé d'origine diverse (infection , brulure , irritation , trouble métabolique ...etc.) .Ce dernier devenu exagère chronique ou associé à des phénomènes immunologiques quel que soit la cause d'inflammation[1]

2. Classification des anti- inflammatoires

Les anti-inflammatoires sont repartis en 2 classes :

2.1. Les anti inflammatoires stéroïdiens (AIS)

Les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) ou les glucocorticoïdes, sont des dérivés des hormones naturelles cortisol et cortisone dont ils se distinguent par un pouvoir anti-inflammatoire plus marqué et à l'inverse, un moindre effet minéralocorticoïde.

Les AIS sont employés dans le domaine médical pour leurs propriétés :

- Antiallergiques (asthme, œdème).
- Anti-inflammatoires (rhumatisme, polyarthrites).
- Immunosuppressives.
- Immunomodulatrices

Le mécanisme d'action passe par une inhibition de la phospholipase A2, ce qui explique qu'il n'y a pas d'augmentation des leucotriènes

L'usage des glucocorticoïdes est associé à de nombreux effets indésirables, l'apparition de cet effet s'acérat avec le prolongement de la durée du traitement et l'augmentation de la posologie.

Les troubles observés sont centrés sur la complication métabolique, osseuse et infectieuse [2].

2.2. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)

2.2.1. Définition

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) sont des médicaments symptomatiques capables de centrer les manifestations de la réaction inflammatoire, ils caractérisent par

l'absence d'une structure chimique stéroïdienne. Les AINS appartiennent à divers catégories mais sont tous capables d'inhiber le COX qui cause la formation de certaines substances comme la prostaglandine, médiateurs chimiques nécessaires au développement de l'inflammation, ils sont utilisés en rhumatologie, en urologie et en gynécologie. [3]

2.2.2. Classification des AINS.

Plusieurs classifications des AINS sont aujourd'hui possibles, les principales étant les classifications pharmacologiques et chimiques.

➤ Pharmacologiques.

La classification pharmacologique des AINS repose sur leurs spécificités pour l'une des deux isoformes de cox.

Tableau I: Classification pharmacologique des AINS [4]

Mécanisme d'action	Anti- inflammatoires non stéroïdiens
Inhibition sélective de la cox-1	Aspirine a faible posologie
Inhibition non sélective de cox-1et cox-2	Majorité des « AINS classiques »
Inhibition sélective de cox-2	Les « COXIBS »
Inhibition préférentielle de la cox-2	« Meloxicam, Nimèsulide, Nabumétone »

➤ Chimiques

1-Les dérivés salicylés : sont généralement des analgésiques et anti pyrétiques utilisés pour traiter les maladies rhumatismales.

Exemple : l'aspirine (acide acétylsalicylique) est l'un des médicaments les plus fréquemment employés dans les douleurs d'origine diverse.

Aspégic (l'acétylsalicylique de lysine) est utilisé comme antipyrétique et antalgique [5]

2-Les dérivés de l'acide propionique et de butyrique : Cette classe d'anti inflammatoire à une efficacité probablement moindre que les autres classes, mais sa tolérance est meilleure.

Exemple : Ibuprofène (BEUFEN, FENALGIC) ; Naproxen (APRAMAX, NAPROXYNE) ; Kétoprofène (PROFENID) ; Fénoprofène (NALGESIC).[5]

3-Les dérivés de l'acide anthranilique (fénamates) : Cette classe d'AINS est un peu différente des précédentes, elle est caractérisée par des effets indésirables digestifs majeurs pouvant aller jusqu'à l'ulcère gastroduodéal exemple : diclofénac sodique (VOLTARENE) ; l'acide méfénamique (PONSTYL) et l'acide niflumique (NIFLURIL). [5]

4-Les dérivés acéto-indoliques : utilisés pour le traitement chronique des affections rhumatismales, ses effets toxiques sont nombreux.

5-Oxicams : piroxicam, tonoxicam, méloxicam. [5]

➤ Classification en fonction de mécanisme d'inhibition.

1-Inhibiteurs irréversibles : parmi tous les AINS, seule l'aspirine possède la capacité d'inactiver de manière irréversible la cox-1 et la cox-2 par acétylation du site actif enzymatique.

2-Inhibiteurs compétitifs réversibles : ils forment avec la cox un complexe rapidement dissociable (Ibuprofène, Piroxicam).

3-Inhibiteurs réversibles dépendants du temps : certains AINS tel que l'indométacine forment un complexe lentement dissociable (interactions ioniques avec le site enzymatique). [6]

2.2.3 Mécanisme d'action des AINS.

Le mécanisme d'action des AINS est sensiblement le même pour toutes les molécules malgré leurs structures chimiques hétérogènes ; ils inhibent la cyclooxygénase (cox), qui est une enzyme clé de la biosynthèse de prostaglandines.

Lorsqu'il y a une lésion tissulaire une enzyme appelée la phospholipase A₂ qui va sectionner les phospholipides au niveau cellulaire, la section des phospholipides conduit à la libération d'acide arachidonique.

Les cyclooxygénases qui sont des protéines membranaires possédant un domaine enzymatique sont capables de métaboliser l'acide arachidonique.

On a deux isoformes de cyclooxygénases : la cox-1 constitutivement exprimé dans les cellules normales (plaquettes, tractus gastro-intestinale, les reins ...). Alors que le cox-2 est spécifiquement exprimé dans les cellules inflammatoires aiguës et chroniques.

Les cox-1 transforment l'acide arachidonique en prostaglandines-1 (PG-1) qui est impliquée dans la sécrétion de mucus et de bicarbonate (HCO_3^-) au niveau gastrique. Ils transforment aussi cet AA en thromboxane (A₂) qui est un facteur d'agrégation plaquettaire. Cette cox-1 un gène qui la prédispose à synthétiser des PG lors de l'homéostasie car ils sont très peu inductibles.

Le gène de la cox-2 est fortement inductible, il est donc capable d'être stimulé pour synthétiser des PG en situation de stress. Ces cox-2 vont transformer l'acide arachidonique en prostaglandines (PGI₂) qui ont un effet antiagrégant plaquettaire et entraîne une vasodilatation ; enfin il va également transformer cet AA en PG2 qui va entraîner le processus fébrile et douleur de d'inflammation par recrutement du système immunitaire. [7]

2.2.4 Propriétés thérapeutiques des AINS (pharmacodynamie).

➤ Action antipyrétique.

Les AINS diminuent la fièvre quelle que soit son origine (infection inflammatoire ou néoplasique.....).

➤ Action antalgique.

Les AINS sont efficaces par excès de nociception.

Aigue : douleurs dentaires, postopératoires, migraines.

Chronique : affections rhumatologiques dégénératives, douleurs néoplasiques ; pour ces dernières les AINS constituent avec le paracétamol le premier palier de la stratégie thérapeutique préconisée par l’OMS.

➤ **Action anti inflammatoire.**

Cette action porte principalement sur la composante vasculaire de la réaction inflammatoire. Elle est mise à profit au cours des accès aigus microcristallines et des rhumatismes inflammatoires chroniques ; l’action anti inflammatoire requiert généralement des posologies d’AINS plus élevées que celle nécessaires dans les autres variétés de douleurs ou dans la fièvre. Aussi certaines spécialités d’AINS sont commercialisées a faible dose en tant qu’antalgique et antipyrétique. [8]

2.2.5 Pharmacocinétiques des AINS

➤ **Absorption**

L’absorption digestive des AINS est excellente, ce qui leur confère une bonne biodisponibilité par voie orale et limite considérablement l’intérêt des formes parentérales.

Après administration orale ; la concentration maximale (C_{max}) est obtenue en général (1 a 2 heures), sauf pour certains pyrazolés dont le T_{max} (temps nécessaire pour obtenir la concentration maximale) est plus tardif (2à 6h) et pour les formes a libérations prolongées (diclofénac) dont le T_{max} est environ 3-6h.

Par la voie rectale : la biodisponibilité est souvent moins bonne, même si le T_{max} est plus précoce ; certains AINS peuvent être administrés par voie intramusculaire, ce qui permet d’obtenir un effet antalgique plus rapide.

➤ **Distribution**

Les AINS ont un faible volume apparent de distribution [(vd) 0.11/kg] dû à leurs fortes fixations à l’albumine plasmatique ainsi leurs concentrations libres actives, représente souvent moins de 1% de leurs concentrations totales.

Cette importante liaison protéique rend compte d’un certain nombre d’interaction avec d’autres substances fixées sur les mêmes sites comme les anticoagulants oraux, les sulfamides hypoglycémiants, le méthotrexate dont la fraction libre est augmentée.

Les AINS diffusent bien à travers la membrane synoviale et dans les tissus synoviaux et leur demi-vie d’élimination articulaire est supérieure à leur demi-vie plasmatique.

Les AINS passent dans le lait maternel à travers la barrière plasmaticque et plus au moins rapidement à travers la barrière hémato encéphalique.

➤ **Métabolisme**

Le métabolisme des AINS est généralement hépatique ; ce métabolisme aboutit à la formation de produits inactifs, cependant certains métabolites sont dotés d'une activité anti-inflammatoire. Les AINS sont administrés sous forme de pro-médicaments inactifs (fenbufène).

➤ **Elimination**

La plupart des AINS sont éliminés par voie rénale sous forme de métabolite actif : certains ont une excrétion biliaire avec « un effet de premier passage hépatique » (indométacine, diclofénac). La demi-vie plasmaticque des AINS conditionne leur rythme d'administration :

- ✓ Les AINS à demi vie courte (la plus part des propioniques) en 3 prises quotidiennes.
- ✓ Les AINS à demi-vie intermédiaire (12 a18 heures) sont administrés à raison de deux prises par jour.
- ✓ Les AINS à demi vie longue (supérieure à24 heures, pyrazoles, piroxicam) sont administrés à raison d'une seul fois par jour.[9]

2.2.6. Posologie

La posologie est efficace et variable d'un produit à l'autre et d'un sujet à un autre.

En cas de pathologie sévère, une fois l'équilibre sanguin est atteint, il faut diminuer les posologies afin d'éviter un surdosage surtout avec la phénylbutazone et les produits d'action prolongé [10].

Classe chimique	Posologie adulte
-----------------	------------------

Indoliques	indométacine	50 à 150 mg/jour
Pyrazolès	phénylbutazone	300 mg/jour maxi 600 mg/ j
Oxicames	piroxicam	20 mg / jour ne pas dépasser 40 mg/ j
	mèloxicam	7.5 mg / j
acide arylacétique	diclofinac	75 à 150 mg /j
	etodolac	400 à 600 mg / j
Acidearyl propionique	febufène	600 à 900 mg / j
	kètoprofène	150 à 300 mg/ j
	naproxène	500 mg a 1 g/ j
Acide anthranilique	Acide niflumique	500 à 750 mg/j

Tableau II: la posologie des principaux anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) [10]

2.2.7. Indications thérapeutiques des AINS

-Traitement symptomatique du rhumatisme inflammatoire chronique : polyarthrite rhumatoïde ; spondylarthrite rhumatoïde ; rhumatisme psoriasique.

-Traitement symptomatique à long terme de certaines arthroses douloureuses et invalidantes.

-Traumatologie.

-Dysménorrhée.

-Colique néphrétique.

-Traitement adjuvant des manifestations inflammatoires en ORL (angines, otite) et stomatologie. [11]

2.2.8. Effets indésirables d'AINS.

L'administration des AINS expose aux mêmes effets indésirables dont l'incidence dépend de leurs natures et plus souvent de leurs posologies, ainsi que du terrain de maladie et des médicaments associés.

➤ Troubles digestifs

Les AINS en agissant sur les COX inhibent la formation de PG qui ont une activité protectrice sur la muqueuse gastro-intestinale. Les troubles fonctionnels (gastralgies, dyspepsies, nausées, diarrhée) sont ainsi fréquents et réversibles à l'arrêt de traitement.

Ils favorisent également la survenue d'ulcère gastroduodénal 3 à 5 fois plus, ils peuvent se compliquer de manifestations sévères ; comme des perforations ou des hémorragies digestives ; parfois létales.

Les effets indésirables (EI) des AINS peuvent affecter tout le tube digestif, essentiellement, estomac et duodénum, mais aussi œsophage, intestin grêle et colon, de plus ils augmentent les poussées de maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI).

L'utilisation de COX-2 réduit le risque d'EI digestif, toutefois ils majorent le risque de troubles cardiovasculaires graves ; ce qui limite leur utilisation [12].

➤ Trouble rénaux

Les COX interviennent dans la perfusion rénale, et le débit de filtration glomérulaire (DFG), alors que les COX-2 jouent un rôle dans l'excrétion du sodium et de l'eau, leur blocage par les AINS va donc avoir des conséquences sur la fonction rénale. Il peut s'agir d'une rétention hydrosodique, d'une hausse de la pression artérielle ou d'une décompensation cardiaque.

Les AINS en diminuant les DFG, exposent également au risque d'insuffisance rénale aiguë. Cela s'observe notamment en cas d'insuffisance rénale (déshydrations ou en association avec un diurétique : un inhibiteur de l'enzyme de conversion (IEC) ou un antagoniste des récepteurs 2. [12]

➤ Réactions cutanées

La réaction cutanée soit les deuxièmes effets indésirables retrouvés assez fréquemment avec les AINS, en particulier, l'acide méfénamique et la sulindac. Les patients présentent des

affections cutanées variant d'une éruption légère à de l'urticaire à une photosensibilité ou même, mais rarement à des affections plus grave et potentiellement mortelles [12].

➤ **Risques d'infections.**

Les AINS sont susceptibles d'aggraver différents types d'infections bactériennes ou virales, infection dentaire, varicelle, zona, infection ORL. Ils peuvent conduire au décès du patient [12]

➤ **Troubles hématologiques.**

Les effets hématologiques sont nombreux : anémie, thrombopénies, neutropénies...etc. Les mécanismes de ces cytopénies sont multiples : carence mortelle médullaire ou immuno-allergique.

L'effet antiagrégant plaquettaire est également à souligner surtout pour aspirine. [12]

➤ **Trouble cardiovasculaire**

C'est surtout lors de la commercialisation des AINS inhibiteur sélectif des cox 2 ou coxib que des effets secondaires cardiovasculaires ont commencé à être répertorié et étudié.

Les coxibs bien plus tolère sur le plan digestif ,augmentent le risque thrombotique [12].

2.2.9. Contre-indication

Dans certaines physiopathologies, les AINS sont strictement contre indiqués dans les cas suivants :

➤ **Ulcère gastroduodéal**

En cas d'ulcère gastroduodéal en évolution, les AINS ne peuvent absolument être utilisés ; ils sont également contre-indiqués en cas d'antécédent d'ulcère, d'hémorragie ou perforation digestive au cours d'un précédent traitement par AINS.

Chez un patient présentant un antécédent d'ulcère gastroduodéal, les AINS devront dans ce cas être utilisés seulement en absence d'alternative thérapeutique et si nécessaire avec un traitement protecteur de la muqueuse gastrique associe, comme les IPP en première intention ou les anti-H2 en deuxième intention afin de limiter au maximum le risque de récidence de l'ulcère.

