

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

Ministère de l'Enseignement Supérieur
et de la Recherche Scientifique

Université Mouloud MAMMERI
FACULTE DE MEDECINE
TIZI-OUZOU



وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

جامعة مولود معمري
كلية الطب
تيزي وزو

U.M.M.T.O.

Département de pharmacie

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

N° d'ordre :.....

Présenté et soutenu publiquement

Le : 27 juin 2016

En vue de l'obtention du diplôme de Docteur en Pharmacie

Thème

**EVALUATION DE L'ACTIVITE ET DE LA
TOXICITE D'UN AINS : LE DICLOFENAC**

Réalisé par :

M^{lle} BENOURETS Meriem
M^{lle} MOKNINE Khaoula

Encadrées par :

Dr L. MOUHOUB
Dr A. CHENNOUFI

Composition du jury :

Dr N. HADHOUM	M.A en Chimie thérapeutique	UMMTO	Président de jury
Dr L. MOUHOUB	M.A en Pharmacologie	UMMTO	Promotrice
Dr A. BOUAZDI	Assistante en Pharmacologie	LNCPP	Examinatrice
Dr A. CHENNOUFI	Assistante en Pharmacologie	LNCPP	Co-promotrice
Pr CHADDER	Professeur en Pharmacologie	LNCPP	Invité

Dédicaces

Avec un énorme plaisir, un cœur ouvert et une immense joie je dédie mon travail :

A mes très chers parents, sans eux je n'aurai jamais pu être ce que je suis :

Ma mère, ma perle précieuse qui ne cesse de prier pour moi et qui m'a été toujours source de volonté dans mon parcours d'études, chez qui j'ai toujours trouvé un cœur plein de tendresse.

Mon père, mon exemple idéal dans la vie qui m'a aidé à prendre le meilleur chemin et qui m'a apporté le soutien moral et financier pour assurer mon bien être. Ce travail est le fruit de leurs sacrifices, que dieu me les protège.

A mes très chères sœurs Sabiha et son mari Madjid, Souhila et son mari Mohamed, Naoual et Khadidja.

A mes très chers frères Mohamed et Abdelhek,

Au nom de notre fraternité, je vous dédie ce travail et je vous souhaite beaucoup de chance dans la vie avec autant de réussite, que dieu vous protège et nous aide à rester solidaires.

A mon cher fiancé Djillali, l'homme de ma vie qui par son encouragement, ses conseils et son profond attachement m'a permis d'aller loin et de dépasser les obstacles.

A mes neveux Mohamed, Ilyes, Ayoub et Ouanis et ma nièce Nada, les anges de la famille auxquels je souhaite tout le bonheur du monde.

A mes chers beaux parents, mes belles sœurs, mes beaux frères.

A mes oncles, mes tantes, mes cousines et mes cousins.

A Mr Rabta, le pharmacien qui m'a accueilli au sein de son officine et qui m'a permis d'apprendre et d'améliorer mon parcours de formation.

A son adorable équipe : Nacer, Mohamed, Hacem, Rafik, Fatiha et Lamia, qui m'ont aidé tout au long de mon stage.

A mes amies, en particulier mes belles Ben adjali Zineb et Belkacem Sabrina, Amel, Nassima, Sara, Khadidja, Imene, Hadjer, Amina, et sans oublier mon binôme Khaoula avec qui j'ai passé des moments inoubliables.

A toute la famille Benouarets et à toute personne qui m'a aidé ou encouragé tout au long de mes études.

Meriem

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail avec hommage:

A mes très chers parents

Qui ont sacrifié leur vie pour notre réussite et nous ont éclairé le chemin par leur conseils judicieux, que dieu leur procure bonne santé et longue vie, nous espérons qu'un jour nous pourrons leur rendre un peu de ce qu'ils ont fait pour nous.

A mes chères deux sœurs Hadjer et Wissal

Pour les liens solides et intimes qui nous unissent, je vous souhaite un avenir plein de succès et de bonheur.

A mon cher fiancé Mohamed

Pour votre soutien et vos encouragements qui me donnent la force pour continuer, que dieu vous protège et vous procure bonne santé et longue vie pleine de bonheur et de réussite.

A toute ma chère famille

De plus petit au plus grand membre de ma famille

A mes amies Zineb, Malika, Imene, Amina, Nadjet...

