

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 PHARMACEUTIQUE

### *THEME*

**Etude de la stabilité physique et de l'effet antibactérien  
d'une suspension à base de la Sulfamethazine**

*Présenté par :* Djaou Radia

Lamraoui Fadila

*Soutenu publiquement, le*

21 /09 /2017,

*devant le Jury composé de :*

AYATI	Fadila	MCB	UMMTO	PRESIDENTE
TOUZOUIRT	Saida	MCB	UMMTO	ENCADREUR
AHMED ZAÏD	Toudert	Professeur	ENP	Co-ENCADREUR
KESSEL	Fetta	MAA	UMMTO	EXAMINATEUR
KHALDI	Nassima	MAA	UMMTO	EXAMINATEUR

# Dedicace

*Je dédie ce travail*

*A mes chers parents qui m'ont appris à donner le maximum pour réaliser un bon travail.*

*A mon fiancé HACENE qui m'a beaucoup soutenu,*

*A mon binôme FADILA et à sa famille,*

*A tous mes amies.*

**RADIA**

# Dedicace

*Je dédie ce travail*

*A mes parents pour leur soutien et encouragements et leurs prières tout au long de mes études,*

*A mes frères WALID, MAHDI et ma sœur IMANE pour leurs encouragements permanents, et leur soutien moral,*

*A mon binôme RADIA et à sa famille,*

*A tous mes amies.*

**FADILA**

# Remerciements

Nous remercions Dieu de nous avoir donné la patience et la volonté pour réaliser ce travail. Nos remerciements et nos profondes reconnaissances à notre promotrice Mlle TOUZOUIRT Saida qui a su nous guider avec patience, nous prodiguer conseils judicieux et orientations scientifiques ainsi la confiance, et le temps qu'elle a bien voulu nous consacrer C'est un grand honneur pour nous d'avoir travaillé sous sa direction.

Un remerciement particulier à notre Co-promoteur le professeur AHMED ZAID de L'Ecole Nationale Polytechnique qui a toujours été à notre disposition pour nous aider de manière très cordiale.

Nos remerciements vont également à tous nos enseignants durant ces années d'études.

Nous exprimons nos sincères remerciements à Mme F. AYATI qui nous a honorées de sa présence en acceptant de présider le jury de notre soutenance.

Nos remerciements s'adressent également à Mme F. KESSEL et à Mme N. KHALDI, qui ont acceptés d'examiner ce travail.

Un grand merci pour tout le personnel de laboratoire de pharmacie galénique de l'Université de Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou en particulier l'ingénieur de laboratoire.

Nous remercions aussi Mme AZEM le chef de service de laboratoire de microbiologie du CHU de TIZI OUZOU pour son aimable contribution.

Un remerciement à Dr ZERRAR Ammar qui nous a permis de réaliser l'étude antibactérienne au sein de son Laboratoire et tout le personnel de son laboratoire et plus particulièrement Melle ABED Nassima ingénieure en contrôle de qualité et analyse pour son soutien.

Enfin, nos remerciements vont vers toutes les personnes qui, de près ou de loin nous ont apporté leurs soutiens et leurs conseils pour la réalisation de ce mémoire.

*Merci* 

## Résumé

L'objectif de notre travail est d'étudier la stabilité physique d'une suspension pharmaceutique à base de sulfaméthazine, en utilisant la méthodologie des plans d'expériences afin de trouver la composition qui donne meilleure la stabilité de la suspension dans le temps. L'étude est complétée par une évaluation de l'activité antibactérienne vis-à-vis de quatre espèces bactériennes : Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Bacillus, Pseudomonas. Les résultats ont montré une bonne stabilité avec l'augmentation de viscosité pour une limite de 4% d'agent viscosifiant. Une activité antibactérienne a été constatée vis-à-vis d'Escherichia coli, et Staphylococcus aureus.

**Mots clés :** Stabilité physique, suspension, Sulfaméthazine, plans d'expériences, activité antibactérienne.

## Abstract

The objective of our work is to study the physical stability of a sulfamethazine-based suspension, using the experimental design methodology in order to find the correct composition which gives the better suspension stability over time. The antibacterial activity against four bacterial species: Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Bacillus, Pseudomonas has been investigated. The results showed that a concentration of 4% of viscosifying agent confers a good stability to the studied suspension. Antibacterial activity was observed against Escherichia coli, and Staphylococcus aureus.

**Keywords:** Physical stability, Suspension, Sulfamethazine, design of experiments, antibacterial effect.

## ملخص

الهدف من عملنا هو الدراسة المادية لمسحوق معلق من السولفاميتازين باستخدام منهجية خطط الخبرات للعثور على الصيغة التي تعطي الاستقرار الأفضل بالإضافة الى دراسة على التأثير المضاد للبكتيريا على أربعة أنواع مختلفة ايشيريشيا كولي، الباسيلوس، البسودوموناس، الستافيلوكوك. قمنا بتحسين العوامل المدروسة مثل كمية عامل اللزوجة والعامل السطحي. قيم استقرار المادة في فترة ستة أسابيع وذلك عن طريق قياس اللزوجة والقياسات الزيتامترية ومقاومة الطرد المركزي. أظهرت النتائج ان الاستقرار يكون أحسن بزيادة اللزوجة مع قيمة لا تتعدى 4 بالمائة من عامل اللزوجة و ان الحرارة تؤثر على الاستقرار كما أظهرت الدراسة المضادة للبكتيريا على نشاط ضد ايشيريشيا كولي والستافيلوكوك.

**كلمات مفتاحية:** الاستقرار المادي، تعليق، سلفاميتازين، تصميم التجارب، تأثير مضاد للجراثيم.

# Sommaire

---

**Glossaire**

**Liste des abréviations**

**Liste des figures**

**Liste des tableaux**

**Introduction générale**.....1

## **Synthèse bibliographique**

1. Généralités .....	2
1.1 Définition d'une dispersion.....	2
1.2 Suspension pharmaceutique.....	3
1.3 Propriétés électriques.....	3
1.3.1 Double couche électrique.....	3
1.3.2 Potentiel zêta.....	4
2. Stabilité d'une suspension.....	5
2.1 Stabilité chimique des suspensions.....	5
2.2 Stabilité physique d'une suspension.....	5
3. Instabilité des dispersions.....	5
3.1. Causes d'instabilité.....	5
3.1.1 Energie gravitationnelle .....	5
3.1.2 Energie des interfaces.....	6
3.1.3 Energie de réseau.....	6
3.2. Phénomènes de déstabilisation des suspensions.....	6
4. Comment stabiliser une dispersion ?.....	7
4.1. Blocage des mouvements.....	8
4.2. Blocage des rencontres par répulsions ioniques.....	8
4.3. Blocage des rencontres par répulsions dues à des espèces adsorbées.....	9
4.4. Blocage de l'adhésion entre particules.....	9
4.5. Blocage du transfert.....	9
5 Formulation des suspensions pharmaceutiques.....	10
5.1 méthode de formulation.....	10
5.1.1 Formulation par floculation contrôlée des particules.....	10

# Sommaire

---

5.1.2 Formulation basée sur l'augmentation de la viscosité de la phase dispersante.....	11
5.2 Etapes de préparation des suspensions pharmaceutique.....	11
5.2.1 Dispersion du médicament.....	11
5.2.2 Préparation du véhicule structuré.....	11
5.2.3 Addition d'autres excipients de formulation (adjuvants).....	12
5.2.4 Désaération puis formation du volume final.....	12
5.2.5 Homogénéisation.....	12
5.3 Plans d'expériences.....	13
5.3.1 Méthodologie pour élaborer un plan d'expériences.....	13
5.3.2 Plan de surface de réponse et optimisation .....	13

## **Etude pratique**

### **Matériels et méthodes**

1. Matériels.....	15
1.1 .matière chimiques.....	15
1.2 . Matériels de laboratoire.....	15
1.3 . Matières biologiques et milieu de culture .....	15
1.3.1 Souche bactérienne.....	15
1.3.2 Milieux de culture.....	16
2. Méthodes.....	16
2.1.. Méthodologie des plans d'expériences .....	16
2.1.1. Choix du plan d'expériences.....	16
2.1.2 Choix de facteurs.....	16
2.1.3 Choix de réponses.....	17
2.1.4 Construction du plan composite centré.....	17
2.2 Procédés de formulation.....	18
2.3 Techniques d'évaluations de la stabilité physique des suspensions.....	18
2.3.1 Mesure de viscosité.....	18

# Sommaire

---

2.3.2	Mesure de sédimentation accélérée (centrifugation).....	19
2.3.3	Mesure de Potentiel zêta.....	19
2.4	Evaluation qualitative de l'activité antibactérienne de la suspension optimale formulée..	19
2.4.1	Réalisation de l'antibiogramme.....	19
2.4.1	Préparation des disques.....	20
2.4.2	Préparation des cultures.....	20
2.4.3	Préparation des suspensions bactériennes.....	20
2.4.4	Ensemencement.....	20
2.4.5	Lecture.....	20

## Résultats et interprétation

1.	Evolution de la viscosité dans le temps.....	22
2.	Etude statistique des résultats et interprétation.....	22
2.1	Validation du modèle.....	23
2.1.1	Adéquation du modèle.....	23
2.1.1.1	Viscosité.....	23
2.1.1.2	sédimentation accéléré (centrifugation).....	24
2.1.1.3	Potentiel zêta.....	24
2.1.2	Facteurs significatifs.....	25
2.1.2.1	Viscosité.....	25
2.1.2.2	Résistance à la centrifugation.....	25
2.1.3	Analyse de la variance.....	26
2.1.3.1	Viscosité.....	26
2.1.3.2	Résistance à la centrifugation.....	26
2.1.4	Etude des résidus.....	27
2.1.4.1	Viscosité.....	27
2.1.4.2	Résistance à la centrifugation.....	27

# Sommaire

---

2.2 Modélisation des réponses à l'aide du logiciel Modde 06.....	28
2.2.1 Modélisation de la viscosité.....	29
2.2.2 Modélisation de la résistance à la centrifugation .....	29
2.3 Phase d'optimisation.....	30
3. Résultats et interprétation de l'étude antibactérienne.....	31
3.1. Choix de l'antibiotique utilisé comme témoin.....	31
3.2. Résultats de la lecture.....	32
Conclusion générale.....	34

## **Bibliographie**

## **Annexe**

## Glossaire

---

**Antibactérienne** : Une substance possédant la capacité de tuer des bactéries.

**Antibiogramme** : Une technique de laboratoire visant à tester la sensibilité d'une souche bactérienne vis-à-vis d'un ou plusieurs antibiotiques supposés ou connus.

**Bacillus** : Une bactérie appartenant à la catégorie des Bacillaceae. Cette bactérie résiste à de hautes températures (plus de 100 °C), une des raisons pour laquelle elle est mise en cause dans de nombreuses infections alimentaires.

**Bactéries** : Des microorganismes unicellulaires simples. Invisibles à l'œil nu, ils ne contiennent pas de noyaux. Ils se trouvent généralement en très grand nombre vu leur grande capacité à se multiplier.

**Escherichia coli** : Un bacille gram négatif de la famille des Enterobacteriaceae. Également appelée colibacille et abrégée en E. coli, est une bactérie intestinale des Mammifères, très commune chez l'être humain. En effet, elle compose environ 80 % de notre flore intestinale aérobie.

**Excipients** : C'est tout composant autre que le(s) principe(s) actif(s) présent dans un médicament ou utilisé pour sa fabrication, sa fonction est de servir de vecteur (véhicule ou base) au (x) principe(s) actif(s).

**Facteur** : Un paramètre d'entrée d'un système (variable d'entrée) est appelé facteur X. ce facteur est une cause possible de variation de la réponse Y.

**Force de Van Der Waals** : est une interaction de faible intensité entre atomes, ou molécule.

**Hydrocolloïdes** : Des macromolécules hydrosolubles qui, en solution aqueuse, gênent la mobilité de l'eau et déterminent ainsi le comportement rhéologique du produit.

**Interface** : Limite entre deux phases condensées.

**Lyophilisation** : Une technique de dessiccation à froid qui consiste à enlever l'eau ou le solvant d'une substance liquide ou pâteuse par un passage de l'état solide (congélation au préalable) à un état gazeux (évaporation) sans passer par l'état liquide. Le résultat de l'opération est appelé « lyophilisat ».

**Lyophobe** : Substance qui ne peut pas se lyophiliser, qui ne présente pas d'affinité avec un

## Glossaire

---

solvant donné.

**Réponse :** La réponse Y (variable de sortie) correspond à un paramètre de sortie d'un système étudié.

**Papier wattmen :** Papier poreux capable d'absorber par capillarité une petite quantité de liquide.

**Principe actif :** Substance responsable de l'action pharmacologique, Le choix se fera en fonction du mode d'administration, de considérations de stabilité, de solubilité et de biodisponibilité.

**Pseudomonas aeruginosa:** Une bactérie gram-négative du genre Pseudomonas. Ils apparaissent la plupart du temps isolés ou en diplobacilles. Elle peut, dans certaines conditions, être pathogène. Très résistante, elle est avec d'autres bactéries à gram-négatif de plus en plus souvent responsable d'infections nosocomiales. C'est l'une des bactéries les plus difficiles à traiter cliniquement.

**Staphylocoques :** Bactéries de type cocci c'est-à-dire sphériques, à Gram positif, qui se trouvent fréquemment chez les personnes en bonne santé, habituellement dans la muqueuse du nez.

**Tension actif :** Une substance modifiant la tension superficielle entre deux surfaces. Ils se composent de molécules amphiphiles présentant un côté lipophile (affinité pour les lipides) et un côté hydrophile (affinité pour l'eau).

**Tension superficielle :** Energie d'interface ou énergie de surface, est la tension qui existe à la surface de séparation de deux milieux.

**Test de Fisher** ou **Test F :** Un test d'hypothèse statistique qui permet de tester l'égalité de deux variances en faisant le rapport des deux variances et en vérifiant que ce rapport ne dépasse pas une certaine valeur théorique que l'on cherche dans la table de Fisher

**Valeur-p :** parfois aussi appelée p-value, est la probabilité d'obtenir la même valeur (ou une valeur encore plus extrême) du test si l'hypothèse nulle était vraie.