➤ **Insuffisance rénale et hépatique**

Une fois administrés les AINS subissent un métabolisme hépatique important, afin d'être dégradés en métabolites inactifs puis éliminés de l'organisme par voie rénale. Les AINS ne sont donc plus correctement bio-transformés au niveau hépatique ou complètement éliminés. Au niveau rénal leur demi vie plasmatique est donc augmentée et l'effet thérapeutique ainsi que les effets indésirables sont prolongés donc exposent le patient à un potentiel risque de surdosage.

Les AINS sont donc contre indiqués en cas d'insuffisance rénale sévère ou d'insuffisance hépatique sévère. Une surveillance renforcée est conseillée en cas de tout autre type d'insuffisance rénale et hépatique.

➤ **Hypersensibilités aux AINS**

Les antécédents d'hypersensibilités à la substance active ou à l'un des excipients de la spécialité sont une contre-indication ; en ce qui concerne les antécédents d'hypersensibilité à un autre AINS la conduite à tenir dépend du mécanisme évoqué.

➤ **Grossesse**

Les AINS sont classiquement contre- indiqués à partir du sixième mois de grossesse.

Les coxibs sont contre-indiqués durant toute la grossesse ; en effets les AINS peuvent entrainer de graves conséquences pour le fœtus ; potentiellement irréversibles et avec un risque létale. Ils peuvent aussi entrainer une diminution de la force de contraction qui peut entrainer un retard de l'accouchement. Ils peuvent provoquer aussi la fermeture du canal artériel qui conduit à des conséquences graves voire létale notamment au niveau cardiovasculaire et rénal. [13].

Chapitre II

Les Sirops

1. définition d'un sirop

Les sirops sont des préparations aqueuses multi doses caractérisées par leurs saveurs sucrées et leurs consistances visqueuses, ils sont généralement préparés avec du saccharose à une concentration minimale de 45% m/m, et maximale de 65% m/m pour assurer une protection antimicrobienne.

Le saccharose peut être remplacé par le glucose, fructose, aussi des polyols (glycérolé, sorbitol) de saveur sucrée, d'édulcorants artificiels et d'épuisants pour atteindre une viscosité voisine à celle du sirop de saccharose.

Chaque dose de sirop est administrée à l'aide d'un dispositif permettant de respecter la quantité prescrite [14].

2-composition d'un sirop

Le sirop est composé d'une substance active dite « principe actif » avec d'autres substances accessoires appelées « excipients » qui permettent l'obtention de sa forme finale.

2.1 Principes actifs

C'est une substance active destinée à exercer une action pharmacologique et thérapeutique.

On distingue différentes origines pour les PA : végétales, animales et synthétiques. Le choix de ces dernières se fait en fonction du mode d'administration, la considération de stabilité et la biodisponibilité [15].

2.2 Excipients

Les excipients sont des substances dépourvues d'activité thérapeutique, utilisées pour pallier à certaines propriétés du PA en améliorant par exemple son écoulement, sa stabilité, son goût ...et ainsi faciliter sa fabrication, son administration et assurer la stabilité de la consommation du médicament [16].

3. Classification des sirops

3.1. Les sirops simples à base de sucre

C'est une solution de sucre, elle est composée d'un solvant qui est l'eau purifié et un soluté qui est le saccharose (cristallin) [17].

3.2. Les sirops simples médicamenteux

Ce sont des sirops obtenus par la dissolution du PA dans le sirop simple de sucre, c'est le cas de sirop acide citrique [17].

3.3. Les sirops composés

Sont des préparations liquides qui contiennent plusieurs PA à préparation thérapeutique convergente, introduit à l'état naturel ou sans forme élaborée [17].

4. Préparation des sirops

Les sirops peuvent être préparés à froid ou à chaud par la dissolution du sucre blanc du premier choix dans un véhiculant qui est généralement l'eau.

4.1. Principe des méthodes de préparation

✓ Préparation à chaud

Cette méthode de préparation est utilisée lorsque le sirop doit être préparé rapidement et quand ses constituants ne sont pas sensibles à la chaleur.

Dans cette méthode 165g de sucre sont ajoutés à 100g de véhicule (l'eau distillée), l'ensemble est chauffé à ébullition jusqu'à la dissolution complète du sucre. Leur densité est de 1.26, il est ensuite filtré à chaud [18].

✓ Préparation à froid

La préparation à froid se fait par dissolution de 180 g du sucre dans 100 g d'eau, la préparation est ensuite filtrée. Sa densité est de 1.32 [18].

4.2. Matériels nécessaires pour la préparation

Les sirops sont préparés dans des cuves à double parois, le chauffage s'effectue par la vapeur d'eau sous pression et le refroidissement par la circulation d'eau glacé.

- Un système d'agitation à palette ou hélice qui facilite la dissolution du sucre, ainsi qu'un homogénéisateur de fond qui relargue les particules pour éviter la sédimentation du sucre.
- Un aspirateur sous vide pour le transfert de sucre de la trémie vers la cuve de préparation.
- Après la préparation du sirop on doit procéder à son transfert de la cuve de préparation vers la cuve de stockage ou il traverse un filtre clarifiant qui retiendra les impuretés
- Une cuve de stockage muni d'agitation qui permet de maintenir le sirop sous agitation pendant toute la durée de stockage.

- Une cuve tampon installée dans l'atelier de conditionnement, elle est alimentée à partir de la cuve de stockage, elle comporte un indicateur qui sert à remplir les flacons

Toutes les cuves sont en acier inoxydable [18].

5. Conservation et altération des sirops

5.1. Conservations

Il est conseillé de mettre les sirops en flacon bien bouchés dans des endroits frais.

En fait malgré leurs fortes concentrations en sucre, les sirops sont plus ou moins bien conservés. La présence d'un peu d'alcool dans certains sirops facilite leur conservation mais cette addition est à éviter pour les enfants.

Pour certaine formule, il est nécessaire d'ajouter des conservateurs anti microbiens mais il est à noter que ces additifs peuvent être la source d'incompatibilité (coloration, précipitation par variation du pH [19].

5.2. Altérations

L'altération d'un sirop peut être due à une concentration trop faible ou à un trop fort en sucre :

- S'il est trop concentré (trop cuit) le saccharose cristallise, il suffit d'ajouter la quantité d'eau nécessaire pour ajuster la densité.
- S'il est trop dilué, la teneur en sucre est insuffisante d'où la prolifération des micro-organismes, levures et moisissures et intervention du sucre sans l'action d'inversion et fermentation alcoolique.
- Si le sirop supporte l'action de la chaleur, il pourra être ramené à la densité voulu par son maintien à ébullition pour un laps de temps [19].

6. Stabilité des sirops

La stabilité est définie comme étant la capacité du produit à conserver ces propriétés chimiques, physiques, microbiologiques et biopharmaceutiques dans les limites spécifiées, pendant toute sa durée de validation.

La stabilité après ouverture est définie pour un conditionnement donné et dans des conditions bien précises de conservation, on parle ainsi de délai d'utilisation d'un médicament.

6.1. Aspect chimique

Pour un sirop déjà entamé, diverses réactions d'oxydations et de photolyses peuvent être à l'origine de la dégradation du PA. On obtient ainsi des substances toxiques ou non avec une diminution de la concentration du PA. Les ouvertures et fermetures répétées des récipients multi-doses empêchent leurs bonnes conservations [20]

6.2. Aspect physique

Il est défini par l'homogénéité et le comportement rhéologique (viscosité), absence de particule et absence de sédimentation. Il est plus souvent influencé par la température [20].

6.3. Aspect microbiologique

Le milieu aqueux est très favorable à la prolifération microbienne.

Une fois le flacon est ouvert, la durée de conservation de certains produits en présence ou non de conservateurs sera déterminée par le risque de contamination microbienne. C'est l'une des raisons qui justifie l'emploi des conservateurs antimicrobiens dans la formulation d'un sirop [21]

7. Avantages et inconvénients des sirops

7.1. Les avantages

- ✓ La flexibilité des doses.
- ✓ Facilite l'administration.
- ✓ Meilleure biodisponibilité.
- ✓ Le PA est en solution à l'état moléculaire et donc directement disponible à l'absorption.
- ✓ Bien tolérer notamment par les enfants [22].

7.2. Les inconvénients

- ❖ Texture trop sucrée.
- ❖ Peu Stables.
- ❖ Conditionnement lourd et fragile
- ❖ Conservation limité [23].

Chapitre III

Les Parabènes

1. Présentation

Les parabènes sont des ésters de l'acide p-hydroxybenzoïque, ils présentent un cycle benzénique substitué en para (position 1 et 4), par un groupement ester avec des chaînes alkyles de taille variable. Il existe un certain nombre de parabènes qui se différencient par la longueur et la nature de leur chaîne alkyle.

Certains parabènes, notamment le méthyle parabène existent à l'état naturel à des faibles concentrations dans les fruits et légumes, pour l'utilisation industrielle, mais majoritairement ils sont produits par synthèse chimique.

C'est dans le milieu des années 1920 que les parabènes ont commencé à être utilisés en tant qu'agent de conservation antimicrobien et antifongique dans les produits cosmétiques. Ils sont efficaces à faible concentration et sont utilisés généralement seuls ou en combinaison pour exercer une activité optimale, Comme ils se sont avérés très efficaces et relativement sans danger pour l'homme. L'action la plus connue des parabènes est leur effet inhibiteur sur le transport membranaire microbien et sur la fonction mitochondriale [24]

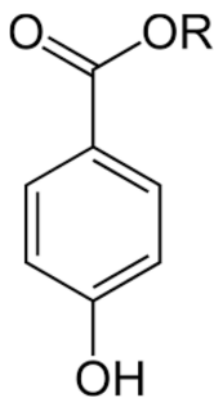
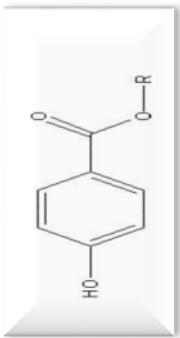


Figure 0 1: Structure développée des parabènes.

Tableau III: formule semi développés des parabènes [24]

La structure	Nom chimiques	Chaines alkyl R
	méthylparabène	CH ₃
	éthylParabène	CH ₂ -CH ₃
	propyl parabène	CH ₂ -CH ₂ -CH ₃
	isopropylparabène	-CH ₃ -(CH ₃) ₂
	butylparabène	CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₃
	isobutylparabène	CH ₂ -CH(CH ₃) ₂
	benzylparabène	CH ₂ -C ₆ H ₅

2. Propriétés physico-chimiques

- A l'état pur, les parabènes sont sous la forme d'une poudre cristalline incolore et inodore.

-Leurs solubilités dans l'eau étant assez faible, des solubilisants sont employés et parfois notamment en alimentaire ; les parabènes sont remplacés par leurs sels.

Les parabènes à chaîne courte (méthyl et éthyl) sont beaucoup plus solubles que les parabènes à chaîne longue (propyl et butyl)

-Compte tenu de leurs point d'ébullition supérieur à 270°C, les parabènes sont stable à Température de cuisson habituelle des aliments. [25]

Les principales caractéristiques physico-chimiques des parabènes sont présentées dans le Tableau suivant :

Tableau IV: caractéristiques physico-chimique des parabènes [25]

Caractéristiques	R : methyl	R : ethyl	R : propyl	R : butyl
Masse Molaire (g/ mol)	152.05	166.06	180.08	194.09
Point de fusion (°C)	131	116-118	96-98	68-69
Point d'ébullition(°C)	270-280	297-298		
Solubilité dans L'eau à 25°C	0.25%	0.17%	0.05%	0.02%
Pka	8.17	8.22	8.35	8.37

3. Synthèse des parabènes

3.1. Synthèse chimique

Les parabènes sont chimiquement synthétisés à partir de l'APHB et d'un alcool dont choix dépend de la longueur de la chaîne alkyle d'intérêt. Cette synthèse se réalise généralement en deux étapes : la réaction de Kolbe-Schmitt produisant l'APHB suivie d'une réaction d'estérification produisant le parabène d'intérêt [26].

3.2. Synthèse naturelle

Les parabènes se trouvent à l'état naturel dans les plantes et certaines bactéries. Par exemple, le méthylparabène et le propylparabène chez *Stockia Brahuica* (famille des Sapindaceae, qui compte également les litchis). On retrouve également la présence du méthylparabène dans les graines de pamplemousse, le murier, la passiflore, le myrtille, la vanille et dans les plants d'Oca (*Oxalis Tuberosa*). L'étude de Bais et al, Menée sur des plantes d'Oca, non-modifiées et modifiées à l'aide de *Agrobacterium rhizogenes*, met en évidence la présence de méthylparabène,

ainsi que d'harmine et d'harmaline. Ces trois molécules sont reconnues pour leur activité antibactérienne et antifongique. [26].

4. Mécanismes et spectre d'action

Le mécanisme d'action des parabènes sur les microorganismes reste encore mal connu.

Toute fois, les parabènes sont actifs vis-à-vis d'un grand nombre de microorganismes. Ils agissent au niveau des voies métaboliques clés. Ils sont plus efficaces sur les levures et les moisissures que sur les bactéries.

Leur spectre d'action est très large :

- **Bactéries:** *Bacillus cereus*; *Escherichia coli* ; *Streptococcus pyogenes*; *Staphylococcus aureus*.

- **Champignons :** *Aspergillus niger*, *Candida albicans* , *Penicillium digitatum*.

Les bactéries à Gram positif (*Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*...) sont plus sensibles que les bactéries à Gram négatif (*Escherichia*, *Salmonella*, *Pseudomonas*). C'est d'ailleurs pour cette raison que les fabricants de cosmétiques associent aux parabènes le phénoxyéthanol, agent de conservation améliorant l'activité vis-à-vis des bactéries Gram négatif.

Les parabènes vont tuer les bactéries de façon irréversible : c'est ce qu'on appelle une action bactéricide. Ils vont agir au cours du développement de ces micro-organismes à différentes phases du processus. Il apparaîtrait que les parabènes agissent en se fixant sur la membrane cytoplasmique des bactéries entraînant une rupture puis une destruction de cette membrane. La bactérie se viderait alors peu à peu de son contenu ce qui entraînerait sa mort [27].