Pour l'amitié sincère qui nous a lié et des bons moments passés ensemble. Ainsi mon binôme Meriem qui a supporté mon humeur au moment de stresse.

Je vous remercie tous

Khaoula

Remerciements

Avant tout, nous remercions **Allah** le tout puissant qui nous a donné autant de courage, de volonté, de santé et de patience pour réaliser ce travail.

Nous adressons nos sincères remerciements à tous ceux qui nous ont apporté de près ou de loin, aide et conseils lors de l'élaboration de ce mémoire de fin d'étude. Nous voudrions remercier en particulier :

Professeur **Mansouri**, Directeur Général du Laboratoire National de Contrôle de qualité des Produits Pharmaceutiques (LNCPP), de nous avoir accueilli au sein de son établissement.

Professeur **Chadder**, Chef de service pharmacotoxicologie, qui nous a accepté au sein de son service et qui nous a accordé une confiance tout au long de notre travail.

Docteur **Mouhoub**, Maître assistant en pharmacologie, pour avoir assuré la tâche d'encadrement de ce mémoire, ainsi que pour sa collaboration franche et cordiale et ses précieux conseils et idées.

Docteur **Chennoufi**, Assistante en pharmacologie, de nous avoir assisté et qui a consacré de son temps et de son énergie pour nous aider et nous orienter tout au long de la réalisation de nos travaux.

On remercie vivement, les **résidents** et le **personnel** du LNCPP pour leurs conseils, leur disponibilité et le partage de leurs nombreuses connaissances à l'élaboration de la partie pratique.

Docteur **Hadhoum**, Maître assistant en chimie thérapeutique, d'avoir accepté d'assurer la présidence du jury de notre soutenance.

Docteur **Bouazdi**, Maître assistant en pharmacologie, d'avoir accepté d'examiner notre travail.

Nous tenons aujourd'hui à vous exprimer notre profonde gratitude et notre profonde estime.

Merci

Table des matières

Dédicaces ;	
Remerciements ;	
Table des matières ;	i
Liste des abréviations ;	iv
Liste des tableaux ;	vi
Liste des figures ;	vii
Introduction générale et problématique;	1
Objectifs ;	2

REVUE DE LA LITTERATURE

Chapitre I : L'inflammation

1. Définition de la réaction inflammatoire.....	3
2. Médiateurs de la réaction inflammatoire	3
3. Biosynthèse des eicosanoïdes.....	4
3.1. Voie de la lipooxygénases	4
3.2. Voie de la cyclooxygénase	5
4. La thérapeutique anti-inflammatoire	
4.1. Définition d'un médicament anti-inflammatoire	6
4.2. Classification des médicaments anti-inflammatoires	6

Chapitre II : Généralités sur les médicaments anti-inflammatoire non stéroïdiens (AINS)

1. Classification des AINS	
1.1. Classification selon la structure chimique	7
1.2. Classification selon le risque lié à leur utilisation	7
1.3. Classification selon leur sélectivité	7
1.4. Classification selon la demi-vie	8
2. Mécanisme d'action	8
3. Propriétés pharmacologiques	
3.1. Action antalgique	10
3.2. Action anti-inflammatoire	10
3.3. Action antipyrétique	10
3.4. Action antiagrégante	10
4. Pharmacocinétique	
4.1. Absorption	10
4.2. Distribution	11
4.3. Métabolisme	11

4.4. Elimination	11
5. Indications	
5.1. Utilisation de courte durée	11
5.2. Utilisation prolongée	11
6. Effets indésirables	
6.1. Atteinte digestive	12
6.2. Atteinte rénale	12
6.3. Atteinte hématologique	12
6.4. Atteinte cardiovasculaire	12
6.5. Autres effets	12
7. Contre-indications	
7.1. Absolues	13
7.2. Relatives	13
8. AINS chez l'enfant et personne âgée	
8.1. Chez l'enfant	13
8.2. Chez les personnes âgées	13
9. Grossesse et allaitement	
9.1. Grossesse	14
9.2. Allaitement	14
10. Interactions médicamenteuses	14

Chapitre III : Le Diclofénac

1. Présentation	16
2. Mécanisme d'action	16
3. Pharmacocinétique	17
4. Indications	18
5. Contre-indications	18
6. Surdosage	18