## Liste des Abréviations

---

**PA :** Principe Actif

**mv :** Millivolt

**DLVO :** Derjaguin, Landau, Vervey et Overbeek (théorie DLVO).

**CMC :** carboxyméthylcellulose

**tr/min :** tour par minute

**cP :** centipoise

**TA :** tensioactif

**NaCl :** chlorure de sodium

**R<sup>2</sup><sub>aju</sub> :** coefficient de détermination ajusté

**Fcrit :** F- critique

**Fobs :** F -observé

**D :** Diamètre

**E. coli:** Escherichia coli

**M-H:** Müller Hinton

## Liste des figures

---

<b>Figure 1 :</b> Différents types de dispersions.....	2
<b>Figure 2:</b> Potentiel zêta et le phénomène de double couche superficielle.....	4
<b>Figure 3 :</b> Phénomènes de déstabilisation d'une suspension.....	7
<b>Figure 4:</b> Variations de l'énergie libre d'un système au voisinage d'un état stable, d'un état métastable et d'un état instable.....	8
<b>Figure 5:</b> Interaction entre deux particules ionisées dans une solution aqueuse.....	8
<b>Figure 6 :</b> Variation de la viscosité au cours du temps.....	22
<b>Figure 7:</b> Représentation graphique des valeurs observées en fonction de valeurs estimées de la viscosité.....	24
<b>Figure 8 :</b> Représentation graphique des valeurs observées en fonction des valeurs estimées pour la résistance à la centrifugation.....	24
<b>Figure 9:</b> Histogramme de l'influence des coefficients sur la viscosité.....	25
<b>Figure 10 :</b> Histogramme de l'influence des coefficients sur la résistance à la centrifugation.....	25
<b>Figure11:</b> Evolution des résidus en fonction des valeurs prévues pour la viscosité.....	27
<b>Figure 12 :</b> Evolution des résidus en fonction des valeurs prévues pour la centrifugation...	28
<b>Figure 13 :</b> Courbe iso-réponse de la viscosité en fonction de pourcentage en CMC et la concentration en tween.....	29
<b>Figure 14 :</b> Résultats d'activité antibactérienne.....	Annexe 5

## Liste des tableaux

---

<b>Tableau 1.</b> Classification des suspensions selon différents critères. ....	3
<b>Tableau 2.</b> Généralités sur la Coagulation et la floculation.....	7
<b>Tableau 3.</b> Ingrédients utilisée pour la formulation des suspensions.....	15
<b>Tableau 4.</b> Matériels de laboratoire utilisés .....	15
<b>Tableau 5.</b> Souches bactériennes utilisées .....	16
<b>Tableau 6.</b> Facteurs étudiés et leurs niveaux respectifs en valeurs réduites et réelles.....	17
<b>Tableau 7.</b> Plan d'expériences et réponses enregistrées.....	23
<b>Tableau 8.</b> Analyse de la variance pour la viscosité.....	26
<b>Tableau 9.</b> Analyse de la variance pour la centrifugation.....	27
<b>Tableau 10.</b> Valeurs de $R^2$ , $Q^2$ de la viscosité et le temps de résistance à la centrifugation.....	28
<b>Tableau 11.</b> Propriétés désirées pour la formule.....	30
<b>Tableau 12.</b> Solutions renvoyées par l'optimiseur du logiciel Modde 6.....	31
<b>Tableau 13.</b> Valeurs de viscosité et de la résistance à la centrifugation de la formule optimale ...	31
<b>Tableau 14.</b> Antibiogrammes utilisés pour la sélection d'un témoin .....	32
<b>Tableau 15.</b> Diamètres et pourcentage d'inhibition de la suspension à 2% de sulfaméthazine.....	32
<b>Tableau 16.</b> Table de Fisher-Snedecor ( $\alpha= 5\%$ ).....	Annexe 4

# Introduction générale

# Introduction générale

---

Les progrès scientifiques et technologiques accélèrent la découverte et la mise au point de produits pharmaceutiques plus efficaces et aux effets secondaires réduits. Elle est souvent une étape de fabrication d'un produit, car avant d'intégrer leur forme galénique définitive, de nombreuses préparations subissent une étape de dispersion en milieu liquide (c'est le cas pour la majorité des antibiotiques) [1]. Cette dispersion présente une forme intéressante pour certains PA pratiquement insolubles dans les solvants utilisables qui peuvent aussi diminuer le goût désagréable d'un PA ce qui est intéressant en pédiatrie. En ce qui concerne la biodisponibilité, les suspensions se situent bien avant d'autres formes solides. Cependant, la forme suspension présente un problème majeur d'instabilité et de dés-homogénéisation au cours de sa conservation [2]. Cette préparation pose deux types de problèmes. Tout d'abord, ce ne sont jamais des systèmes stables au sens de la thermodynamique. De plus, les dispersions ont des propriétés originales, qui diffèrent des propriétés des phases constituantes. Ces propriétés sont mécaniques (écoulement de la dispersion lorsqu'elle est à l'état fluide, résistance mécanique lorsqu'elle est à l'état solide), Néanmoins le contrôle de cette stabilité à long terme reste un problème particulièrement difficile du fait de la présence de deux phases susceptibles de se séparer par sédimentation. Les formulateurs ne peuvent pas éviter ce phénomène mais peuvent ralentir la vitesse de sédimentation [3].

L'objectif principal, du présent travail, est d'étudier la stabilité d'un système dispersé à savoir une suspension pharmaceutique à usage thérapeutique à base de la sulfaméthazine à 2%.

Une approche basée sur la méthodologie des surfaces de réponse a été retenue et les méthodes d'évaluation de la stabilité reposent essentiellement sur des mesures de viscosité échelonnées dans le temps, la résistance à la centrifugation et le potentiel zêta.

La méthode a permis de cerner le domaine de concentration des deux principaux excipients assurant la stabilité physique optimale.

Le présent manuscrit commence par une recherche bibliographique, puis une étude pratique subdivisée en deux parties :

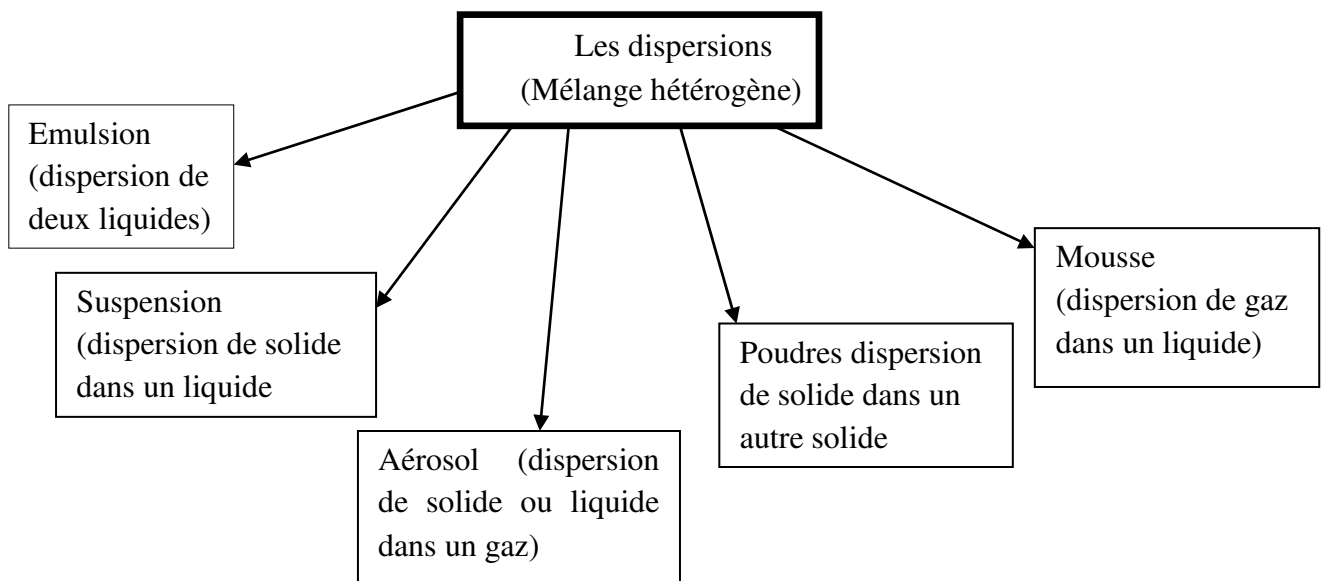
- La première présente les méthodes, le matériel et les techniques utilisées pour la formulation et la caractérisation d'une suspension de Sulfaméthazine ainsi qu'une étude antibactérienne in vitro du produit fini.
- La deuxième partie est consacrée à l'interprétation et l'étude statistique des résultats obtenus.

# Synthèse Bibliographique

## 1. Généralités

### 1.1. Définition d'une dispersion

Une dispersion peut être définie comme un système dans lequel des particules sont dispersées dans une phase continue de composition différente. L'état de la phase dispersée solide ou liquide dans le milieu de dispersion définit le système sous forme de suspension, d'émulsion, ou de mousse etc.... [4]. La figure 1 représente les différentes classes de dispersions.



**Figure 1 :** Différents types de dispersions.

La plupart des dispersions sont utilisées comme intermédiaires de fabrication. D'autres sont utilisées telles quelles, comme vecteurs de molécules actives (dans la pharmacie ou dans les produits de soins corporels) ou comme agents de molécules cibles (dans les tests de diagnostic médical) [5].

### 1.2 Suspension pharmaceutique

Les suspensions sont des préparations généralement liquides constituées par un ou plusieurs solides dispersés sous la forme de fines particules dans un milieu de dispersion appelé phase dispersante ou externe ou continue.

Les suspensions renferment généralement des adjuvants tels que : Mouillants, épaississants, agents flocculant, substances tampons, colorants, substances antimicrobiennes, conservateurs... Les préparations destinées à la voie orale peuvent contenir aussi des édulcorants et des aromatisants [6]. La classification des suspensions est donnée dans le

# Synthèse bibliographique

tableau 1 selon différents critères.

**Tableau 1.** Classification des suspensions selon différents critères.

<i>Voie d'administration</i>	<i>Proportion de particules solides</i>	<i>Taille des particules solides</i>
- Suspensions orales - Suspensions pour application locale - Suspensions parentérales [4]	- Suspension diluée (2 à 10% de solide) - Suspension concentrée (50% de solide)	- Dispersions colloïdales (Taille inférieure à 1µm) - suspensions (Taille supérieure à 1µm) [5]

## 1.3. Propriétés électriques des dispersions

### 1.3.1. Double couche électrique

La plupart des particules acquièrent des charges électriques extérieures, celles-ci peuvent également être dues à des phénomènes d'ionisation, ou d'adsorption d'ions. Les particules dispersées dans la phase mobile peuvent se trouver en présence d'ions de même signe ou de charge inverse, les premiers seront repoussés et les seconds attirés.

Au voisinage d'une surface chargée négativement, les ions de signe opposés (souvent appelés *contre-ions*) se concentrent pour neutraliser la charge à la surface de la particule et former une mince couche (théorie de Helmholtz) ; dont la densité est assez importante au près de la surface, elle s'affaiblira avec la distance.

Des ions positifs additionnels sont encore attirés par le colloïde négatif et d'autres ions négatifs inégalement répartis, cependant ils sont repoussés par la couche sévère aussi bien que par d'autres ions positifs qui essaient également d'approcher le colloïde. Cet équilibre dynamique a comme conséquence la formation d'une *couche diffuse* (théorie de Gouy-Chapman). Cette couche diffuse dépend de la surface jusqu'à une distance de quelques Angströms qui peut être d'ailleurs définie par l'étude de potentiel électrique du milieu. L'épaisseur de cette couche (appelée longueur de Debye) apparaît comme un paramètre essentiel, permettant de caractériser la décroissance du potentiel zêta. Les ions présents dans cette couche n'accompagnent pas la particule dans ses déplacements d'où l'inégalité dans la densité et la répartition des ions la composant. Les deux théories communément rassemblées constituent la théorie de double couche [7].

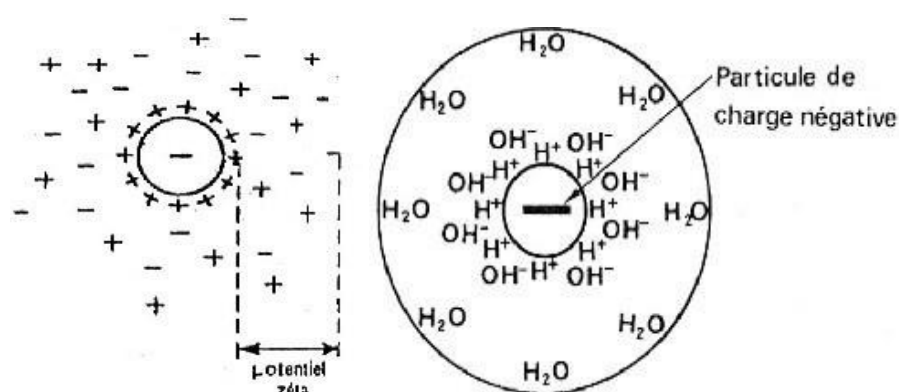
# Synthèse bibliographique

## 1.3.2 Potentiel zêta

Le potentiel zêta représente le potentiel électrostatique des particules dans la solution. Il est mesuré non pas à la surface des molécules mais à l'extérieur de la double couche ionique de solvation. Le potentiel zêta représente la charge que la particule acquiert quand elle est mise en solution. Dans le cas de particules dispersées dans un milieu liquide, cette charge est essentiellement liée à l'ionisation de groupes chimiques situés à la surface ainsi qu'à l'adsorption de surfactants ioniques. L'apparition d'une charge à la surface d'une particule affecte la distribution ionique dans la région interfaciale entre la particule et le liquide. Il en résulte une augmentation de la concentration en contre ions près de la surface. Il existe donc une double couche électrique autour de chaque particule. La couche de liquide qui entoure la particule peut ainsi être modélisée sous la forme de deux couches :

- La première couche correspond à la région la plus proche de la surface et comporte des ions solidement liés à cette dernière, c'est la couche de Stern.
- La seconde, externe, est plus diffuse et présente une distribution ionique déterminée par les forces électriques mais aussi par les mouvements thermiques aléatoires.