5. Domaine d'utilisation

5.1 Alimentaire

Les composés de la famille des parabènes les plus couramment utilisées comme additifs alimentaires sont le méthylparabène (E218) et son sel de sodium (E219) ; ainsi que l'éthylparabène (E214) et son sel de sodium (E215), leur emploi est régi par la directive européenne 95/02CE du 20 /02/1995, concernant les additifs alimentaires autre que les colorants et édulcorants. [28]

5.2 .Cosmétique

Les parabènes les plus utilisés en cosmétique sont les methylparabènes, ethylparabènes ,propylparabènes ,butylparabènes et isobutylparabènes. La directive 76/768/CEE de 27/09/1976, concernant le rapprochement des législations des états membres relatives aux produits cosmétiques régit l'utilisation des parabènes dans les produits cosmétiques et fixe leurs emplois à 0.4%(en acide) pour un ester et 0.8%(en acide) pour les mélanges d'esters.[28]

5.3. Pharmaceutique

Dans les médicaments, le métyl et propyl parabènes sont principalement utilisés comme des conservateurs antimicrobiens et aussi ils sont classés comme excipients à effet notoire pour leurs risques allergiques et comme faibles perturbateurs endocriniens ; ils sont souvent associés à d'autres conservateurs afin d'élargir leurs spectres de conservation et abaisser leurs concentrations respectives. [29]

L'ethyl et butylparabène ne sont présents que dans quelques spécialités d'après un article paru dans le journal du monde ,environ 400 spécialistes pharmaceutiques , contrairement des parabènes sous forme de base ou de sel sodique, globalement, il s'agit dans 70% des cas de formes administrées par voie orale (forme liquides du type sirop ou solide de type comprimé) et 13% des cas de forme par voie cutanée, les concentrations efficaces utilisées dans les formes orales sont comprises entre 0.01et 0.1% en fonction de type de parabène. [30]

6. Exposition de la population aux parabènes

Les parabènes sont présents dans les produits quotidiens ; la population est donc exposée régulièrement aux parabènes, que ce soit par la voie orale ou par voie topique

Lors des études de Raflat et al (2010),2548 échantillons d'urines ont été analysés afin d'évaluer la présence des parabènes dans la population générale au Etat Unis, le metylparabène est détecté dans 99.1% des échantillons ; le propylparabène dans 92.7, 1%,ethylparabène dans 42.4 % et le butylparabène dans 47%, il s'agit d'une forte imprégnation de la population aux parabènes avec des concentrations plus importantes chez les adolescentes et les femmes adultes .Bien que les parabènes aient une réglementation assez stricte, En Europe, les consommateurs sont exposés à cette famille de composés, à faibles doses mais quotidiennement, cela pose la question du devenir des parabènes dans l'organisme et de ces effets sur la santé humaine. Largement

dérivés depuis plusieurs années les parabènes sont soupçonnés d'être des perturbateurs endocriniens [31].

7. Toxicité des parabènes

Du fait de leurs emplois comme conservateurs dans plusieurs produits cosmétiques et pharmaceutiques, l'être humain est régulièrement exposé aux parabènes. Leurs utilisations dans plus de 13 000 formules cosmétiques, ainsi que leurs capacités à pénétrer à travers la peau. [32] D'après l'Agence nationale de sécurité du médicament (ANSM), les parabènes sont généralement bien tolérés dans les médicaments, donc par voie orale [33].

L'association de méthylparabène et de propylparabène (qui permet de diminuer les doses respectives des deux composés) est la plus souvent utilisée.

Des études récentes montrent cependant que les parabènes sont capables d'établir des liaisons avec les récepteurs aux œstrogènes. Cependant, la réponse provoquée par les parabènes serait de cent mille à un million de fois plus faible que la réponse physiologique au 17 β -estradiol. Cette caractéristique conduit à deux risques : une baisse de la fertilité pour l'homme, et une promotion de tumeurs oestrogéno-dépendantes [34].

Des études aux résultats contradictoires ayant été publiées concernant l'effet sur la fertilité et le potentiel cancérigène, des recherches sont toujours en cours en 2010 pour déterminer un risque avéré dans l'utilisation médicamenteuse des parabènes, et des seuils de toxicité. Le débat scientifique à propos de leur toxicité et de leurs effets cancérigènes pousse l'Assemblée nationale à voter leur interdiction le 3 mai 2011.

D'après le groupe scientifique sur les additifs alimentaires, les arômes, les auxiliaires technologiques et les matériaux en contact avec les aliments (groupe scientifique AFC) :

« Plusieurs parabènes ont montré une activité oestrogénique in vitro. Cependant, aucune activité oestrogène n'a pu être détectée in vivo pour le méthyl parabène, l'éthyl parabène et le propyl parabène au cours d'essais utéro-trophiques classiques sur la base d'administrations, per os ou sous-cutanée, de fortes doses à des souris et des rats. Un effet utéro-trophe in vivo a été observé après l'injection sous-cutanée de butyl parabène ou d'isobutyl parabène, qui ne sont pas utilisés comme additifs alimentaires. Le métabolite commun des parabènes, l'acide p-hydroxybenzoïque, a été considéré comme non-oestrogénique. — EFSA » [35].

L'ANSM a ainsi indiqué le 29 septembre 2005 que : « La commission de cosmétologie s'est prononcée favorablement à la poursuite de l'utilisation, aux conditions prévues par la réglementation actuelle, de quatre des cinq parabènes les plus couramment utilisés (méthyl, éthyl, propyl et butyl parabènes). »

« La législation européenne autorise l'utilisation des parabènes dans les cosmétiques et un ou plusieurs parabènes peuvent être présents dans un produit donné. La concentration totale maximale autorisée dans ces produits de consommation est de 8 g de parabènes par kg du produit cosmétique, aucun parabène ne devant avoir une concentration supérieure à 4 g/kg. » . Mais en 2011, le gouvernement danois décide d'interdire l'utilisation de certains parabènes (parabènes de propyle, d'isopropyle, de butyle et d'isobutyle) dans les produits de soins destinés aux enfants de moins de trois ans [36].

8. Les avantages des parabènes

Les parabènes ont de nombreux avantages expliquant leur fréquente utilisation dans les produits cosmétiques et pharmaceutiques:

- un large spectre d'activité contre les bactéries, les moisissures et les levures.
- Une grande stabilité chimique vis-à-vis de la température pour des niveaux de pH compris entre 4.5 et 7.5.
- Leur coût est relativement faible.
- Il n'entraînent pas des modifications de texture ou de viscosité en plus du fait qu'ils soient efficaces à faibles concentrations [37].

9. Limites des parabènes

Les parabènes peuvent montrer certaines limites qui pourront orienter les laboratoires à utiliser d'autres conservateurs. Leur activité est très faible contre certaines bactéries en particulier celles du genre *Pseudomonas*. De plus, l'activité des parabènes peut être affectée par certains facteurs environnementaux (pH du produit fini, présence de pigments, teneur en huile...) [38].

Chapitre IV

La Chromatographie sur couche mince

1. Historique

-La chromatographie sur couche mince actuelle a comme début le travail du biologiste allemand BEYERINCK en 1889 quand il a diffusé à travers une couche mince de gélatine une solution

contenant un mélange d'acide chlorhydrique et d'acide sulfurique. Il a constaté que l'acide chlorhydrique migre en premier alors que l'acide sulfurique en dernier.

-En 1898 : ISMAILOV et SCHRAIBER proposent l'utilisation d'oxyde d'aluminium ou alumine comme couche mince.

-En 1939 : EARLIER développa la chromatographie sur papier par emplacement d'une feuille de papier filtre entre deux plaques de verre.

-En 1940 : LAPP et ERAI développèrent la CCM descendante.

En 1942 : Bekesy utilisa une substance adhésive pour fixer la phase stationnaire en CCM à la plaque de verre.

En 1956 : STAHL publia ses premiers travaux sur la CCM, il a amélioré la technique en éliminant ses difficultés relatives à la fabrication de la phase stationnaire-substance adhésive.

-Cette amélioration consiste à l'utilisation des grains extrêmement fins ($0.5\text{ à }5\text{ }\mu\text{m}$) d'acide silicique qui s'adhère facilement au verre, ceci permet d'éliminer l'utilisation d'une substance adhésive [39].

2. Principe de la CCM

Technique de séparation dans laquelle :

- La phase stationnaire constituée d'un matériau approprié, est déposée en une couche mince et uniforme sur un support constitué par une plaque de verre, de métal ou de plastique.
- La phase mobile se déplace par capillarité à travers la phase stationnaire entraînant à des vitesses différentes les constituants à séparer.

-Au cours de leur migration (développement) les solutés (solutions d'analytes) entraînés par la phase mobile à travers la couche mince vont se déplacer en fonction de leurs affinités pour chacune des phases.

-Plusieurs phénomènes physico-chimiques peuvent avoir lieu au cours d'une analyse par CCM (adsorption, partage, échange d'ion, exclusion stérique....).

-L'un ou l'autre de ces phénomènes prédominera suivant le système chromatographique utilisé, exemples :

-Gel de silice et alumine : à la fois adsorption et partage.

-Poudre de cellulose : essentiellement partage.

3. Technique de la CCM

3.1. Matériel utilisé

3.1.1. Plaque

- Support lisse, inerte, rigide ou souple (verre, plastique ou aluminium) recouvert d'une couche fine et adhérente de phase stationnaire.
- L'adhérence de la phase stationnaire sur le support est assurée par un liant organique (amidon) ou minéral (sulfate de calcium hydraté) ajouté dans des proportions de 1 à 15% à la phase stationnaire en cours de fabrication [39]
- La plaque de CCM peut avoir différentes dimensions: 5 x 5 / 10 x 20 / 20 x 20.

3.1.2. La phase stationnaire

-La phase stationnaire est déposée sous forme d'une couche mince sur une feuille d'aluminium.

-L'épaisseur de la couche dépend de l'objectif de l'usage.

-Les phases stationnaires traditionnellement utilisées en CCM sont : la silice, l'alumine, la cellulose, le polyamide.

-Le gel de silice reste le plus utilisé en CCM classique [39]

-Les couches minces utilisées actuellement font l'objet du tableau ci-après.

Tableau V: Les couches minces utilisées [39]

Type de phase	Principe de rétention	Domaine d'application
Gel de silice	Adsorption	Substances apolaires ou peu polaires
	Partage (exceptionnellement)	

Gel d'alumine	Adsorption Partage	Séparation des composés basiques
Terre siliceuse de diatomée (Kieselguhr)	Adsorption Partage	Substance polaire
Cellulose	Adsorption /partage	Séparation des molécules (sucre, acides aminés)

3.1.3. La phase mobile

Très nombreuses, elles sont constituées de mélanges de solvants de natures différentes (organiques, acides, bases, polaires et apolaires...). [40]

Le choix de la phase mobile en CCM dépend de la nature des substances à séparer et de la phase stationnaire constituant la couche mince en respectant le principe des semblables :

Substance polaire → phase stationnaire polaire → phase mobile apolaire

Substance apolaire → phase stationnaire apolaire → phase mobile polaire

3.1.4. Cuve ou enceinte de migration

-Les cuves de développement sont des récipients en verre quadrangulaires ou cylindriques d'une étanchéité parfaite [40]

-Pour que l'atmosphère de la cuve soit parfaitement saturée:

-On tapisse entièrement les parois de papier filtre et on introduit les solvants pour que le papier en soit imprégné.

-On laisse la phase mobile dans la cuve pendant 24 heures (phase de saturation).

3.2. Mise en œuvre de la CCM

3.2.1. Dépôt de l'échantillon

- Selon la nature des produits, on prépare des solutions de 0.1 à 5 % dans un solvant très volatil

- Sur la couche mince, on commence par tracer légèrement une ligne horizontale à 1cm de son bord inférieur.
- On trace une autre ligne horizontale en grattant la PS pour stopper l'évolution du solvant, située à environ 15 cm du bord inférieur.
- On dépose un petit volume (compris entre quelques nano litres et plusieurs microlitres) de l'échantillon en solution diluée, à proximité du bord inférieur de la plaque sous forme d'une tache de 1 à 3 mm de diamètre [41]

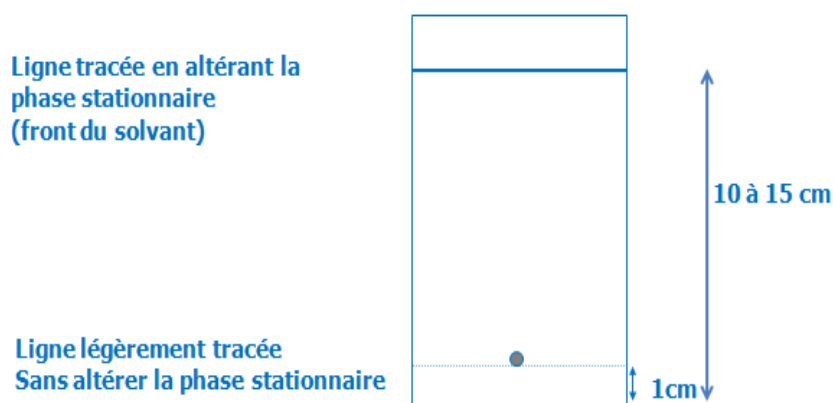


Figure 02: dépôt des substances.

- Il est important que le diamètre de la tache produite au moment du dépôt soit faible, idéalement, il ne devrait pas dépasser 3 mm. Ce sont généralement les dépôts les moins étalés qui permettent les meilleures séparations. Pour augmenter la quantité déposée, il est toujours préférable d'effectuer plusieurs dépôts au même point, en séchant rapidement entre chaque application plutôt que de déposer en une seule fois un grand volume d'échantillon qui produirait une tache plus large.
- L'échantillon est déposé à l'aide d'une micropipette ou d'un tube capillaire en appuyant légèrement et brièvement l'extrémité de la pipette sur la couche d'adsorbant en prenant soin de ne pas la détériorer.

3.2.2.Développement des plaques

- Processus au cours duquel l'échantillon est entraîné par la phase mobile à travers la phase stationnaire.

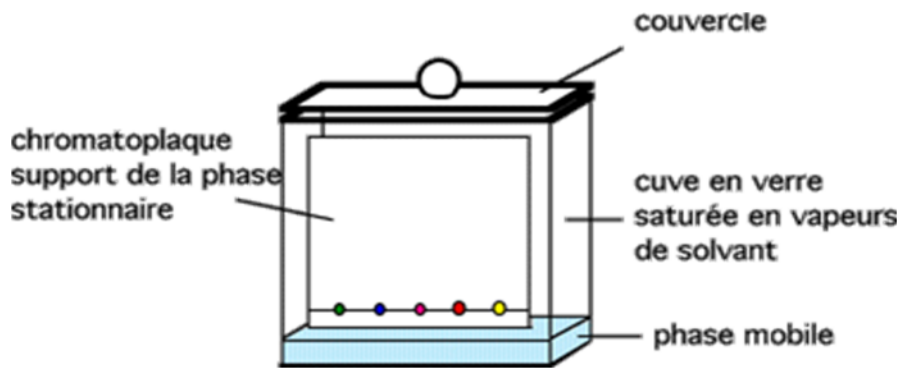


Figure 3:Développement de la plaque dans la cuve de migration

- La Phase mobile migre par capillarité à travers la phase stationnaire sèche, entraînant à des vitesses différentes les solutés à séparer.
- Durée de développement selon la nature des solvants (de 30 minutes à 3 heures au maximum).
- Migration arrêtée lorsque le front du solvant a parcouru 10 à 15 cm.
- De nombreux systèmes de développement peuvent être utilisés :
 - *Développement linéaire.
 - *Développement circulaire.
 - *Développement anti-circulaire.
 - *Développement à flux forcé.