Chapitre IV : Evaluation pharmaco-toxicologique d'un anti-inflammatoire

1. Evaluation de la toxicité	
1.1. Test de la toxicité anormale	19
1.2. Essai de recherche des endotoxines bactériennes « LAL test ».....	19
1.3. Test de la tolérance cutanée	20
1.4. Essai de pyrogène	20
2. L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire	
2.1. Méthodes in vivo	
2.1.1. Œdème de la patte	21
2.1.2. Œdème de l'oreille	22

2.1.3. Erythème aux rayons ultraviolets	23
2.1.4. Perméabilité capillaire	24
2.1.5. Technique de la poche granulomateuse.....	24
2.1.6. Arthrite à l'adjuvant de Freund	25
2.1.7. Test de pleurésie	26
2.2. Méthodes in vitro	
2.2.1. Mesure de l'activité inhibitrice de la COX	27

PARTIE PRATIQUE

I. Matériels et méthodes

1. Evaluation de la toxicité du Diclofénac	
1.1. Test de la toxicité anormale	29
1.2. Essai de recherche des endotoxines bactériennes « LAL test »	34
1.3. Test de la tolérance cutanée.....	46
2. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire du Diclofénac	
2.1. In vivo : Œdème de la patte	50

II. Résultats

1. Résultats de l'évaluation de la toxicité du Diclofénac	
1.1. Test de la toxicité anormale	58
1.2. Essai de recherche des endotoxines bactériennes « LAL test »	59
1.3. Test de la tolérance cutanée	62
2. Résultats de l'évaluation de l'activité du Diclofénac	
2.1. Test de l'œdème de la patte de la souris	64

III. Discussion	70
-----------------------	----

Conclusion générale et recommandations	72
--	----

Références bibliographiques ;

Annexes ;

Résumé.

Liste des abréviations

Abréviation	Signification
µg	Microgramme
µl	Microlitre
AA	Acide arachidonique
AINS	Anti-inflammatoire non stéroïdien
AIS	Anti-inflammatoire stéroïdien
Arg	Arginine
AVK	Anti Vitamine K
C3a	Fraction c3 du complément actif
C5a	Fraction c5 du complément actif
Cm	Centimètre
COX	Cyclooxygénase
CSE	Contrôle standard d'endotoxine
DT	Dilution testée
g	Gramme
H	Heure
IEC	Inhibiteur de l'Enzyme de Conversion
IL	Interleukines
Ile	Isoleucine
IM	Intramusculaire
IP	Intraplantaire
IPc	Indice d'irritation primaire cutanée
Kg	Kilogramme
LAL	Lysat d'amœbocytes de limule
LP	Libération prolongée
LPS	Lipopolysaccharide
LT	Leucotriènes
mg	Milligramme
Min	Minute
ml	Millilitre

Mm	Millimeter
OMS	Organisation mondiale de santé
ORL	Oto-rhino-laryngologie
PG	Prostaglandine
PGI ₂	Prostacycline
pH	Potentiel hydrogène
Ser	Serine
SNC	Système nerveux central
TNF α	Tumor Necrosis Factor Alpha
TXA ₂	Thromboxanes A ₂
UI	Unité internationale
Val	Valine

Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
Tableau I	Principaux effets des prostaglandines et des thromboxanes.	5
Tableau II	Interactions d'ordre pharmacodynamique et d'ordre pharmacocinétique entre les AINS et d'autres médicaments.	15
Tableau III	Profil d'absorption des différentes formes du diclofénac.	17
Tableau IV	Interprétation des résultats de l'essai selon la différence entre la température maximale et la température initiale moyenne.	21
Tableau V	Série des dilutions des solutions d'endotoxines pour la validation initiale.	39
Tableau VI	Préparation des dilutions.	44
Tableau VII	Echelle numérique des phénomènes à observer.	49
Tableau VIII	Catégories des produits testés selon la valeur d'IPc résultante.	49
Tableau IX	Poids des souris et poids moyen de chaque lot.	52
Tableau X	Observation des souris après 24h.	58
Tableau XI	Calcul des points finaux et log points finaux.	59
Tableau XII	Expression des résultats du LAL test.	60
Tableau XIII	Résultats d'observation après 24h et 72h.	62
Tableau XIV	Résultats de cotation des phénomènes observés.	62
Tableau XV	Résultats de lot témoin négatif.	64
Tableau XVI	Résultats de lot référence (témoin positif).	64
Tableau XVII	Résultats de lot test.	65