Le potentiel zêta influe directement sur la stabilité des émulsions et des suspensions, sur la nature des interactions entre les particules et l'électrolyte mais aussi sur les caractéristiques rhéologiques. Une suspension présentant un potentiel zêta inférieur à  $|10 \text{ mV}|$  est souvent instable, alors qu'une valeur supérieure à  $|30 \text{ mV}|$  confère en général une bonne stabilité [8]. La figure 2 représente le Potentiel zêta et le phénomène de double couche.



**Figure 2:** Potentiel zêta et le phénomène de double couche superficielle [5]

## 2. Stabilité d'une suspension

La stabilité est la propriété d'une forme pharmaceutique, dans des conditions données de formulation, de fabrication, de conditionnement et de conservation pendant une durée déterminée. Au cours de cette durée, la forme pharmaceutique devra conserver toutes les caractéristiques dont elle a été pourvue au moment de la fabrication [9,10].

Pour une suspension on parle de deux types de stabilité ; chimique et physique.

### 2.1. Stabilité chimique des suspensions

La stabilité chimique est définie comme la période pendant laquelle la concentration en médicament se maintient plus de 90% par rapport à la concentration initiale [11].

Les agents de suspension sont également soumis à une dégradation avec l'âge. Les paramètres fonctionnels, la viscosité, peuvent être examinés à des températures élevées pour déterminer les caractéristiques de vieillissement [4].

### 2.2. Stabilité physique d'une suspension

En règle générale, le problème de la stabilité des suspensions est associé au fait que la stabilité physique des suspensions pharmaceutiques et les facteurs affectant cette stabilité sont égaux ou plus importants que la stabilité chimique [4].

La stabilité d'une dispersion solide-liquide est déterminée par le bilan des forces répulsives et des forces attractives qu'exercent les particules entre elles lorsqu'elles se rapprochent. La stabilité étant régie par la charge des particules (stabilisation électrostatique), la force répulsive dépend du degré de recouvrement de la double couche. La force attractive est fournie par l'interaction des forces de Van Der Waals, qui dépendent de la distance entre les particules. Toute l'énergie potentielle d'interaction peut aisément être changée en modifiant l'importance de la répulsion, soit en augmentant la concentration ionique de la solution (en ajoutant un électrolyte) ou en changeant le potentiel extérieur des particules [3].

## 3. Instabilité des dispersions

### 3.1. Causes d'instabilité

#### 3.1.1 Energie gravitationnelle

Dans la mesure où les particules sont très petites, les dispersions colloïdales sont peu sensibles à l'action de la gravité, et l'agitation thermique suffit généralement à disperser les particules. Cependant, lorsque les particules ont une densité élevée (oxydes minéraux) et des tailles supérieures à 0,1  $\mu\text{m}$ , et lorsque le liquide dispersant a une viscosité faible, elles

## Synthèse bibliographique

---

sédimentent de manière visible. On arrive ainsi à une séparation nette entre un sédiment dense et un liquide surnageant ne contenant plus de particules. Cette sédimentation peut aussi être provoquée délibérément par l'utilisation d'une accélération plus forte que la gravité, par exemple par centrifugation.

### **3.1.2 Energie des interfaces**

Comme les particules dispersées sont très petites, elles ont une énorme quantité d'interfaces, ces interfaces ont une énergie élevée. A cause de cet excès d'énergie libre, les dispersions évoluent spontanément. Elles peuvent en effet réduire cette énergie de deux manières : soit en abaissant l'énergie libre par unité d'aire d'interface, soit en réduisant l'aire totale d'interface. La première évolution se fait par adsorption d'espèces dissoutes dans la phase continue : par exemple, si des ions, des tensioactifs ou des macromolécules se trouvent dans la phase continue, ils peuvent s'adsorber sur les particules et réduire ainsi l'énergie de leurs interfaces. L'autre évolution se fait par rencontre des particules et collage de leurs surfaces (agrégation) ou par transfert de matière entre particules (mûrissement ou recristallisation).

### **3.1.3 Energie de réseau**

Il arrive souvent que les particules dispersées aient une structure amorphe. C'est le cas pour la plupart des particules obtenues par précipitation ou par polymérisation d'espèces initialement dissoutes dans la phase continue, dès lors que les conditions de précipitation conduisent à une croissance rapide (sursaturation élevée). La dispersion est alors instable vis-à-vis de toute transformation qui ferait passer la phase dispersée à un état cristallin ; elle va alors évoluer par germination de cristaux qui ont une énergie élevée [5].

## **3.2 Phénomènes de déstabilisation des suspensions**

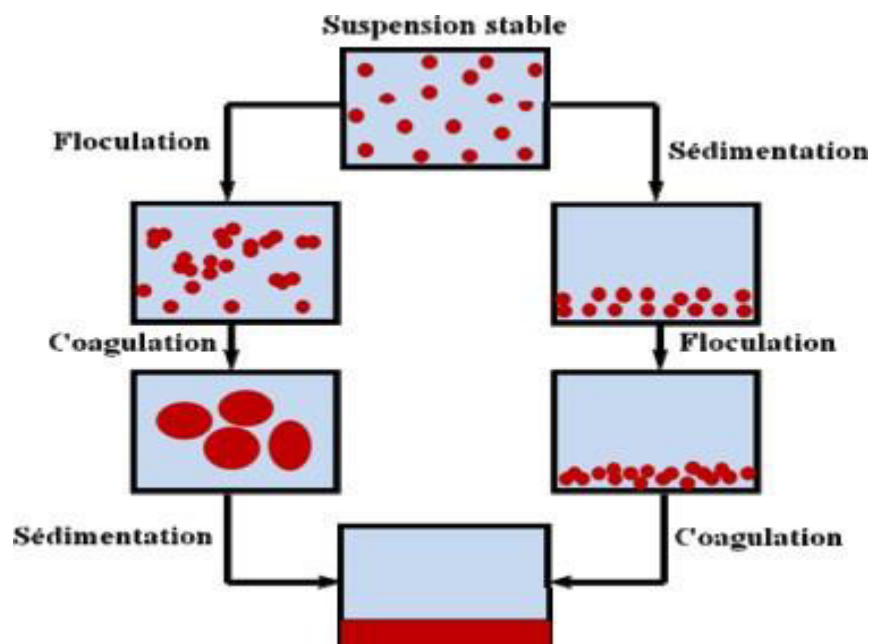
La stabilité d'une dispersion peut être définie comme la constance du nombre de particules dans un volume unitaire. Le nombre de particules par volume unitaire peut changer en raison de l'agrégation (coagulation ou floculation), de la sédimentation, et/ou des réactions chimiques. La différenciation entre ces phénomènes : floculation, coagulation, et agrégation est difficile en raison de leur utilisation ambivalente.

Le tableau 2 présente quelques généralités sur la coagulation et la floculation. Ces phénomènes sont représentés dans la figure 3.

# Synthèse bibliographique

**Tableau 2.** Généralités sur la Coagulation et la floculation [3, 12]

<i>Coagulation</i>	<i>Floculation</i>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Elle signifie la déstabilisation d'une dispersion par l'ajout de produits chimiques.</li><li>• C'est l'agglomération des particules lorsque les forces d'attraction de Van Der Waals dominent en raison de la diminution des forces répulsives.</li><li>• Elle est due à la compression de la double couche et l'adsorption des contre ions qui mène à la formation d'agrégats et précipitation.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• C'est une agrégation réversible des particules qui peuvent être redispersées à nouveau.</li><li>• Généralement induite par :<ul style="list-style-type: none"><li>- Compression de la double couche</li><li>- Interactions hydrophobes ou électrostatiques entre les parties monocouches sur deux particules.</li><li>- La floculation par pontage</li><li>- La floculation d'épuisement par un polymère libre.</li></ul></li></ul>

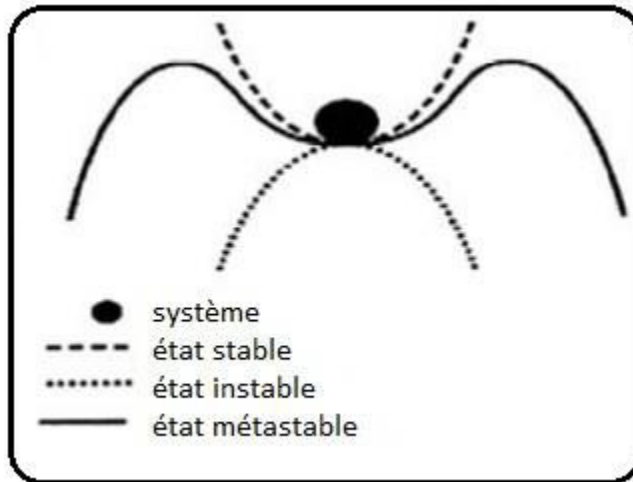


**Figure 3 :** Phénomènes de déstabilisation d'une suspension

## 4. Comment stabiliser une dispersion?

On peut facilement ralentir ou bloquer ces processus de dégradation et stabiliser les dispersions sur des durées compatibles avec les contraintes de leur utilisation. Si l'on ne fait que les ralentir, la dispersion reste dans un état instable, mais sa cinétique de dégradation est lente par rapport aux temps de conservation du produit. Si l'on arrive à les

bloquer, la dispersion devient métastable et peut rester dans cet état tant qu'aucun processus ne lui permet de surmonter les barrières qui s'opposent à son évolution.



**Figure 4 :** Variations de l'énergie libre d'un système au voisinage d'un état stable, d'un état métastable et d'un état instable [5].

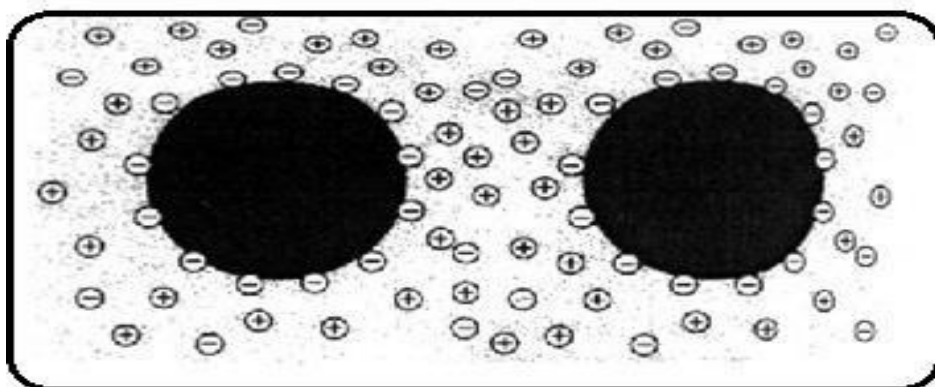
### 4.1 Blocage des mouvements

On peut ralentir de manière spectaculaire les processus d'agrégation et de sédimentation en bloquant tous les mouvements de particules. Pour cela, on ajoute dans la phase continue des macromolécules ou des micro-gels qui occupent tout le volume disponible et bloquent tous les mouvements spontanés.

### 4.2 Blocage des rencontres par répulsions ioniques « Atmosphère répulsive »

On peut laisser les particules libres de leurs mouvements à travers le liquide, mais les empêcher de se rencontrer. Pour cela, on entoure chaque particule d'une atmosphère répulsive (Couronne gonflée par le solvant), qui joue le rôle de pare-chocs.

Dans les dispersions aqueuses, cette atmosphère est souvent constituée par les contre-ions issus de l'ionisation des groupes de surface des particules.



**Figure 5:** Interaction entre deux particules ionisées dans une solution aqueuse [5].

### 4.3 Blocage des rencontres par répulsions dues à des espèces adsorbées

Dans les dispersions aqueuses contenant des sels dissous, l'extension des atmosphères ioniques est réduite, et la portée des répulsions entre particules qu'elles engendrent peut ne plus être suffisante pour bloquer les processus d'agrégation. On utilise alors des atmosphères non ioniques formées par l'adsorption de macromolécules qui sont fortement gonflées par l'eau. Les couches formées au voisinage des surfaces par ces macromolécules et les molécules de solvant sont liées et forment alors des « pare chocs » qui s'opposent aux contacts directs entre surfaces. Les répulsions créées par ces macromolécules adsorbées sont souvent dénommées répulsions stériques, donc c'est la pression osmotique des macromolécules solvatées, qui est à l'origine de la protection.

### 4.4 Blocage de l'adhésion entre particules

On peut laisser les particules libres de bouger et de se rencontrer, mais néanmoins bloquer leur agrégation en les empêchant de réagir chimiquement ou de se coller physiquement. Pour cela, on passive chimiquement les groupes de surface et on assure la rétention d'une couche de solvant au contact des surfaces.

Pour les particules dispersées dans l'eau, la réactivité des surfaces est minimale en un point, appelé *point isoélectrique*. Si l'on peut atteindre ces conditions, on évite que les particules ne se lient par des réactions chimiques entre leurs surfaces. La dispersion reste soumise à l'action des attractions de Van der Waals. Cependant, dans les cas les plus fréquents, la réactivité des groupes de surface reste trop importante dans les conditions de pH imposées à la dispersion. Une protection contre les réactions entre surfaces peut alors être obtenue en bloquant les groupes de surface qui assure aussi la rétention de molécule de solvant au voisinage des surfaces.

### 4.5 Blocage du transfert

Le blocage des mouvements ou des rencontres des particules ne suffit pas forcément à assurer la métastabilité d'une dispersion. Dans le cas où la phase dispersée est très légèrement soluble dans la phase continue, la dispersion peut très bien évoluer par transfert de molécules, soit depuis les plus petites particules vers les plus grosses, soit depuis des particules amorphes vers des cristaux. Une méthode radicale pour bloquer tous ces processus consiste à remplacer la phase continue liquide par une phase solide.