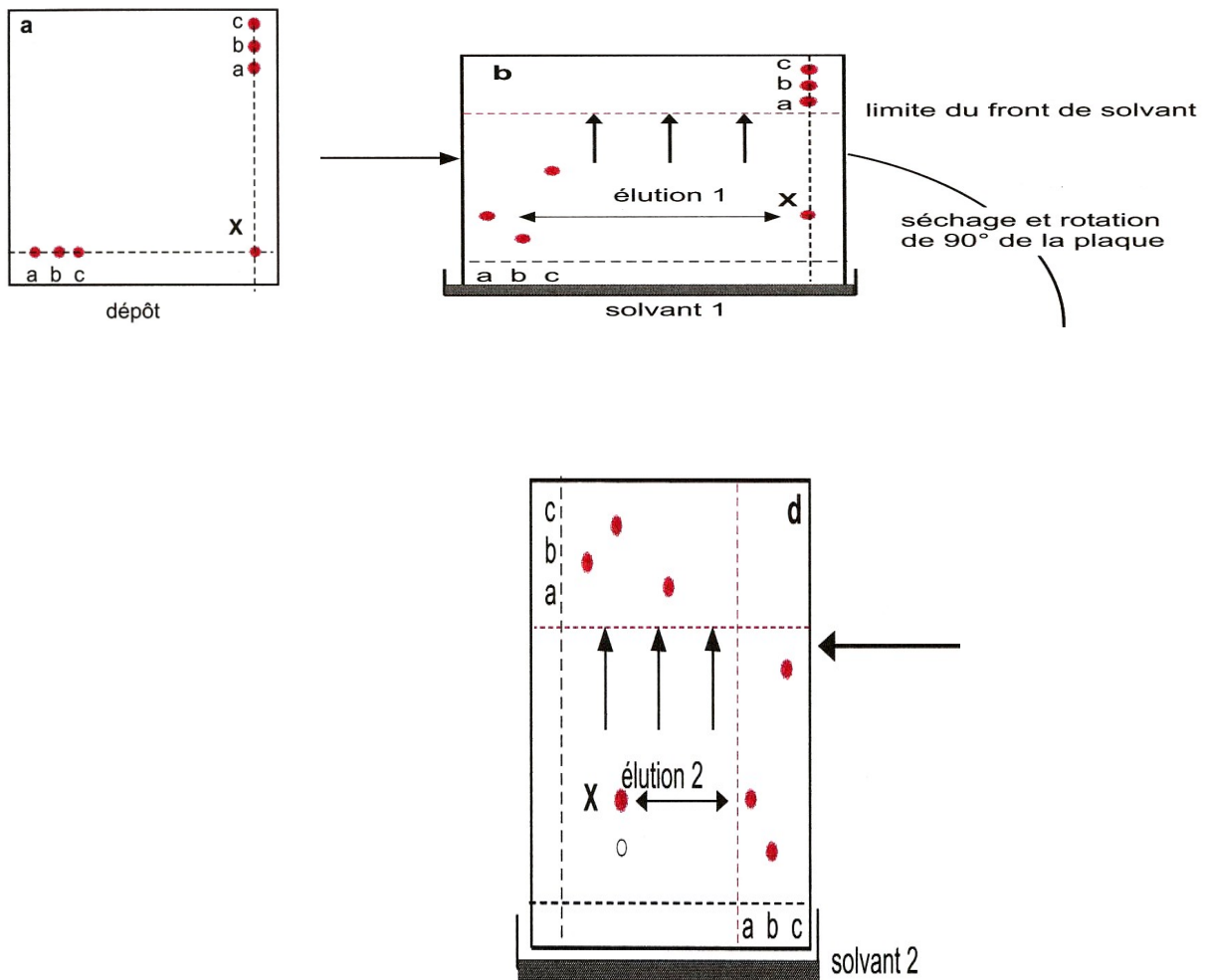
3.2.2.1. Développement linéaire

Chromatographie ascendante : une fois la solution à étudier déposée sur la ligne de départ de la plaque et séchée, on l'introduit dans la cuve de développement, celle-ci a reçue de la phase mobile jusqu'à une hauteur de 0.5 à 1 cm. Il est très important d'assurer la saturation de l'atmosphère à l'intérieur de la cuve. Si l'on veut mettre plusieurs plaques dans la même cuve, il faut éviter qu'elles ne soient pas trop rapprochées les unes des autres [41].

3.2.2.2. Développement bidimensionnelle

Si un développement linéaire ne permet pas de séparer les constituants du mélange

→ Développement bidimensionnel : deux éluions successives dans deux directions perpendiculaires.



Plaque de forme carrée Permet de faire la CCM bidimensionnelle

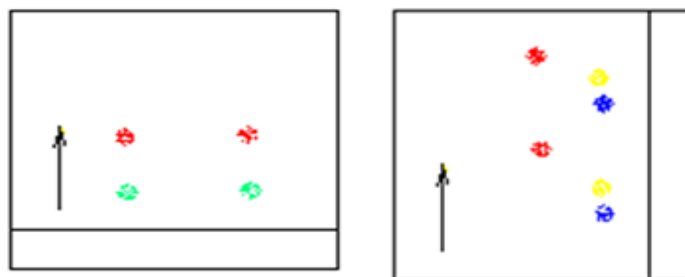


Figure 04: Développement bidimensionnel en CCM.

3.2.3. Révélation

3.2.3.1. Révélation par des réactifs

a. Détection visuelle

-**Lumière blanche** pour les substances colorées.

-**Lumière ultraviolette :**

- Substances sont fluorescentes à l'examen de la plaque aux radiations ultraviolettes → elles apparaissent brillantes sur fond sombre.

- Substances non fluorescentes → on introduit un indicateur fluorescent lors de la préparation de la couche mince.

-L'indicateur fluorescent est un sel inorganique (sulfure mixte de zinc et de cadmium fluorescent à 254 nm.) ou organique fluorescent généralement à 366 nm.

Les substances non fluorescentes masqueront la fluorescence de la plaque et apparaîtront sous forme de taches sombres sur fond lumineux [41]

b.Révélation par des réactifs

Lorsque le soluté ne possède aucun groupement chromophore susceptible de permettre une détection spectrophotométrique, il faut transformer le soluté avec un réactif spécifique.

b1. Révélation pré-chromatographique

Dans ce cas, la réaction doit donner des produits stables et ci possible un seul produit avec un rendement très élevé. De plus, il ne doit pas y avoir aucune interférence chromatographique entre le réactif et le produit formé.

Les réactions utilisées sont :

-L'oxydation ou la réduction au moyen de l'eau oxygénée, le périodate de sodium, l'acide chromique, l'iode ou le chlorure de palladium.

-L'hydrolyse qui peut être chimique ou enzymatique.

-L'halogénéation par des vapeurs d'iode ou de chlore, qui permet une bonne visualisation des molécules insaturées.

-L'estérification qui est employée pour les acides et alcools gras [41]

b2.Révélation post-chromatographique

La formation des dérivés après chromatographie est très répandue. La technique la plus commune consiste à projeter un aérosol sur la plaque séchée et débarrassé le solvant. D'autres techniques tels que l'imprégnation et le trempage dans une solution peuvent être utilisées

Suivant la nature des réactifs, on peut distinguer des réactifs généraux et des réactifs spécifiques.

-Réactifs généraux

- Acide sulfurique concentré.
- Acide phosphorique.
- Acide phosphomolybdique.
- Bichromate de potassium en solution sulfurique.
- Permanganate de potassium en solution sulfurique.
- Vapeurs d'iode (substances organiques sous forme de taches brunes)
- Solution chloroformique d'iode à 0.5%

Exposition aux vapeurs d'iode : de très nombreux composés organiques peuvent être localisés par ce procédé extrêmement simple.

La plaque chromatographique est placée pendant quelques minutes dans une enceinte close au fond de laquelle se trouvent des cristaux d'iode métalloïdique. Les vapeurs d'iode s'absorbent sur la plupart des composés organiques qui apparaissent alors sous forme de taches brunes foncées. Cette réaction est réversible.

Les réactifs spécifiques :

- Réactifs des alcaloïdes.
- Réactifs des stéroïdes.
- Réactifs des phénols.
- Réactifs des amines.

4. Grandeurs caractéristiques de la CCM

-Pour pouvoir évaluer la qualité de la séparation et comparer différents systèmes chromatographiques, il est nécessaire de quantifier la séparation suivant certains paramètres.

-La qualité d'un chromatogramme peut être évaluée. En comparant :

1-L'aptitude à séparer un mélange.

2-La distance entre deux taches (résolution).

3-Le temps nécessaire à l'analyse.

-Pour une même phase stationnaire, un même éluant et des conditions expérimentales identiques, chaque chromatogramme présente un même aspect, c'est-à-dire que chaque constituant du mélange à analyser a migré de manière identique.

Pour un système chromatographique donné un soluté peut être caractérisé par la distance qu'il a parcourue par rapport à celle parcourue par le solvant de développement.

-Le rapport frontale « R_f »:

Pour un système chromatographique donné, un soluté peut être caractérisé par un rapport appelé « facteur de retardement » R_f exprimé par la relation :

Distance parcourue par le soluté

R_f = _____

Distance parcourue par le front du solvant

Paramètres qui influencent R_f

- Épaisseur de la phase stationnaire.
- Contenu en eau dans les phases mobiles et stationnaires.
- La température.
- Le degré de saturation par la vapeur de la phase mobile de l'enceinte de développement.
- La taille de l'échantillon [41]

5. Applications de la CCM

a. Analyse qualitative

- Identification d'une substance inconnue: par comparaison de son R_f à celui d'un standard élué sur le même chromatogramme.
- Mise en évidence des impuretés de synthèse, des substances apparentées et des produits de dégradation.
- Études de stabilité des médicaments aussi bien en développement qu'en analyse de routine.

b. Analyse quantitative

Pour rendre la CCM exploitable en tant que méthode quantitative d'analyse. Il faut pouvoir quantifier les taches, dans ce but, la plaque à examiner est déplacée sous l'optique d'un densitomètre qui mesure soit l'absorption soit la fluorescence à une ou plusieurs longueurs d'onde. Cette opération conduit à un diagramme qui est un pseudo chromatogramme comportant des pics dont on peut mesurer les aires.

On peut également précéder à la mise en solution de cette tache (élution des taches) après isolement de la zone où elle est localisée et procéder sur la solution ainsi obtenue au dosage par les méthodes habituelles, spectrophotométrie.

Considérant que la surface de la tache est proportionnelle au logarithme de la masse du composé élué, il est possible à condition de déposer sur le chromatogramme des volumes exactement connus des solutions à analyser et de solutions étalons, d'avoir une idée approximative de la concentration [41]

6. les avantages de la CCM

- ✓ permet le traitement de plusieurs échantillons en même temps, par mise en œuvre d'analyse faites en parallèle sur la même plaque.
- ✓ Très compacte et aussi peu coûteuse.
- ✓ Permet une séparation rapide et souvent meilleure
- ✓ La multiplicité des adsorbants utilisables augmentent la souplesse de la méthode
- ✓ Méthode très simple à mettre en œuvre
- ✓ Reproductibilité des résultats pour la plupart des applications analytiques.
- ✓ Sa sensibilité de l'ordre des microgrammes [42]

Partie pratique

Chapitre V

Matériels et Méthodes

Le but de cette partie consiste en l'extraction des conservateurs antimicrobiens (excipients) qui sont les parabènes (parahydroxybenzoate de méthyle et parahydroxybenzoate de propyle) contenus dans le sirop pédiatrique (MAXILASE®) puis leur l'identification par chromatographie sur couche mince (CCM), pour ensuite mettre en évidence leurs activité antimicrobienne protectrice qu'il confère à ce même sirop.

Ce travail est réalisé au laboratoire de Chimie Analytique du .Département de Pharmacie de Tizi-Ouzou en collaboration avec le laboratoire de microbiologie du CHU Nadir Mohammed de Tizi-Ouzou.

1. Extraction des excipients (les parabènes) à partir du sirop (MAXILASE®).

1.1. Matériels.

1.1.1. La Matrice d'étude

Notre travail à porté sur le sirop **MAXILASE®**.



Figure 05 : Sirop MAXILASE

-Sa classe thérapeutique : c'est un anti-inflammatoire indiqué dans les maux de gorge peu intenses sans fièvre.

-Sa composition :

- La substance active : alpha amylase.
- Les excipients(Les parabènes) : **parahydroxybenzoate de méthyle sodé (E219), parahydroxybenzoate de propyle sodé (E217)**, Solution de saccharose, acide

citrique monohydraté, Jaune orangé S (E110), Glycérol, huile essentielle soluble de mandarine (S164), eau potable.

1.1.2 Appareillage, verrerie et autre matériel.

Tableau VI : Appareillage et verreries utilisés dans extraction des parabènes à partir du MAXILASE®.