C'est ce que l'on fait par les procédés de lyophilisation et d'atomisation. Dans un premier temps, on disperse les particules dans une phase aqueuse contenant du sucre ou un polymère hydrosoluble. Ensuite, on extrait l'eau par congélation-sublimation ou par

chauffage évaporation, et les particules se retrouvent piégées dans une phase solide formée par les additifs de formulation (sucre et/polymère). Si les additifs sont bien choisis et si l'opération est correctement conduite, on obtient une poudre sèche qui peut être redispersée dans l'eau lors de l'application.

### **5. Formulation des suspensions pharmaceutiques**

La formulation recouvre l'ensemble des opérations nécessaires à la préparation d'un produit par mélange de matières premières synthétiques ou naturelles. Cette science fortement pluridisciplinaire doit gérer de manière optimale la complexité provenant de l'association de plusieurs constituants (ingrédients), éventuellement incompatibles, en vue d'élaborer ou synthétiser une ou plusieurs propriétés ou fonctions d'usage alimentaire, thérapeutique, cosmétique.

Dans le cas d'une suspension, les considérations à prendre en compte lors d'une formulation sont :

- Milieu de dispersion ;
- Nature et taille des particules ;
- Espèces dissoutes ;
- Interactions inter particules [5].

#### **5.1 Méthode de formulation**

La préparation des suspensions consiste pour l'essentiel à disperser le constituant solide (si nécessaire préalablement broyé et tamisé) dans la phase dispersante Cette dernière possède une certaine viscosité qui s'oppose à la sédimentation des particules. Elle peut être aussi obtenue par l'utilisation d'épaississant comme la gomme arabique et les dérivés de la cellulose [6].

##### ***5.1.1 Formulation par floculation contrôlée des particules***

La formulation des suspensions repose sur la recherche d'un état floculé, caractérisé par la formation d'agrégats, favorisant la formation de sédiments volumineux, faciles à redisperser. Les agents de floculation utilisés sont les électrolytes, les tensioactifs et les polymères.

### ***5.1.2 Formulation basée sur l'augmentation de la viscosité de la phase dispersante***

L'obtention des conditions de viscosité idéales nécessite l'emploi d'un véhicule dispersant par une haute viscosité au repos et une viscosité plus faible lors de l'utilisation permettant le prélèvement aisé d'une dose.

Les agents viscosifiants les plus souvent utilisés sont :

Gommes, mucilages, alginates de soude et de potassium et des dérivés solubles de la cellulose (CMC), les montmorillonites (bentonites, Veegum), Carbopols et la cellulose microcristalline [13].

### **5.2 Etapes de préparation des suspensions pharmaceutiques**

La formule d'une suspension est développée empiriquement, plusieurs formules sont testées pour déterminer la quantité optimale d'excipients nécessaire pour atteindre les propriétés physiques désirées.

Les étapes nécessaires pour préparer de telles formules à l'échelle laboratoire ou pilote sont :

#### ***5.2.1 Dispersion du médicament***

L'introduction des particules dans un véhicule est l'étape critique dans la préparation d'une suspension pharmaceutique qui exige un mouillage proportionné des particules pour assurer sa stabilité. Le mouillage des particules implique le remplacement d'air sur une surface par le liquide. Habituellement, les poudres légèrement lyophobes ne présentent aucun problème principal et peuvent être mouillées facilement. Par ailleurs, les poudres fortement lyophobes peuvent flotter dans un milieu aqueux en raison de l'énergie élevée entre le véhicule et la poudre. Dans ce cas, l'utilisation d'une quantité minimale d'agents mouillants est nécessaire, de préférence des tensio-actifs anioniques, les non ioniques peuvent aussi être utilisés.

#### ***5.2.2 Préparation du véhicule structuré***

L'approche finale à la préparation d'une suspension stable est basée sur le concept du «véhicule structuré ». On dit que le véhicule se comporte comme un "faux corps" qui peut maintenir les particules suspendues dans un état de suspension plus ou moins permanente. Les véhicules structurés sont des solutions aqueuses des agents de suspension : des hydro colloïdes, des polysaccharides, des argiles ou un mélange de ces derniers. Pour la suspension, le véhicule utilisé peut être soit de l'eau, de la glycérine ou bien un mélange de plusieurs solvants. En général, un milieu chaud est préférable à un milieu froid du fait que

le premier hydrate plus facilement les hydrocolloïdes et les argiles bien qu'il ne soit pas le milieu requis pour tous les hydrocolloïdes.

### **5.2 .3 Addition d'autres excipients de formulation (adjuvants)**

Pendant la préparation des suspensions pharmaceutiques physiquement stables, un certain nombre de composants de formulation sont utilisés pour aider à maintenir les particules dans un état de suspension (agents de suspension), tandis que d'autres composants sont simplement une partie du véhicule liquide lui même.

Le temps et la température d'addition de certains adjuvants dépendent des propriétés physicochimiques de ces derniers. Les matières sensibles à la température comme les parfums sont ajoutées à des températures relativement basses et vers la fin du procédé de fabrication. Selon la manière de l'administration et le comportement physico-chimique exigé de la suspension, la composition finale de la formulation peut différer d'un cas à l'autre, mais d'une manière générale, les composants habituels d'une suspension pharmaceutique incluent, en plus du dissolvant aqueux et du médicament insoluble, un ou plusieurs des additifs suivants

- Agents mouillants.
- Composés permettant la commande de la stabilité et de la sédimentation.
- Additifs régulant le comportement d'écoulement.
- Régulateurs de pH.

D'autres additifs (principalement protecteurs, mais également ceux pour assurer le goût, la couleur, le parfum... etc.).

### **5.2 .4 Désaération puis formation du volume final**

La charge est traitée par un appareil de désaération juste avant de compléter le volume final. Une suspension qui contient une grande quantité d'air est, du point de vue pharmaceutique inacceptable par ce que l'excès d'air va affecter les propriétés rhéologiques, le dosage du médicament, la couleur, la densité et le volume.

Cette étape est peu utilisée dans le domaine de l'industrie pharmaceutique en raison du coût élevé des équipements qu'elle requiert.

### **5.2 .5 Homogénéisation**

Enfin, la suspension est passée dans un homogénéiser afin de réduire la taille des agglomérats [4].

### 5.3 Plans d'expériences

Les plans d'expérience constituent essentiellement une stratégie de planification d'expériences afin d'obtenir des conclusions adéquates de manière efficace et économique. La méthodologie des plans d'expérience se base sur le fait qu'une expérience convenablement organisée conduira fréquemment à une analyse et à une interprétation statistique relativement simple des résultats (norme ISO 3534-3) [14].

#### 5.3.1 Méthodologie pour élaborer un plan d'expériences

Nous distinguerons 7 étapes pour arriver au résultat final :

1. Définir des objectifs et des moyens : que faire, pourquoi ? par qui, quand, comment, où ?
2. Définition plus technique des problèmes et des moyens : choisir les facteurs et les niveaux et les domaines d'amplitude, un type de modèle et choix des interactions et les variances.
3. La construction du plan.
4. La réalisation des essais.
5. Analyse des résultats et interprétation.
6. Validation des résultats.
7. Valorisation, archivage. [15]

#### 5.3.2 Plan de surface de réponse et optimisation

Les plans du second degré ou plans pour surfaces de réponse permettent d'établir des modèles mathématiques du second degré. Ils sont utilisés pour les variables continues.

Ces plans sont utiles à chaque fois que l'on se trouve près d'un maximum ou d'un minimum [16].

L'optimisation de la formulation pharmaceutique a pour objectif d'aboutir à un degré de qualité acceptable quant aux objectifs de sécurité, d'efficacité et de qualité. Pour y arriver il faudra respecter certaines contraintes imposées aux niveaux de la fabrication par les bonnes pratiques, le contrôle par le comportement in vitro et in vivo de la forme réalisée, et le prix de revient [17].

Etude pratique

## Partie Pratique

---

Dans le présent travail, la stabilité d'une suspension de Sulfamethazine a été étudiée en se basant sur des résultats d'une étude précédente [8], dans laquelle une composition optimale a été obtenue en utilisant la méthodologie des plans d'expériences. Pour notre cas d'étude, nous gardons la même formulation de base et la même méthodologie mais nous utilisons d'autres agents stabilisants afin de trouver la composition adéquate qui donne une meilleure stabilité de la suspension dans le temps.

Nous avons réalisé une étude antibactérienne in vitro, l'étude de l'activité antibactérienne de cette suspension vis-à-vis de quatre bactéries différentes a également été menée et ce afin de déterminer son efficacité.

# Matériels et Méthodes

# Matériels et Méthodes

## 1. Matériels

### 1.1. Matière chimique

Les ingrédients utilisés pour la formulation des suspensions étudiées sont décrits dans le tableau 3 ; des détails sont donnés dans l'annexe 1.

**Tableau 3.** Ingrédients utilisés pour la formulation des suspensions.

Composé	Formule	Caractéristiques	Rôle	Marque
<b>Sulfamethazine</b>	$S_{12}H_{24}N_4O_2S$	Poudre blanche, soluble dans l'acétone	principe actif	Sigma Aldrich
<b>Tween 80</b>	$C_{64}H_{124}O_{26}$	Liquide très soluble dans l'eau	Agent dispersant	Fluka
<b>Carboxyméthylcellulose sodique</b>	Polymère	Poudre très hygroscopique	Agent viscosifiant	Sigma Aldrich
<b>Sirop simple</b>	----	Densité 1.32 Viscosité 69Cp	Additif	Préparé au laboratoire

### 1.2. Matériels de laboratoire

**Tableau 4.** Matériels de laboratoire utilisés.

Verreries	Equipements	Appareils de mesure	Matériels biologique
- Becher de 250 ml en plastique - Tubes à essais - Une spatule - Pissette - Verre de montre - Flacons pour la conservation	- Balance analytique - Ultra Turax de type IKA T18. - Agitateur à hélice de type Wise stir HS-30D.	-Viscosimètre rotatif de types BROOKFIELD LV-I+ -Centrifugeuse HETTICH de type EBA20 -Zétamètre Malvern(2000)	- Boîtes de pétri - Pipettes pasteur - Bec benzène -Etuve -Pied à coulisse - Ecouvillon -Pince stérile -Vortex

### 1.3. Matières biologiques et milieu de culture

#### 1.3.1 Souche bactérienne

Nous avons utilisé des souches de référence (tableau 5) fournies par le Laboratoire de microbiologie du C.H.U NEDDIR MOHAMED de Tizi Ouzou.

## Matériels et Méthodes

**Tableau 5.** Souches bactériennes utilisées

Nom scientifique	Gram	Référence
Staphylococcus aureus	Gram +	ATCC25923
Bacillus	Gram +	SP
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Gram -	ATCC27853
<i>E. Coli</i>	Gram -	ATCC25922

### 1.3.2 Milieux de culture

Milieu de MUELLER-HINTON, l'eau physiologique et gélose nutritive. La composition détaillée est donnée dans l'Annexe 2.

## 2. Méthodes

Nous avons procédé à la formulation d'une dizaine de suspensions en utilisant la méthodologie des plans d'expériences, les suspensions sont caractérisées par plusieurs méthodes.

### 2.1. Méthodologie des plans d'expériences

Elle a pour but d'optimiser les niveaux des facteurs étudiés pouvant influencer la stabilité physique de la suspension à base de sulfaméthazine formulée à partir des ingrédients cités précédemment.

Avant de construire la matrice, il faut choisir le plan qui correspond aux objectifs tracés pour l'étude, puis la définition des facteurs ainsi que les réponses correspondantes.

#### 2.1.1. Choix du plan d'expériences

L'objectif étant d'optimiser les attributs du système étudié, nous avons privilégié un plan de surface du type composite centré. Ce plan permet de générer des surfaces de réponse, qui facilitent la recherche de solutions favorables ou optimales et le repérage des valeurs des facteurs étudiés qui conduisent à ces solutions. [16]

#### 2.1.2. Choix des facteurs

La stabilité des suspensions dépend de plusieurs facteurs, le facteur le plus important est la composition en agent viscosifiant et en agent stabilisant. Dans notre cas le composant principal est l'agent viscosifiant qui confère au milieu une viscosité élevée qui ralentit la

## Matériels et Méthodes

sédimentation ; l'autre composant essentiel est le tensioactif (tween 80) qui disperse les particules dans la phase dispersée et en favorisant leur mouillage.

Le Tableau 6 ci-dessous représente les facteurs étudiés et leurs niveaux exprimés à la fois en valeur codées (-1 désignant le niveau bas ,0 le niveau moyen et +1 le niveau haut) et en valeurs réelles. Les facteurs maintenus constants sont la teneur en Sulfaméthazine et celle du sirop simple.

**Tableau 6.** Facteurs étudiés et leurs niveaux respectifs en valeurs réduites et réelles

Facteurs étudiés	Niveau			Facteurs fixes	Valeurs
	-1	0	+1		
				Sulfamethazine (%)	2
CMC%	1	2.5	4	Sirop simple (%)	25
Tween 80%	0,01	0,03	0,05	Eau distillée (%)	Qsp 100

Le choix des niveaux des facteurs est basé sur des résultats publiés :

- Pour la concentration en CMC, la norme exige un maximum de 4-6%. [18]
- Pour la concentration en Tween 80, un travail antérieur utilise un pourcentage de 0.03% pour stabiliser les suspensions. [19]

### 2.1.3. Choix des réponses

Au niveau macroscopique, la suspension est stable tant qu'il n'y a pas de séparation de phases, aussi le nombre de réponses étudiées a été limitée à trois : la sédimentation forcée par centrifugation, la viscosité et le potentiel zêta.

### 2.1.4. Construction du plan composite centré

Pour notre étude le nombre de facteurs  $k$  est égal à 2 (pourcentage en CMC, et le pourcentage en Tween 80) le nombre d'essais est composé des essais du plan factoriel (NF) auquel on ajoute trois essais supplémentaires au centre (N0) pour évaluer la reproductibilité des mesures et l'erreur expérimentale et deux points axiaux (points étoiles) pour chaque facteur (Na).

Le nombre total d'essais à réaliser est donc :  $NF+NO+Na = 2^K + 3 + 2*K=11$  (1)

Le modèle mathématique décrivant les réponses est un modèle du second degré qui tient compte des effets des facteurs et de leurs interactions :

$$y = a_0 + a_1x_1 + a_2x_2 + a_3x_3 + a_{11}x_1^2 + a_{22}x_2^2 \quad (2)$$

Où Y représente la réponse des facteurs 1, 2

$a_0, a_1, a_2,$  sont les coefficients du modèle ;  $x_1, et x_2$  les niveaux des facteurs 1, et 2. [20]

### 2.2 Procédé de formulation

Nous avons suivis le protocole indiqué dans la littérature [19] auquel on a ajouté quelques modifications. Deux mélanges ont été préparés sous agitation à l'aide d'un agitateur à hélice tournant à la vitesse de 500tr/min pendant 2min.

Le premier mélange est constitué de la sulfaméthazine, le Tween80 et 5ml d'eau, alors que le deuxième mélange contient la CMC et le sirop simple de saccharose. La préparation du sirop simple est décrite dans l'annexe 3.

Ensuite, le premier mélange est ajouté au deuxième et le tout est agité pendant 10min après ajustement du volume.

Le mélange final est homogénéisé pendant 5min à une vitesse de 10000tr/min à l'aide d'un homogénéiseur IKA Ultra Turax.

### 2.3 Techniques d'évaluations de la stabilité physique des suspensions

Notre étude de la stabilité physique de la suspension formulée a été évaluée par des mesures de chacune des variables suivantes : la viscosité ; la sédimentation accélérée (centrifugation) et le potentiel zêta.

Nous avons choisis la technique de stabilisation par augmentation de la viscosité de la phase externe, pour cela nous avons suivi les variations de la viscosité des suspensions formulées en fonction du temps pendant six semaines.

#### 2.3.1 Mesures de viscosité

La viscosité est la résistance d'un liquide contre un mouvement irréversible forcé des éléments de volume, c'est donc une mesure de friction. [12]

La mesure de la viscosité a été réalisée au laboratoire de département de génie chimique de l'Ecole Nationale Polytechniques d'Alger à l'aide d'un viscosimètre rotatif de marque Brookfield, modèle DV-I+, ce modèle utilise quatre mobiles de tailles différentes, chaque mobile étant destiné à mesurer la viscosité dans un intervalle déterminé. Pour nos

suspensions le mobile S64 a été utilisé. L'écran du viscosimètre affiche des valeurs de viscosité exprimées en centipoises (cP).

### ***2.3.2 Mesure de sédimentation accélérée (tests de résistance à la centrifugation)***

Les essais ont été réalisés au laboratoire de pharmacie galénique de la faculté de pharmacie de l'UMMTO. Les tests de résistance à la centrifugation ont été réalisés en variant la vitesse de centrifugation de 2000tr/min, 3000 tr/min ; 4000 tr/min et 5000 tr/min pour évaluer le temps de résistance à la sédimentation des suspensions.

### ***2.3.3 Mesure de Potentiel zêta***

Les phénomènes électrocinétique sont d'une grande importance pour la caractérisation de l'état d'une dispersion solide. [12]

Les mesures de potentiel zêta ont été effectuées à l'unité de recherche matériaux, procédés et environnement de l'université de Boumerdès.

Le zêta mètre est composé d'une unité de mesure, dans laquelle on injecte l'échantillon, et une cellule où on applique un champ électrique pour déplacer les charges électriques contenues dans l'échantillon.

Cette unité pilotée par un micro-ordinateur utilise le logiciel « zétasizer Advanced ». L'appareil effectue l'analyse automatique trois fois.

## **2.4 Evaluation qualitative de l'activité antibactérienne de la suspension**

Les manipulations ont été réalisées au Laboratoire de microbiologie du Dr ZERAR dans des conditions strictes d'asepsie sous une hotte.

### **2.4.1 Réalisation de l'antibiogramme**

Cette technique est utilisée en bactériologie médicale, appelée Technique d'étude sur milieu solide ou encore méthode des disques. [21] C'est une méthode de mesure in vitro de l'effet antibactérien de substances actives (principes actifs) qui consiste à déterminer le spectre d'activité de ces composés sur des espèces bactériennes pour essayer de vérifier la sensibilité ou la résistance des germes pathogènes vis-à-vis de ces principes [22].

Avant de réaliser l'antibiogramme nous avons testé l'efficacité d'une série d'antibiotiques afin de choisir celui à utiliser comme témoin positif, il s'agit de Cefoxithin CX30, Oxacilin P10, Peniciline P10, Clarithromicin CLR15, Cloramphenicol C30, Rifampicin RIF5 et Levofloxacin LE5.

## Matériels et Méthodes

---

La réalisation de l'antibiogramme s'effectue en plusieurs étapes :

### **2.4.1.1 Préparation des disques**

Des disques de 6 mm de diamètre sont préparés à partir de papier Whatman dans un appareil approprié, puis sont stérilisés dans l'autoclave pendant 20 minutes à 120°C, ils sont ensuite stockés à une température ambiante. [23]

### **2.4.1.2 Repiquages des cultures jeunes (pré-culture bactérienne)**

La revivification des souches a pour objectif l'obtention d'une culture jeune et pure. Elle consiste à ensemencer en stries quelques colonies de souches conservées à la surface de la gélose préalablement coulée et solidifiée dans des boîtes de pétri. [23]

### **2.4.1.3. Préparation des suspensions bactériennes**

A partir des cultures bactériennes jeunes, quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques sont inoculées dans 5 ml d'eau physiologique stérile à 0.9 % de sel (NaCl). La suspension bactérienne ainsi préparée, est bien homogénéisée à l'aide d'un homogénéiseur VORTEX et laissée sur la paillasse pendant 30 minutes. [23]

### **2.4.1.4 Ensemencement**

Cette étape consiste à liquéfier d'abord le milieu gélosé (Agar de Müller-Hinton [23]) dans un bain marie à 95°C et à le laisser refroidir. Ensuite, repartir la gélose MH dans des boîtes de pétri stériles, les refermer et les conserver à température ambiante avant leur emploi.

Après refroidissement et solidification du milieu de culture, les suspensions bactériennes à tester sont étalées à l'aide d'un écouvillon stérile dans chaque boîte de telle sorte à assurer une distribution homogène des bactéries sur le milieu, puis laissées reposer pendant 30 minutes. Dans des conditions aseptiques et à l'aide d'une pince stérile un disque de chaque lot est placé dans des boîtes de pétri. Pour le témoin positif nous avons mis des disques imbibés d'antibiotique et pour le témoin négatif nous avons mis un disque imbibés d'eau distillée stérile, ainsi que les disques imbibés par la suspension de sulfaméthazine. Les boîtes sont ensuite incubées immédiatement pendant une durée de (18 – 24) heures à 37°C. [23]

### **2.4.1.5 Lecture**

La lecture se fait en mesurant le diamètre des zones d'inhibition autour du disque à l'aide d'un pied à coulisse. Les bactéries croissent sur toute la surface de la gélose sauf là où

## Matériels et Méthodes

---

elles rencontrent une concentration d'antibiotique suffisante pour inhiber leur croissance. On observe ainsi autour des disques une zone circulaire indemne de colonie, appelée zone d'inhibition. Plus le diamètre de cette zone est grand, plus la souche est sensible à l'antibiotique. Plus il est petit, plus la bactérie est résistante.

L'interprétation des résultats se fait selon l'échelle d'estimation de l'activité antimicrobienne.

- Les diamètres des zones d'inhibition de la croissance microbienne sont divisés en quatre classes.

- Non inhibitrice : diamètre de la zone d'inhibition < 10 mm;

- Légèrement inhibitrice : 10 mm < diamètre de la zone d'inhibition < 16 mm;

- Modérément inhibitrice : 16 mm < diamètre de la zone d'inhibition < 28 mm;

- Fortement inhibitrice : diamètre de la zone d'inhibition > 28 mm.

- Le pourcentage d'inhibition est calculé par la loi suivante

$$\% \text{ Inhibition} = D (\text{test}) / D \text{ boites de pétri} \times 100 \quad (3)$$

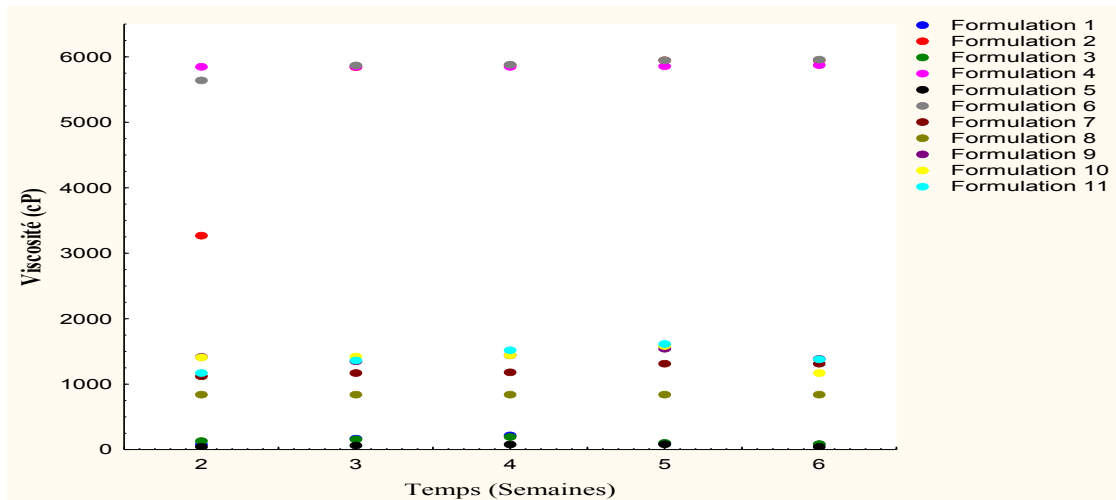
D (test) : Diamètre de la zone d'inhibition.

D (boites de pétri): Diamètre de la boite de pétri. [21]

# Résultats et Interprétations

# Résultats et Interprétations

## 1. Evolution de la viscosité dans le temps



**Figure 6 :** Variations de la viscosité au cours du temps.

Nous remarquons deux groupes de formulations, un groupe qui présente des valeurs élevées de la viscosité (de l'ordre de 6000cP) : formules 2, 4, et 6, et un deuxième groupe des formules présentant des faibles valeurs de viscosité.

Nous remarquons aussi que les valeurs de la viscosité des onze formules n'ont pas évolué de manière significative au cours du temps, ce qui nous indique qu'il n'y a pas eu de dégradation des produits.

## 2. Etude statistique des résultats et interprétations

Le tableau 7 donne la matrice d'expériences ainsi que les résultats des mesures effectuées au bout d'une semaine suivant la formulation.

## Résultats et Interprétations

Tableau 7. Plan d'expériences et réponses enregistrées.

No	Sulfamethazine	sirop	CMC	Tween	Potentiel Zêta (Mv)	Viscosité (cp)	Resistance à la centrifugation (mn)
1	0,02	0,25	0,01	0,01	6,567	78	2
2	0,02	0,25	0,04	0,01	28,6	3270	22
3	0,02	0,25	0,01	0,05	3,878	126	2
4	0,02	0,25	0,04	0,05	8,72	5850	22
5	0,02	0,25	0,00379	0,03	8,825	42	0
6	0,02	0,25	0,04621	0,03	2,308	5634	22
7	0,02	0,25	0,025	0,00172	1,294	1116	12
8	0,02	0,25	0,025	0,05828	11,603	834	7
9	0,02	0,25	0,025	0,03	12,075	1410	7
10	0,02	0,25	0,025	0,03	5,672	1410	7
11	0,02	0,25	0,025	0,03	25,5	1170	12

### 2.1 Validation du modèle

Il faut d'abord vérifier l'adéquation du modèle mathématique, puis l'analyse des coefficients du modèle qui nous permettra de déterminer les facteurs significatifs ainsi que les interactions pour pouvoir écrire l'équation du modèle. Enfin on passe à l'analyse de la variance pour valider le modèle. Et ceci pour les trois réponses étudiées.

#### 2.1.1. Adéquation du modèle

La qualité du modèle polynomial adapté est appréciée par le coefficient de détermination multiple ( $R^2$ ). Pour avoir un bon ajustement,  $R^2$  doit être supérieur à 0,8

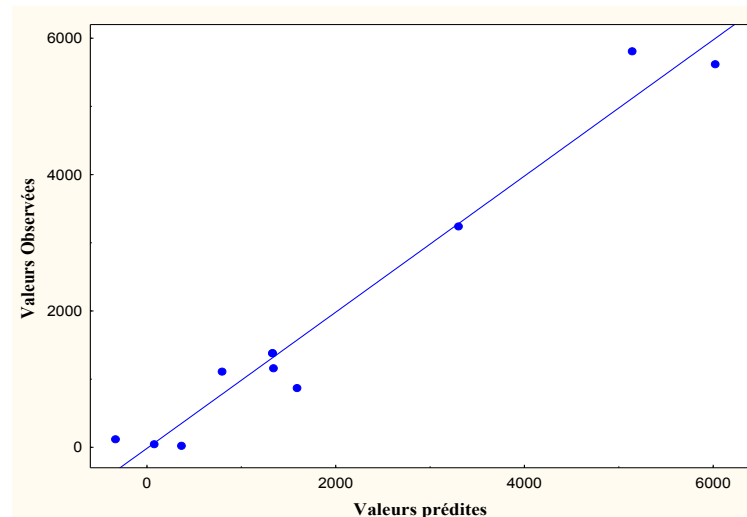
[20]

##### 2.1.1.1 Viscosité

Les valeurs élevées de ces coefficients ( $R^2 = 0,959$ ,  $R^2_{aj\ddot{u}} = 0,931$ ) indique une très bonne qualité descriptive du modèle ce qui est bien illustré par la figure 7 ci-dessous.

On remarque que tous les points se rapprochent de la diagonale, donc les valeurs expérimentales sont proches des valeurs théoriques.