Appareillage	Verrerie	Autres matériel
-Balance analytique -Etuve -Hotte ?	-Eprouvettes (10 ml ; 50 ml) -Entonnoir -Ampoule à décanter. - Béchers. -Doseur . -Spatule métallique	-Papier filtre

1.1.3. Réactifs et solvants.

- Echantillon à analyser : sirop pédiatrique (MAXILASE®)
- Solvant d'extraction: éther diéthylique ($\text{CH}_2\text{-O-CH}_2$)
- Acide chlorhydrique à 37% (**attention acide pure très dangereux !!!**)
- sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4)
- Ethanol à 96%
- Eau distillée

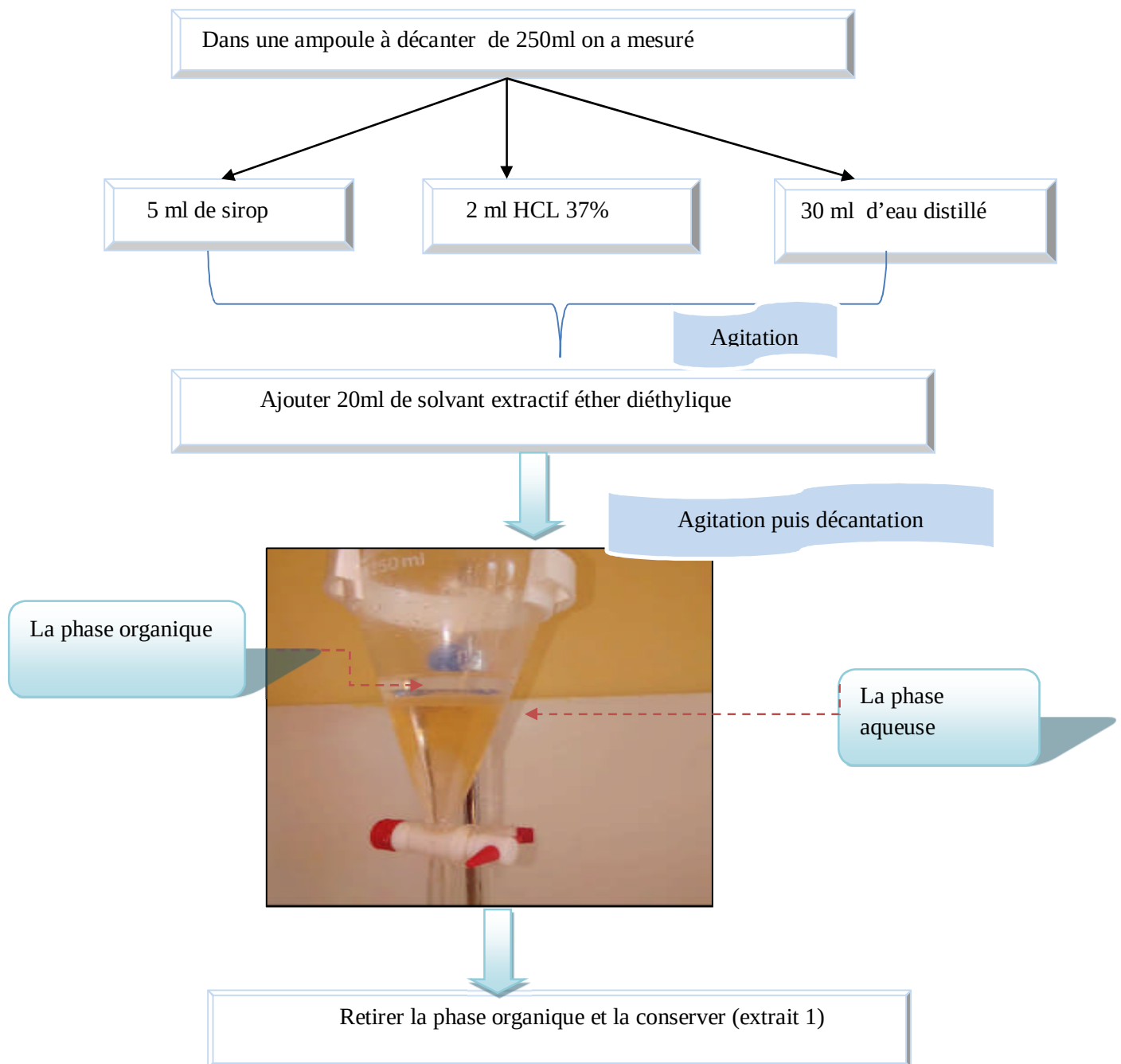
1.2. Méthode.

Nous avons procédé à une double extraction liquide- liquide (répétée 2 fois) pour extraire les conservateurs antimicrobienne parahydroxybenzoate de méthyle et parahydroxybenzoate de propyle à partir d'un sirop MAXILASE® en utilisant comme solvant d'extraction l'éther diéthylique qui représente la phase organique.

1.2.1. L'extraction proprement dite

Elle se déroule en 2 étapes.

➤ **La première étape: Première extraction**



2^{ème} étape (la deuxième extraction) : elle consiste à répéter l'opération en utilisant une phase organique neuve .

Dans une ampoule à décanter de 250 ml on verse la phase aqueuse

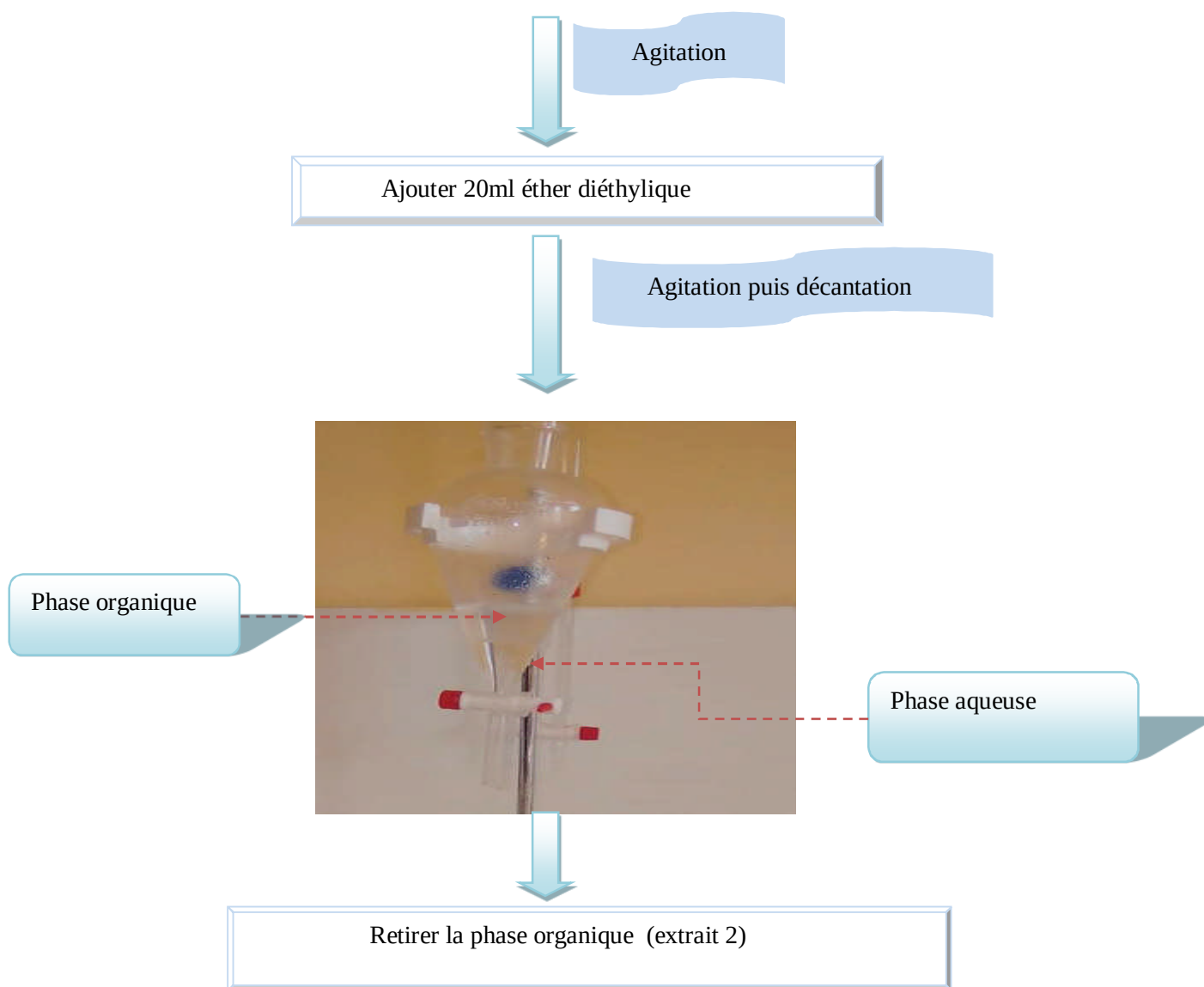


Figure 06: Protocole de l'extraction.

1.2.2. Traitement de la phase organique globale (les 2 extraits réunis)

1.2.2.1. Lavage des extraits.

Dans une ampoule à décanter de 500ml, introduire :

- La phase organique globale.
- 10ml de l'eau distillée.

Agiter, laisser décanter puis récupérer la phase aqueuse.

Répéter l'opération deux fois.

1.2.2.2. Séchage des extraits.

Les traces d'eau de la phase organique globale sont éliminées par séchage sur sulfate de sodium anhydre (SO_4Na_2).

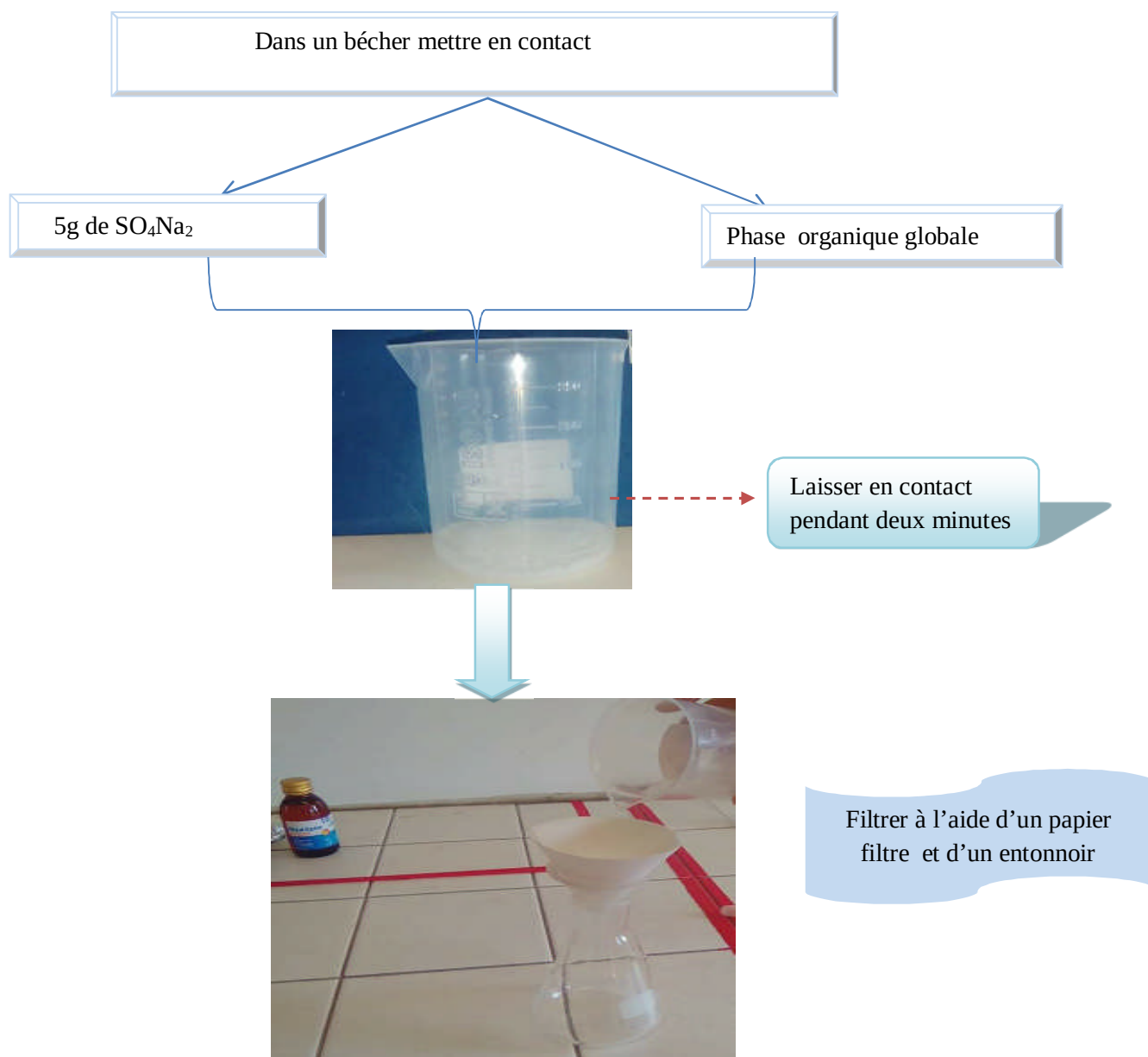


Figure 07: Protocole de séchage

1.2.3. Obtention de la solution finale à analyser

- Le filtrat est recueilli dans un récipient approprié et évaporé à sec sous hotte.
- Le résidu d'évaporation est repris par 2 ml d'éthanol nommé la solution S.

-Les excipients recherchés sont contenus dans la solution S qui sera soumise à analyse chromatographique.

2. Identification des excipients par Chromatographie sur couche mince (CCM).

La séparation sur la couche mince des composés de la solution S est le résultat de leur répartition entre la phase stationnaire solide fixe sur la plaque et la phase mobile ou éluant. Le phénomène chromatographique responsable de la séparation est l'adsorption.

2.1 Matériels.

2.1.1. Appareillage, verrerie et autre matériel.

Tableau VII: Appareillage et verreries utilisé dans l'identification des excipients (parabènes)

Appareillage	Verrerie	Autres matériel
• Chambre noir contenant une lampe UV (254nm). • Balance. • Etuve. • Cuve chromatographique	• Fioles 100ml, • Erlenmeyer 100 ml • Entonnoir • Bêchers • micro seringue	• Plaque CCM (phase stationnaire). • Papier aluminium. • Spatule métallique • Crayon fin

2.1.2 Réactifs.

- Acide acétique glacial
- Ethanol.
- Dichloromethane.
- solution S (l'extrait recueilli contenant les excipients recherchés).
- Solution témoins :

T1 :157 mg de parahydroxybenzoate de méthyle dans 100ml de méthanol

T2 :67 mg de Parahydroxybenzoate de propyle dans 100 ml de methanol.

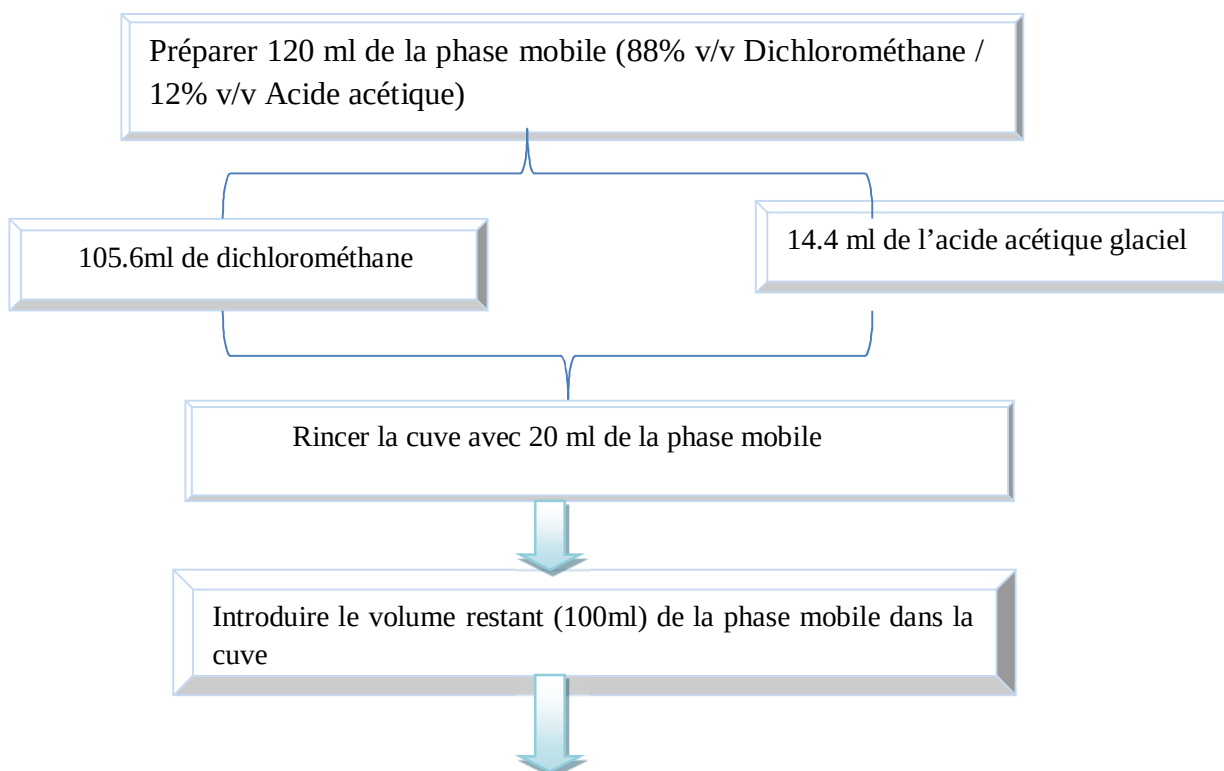


Figure 08: Solution témoin T1et T2

2.2. Méthode

Le protocole suivi pour réaliser l'identification des parabènes est le suivant.