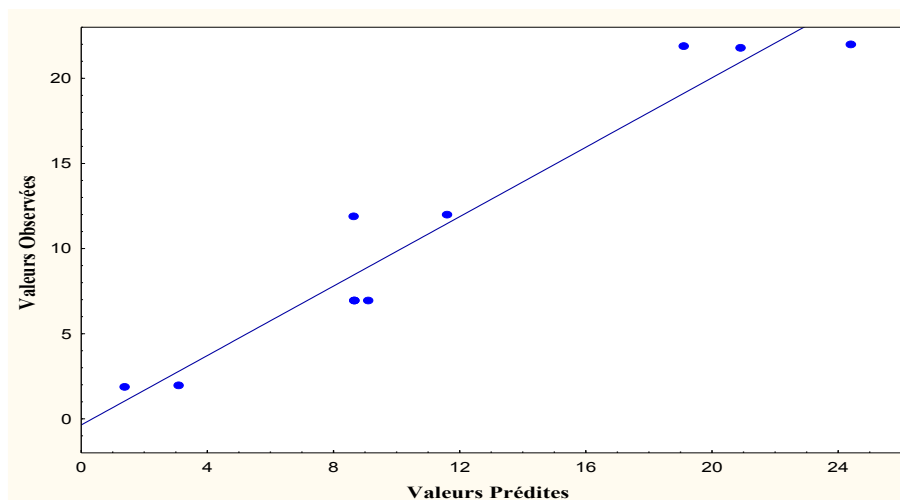
## Résultats et Interprétations



**Figure 7:** Représentation graphique des valeurs observées en fonction de valeurs estimées de la viscosité.

### 2.1.1.2 *Resistance à la centrifugation*

Pour la sédimentation forcée par centrifugation on remarque que les valeurs sont acceptables avec des valeurs de 0,929 et 0,911 pour  $R^2$  et  $R^2_{ajust}$  respectivement, donc les valeurs expérimentales sont proches des valeurs théoriques (Figure 8).



**Figure 8 :** représentation graphique des valeurs observées en fonction des valeurs estimées pour la résistance à la centrifugation.

### 2.1.1.3 *Potentiels zêta*

En ce qui concerne le potentiel zêta, les valeurs sont non valides avec 0.212 et 0.576 pour  $R^2$  et  $R^2_{ajusté}$  respectivement, donc la réponse est éliminée.

## Résultats et Interprétations

### 2.1.2 Facteurs significatifs

L'effet d'un facteur est défini par la variation d'une réponse lorsque ce facteur passe du niveau inférieur (-1) à son niveau supérieur (1) les autres étant fixés à leurs niveaux moyens (0). Le coefficient est significatif lorsque l'intervalle de confiance (matérialisé par la barre verticale) ne coupe pas l'axe horizontal (zéro). [24]

#### 2.1.2.1 Viscosité

Au seuil de signification de 5%, les facteurs significatifs pour la viscosité sont la concentration en CMC dans ses deux termes linéaire et quadratique. La figure 9 représente l'histogramme de l'influence des facteurs sur la viscosité.

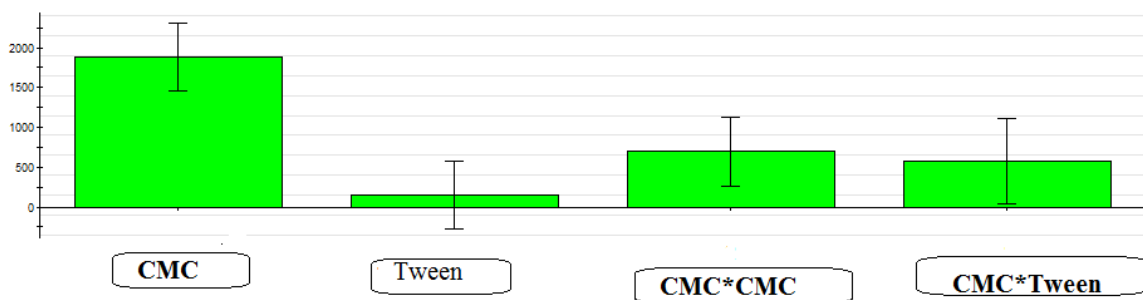


Figure 9 : histogramme de l'influence des coefficients sur la viscosité

#### 2.1.2.2 Résistance à la centrifugation

Au seuil de signification de 5%, le seul facteur significatif pour la résistance à la sédimentation accélérée est la concentration en CMC (terme linéaire, figure 10)

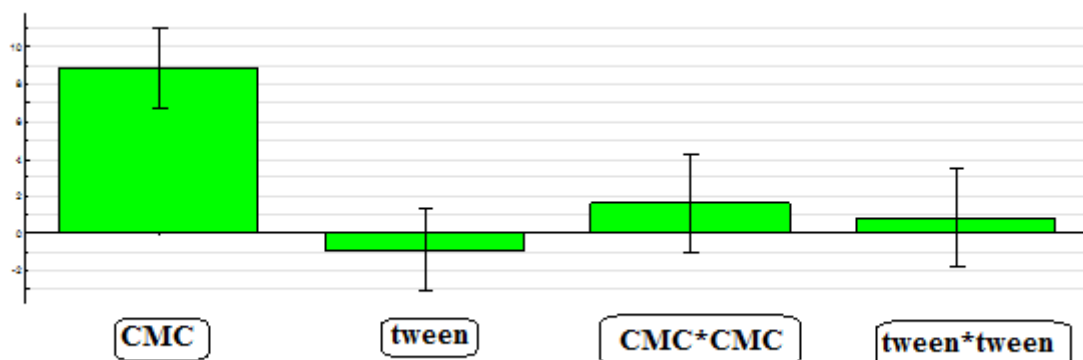


Figure 10 : histogramme de l'influence des coefficients sur la résistance à la centrifugation.

## Résultats et Interprétations

### 2.1.3 Analyse de la variance

L'analyse de la variance s'effectue sur les modèles après exclusion des facteurs non significatifs. Les modèles avec des valeurs de p-value (la probabilité que le coefficient du modèle soit nul ou, autrement dit sans importance ou peu significatif) proches de zéro sont statistiquement significatifs et considérés comme appropriés pour décrire la réponse étudiée correspondante.

La valeur F de Fisher est le rapport du carré moyen du modèle à celui des résidus. Cette valeur permet de calculer la probabilité que ces deux carrés ne soient pas égaux. Si le F de Fisher expérimental ( $F_{\text{obs}}$ ) est supérieur à F de Fisher donné par les tables ( $F_{\text{crit}}$ ) dans l'annexe 5, les variations des réponses mesurées sont bien dues aux variations des facteurs, et le modèle est jugé valide. [20]

#### 2.1.3.1 Viscosité

D'après le tableau de l'analyse de la variance (ANOVA), la valeurs de p-value est égale à 0,00 et  $F_{\text{obs}}$  est supérieur à  $F_{\text{crit}}$ .

$F_{\text{crit}} = F(\text{régression}/\text{résiduelle}) = F(4, 6, 0.05) = 6.163$ . Au seuil de signification de  $\alpha = 0.05$ ,  $R^2 = 0.959$  et  $R^2_{\text{ajust}} = 0.931$ .

**Tableau 8.** Analyse de la variance pour la viscosité.

	Somme des carrés	DDL	Carré moy	Fobs	Fcrit	P- value
Régression	42287200	4	10571800	34,8936	6,163	0,000
Résidus	1817840	6	302973			
Total	44105040	10	10874773			

Comme  $F_{\text{obs}} > F_{\text{crit}}$ , le modèle est valide.

#### 2.1.3.2 Resistance à la centrifugation

Le modèle est aussi valide pour la centrifugation d'après le tableau ANOVA.

$R^2 = 0,929$  et  $R^2_{\text{ajusté}} = 0,911$

## Résultats et Interprétations

**Tableau 9.** Analyse de la variance pour la centrifugation.

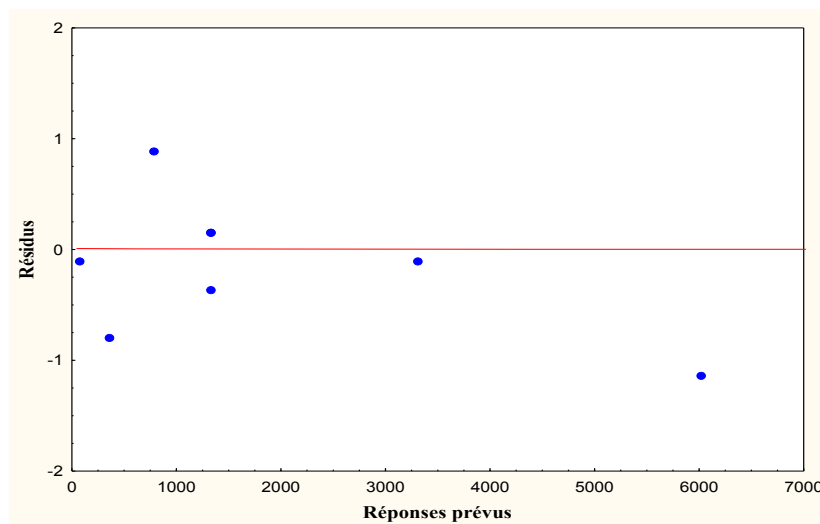
	Somme des carrés	DDL	Carré moy	Fobs	Fcrit	P- value
Régression	643,458	2	321,729	52,2404	19,37	0,000
Résidus	49,269	8	6,15863			
Total	692,727	10	327,88763			

### 2.1.4 Etude des résidus

Pour compléter l'analyse statistique du modèle, il faut s'assurer que les résidus ne soient pas anormalement importants. Si le nuage de point est approximativement aligné le long d'une droite, on conclut que les résidus sont normalement distribués. Seules des causes aléatoires sont alors à l'origine de la dispersion des résidus autour de la moyenne. [20]

#### 2.1.4.1 Viscosité

La figure 11 représente l'évolution des résidus pour la viscosité en fonction des réponses prévues. Celles-ci montrent bien que ces derniers sont normalement distribués et que leur dispersion est due à des causes aléatoires.

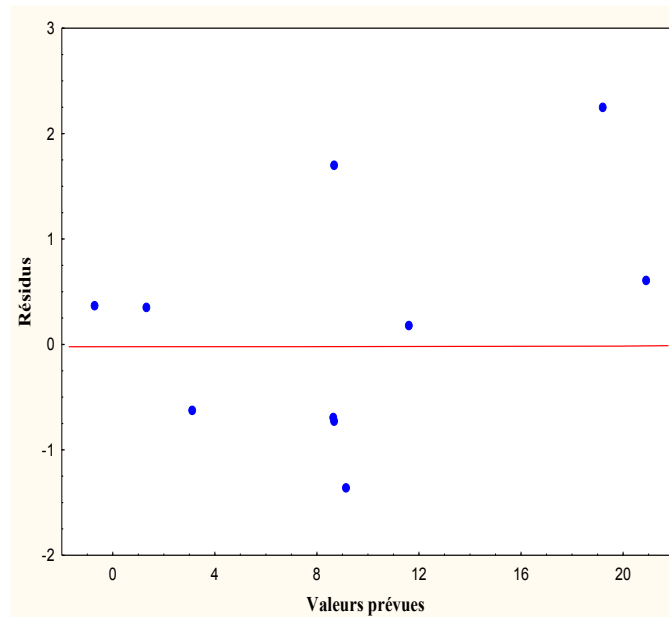


**Figure 11:** Evolution des résidus en fonction des valeurs prévues pour la viscosité

#### 2.1.4.2 Résistance à la centrifugation

La figure 12 montre l'évolution des résidus en fonction des réponses prévues pour la centrifugation qui sont également distribués d'une façon aléatoire.

## Résultats et Interprétations



**Figure 12 :** Evolution des résidus en fonction des valeurs prévues pour la centrifugation

D'après ces résultats, on peut conclure que notre modèle est statistiquement validé. De ce fait on peut procéder à l'étape de modélisation des réponses et aussi à l'optimisation de la formule.

### 2.2 Modélisation des réponses à l'aide du logiciel Modde 06

Les coefficients déterminants la validité du modèle sont calculés, il s'agit du coefficient de corrélation  $R^2$  et le coefficient de détermination  $Q^2$ .

$R^2$  mesure l'ajustement de la réponse ; plus il est grand meilleur est le modèle. Alors que  $Q^2$  traduit la capacité du modèle à traduire la réponse ; plus il est élevé plus le modèle peut prédire la réponse, la valeur de  $Q^2$  doit être supérieur à 0.5. [24]

Le tableau 10 regroupe les valeurs du coefficient de corrélation  $R^2$  et le coefficient de détermination  $Q^2$  pour les deux des réponses étudiées.

**Tableau 10.** Valeurs de  $R^2$ ,  $Q^2$  de la viscosité et le temps de résistance à la centrifugation.

Valeurs	$R^2$	$Q^2$
Viscosité (Cp)	0.961	0.817
Temps de résistance a la centrifugation (mn)	0.938	0.829

## Résultats et Interprétations

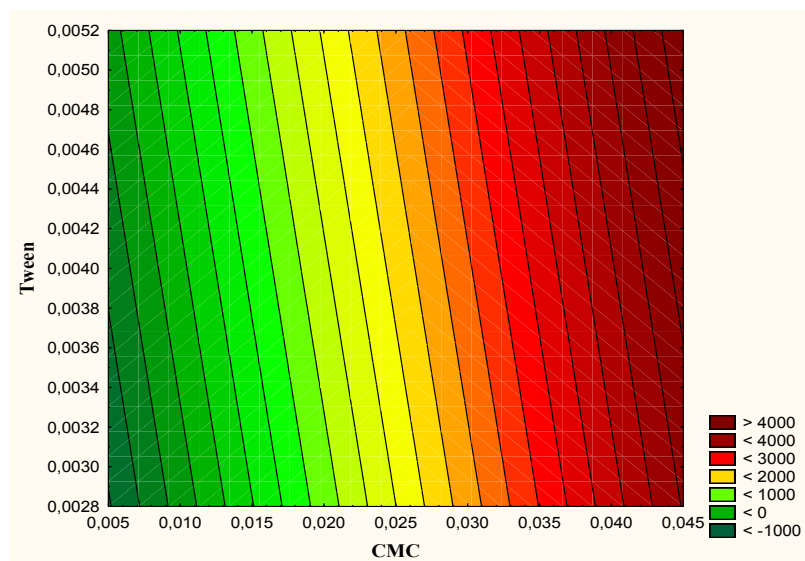
Les valeurs de  $R^2$  et  $Q^2$  sont acceptables pour les deux réponses : viscosité et résistance à la centrifugation.