2.2.1. Préparation de chambre de développement.





Recouvrir immédiatement et
laisser saturer

Figure 09: Protocole de préparation de chambre de développement.

2.2.2. Préparation du support chromatographique

-La plaque a chromatographie est préalablement activée par passage à l'étuve à 105°C durant 30 minutes.

-Définir la ligne de dépôt et le front du solvant par des traits.

A 2,5 cm du bord inférieur de la plaque, tracer la ligne de dépôt à l'aide d'un crayon sans léser la couche de gel de silice

A 17.5 cm du bord inférieur de la plaque, tracer la ligne du front du solvant par une rainure profonde.

-Dépôt des solutions :

A l'aide de la micro-seringue ; prélever successivement 5 μ l de chacune des solutions T1 ; T2 et S.

Après chaque prélèvement ; déposer la solution sans étaler ; pour cela, sécher au fur à mesure les taches.

Les dépôts doivent être situés à 1 cm des bords latéraux de la plaque et être distants d'au moins 1cm les uns des autres.

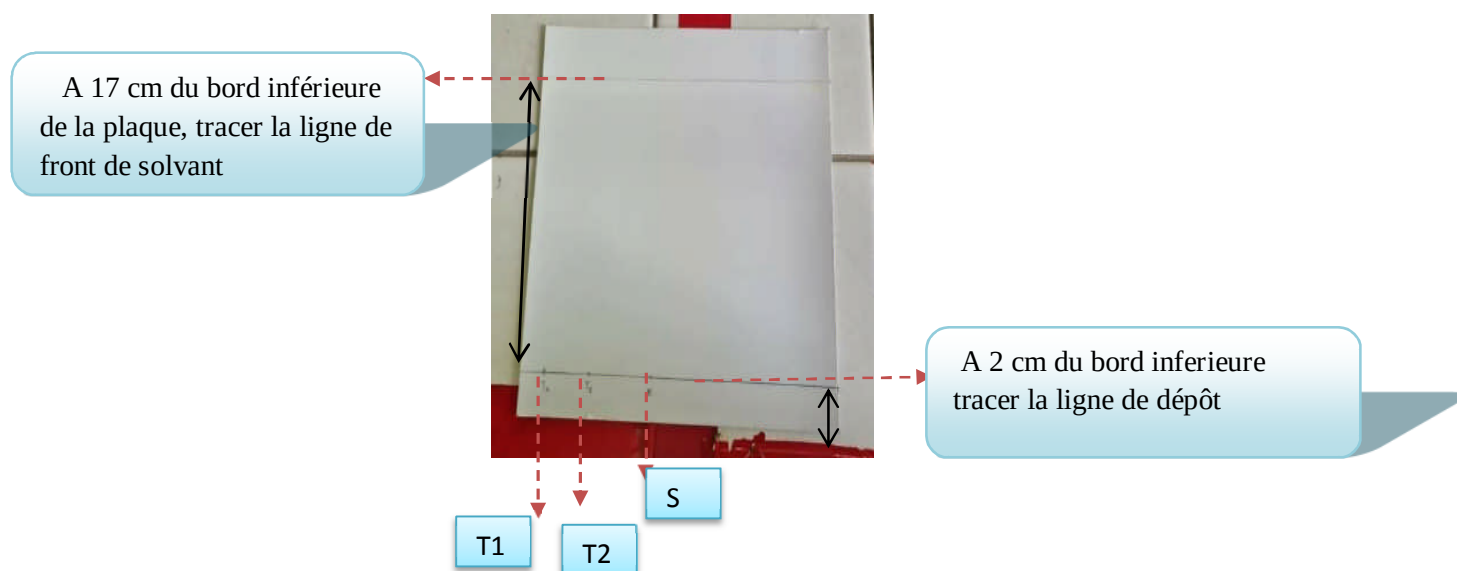


Figure 10 : traçage de la plaque et dépôt des solutions

2.2.3. Migration des composés.

La plaque préparée est introduite dans la chambre de développement (la cuve) qui immédiatement recouverte .

Les différents composés entraînés par la phase mobile se déplacent par capillarité le long de la phase stationnaire selon des vitesses qui leur sont propres.

Lorsque le front du solvant est atteint par la phase mobile ;retirer la plaque et laisser sécher a l'air libre durant quelques minutes.



Figure 11:Le protocole de migration des composantes.

2.2.4. Révélation des spots.

Observation de la plaque sous lampe UV a une longueur d'ondes de 254 nm ;afin de localiser les taches.

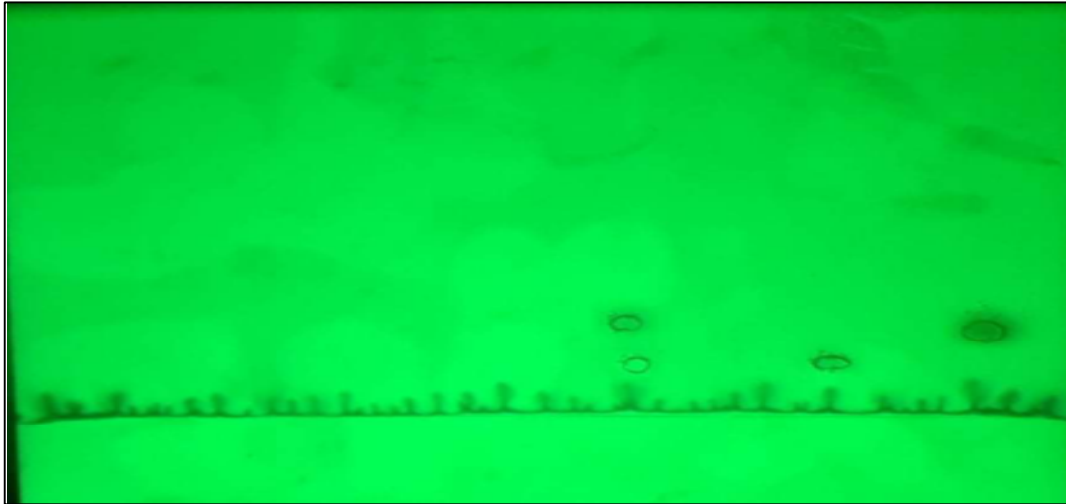


Figure 12: Révélation des spots

3. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne des excipients (parabènes) dans le sirop MAXILASE®

Etant donné que les excipients (parabènes) contenus dans le MAXILASE® ont un spectre actif sur les bactéries à gram négatif (*Escherichia Coli*), les bactéries à gram positif (*Staphylococcus aureus*, *Streptocoques pyogens*) ainsi que les levures (*Candida albicans*).

3.1. Matériels.

- Flacon de sirop maxilase.
- Pipettes pasteur stériles.
- Milieux de culture (Hoektoen,Chapman,Poupre de bromocrésol (BCP), gélose au sang frais gélose au sang cuit, sabouraud).
- Etuve réglée à 37°C.
- Jarre.
- Bougie.
- Bac benzène.

3.2. Méthode

Afin de mettre en évidence cette activité antimicrobienne et de démontrer que le sirop MAXILASE® est dépourvu de microorganismes sensibles aux parabènes. Il convient alors de d'ensemencer le sirop sur les 6 milieux de culture sélectifs aux microorganismes cités précédemment :

1. milieu Hektoen (vert) sélectifs des bactéries gram négatif.
2. milieu Chapman (Rose) sélectifs des staphylocoques.
- 3..milieu BCP (violet) sélectifs : bacilles gram négatif.
4. gélose au sang frais (rouge clair) sélectif des streptocoques.
5. gélose au sang cuit (marron) sélectif des streptocoques.
6. milieu Sabourand (tube à vis) : sélectifs des candidas.



Figure 13: Les milieux de cultures

➤ Le protocole à suivre est :

Le premier ensemencement se fait juste après l'ouverture du flacon de sirop

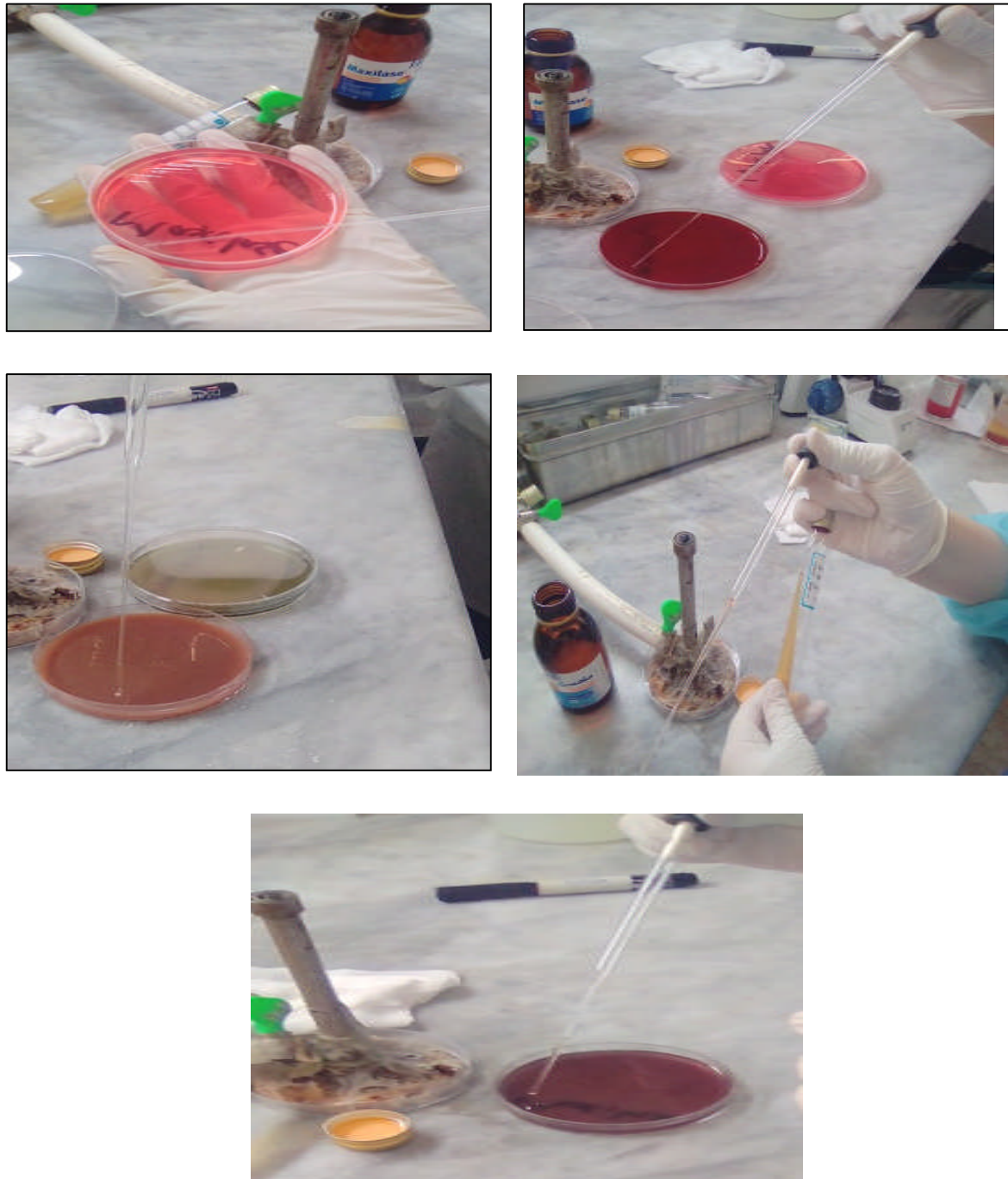


Figure 14: ensemencement des différents milieux de culture

On incube les milieux 1.2.3.6 à 37°C pendant 24 h à l'étuve



Figure 15: l'étuve du laboratoire de Microbiologie du CHU Tizi-Ouzou

Remarque.

Les milieux 4 et 5 exigent l'anaérobiose (absence d'O₂)



Incubation dans une jarre contenant une bougie qui combuste l'oxygène (O₂) contenu dans la jarre en dioxyde de carbone (CO₂).



Figure 16: la jarre du laboratoire de microbiologie du CHU TIZI OUZO



Un 2^{ème} ensemencement est réalisé de la même manière après avoir conservé le même flacon de sirop à température ambiante pendant 7 jours afin de détecter une éventuelle poussée microbienne.



La lecture se fait toujours après incubation à 37°C pendant 24h

Chapitre VI

Résultats et Discussion

1. Extraction des excipients (parabènes)

-L'extraction des parabènes s'est faite en milieu acide en présence d' HCL à 37% afin de les garder sous forme moléculaire, étant donné qu'ils sont des dérivés d'acide (ester).

-L'étape de lavage à pour but d'éliminer la majeure partie du principe actif (alpha amylase).

-Le séchage à pour but d'éliminer les molécules d'eau restante dans l'extrait.

-L'extrait final se trouve composé de (parabènes +diethylether).

Après évaporation, il ne reste dans le flacon que les parabènes d'où l'intérêt de les récupérer par un second solvant volatil, qui est l'éthanol (moins toxique et peu cher).

2. Identification des excipients (parabènes)

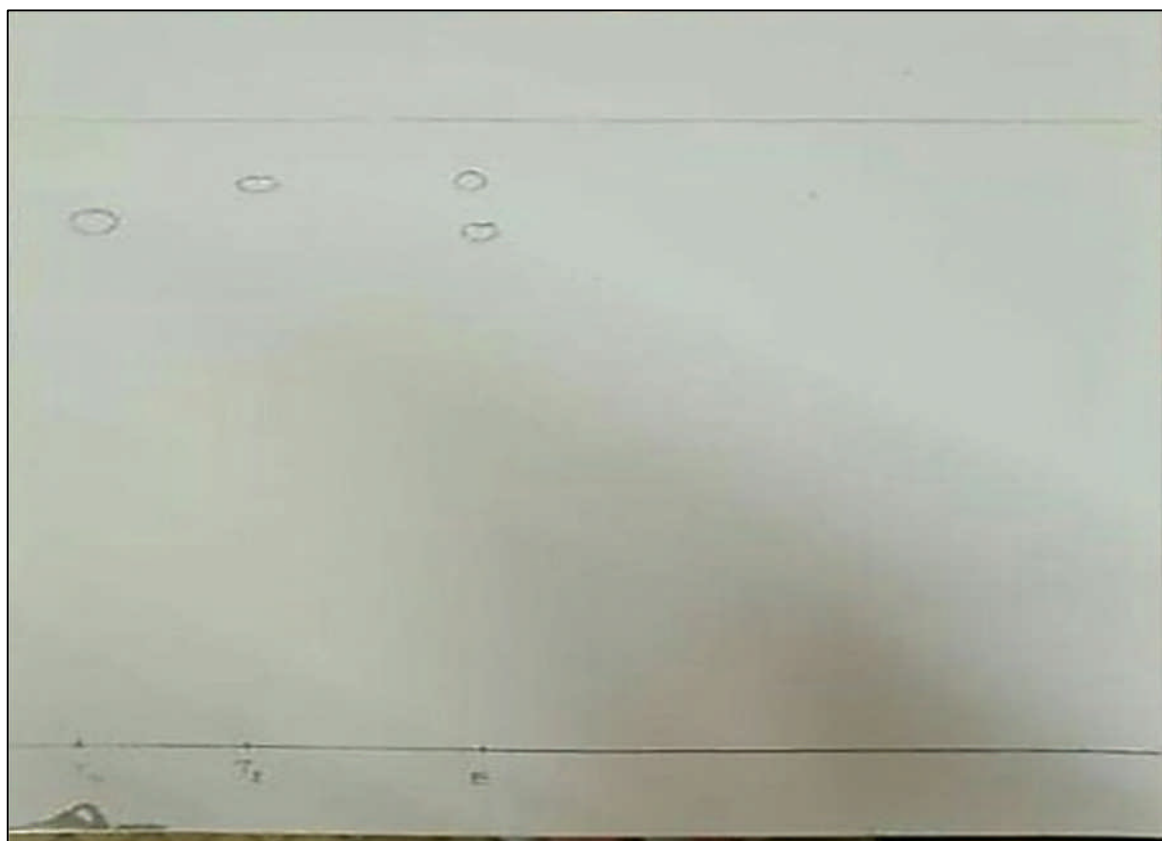


Figure 17: résultats de migration des composantes par CCM

Elle se fait par du calcul du rapport frontal R_f pour chaque un des 2 témoins puis comparaison avec les rapports frontaux de l'échantillon.

Distance de migration du composant

$R_f = \frac{\text{Distance de migration du composant}}{\text{Distance de migration de solvant}}$

Distance de migration de solvant

La distance de migration de solvant dans notre cas est : $D=15.5\text{cm}$.

Les résultats sont rapportés dans le tableau suivant :

Tableau VIII: Les résultats des rapports frontaux des substances

substances	Distance de migration	Rapport frontal
T1	$d_1 = 10.8\text{cm}$	$R_f = \frac{d_1}{D} = \frac{10.8}{15.5} = 0.67$
T2	$d_2 = 11.5\text{cm}$	$R_f = \frac{d_2}{D} = \frac{11.5}{15.5} = 0.74$
Composants de la solution S	$d_3 = 10.8\text{cm}$	$R_f = \frac{d_3}{D} = \frac{10.8}{15.5} = 0.69$
	$d_4 = 11.6\text{cm}$	$R_f = \frac{d_4}{D} = \frac{11.6}{15.5} = 0.74$

On remarque :

$R_{f1} \approx R_{f3}$ donc T1 et la tâche correspondante à d_3 relèvent du même composé.

$R_{f2} = R_{f4}$ donc T2 est la tâche correspondante à d_4 relèvent du même composée.

**Identification des tâches proprement dite et discussion

-La phase stationnaire est composée de gel de silice qui est de nature polaire, donc retient les composés polaires d'une manière plus importante que les composés apolaires.

-Le parahydroxybenzoate de méthyle de faible poids moléculaire est plus polaire que le parahydroxybenzoate de propyle et par conséquent, il sera plus retenu par la phase stationnaire que le parahydroxybenzoate de propyle.

Ainsi la tâche qui apparaît en dernier (R_f plus élevé) correspondant au parahydroxybenzoate de propyle, alors que la première tâche (R_f plus faible) correspondant au parahydroxybenzoate de méthyle.

3. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne des parabènes

3.1. Résultats du 1^{er} ensemencement après incubation.

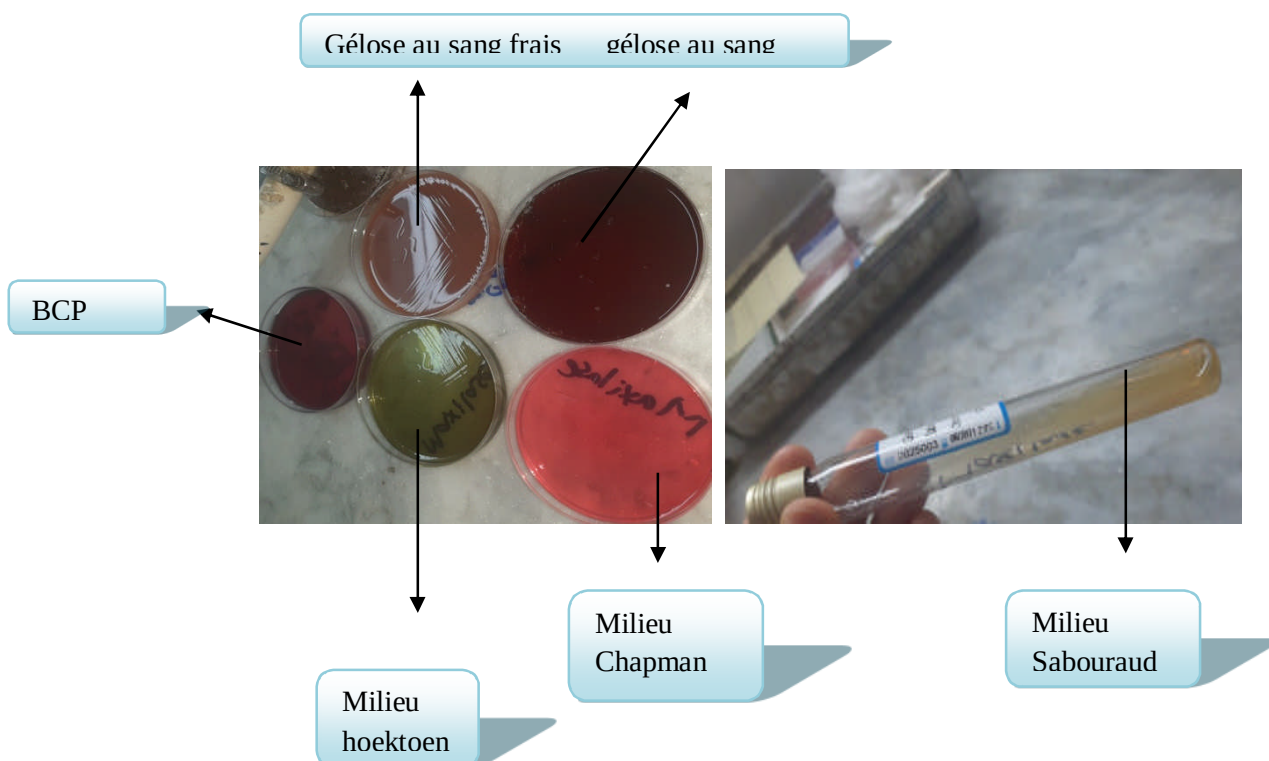


Figure 18: résultats de 1er ensemencement

On remarque que la culture sur ces six milieux est négative ce qui confirme réellement que notre sirop est protégé des germes en question (staphylocoques, streptocoques, Escherichia. Coli, Candida albicans) grâce à l'activité antimicrobienne conservatrice des parabènes

3.2 Résultats du 2^{ème} ensemencement réalisé après la conservation du sirop a température ambiante pendant 7 jours suivis d'incubation.

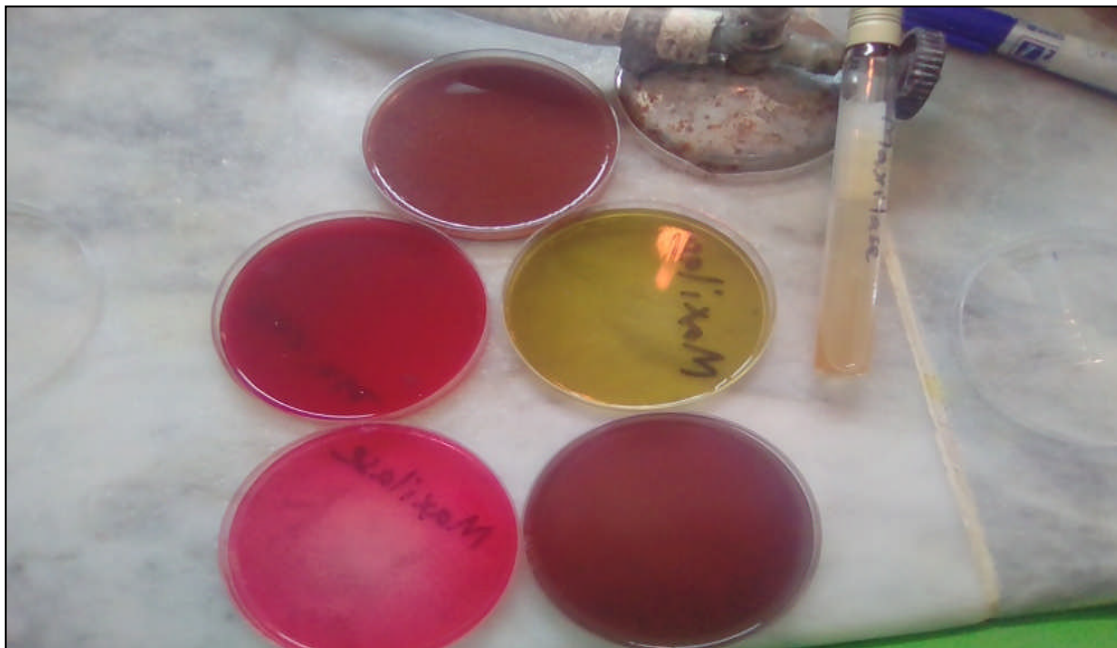


Figure 19: résultats de 2^{ème} ensemencement

Bien que le sirop était conservé à température ambiante pendant 7 jours et malgré qu' il contient une forte teneur en saccharose qui favorise la prolifération microbienne mais la culture sur les six milieux est restée toujours négative grâce à l'effet protecteur des parabènes ce qui confirme et met en évidence leurs activité antimicrobienne.

Conclusion générale

Conclusion

Le MAXILASE est un sirop pédiatrique à visée anti-inflammatoire, largement utilisé dans le monde entier et l'Algérie en particulier.

Comme tout médicament, il est composé d'un principe actif « alpha amylase » lui conférant des propriétés anti-inflammatoires et décongestionnantes de la gorge chez l'enfant, ainsi que des excipients permettant une meilleure mise en forme du principe actif et une formulation correcte du médicament.

Parmi les excipients du sirop MAAXILASE, on est intéressé dans notre travail aux « PARABENS », propriétés conservatrices antimicrobiennes, utilisés dans ce sirop en vue de le protéger contre une éventuelle prolifération de germes et de levures.

Au cours de notre travail, nous avons caractérisé les parabènes, par le biais d'une extraction répétée liquide-liquide suivi d'une identification par la chromatographie sur couche mince (CCM) révélée par la lumière ultra violette et cela en comparant la migration des dépôts du sirop avec celles de témoins réalisés dans les mêmes conditions, nous avons confirmé réellement que le sirop MAAXILASE contient les parabènes.

Dans un deuxième temps, on avait mis en évidence l'activité antimicrobienne protectrice que confèrent les parabènes au sirop pédiatrique MAXILASE, et cela en ensemençant le sirop sur les différents milieux de culture sélectifs aux germes et levures appartenant au spectre d'action des parabènes.

Cette activité antimicrobienne a été étudiée en deux temps : immédiatement après l'ouverture du flacon et après 7 jours de conservation à température ambiante.

Dans les deux cas, toutes les cultures microbiennes étaient négatives ce qui confirme et met en évidence l'activité antimicrobienne des parabènes.

Références bibliographiques

- [1] **CHARPENTIER.B., HAMON-LORLEACH.F., ALAIN.H., ALAN-HCRA.D., RIDOUX.L., CHANSE-LLE.S. (2008).**Guide du préparateur en pharmacie.3^{ème} éd. France.
- [2] **GOIRAND.F. , BARDOU.M. (2011).** Pharmacologie et thérapeutique, éd Masson.
- [3] **PILLON.F. (2014).** Actualités pharmaceutique : les anti- inflammatoires non stéroïdiennes. 53, (534), p 43- 46.
- [4] **H.BLAIN., C.JEANDEL., JY.JOUZEAU., P.NETTER. (2000).**La Revue de médecine interne : les antis inflammatoires non stéroïdiens inhibiteurs sélectifs, 21, (11), p 978-988
- [5] **GAZENDEL.J.M., ORECCHIONI A.M. (2013).** Guide théorique et pratique: le préparateur en pharmacie. 2^{ème}éd.Paris.
- [6] **LEVET.E. (2011).**Anti-inflammatoire non stéroïdienne : facteur de risque d'aggravation des infections bactériennes connaissance par le pharmacien d'officine de ce risque potentiel.thèse.Université limogén.
- [7] **GIUSI .T.(2018).**les anti –inflammatoire non stéroïdiens étude de terrain d'officine et évaluation de risque .thèse. Université de Lille.
- [8] **ERTUGRUL. G.U. (2015).**Evaluation de la prescription des anti- inflammatoires non stéroïdiens chez les sujets âgés. Thèse. Université Diderot paris7.
- [9] **MOULAYE.S. (2010).**Analyse de prescription des AINS dans le centre de santé de référence de commune III du district de Bamako.Thèse.Université Bamako.
- [10] Les anti-inflammatoires non stéroïdiennes. Disponible sur <http://www.memoireonline.com>. Consulté le 24/05/2021.
- [11]**TALBERT.M., WILLOQUET.G., GERVAIS.R.(2008).**guide pharmaco.8^{ème} éd.
- [12]**BEAULIEU.P, LAMBERT.CH.(2010).** Précis de pharmacologie du fondamental à la clinique ; les presses de l'université de Montréal.
- [13]**AMBER.B. (2020).** AINS et risque infectieux enquête régionale auprès des pharmaciens d'officine et étudiant en pharmacie .thèse de doctorat en pharmacie. Université de bourgogne.
- [14]**TOULISSE.C.(2015).**Développement d'une forme pharmaceutique pédiatrique administré par voie orale ou buccal : réglementation et importance de la palatabilité. Thèse. Université limoges.
- [15] **STARA.D.(2001).** Pharmacologie et thérapeutique, 2^{ème} éd.
- [16] **COROLINE.M.(2014).** Perception du médicament générique par les patients de midi – pyridine : les catégories socio- professionnels ont elle une influence. Thèse. Université Toulouse 3.