### 2.2.1 Modélisation de la viscosité

Les variables apparaissant dans les équations des modèles donnés plus bas sont exprimés en valeurs codées.

Au seuil de signification de 5%, la viscosité peut être décrite par le modèle ci-dessous équation (4), où n'apparaissent que les termes significatifs :

$$\text{Viscosité (cp)} = 1271,43 + 1879,58 \cdot \text{CMC} + 698,42 \cdot \text{CMC}^2 + 572,79 \cdot \text{CMC} \cdot \text{tween}. \quad (4)$$



**Figure 13** : courbe iso-réponse de la viscosité en fonction de pourcentage en CMC et la concentration en tween.

D'après la surface de réponse de la viscosité en fonction de pourcentage en CMC et en tween, on remarque que les meilleurs résultats (valeurs élevées de viscosité associées à une bonne stabilité) sont obtenus avec les niveaux élevés en CMC et en tween.

La CMC est un très bon agent viscosifiant, elle donne de meilleures compatibilités avec les sulfamides. [25]

Le tween comme TA favorise la stabilité des suspensions en diminuant la tension interfaciale et donc freiner l'agglomération des particules [26].

# Résultats et Interprétations

## 2.2.2 Modélisation de la résistance à la centrifugation

La résistance à la centrifugation est décrite dans l'équation (5), il ne dépend que de la teneur en CMC en terme linéaire.

$$\text{Résistance à la centrifugation (mn)} = 9,47 + 7,95 * \text{CMC. (5)}$$

Les résultats montrent que les suspensions contenant une concentration de 4% d'agent viscosifiant CMC ont résisté au test de centrifugation pendant plus de 20 min, tandis que les échantillons formulés avec une plus faible concentration de 1% ou 2,5% se sont déstabilisés. C'est un résultat attendu et prévisible puisque la stabilisation est essentiellement obtenue par l'addition de l'agent viscosifiant.

## 2.3 Phase d'optimisation

Pour déterminer la formule optimale pour notre suspension à base de sulfaméthazine, nous avons utilisé le module « *optimizer* » du logiciel Modde 6.

Les propriétés souhaitées pour la formule sont données dans le Tableau 11 :

**Tableau 11.** Propriétés désirées pour la formule.

Réponse	Critère	Min	Valeur cible (target)
Viscosité	Maximum	5657,08	6305,67
Centrifugation	Maximum	23,5677	26,0838
Potentiel zêta	Exclue		

Le modèle procure un ensemble de solutions possibles, l'écart global avec la réponse ciblée (Target) est mesuré avec le paramètre (Log D).

Le tableau 12 donne les solutions possibles renvoyées par le logiciel.

## Résultats et Interprétations

**Tableau 12.** Solutions renvoyées par l'optimiseur du logiciel Modde 6.

	CMC	Tween	Viscosité (Cp)	Resistance à la centrifugation (mn)
1	0,04	0,0049	5040,34	18,8939
2	0,04	0,0032	4381,59	20,0835
3	0,04	0,0048	5003,21	18,9952
4	0,04	0,005	5091,99	18,7467
5	0,04	0,0046	4929,72	19,1814
6	0,04	0,005	5091,99	18,7467
7	0,04	0,0044	4845,37	19,3741
8	0,04	0,0044	4845,37	19,3741

Les solutions renvoyées indiquent toutes des niveaux élevés en CMC et des niveaux variables de Tween80.

Parmi ces solutions nous avons choisi la solution 2 composée de 4% de CMC, et 0.32% de Tween comme formule optimale pour la suspension de sulfaméthazine à 2%. Cette solution a été choisie puisque elle donne la meilleure résistance à la centrifugation.

La caractérisation de la formule optimale a donné les résultats suivants (Tableau 13)

**Tableau13.** Valeurs de viscosité et de la résistance à la centrifugation de la formule optimale.

<b>Temps de résistance à la centrifugation (mn)</b>	12 à 2000tr /min.
<b>Viscosité (Cp)</b>	1728

Ces résultats montrent une diminution de la viscosité et du temps de résistance à la centrifugation par rapport aux valeurs prédites, choses qui peuvent être expliquées par les conditions opératoires de la formulation de la suspension optimale, plus précisément l'augmentation de la température ambiante qui a une influence considérable sur la préparation et la stabilité à long terme. [4]

### 3. Résultats et interprétation de l'étude antibactérienne

#### 3.1. Choix de l'antibiotique utilisé comme témoin

Les résultats sont donnés dans le tableau suivant.

## Résultats et Interprétations

**Tableau 14.** Antibiogrammes utilisés pour la sélection d'un témoin

Gènes	Antibiotique							
	Cefoxithin CX30	Oxacilin OX5	Peniciline P10	Clarithromicin CLR 15	Cloramphenicol C30	Rifampicin RIF 5	Levofloxacin LE 5	
<b>Staphylococcus aureus</b>	S	S	S	S	S	S	S	S
<b>Bacillus</b>	R	R	R	S	S	S	S	S
<b>Pseudomonas aeruginosa</b>	R	R	R	R	R	R	R	S
<b>E. Coli</b>	S	R	R	R	S	R	R	S

S : Sensible, R : Résistante

L'antibiotique (LEVOFLOXACINE) a été choisi comme témoin positif car les quatre espèces bactériennes ont montré une sensibilité accrue envers ce dernier.

### 3.2. Résultats de la lecture

La méthode de diffusion des disques nous a permis de mettre en évidence le pouvoir antibactérien d'une suspension à base de la sulfaméthazine. Les zones d'inhibition sont indiquées dans le Tableau 15.

**Tableau 15.** Diamètres et pourcentage d'inhibition de la suspension à 2% de sulfaméthazine.

	Suspension de sulfaméthazine		Antibiotique (témoin +)	
	D (mm)	% d'inhibition	D (mm)	% d'inhibition
<b>Staphylococcus aureus</b>	23	27,05%	33	38,82%
<b>Bacillus</b>	0,00	0,00%	33	38,82%
<b>E .coli</b>	18	21,17%	38	44,70%
<b>Pseudomonas aeruginosa</b>	0,00	0,00%	28	32,94

## Résultats et Interprétations

---

La suspension à 2% de sulfaméthazine à une activité modérément inhibitrice sur les souches bactériennes staphylococcus aureus et Escherichia coli ( $16\text{mm} \leq D \leq 20\text{mm}$ ) avec un pourcentage de 27,05% et 21,17%, et, dans une moindre mesure, envers les autres souches Bacillus et Pseudomonas aeruginosa ( $D < 10\text{mm}$ ). Les résultats sont illustrés par les photos des boîtes de pétris données en annexe 5.

Les sulfamides sont très souvent prescrits dans les infections à : S. aureus, H. influenza, N. meningitidis et gonorrhoeae, L. monocytogenes, E. coli et Klebsilla, Pneumocystis carinii et isospora belli. [27] la sulfaméthazine est incorporé à des concentrations jusqu'à 10% [10] sous forme de suspension, alors que le résultat de notre étude a prouvé un effet remarquable à 2% seulement de sulfaméthazine.

Notons que de nos jours, la sulfaméthazine est un antibiotique sulfonamide utilisé uniquement dans l'industrie du bétail.

# Conclusion générale

## Conclusion générale

---

Dans notre travail, nous avons formulé une suspension de sulfaméthazine (2%) en utilisant la technique d'augmentation de la viscosité de la phase continue, en utilisant la CMC comme agent viscosifiant et le Tween 80 comme tensioactif avec un sirop simple comme adjuvant.

Nous nous sommes intéressées à l'étude de la stabilité physique de suspension formulée en réalisant une étude de la variation de la viscosité dans le temps pour une période d'un mois et demi.

Une étude statistique a été réalisée à l'aide de logiciel Modde dans le but de l'optimisation de la formule, et une étude pharmacologique de la formule optimale a été entreprise.

L'objectif est de rechercher des corrélations entre la composition et les différentes propriétés physico-chimiques de la suspension et de trouver les domaines de concentrations les plus favorables.

Les résultats ont permis de tirer les conclusions suivantes :

- La viscosité de la suspension est fortement dépendante de la teneur en agent viscosifiant.
- Les tests de centrifugation ont montré que les trois suspensions contenant des fortes concentrations en CMC sont les plus résistantes à la sédimentation.

Une concentration de 2% en sulfaméthazine sous forme d'une suspension donne un effet antibactérien remarquable sur les deux espèces *E. coli* et *Staphylococcus aureus*, alors que les espèces *Bacillus*, et *Pseudomonas aeruginosa* montrent une forte résistance à cette concentration.

# Bibliographie

## Références Bibliographique

---

- [1] **C. Goalard**, Etude physico-chimique du procédé de dispersion des poudres libres et agglomérées en milieu liquide, thèse de doctorat, Ecole doctorale science des procédés, génie des procédés, université de Toulouse Décembre 2005, p 09.
- [2] **J-M Fonteneau, Mathieu, M. J. and J. M. Fonteneau**. Le manuel porphyre du préparateur en pharmacie, Ed. Porphyre .7<sup>ème</sup> éd, 2008.
- [3] **M. CHABNI**, Etude de la stabilité physique des systèmes dispersés. Thèse de Doctorat en Génie chimique. Université Mouloud Mammeri tizi ouzou, Faculté des sciences, 2012 ,284 p.
- [4] **Hridaya N. Bhargava et al**. Topical Suspensions in Pharmaceutical dosage forms, Disperse Systems, vol 1, 2 éd. By Herbert A. Lieberman, Martin N. Rieger and Gilbert S. Banker, Marcel Dekker 1996.
- [5] **B. Cabane**, Formulation des Dispersions, Techniques de l'Ingénieur, Génie de la formulation, J2 185-1, 2003.
- [6]**J.M. Aiache, E Beyssac, J.M Cadot, V. Hoffart, R. Renoux**. Initiation a la connaissance du médicament, MASSON, 5<sup>ème</sup> éd, 1997, P413.
- [7] **E. Kissa**, Dispersion characterization, testing and measurement, Surfactant Science Series Vol 84, CRC Press , 1999.
- [8]. **S. OULEFKI et D.SI LEKHEL**, Etude de la stabilité physique d'une suspension aqueuse de la sulfamethazine. Mémoire de master. Université Mouloud Mammeri tizi ouzou, Faculté des sciences, 2012, 102p.
- [9] ICH, Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1). Harmonised Tripartite, 2005.
- [10] **Médicaments génériques, principaux enjeux** , Actes du séminaire international sur les procédures scientifiques et techniques pour le développement des médicaments génériques. Alger le 18, 19, 20 mai 2000, Groupe SAIDAL, CRD, P1et 2.
- [11] **L.A. TRISSEL**, Handbook on injectable drugs, 13<sup>ème</sup> éd. American Society of Health-System Pharmacists. 2005, 1645 p

## Références Bibliographique

---

- [12] **D, BOHUSLAV. Qiu et al.** Solid-liquid dispersions, Marcel DEKKER, volume 81, 1999 ; 509p.
- [13] **M.TOURBIN.** Caracterisation et comportement des suspensions concentrées de nanoparticules sous écoulement thèse de doctorat, Génie des Procédés et de l'Environnement. École doctorale de Toulouse : Transferts, Dynamique des Fluides, Énergétique et Procédés, 2006, 313p.
- [14] **K . Sandrine.** Application de la méthodologie des plans d'expériences et de l'analyse de données à l'optimisation des processus de dépôt. Thèse de doctorat de l'université de limoges, 2004.
- [15] **R . LINDER,** Les plans d'expériences un outil indispensable à l'expérimentateur collection du laboratoire central des ponts et chaussées, Presses de l'Ecole Nationale des Ponts et Chaussées, 2005, 15p.
- [16] **J. Goupy, L. Creighton.** Introduction aux plans d'expériences, Dunod, 3<sup>ème</sup> éd, 2006, p336
- [17] **T. Kougnassoukou.** Développement pharmaceutique d'un comprimé pellicule gastro-résistant en remplacement d'une forme générique dragéifiée. Thèse du doctorat en Pharmacie, université Mohammed faculté de médecine et de pharmacie –Rabat année, 2012,103 p.
- [18] **A. wade and P- j Weller,** Handbook of pharmaceutical excipients, second Ed, 1994.
- [19] **Moes,** Préparation de suspension stable de sulfamide et de pi nitrate de chloramphénicol. Étude théorique et pratique : pharm. Acta helv.1568.43, n5, p290
- [20] **S. Touzouirt, C. Limani, F. Oukaci, T. Ahmed Zaïd, M. Nabiev.** Optimisation de la stabilité d'une émulsion de Pickering H/E à l'aide de la méthodologie des surfaces de réponses, the Canadian journal of chemical engineering, 95, 1, 77–82. 2016.
- [21] **Smith, M.D. and Nvilliat, P.L** A new protocol for Antimicrobial Testing of Oils, Journal of Microbiological Methodes, 28, 21-24 (1997).
- [22]**S. Benkherara, O. Bordjiba, A. Boutlelis Djahra,** Etude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de la Saugé officinale : *Salvia officinalis* L. sur quelques entérobactéries pathogènes ,Revue synthèse n° 23 octobre 2011, 74-75P.

## Références Bibliographique

---

[23]. A.H. Fairlamb, G.B. Henderson, A. Cerami; Trypanothione is the primary target for arsenical drugs against African trypanosome , Proc. Natl. Acad. Sci ,1989, 2607–2611p.

[24] Umetrics AB, MODDE Pro, Version 6, MKS Data Analytics Solutions, Umeå 2001

[25] A. Lesschafft, study of the compatibility of various suspensions agents . Drug standard, 1954, 22,155p.