- [17] **AIACHE.J.M.,BEYSSAC.E.,CARDOT.J.M.**Initiation à la connaissance de médicament ,5^{ème} édition.
- [18] **TCHZNAR.N.**Qualification et validation d'unité forme liquide. Mémoire .Université Grenoble.
- [19] **HIR.A ., CHAUMEIL.J.C. , BROSSARD.D., CHARREAU.C., CRAUSTE-MANCIET.S.**2016.Pharmaco galénique : Bonne pratique de fabrication des médicaments.10^{ème} éd .Pologne .
- [20] **JUSS.D. (2016).** Mise en point et étude de stabilité physico-chimique et micro- biologique d'une forme orale liquide microdipine à visée pédiatrique. Thèse .Université Rouen.
- [21] **VIDJRO.S.W .(2015).** Etude de stabilité chimique d'un médicament entamé : cas d'un sirop de paracétamol. Thèse doctorat. Université Mohammed V- Rarat.
- [22] **CECIL.S.(2018).** Administration de forme orale : étude de la précision de la dose administrée en fonction de la forme galénique et étude de stabilité micro- biologie de suspension buvable .Thèse . Université Poitiers
- [23] **POTIER.A.(2017).** Enjeux des formulations orales liquides pédiatriques et initiative récentes- illustration par la réalisation d'une solution de chlorhydrate de clonidine. Thèse. Université de lorraine.
- [24]**ADAMO.C.,ANTIGNAC.J.PH., AUGER.J., BALGUER.P., BOURCHIE.D., ETAL.(2011)** .reproduction et environnement (rapport de recherche) institue de la santé et de la recherche médicale(INSERM).paris. Édition EDP science.
- [25]**CORRE.CH.,DALVAL.J.,DAMPFHOFFER.M.,LAMBERLIN.M.,TERRASON.R..(2009).**Les parabènes : quelle problématiques pour la santé publique ?
- [26]**HAMAN.C.(2014).**les parabènes dans l'eau : introduction dans l'environnement occurrence et toxicité. Thèse. Université de lorraine.
- [27] **KERDUDO.A.(2014).** Optimisation de la conservation des cosmétiques, impact de la formulation, recherche de nouveaux conservateur naturels, encapsulation. Thèse. Université NICE Sophia Antipolis.
- [28] **ALEXENDER.M.(2014).**Phtalates et parabènes dans les médicaments :impact pour l'industrie pharmaceutique d' une évolution de la réglementation visant à les interdit. Thèse .Université de Bordeaux.
- [29]**MONNERT C., JACQUESY. R.A.(2017).** L'actualité chimique. Paris.
- [30] **KALT.A.(2016).** le journal le monde à dévoiler la liste de 400 médicaments continue de parabènes.

- [31] **LAUVEL.L. (2020).** Excipient controversé dans l'industrie pharmaceutique et cosmétiques : quelle alternative possible ? Science pharmaceutique. Université Caen-Normandie.
- [32] **J.R. et al. (2002).** Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology, 80, 49-60
- [33] **a b et c . (2009).** Bulletin de l'AFSSAPS [archive].
- [34] **Paul Benkimoun. (2011).**« Des parabènes présents dans 400 médicaments » [archive], Le Monde).
- [35] «Avis du groupe scientifique sur les additifs alimentaires, les arômes, les auxiliaires technologiques et les matériaux en contact avec les aliments à la demande de la Commission concernant les para hydrox benzoates (E 214-219) [archive] », 13 juillet 2004, EFSA.
- [36] **2017,**«Les cosmétiques passés au crible-la synthèse de l'ASEF» [archive].
- [37] **J.M.BRIGNON., P.BOUCARD. (2015).** Données technico-économiques sur les substances chimiques en France : parabènes.
- [38]**VALKOVA.N.,LEPINE.F.,VALEANU.L.,DUPONT.M.,LABRIE.L.,BISAILLON.J. G., BEAUDET.R., SHAREK.F.,VILLEMUR.R.(2001).** Hydrolysis of 4-hydroxybenzoic acid esters (parabens) and their aerobic transformation into phenol by the resistant *Enterobacter cloacae* strain EM. Applied Environmental Microbiology, 67:2404-9.
- [39] **MAHUZIER.C., HAMON.M., FERRIER.D., PROGNON.P.(1999).** Abrégé de chimie analytique tome 2-Méthodes de séparation. Masson 3^{ème} éd.
- [40] **ROUESSAC.F., ROUESSAC.A., CRUCHE.D. (2001).**Analyse chimique : Méthodes et techniques instrumentales modernes masson 2^{ème} éd.
- [41] **ANTOINE.M., SOUIFFI.CH., PRADEAU.D.D. (2003).** Techniques de l'ingénieur-Chromatographie planaire partie 1 et 2 masson éd.
- [42] **BROWNING.D.R .(1971).** Chromatographie, éd Masson, Paris

Résumé

Le MAXILASE est un sirop pédiatrique à visée anti-inflammatoire, largement utilisé dans le monde entier et l'Algérie en particulier. Les parabènes font partie des excipients retrouvés dans ce médicament, ils sont utilisés en tant que conservateurs antimicrobiens.

L'objectif de ce travail est d'identifier les parabènes contenus dans ce sirop MAXILASE®, une fois extraits, puis la mise en évidence de leur activité antimicrobienne in vitro par ensemencement sur les différents milieux de cultures sélectifs aux germes et levures appartenant au spectre des parabènes.

Les résultats ont montré que les parabènes confèrent une protection antimicrobienne complète au MAXILASE à court et long terme.

Mot clés : sirop, parabènes, identification, extraction, conservateurs antimicrobiens.

Abstract

MAXILAS is pediatric syrup with anti-inflammatory aim, widely used in the whole world and Algeria in particular. Parabens are part of the excipients found in this drug; they are used as antimicrobial preservatives.

The objective of this work is to identify the parabens contained in this syrup MAXILASE, a liver extracted, then the highlighting of their antimicrobial activity in vitro by seeding on different culture media selective to germs and yeasts belonging to the spectrum of parabens.

The results showed that parabens confer a complete antimicrobial protection of MAXILASE in the short and long term.

Keywords : syrup, parabens, identification, extraction, antimicrobial preservatives .

Références bibliographique

- [1] **CHARPENTIER.B., HAMON-LORLEACH.F., ALAIN.H., ALAN-HCRA.D., RIDOUX.L., CHANSE-LLE.S.(2008).**Guide du préparateur en pharmacie.3^{ème} éd. France.
- [2] **GOIRAND.F. , BARDOU.M.(2011).** Pharmacologie et thérapeutique, éd Masson.
- [3] **PILLON.F.(2014).** Actualités pharmaceutique : les anti- inflammatoires non stéroïdiennes. 53, (534), p 43- 46.
- [4] **H.BLAINE., C.JEANDEL., JY.JOUZEAU., P.NETTER.(2000).**La Revue de médecine interne : les antis inflammatoires non stéroïdiens inhibiteurs sélectifs, 21, (11), p 978-988
- [5] **GAZENGE.L.J.M., ORECCHIONI.A.M.(2013).** Guide théorique et pratique: le préparateur en pharmacie. 2^{ème}éd.Paris.
- [6] **LEVET.E. (2011).**Anti-inflammatoire non stéroïdienne : facteur de risque d'aggravation des infections bactériennes connaissance par le pharmacien d'officine de ce risque potentiel.thèse.Université limogén.
- [7] **GIUSI .T.(2018).**les anti –inflammatoire non stéroïdiens étude de terrain d'officine et évaluation de risque .thèse. Université de Lille.
- [8] **ERTUGRUL. G.U. (2015).**Evaluation de la prescription des anti- inflammatoires non stéroïdiens chez les sujets âgés. Thèse. Université Diderot paris7.
- [9] **MOULAYE.S. (2010).**Analyse de prescription des AINS dans le centre de santé de référence de commune III du district de Bamako.Thèse.Université Bamako.
- [10] Les anti-inflammatoires non stéroïdiennes. Disponible sur <http://www.memoireonline.com>. Consulté le 24/05/2021.
- [11] **TALBERT.M., WILLOQUET.G., GERVAIS.R.(2008).**guide pharmaco.8^{ème} éd.
- [12] **BEAULIEU.P, LAMBERT.CH.(2010).** Précis de pharmacologie du fondamental à la clinique ; les presses de l'université de Montréal.
- [13] **AMBER.B. (2020).** AINS et risque infectieux enquête régionale auprès des pharmaciens d'officine et étudiant en pharmacie .thèse de doctorat en pharmacie. Université de bourgogne.
- [14]**TOULISSE.C.(2015).**Développement d'une forme pharmaceutique pédiatrique administré par voie orale ou buccal : réglementation et importance de la palatabilité. Thèse. Université limoges.
- [15] **STARA.D.(2001).** Pharmacologie et thérapeutique, 2^{ème} éd.

[16] COROLINE.M.(2014). Perception du médicament générique par les patients de midi – pyridine : les catégories socio- professionnels ont elle une influence. Thèse. Université Toulouse 3.

[17] AIACHE.J.M.,BEYSSAC.E.,CARDOT.J.M.Initiation à la connaissance de médicament ,5ème édition.

[18] TCHZNAR.N.Qualification et validation d'unité forme liquide. Mémoire .Université Grenoble.

[19] HIR.A ., CHAUMEIL.J.C., BROSSARD.D., CHARREAU.C., CRAUSTE-MANCIET.S.2016.Pharmaco galénique : Bonne pratique de fabrication des médicaments.10^{ème} éd .Pologne .

[20] JUSS.D. (2016). Mise en point et étude de stabilité physico-chimique et micro-biologique d'une forme orale liquide microdipine à visée pédiatrique. Thèse .Université Rouen.

[21]VIDJRO.S.W .(2015). Etude de stabilité chimique d'un médicament entamé : cas d'un sirop de paracétamol. Thèse doctorat. Université Mohammed V- Rarat.

[22] CECIL.S.(2018). Administration de forme orale : étude de la précision de la dose administrée en fonction de la forme galénique et étude de stabilité micro- biologie de suspension buvable .Thèse . Université Poitiers

[23] POTIER.A.(2017). Enjeux des formulations orales liquides pédiatriques et initiative récentes- illustration par la réalisation d'une solution de chlorhydrate de clonidine. Thèse. Université de lorraine.

[24]ADAMO.C.,ANTIGNAC.J.PH., AUGER.J., BALGUER.P., BOURCHIE.D., ETAL.(2011) .reproduction et environnement (rapport de recherche) institue de la santé et de la recherche médicale(INSERM).paris. Édition EDP science.

[25]CORRE.CH.,DALVALJ.,DAMPFHOFFER.M.,LAMBERLIN.M.,TERRASON.R..(2009).Les parabènes : quelle problématiques pour la santé publique ?

[26]HAMAN.C.(2014).les parabènes dans l'eau : introduction dans l'environnement occurrence et toxicité. Thèse. Université de lorraine.

[27] KERDUDO.A.(2014). Optimisation de la conservation des cosmétiques, impact de la formulation, recherche de nouveaux conservateur naturels, encapsulation. Thèse. Université NICE Sophia Antipolis.

[28] ALEXENDER.M.(2014).Phtalates et parabènes dans les médicaments :impact pour l'industrie pharmaceutique d' une évolution de la réglementation visant à les interdit. Thèse .Université de Bordeaux.

[29]MONNERT C., JACQUESY. R.A.(2017). L'actualité chimique. Paris.

[30] **KALT.A.(2016).** le journal le monde à dévoiler la liste de 400 médicaments continue de parabènes.

[31] **LAUVEL.L.(2020).** Excipient controversé dans l'industrie pharmaceutique et cosmétiques : quelle alternative possible ? Science pharmaceutique. Université Caen-Normandie.

[32]**J.R. et al.(2002).** Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology, 80, 49-60

[33] **a b et c(2009).** Bulletin de l'AFSSAPS [archive].

[34] **Paul Benkimoun.(2011).**« Des parabènes présents dans 400 médicaments » [archive], Le Monde).

[35]«Avis du groupe scientifique sur les additifs alimentaires, les arômes, les auxiliaires technologiques et les matériaux en contact avec les aliments à la demande de la Commission concernant les para hydrox benzoates (E 214-219) [archive] », 13 juillet 2004, EFSA.

[36] **2017,**«Les cosmétiques passés au crible-la synthèse de l'ASEF» [archive].

[37]**J.M.BRIGNON., P.BOUCARD.(2015).** Données technico-économiques sur les substances chimiques en France : parabènes.

[38]**VALKOVA.N.,LEPINE.F.,VALEANU.L.,DUPONT.M.,LABRIE.L.,BISAILLON.J. G., BEAUDET.R., SHAREK.F.,VILLEMUR.R.(2001).** Hydrolysis of 4-hydroxybenzoic acid esters (parabens) and their aerobic transformation into phenol by the resistant Enterobacter cloacae strain EM. Applied Environmental Microbiology, 67:2404-9.

[39] **MAHUZIER.C., HAMON.M., FERRIER.D., PROGNON.P.(1999).** Abrégé de chimie analytique tome 2-Méthodes de séparation. Masson 3^{ème} éd.

[40] **ROUESSAC.F., ROUESSAC.A., CRUCHE.D. (2001).**Analyse chimique : Méthodes et techniques instrumentales modernes masson 2^{ème} éd.

[41]**ANTOINE.M., SOUFFLICH., PRADEAU.D.D. (2003).** Techniques de l'ingénieur-Chromatographie planaire partie 1 et 2 masson éd.

[42] **BROWNING.D.R .(1971).** Chromatographie, éd Masson, Paris

Résumé

Le MAXILASE est un sirop pédiatrique à visée anti-inflammatoire, largement utilisé dans le monde entier et l'Algérie en particulier. Les parabènes font partie des excipients retrouvés dans ce médicament, ils sont utilisés en tant que conservateurs antimicrobiens.

L'objectif de ce travail est d'identifier les parabènes contenus dans ce sirop MAXILASE®, une fois extraits, puis la mise en évidence de leur activité antimicrobienne in vitro par ensemencement sur les différents milieux de cultures sélectifs aux germes et levures appartenant au spectre des parabènes.

Les résultats ont montré que les parabènes confèrent une protection antimicrobienne complète au MAXILASE à court et long terme.

Mot clés : sirop, parabènes, identification, extraction, conservateurs antimicrobiens.

Abstract

MAXILAS is pediatric syrup with anti-inflammatory aim, widely used in the whole world and Algeria in particular. Parabens are part of the excipients found in this drug, they are used as antimicrobial preservatives.

The objective of this work is to identify the parabens contained in this syrup MAXILASE, a liver extracted, then the highlighting of their antimicrobial activity in vitro by seeding on different culture media selective to germs and yeasts belonging to the spectrum of parabens.

The results showed that parabens confer a complete antimicrobial protection of MAXILASE in the short and long term.

Keywords : syrup, parabens, identification, extraction, antimicrobial preservatives .