[26] F. González-Caballero et J. D. G. López-Durán, Pharmaceutical Emulsions and Suspensions, Second Edition, Françoise Nielloud and Gilberte Marti-Mestres, CRC Press 2000, p 127–190

[27] Catherine Gaudy, Jaques Bruxeraud. Antibiotiques : pharmacologie et thérapeutique. Collection pharma. ELSEVIER, p211, 212

# Annexes

## ANNEXES 01

### ➤ sulfaméthazine

**1. Formule moléculaire brute :** C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>S

**2. Nomenclature:** 4-Amino-*N*-(4,6-dimethyl-2-pyrimidinyl)benzenesulfonamide  
Selon l'IUPAC: *N*1-(4,6-dimethyl-2-pyrimidinyl)sulfanilamide

**3. Principaux synonymes:** 2-(4-Aminobenzenesulfonamido)-4,6-diméthylpyrimidine; 2-(paraaminobenzenesulfonamido)-4,6-diméthylpyrimidine; 4-amino-*N*-(2,6-diméthyl-4-pyrimidinyl)benzenesulfonamide; 4,6-diméthyl-2-sulfanilamidopyrimidine; sulfadiméthylpyridine; 2-sulfanilamido-4,6-diméthylpyrimidine; sulfadimidine; sulfamidine; sulphadiméthylpyrimidine; sulphadimidine.

### 4. Apparence

Solide sous forme de cristaux, blanc, poudre.

### 5. Propriétés physiques

**État physique :** Solide

**Masse moléculaire :** 278,33g/mole.

**Point de fusion :** 197 à 200°C

### 6. Stabilité

Ce produit est instable dans les conditions suivantes: Lorsque chauffé jusqu'à sa décomposition, il émet des gaz toxiques d'oxydes de soufre et d'oxydes d'azote.

Incompatibilité : Ce produit est incompatible avec ces substances: Les agents oxydants forts, les acides forts, les bases fortes.

### 7. Utilisations

Utilisé pour traiter une variété de maladies bactériennes chez l'homme et l'animal, utilisée depuis 1950.

### 8. Conservation

- ✓ Conserver à l'abri des matières oxydantes, des acides et des bases.
- ✓ Conserver dans un récipient hermétique placé dans un endroit bien ventilé.
- ✓ Conserver dans un endroit sombre.

### 9. Effets aigus

On se réfère à la toxicité des sulfonamides: irritation: peau, yeux, voies digestives; conjonctivite, kératite, troubles visuels (myopie); lésions et éruptions cutanées, érythème; nausées, vomissements, diarrhée, fièvre, étourdissements, tintements; mictions douloureuses, hématurie; dommages rénaux et hépatiques possibles.

## ➤ Carboxyméthylcellulose

### 1. OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION

La carboxyméthylcellulose à usage œnologique est préparée uniquement à partir de bois par traitement avec de la soude et de l'acide monochloroacétique ou son sel de sodium.

La carboxyméthylcellulose inhibe la précipitation tartrique par effet "colloïde protecteur". Sa dose d'utilisation est limitée.

### 2. SYNONYMES

Carboxyméthylcellulose

CMC

CMC sodique

Gomme cellulosique.

Sel de sodium de la carboxyméthyl éther de cellulose

NaCMC

### 3. CARACTERES

#### 3.1 Description

Poudre granuleuse ou fibreuse, blanche ou légèrement jaunâtre ou grisâtre, légèrement hygroscopique, inodore et insipide.

#### 3.2 Formule chimique

Les polymères contiennent des unités d'anhydroglucoses substitués avec la formule générale suivante :



n est le degré de polymérisation

x = de 1,50 à 2,80

y = de 0,2 à 1,50

x + y = 3,0

(y = degré de substitution)

Solide poudreux, granules, blanc ou crème, inodore

#### 3.3 Poids moléculaire

Compris entre 17 000 et 300 000 (degré de polymérisation allant de 80 à 1 500)

Le poids moléculaire peut être évalué par la mesure de la viscosité.

La viscosité d'une solution à 1% doit être comprise entre 10 et 15 mPa.s-1, ou entre 20 et 45 mPa.s-1 pour une solution à 2%, ou entre 200 et 500 mPa. s-1 pour une solution à 4%.

#### 4. OPTENTION

La Carboxyméthylcellulose de sodium est généralement obtenue par la réaction de cellulose pure et d'acide monochloracétique et/ou de monochloracétate de sodium en présence de soude caustique, la soude ayant pour double rôle d'une part de rendre la cellulose réactive par formation d'alcali cellulose, d'autre part de neutraliser l'acide chlorhydrique formé.

#### 5. PROPRIETES PHYSIQUES

<b>État physique</b>	Solide
<b>Densité</b>	1,59 g/ml à 20 °C
<b>Solubilité</b>	Produit une solution colloïdale visqueuse avec de l'eau, insoluble dans l'éthanol
<b>Tension de vapeur</b>	Négligeable
<b>pH</b>	7,5 solution aqueuse à 2%

#### 6. PREVENTION

##### 6.1.Stabilité

Ce produit est stable.

##### 6.2.Incompatibilité

Ce produit est incompatible avec ces substances: Les agents oxydants forts.

##### 6.3.produits de décomposition

Décomposition thermique: monoxyde de carbone, dioxyde de carbone. Selon les conditions, certains aldéhydes aliphatiques et acides carboxyliques peuvent également se former.

#### 7.CONSERVATION

Conserver à l'abri des matières Conserver dans un récipient hermétique oxydantes. placé dans un endroit frais et sec.

##### ➤ Tween 80

Le tween 80 est un surfactant et émulsifiant non anionique.

**1. Formules chimique:**  $C_{64}H_{124}O_{26}$

##### 2. Synonymes

monooléate de polyoxyéthylènesorbitan; monooléate de sorbitane éthoxylate; polysorbate 80.

### **3. caractéristiques**

**Forme:** liquide

**Couleur:** jaune

**Odeur:** inodore

**Point d'ébullition :** > 100 °C

**Température d'inflammation:** > 180 °C

**Point d'éclair:** > 149 °C

**Densité (25 °C):** 1.07 g/cm<sup>3</sup>

**Solubilité dans:**

✓ eau (20 °C) soluble

✓ éthanol (20 °C) soluble

### **4. Préservation**

Température ambiante Numéro de lot et date de péremption notés sur l'étiquette. Entreposé dans un endroit sec et frais, la subsistance à partir de la lumière forte et chaleur.

## ANNEXE 2

### Milieux de culture

#### ✓ Muller-Hinton gélosé (M-H) : (g/l)

Infusion de viande de bœuf.....	3g
Hydrolysate acide de caséine.....	17.5g
Amidon .....	01.5g
Agar.....	16g

#### ✓ Eau physiologique 9% (NaCl)

Chlorure de Sodium.....	9g
Eau ppI qsp .....	1000ml

#### ✓ Gélose nutritive (G-N) :(g /l)

Peptone.....	10g
Extrait de viande.....	3g
Extrait de levure.....	3g
Chlorure de Sodium.....	5g
Agar.....	18g

### ANNEXE 3

#### **Formulation de sirop simple utilisé comme adjuvant pour notre suspension**

Le sirop simple à base de saccharose a été préparé au moyen d'un mini réacteur à double paroi fermé en verre borosilicaté, une paroi intérieure munie d'un robinet de sortie, et une paroi extérieure pourvue de deux ouvertures latérales, permettant l'entrée et la sortie d'un fluide de refroidissement ou de réchauffement.

Après avoir branché le mini réacteur au bain thermostat, au moyen de flexible résistant à la chaleur, la température du bain a été réglée, en parallèle un sirop était préparé en diluant la quantité de saccharose, pesée au préalable, dans une fiole jaugée.

Cette préparation est versée dans le mini réacteur chauffé. La formulation du sirop commence dès le début de l'agitation et se termine après dissolution totale du saccharose. La température est réglée à 100c à une vitesse d'agitation de 100 tr/min avec une concentration de 80% en saccharose, la densité ainsi que la viscosité sont mesurées après refroidissement.

Viscosité (Cp)	69
Densité	1.32

## ANNEXE 4

Quantiles d'ordre 0.95 de la loi de Fisher

Le degré de liberté du numérateur est sur la première ligne ;

Le degré de liberté du dénominateur est sur la colonne de gauche.

**Tableau 16.** Table de Fisher-Snedecor ( $\alpha= 5\%$ )

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	161.4	199.5	215.7	224.6	230.2	234.0	236.8	238.9	240.5	241.9
2	18.51	19.00	19.16	19.25	19.30	19.33	19.35	19.37	19.38	19.40
3	10.13	9.552	9.277	9.117	9.013	8.941	8.887	8.845	8.812	8.786
4	7.709	6.944	6.591	6.388	6.256	6.163	6.094	6.041	5.999	5.964
5	6.608	5.786	5.409	5.192	5.050	4.950	4.876	4.818	4.772	4.735
6	5.987	5.143	4.757	4.534	4.387	4.284	4.207	4.147	4.099	4.060
7	5.591	4.737	4.347	4.120	3.972	3.866	3.787	3.726	3.677	3.637
8	5.318	4.459	4.066	3.838	3.687	3.581	3.500	3.438	3.388	3.347
9	5.117	4.256	3.863	3.633	3.482	3.374	3.293	3.230	3.179	3.137
10	4.965	4.103	3.708	3.478	3.326	3.217	3.135	3.072	3.020	2.978
11	4.844	3.982	3.587	3.357	3.204	3.095	3.012	2.948	2.896	2.854
12	4.747	3.885	3.490	3.259	3.106	2.996	2.913	2.849	2.796	2.753
13	4.667	3.806	3.411	3.179	3.025	2.915	2.832	2.767	2.714	2.671
14	4.600	3.739	3.344	3.112	2.958	2.848	2.764	2.699	2.646	2.602
15	4.543	3.682	3.287	3.056	2.901	2.790	2.707	2.641	2.588	2.544
16	4.494	3.634	3.239	3.007	2.852	2.741	2.657	2.591	2.538	2.494
17	4.451	3.592	3.197	2.965	2.810	2.699	2.614	2.548	2.494	2.450
18	4.414	3.555	3.160	2.928	2.773	2.661	2.577	2.510	2.456	2.412
19	4.381	3.522	3.127	2.895	2.740	2.628	2.544	2.477	2.423	2.378
20	4.351	3.493	3.098	2.866	2.711	2.599	2.514	2.447	2.393	2.348
21	4.325	3.467	3.072	2.840	2.685	2.573	2.488	2.420	2.366	2.321
22	4.301	3.443	3.049	2.817	2.661	2.549	2.464	2.397	2.342	2.297
23	4.279	3.422	3.028	2.796	2.640	2.528	2.442	2.375	2.320	2.275
24	4.260	3.403	3.009	2.776	2.621	2.508	2.423	2.355	2.300	2.255
25	4.242	3.385	2.991	2.759	2.603	2.490	2.405	2.337	2.282	2.236
26	4.225	3.369	2.975	2.743	2.587	2.474	2.388	2.321	2.265	2.220
27	4.210	3.354	2.960	2.728	2.572	2.459	2.373	2.305	2.250	2.204
28	4.196	3.340	2.947	2.714	2.558	2.445	2.359	2.291	2.236	2.190
29	4.183	3.328	2.934	2.701	2.545	2.432	2.346	2.278	2.223	2.177
30	4.171	3.316	2.922	2.690	2.534	2.421	2.334	2.266	2.211	2.165

ANNEXE 5

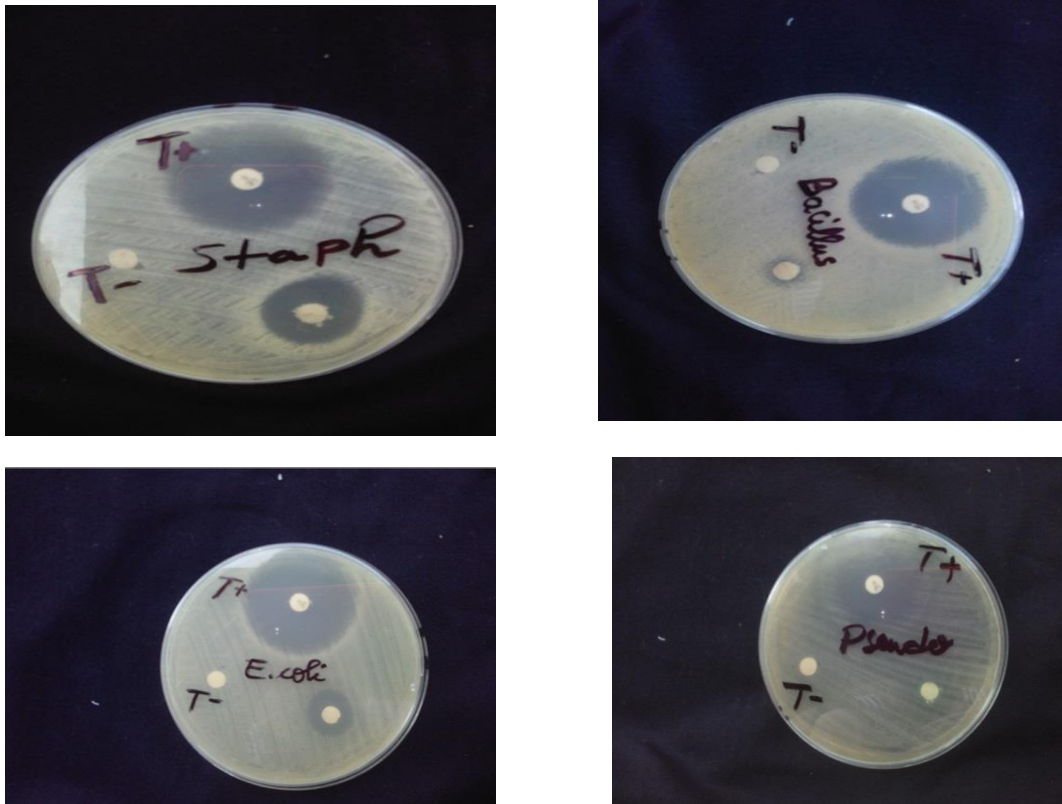


Figure 17: Résultats de l'activité antibactérienne.