Liste des figures

Figure	Titre	Page
Figure 1	Structure chimique de l'acide arachidonique.	4
Figure 2	Inhibition irréversible de la cyclo-oxygénase par acétylation du résidu sérine.	9
Figure 3	Inhibition des COX par un AINS non sélectif.	9
Figure 4	Inhibition de la COX-2 par un coxib.	9
Figure 5	Structure chimique du Diclofénac.	16
Figure 6	Photographie de limule : <i>Limulus polyphemus</i> .	19
Figure 7	Pesée et sélection des souris.	32
Figure 8	Contention des souris.	32
Figure 9	Administration intra péritonéale de la solution de Diclofénac.	32
Figure 10	Schéma réactionnel général des différentes méthodes LAL.	34
Figure 11	Flacon de Lysat d'amœbocytes de limule.	37
Figure 12	Flacon de contrôle standard d'endotoxine.	37
Figure 13	Agitation au vortex de CSE avant et après la manipulation.	38
Figure 14	Schéma récapitulatif de l'étape de validation de la sensibilité de lysat.	40
Figure 15	Schéma récapitulatif de l'essai final.	44
Figure 16	Préparation des dilutions de l'essai final.	44
Figure 17	Incubation des dilutions au bain marie.	45
Figure 18	Lapin après épilation.	47
Figure 19	Etapes de scarification et d'application du produit à tester.	48
Figure 20	Répartition des souris à essai en trois lots.	51
Figure 21	Solutions des produits à tester (test et référence).	53
Figure 22	Agitation de la solution de carragénine.	54
Figure 23	Solution de carragénine à injecter.	54
Figure 24	Sonde gastrique.	55
Figure 25	Administration per os de l'AINS et de l'eau physiologique.	55
Figure 26	Injection intra-plantaire de la solution de carragénine.	55
Figure 27	Sacrifice des souris.	56
Figure 28	Ablation des pattes.	56

Figure 29	Ensemble des Pattes coupées pour chaque lot.	57
Figure 30	Pesée des pattes.	57
Figure 31	Résultat du test de la toxicité anormale après 24h.	58
Figure 32	Vérification du pH de la dilution finale du produit.	60
Figure 33	Résultats de l'essai après 1h à 37 °C.	61
Figure 34	Lapin après 72h d'observation.	63

INTRODUCTION

INTRODUCTION GENARALE ET PROBLEMATIQUE

L'inflammation est un processus habituellement bénéfique, de défense et d'adaptation de l'organisme contre toute agression qui entraîne une altération tissulaire.

Cependant, dans certains cas, elle se développe de manière exagérée, dure trop longtemps et devient délétère du fait de son siège, de l'agressivité de l'agent pathogène ou encore de la régulation anormale du processus inflammatoire.

Afin de pallier à ce problème, les praticiens de santé font appel à des anti-inflammatoires, dont les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) qui sont largement utilisés, que ce soit dans le contexte de la prescription médicale ou de l'automédication. Leurs propriétés antalgiques, anti-inflammatoires et antipyrétiques sont connues depuis la fin du 19^{ème} siècle, ce qui expliquent leur large utilisation à visée symptomatique dans des situations diverses telles que l'arthrose, les rhumatismes inflammatoires, les douleurs dentaires et les dysménorrhées.

L'usage courant des AINS ne signifie pas que ces médicaments ne présentent pas des effets indésirables, plutôt les considérer comme une arme à double tranchant, puisqu'ils ont montré énormément d'effets indésirables, dont certains sont potentiellement graves.

La très forte consommation des AINS surtout dans le contexte d'automédication, a orienté notre travail vers l'étude d'un médicament qui appartient à cette classe et qui reste presque le premier choix des médecins et des patients dans de nombreuses situations ; c'est le **Diclofénac**.

Nous essayons dans notre modeste travail d'étudier ce médicament dans le cadre du **contrôle pharmaco-toxicologique** afin de s'assurer de son **efficacité** et de sa **sécurité**.

Avant d'évaluer notre médicament, nous avons commencé par définir la physiopathologie de l'inflammation et son traitement approprié dont les anti-inflammatoires non stéroïdiens qu'on les a détaillés en long et en large. Ainsi que les différentes méthodes utilisées dans le cadre de ce contrôle.

Pour aboutir à des résultats fiables, notre travail fera référence à des méthodes approuvées et les résultats seront comparés avec les normes exigées par la pharmacopée européenne.

OBJECTIFS

Ce travail de fin d'études a été une étape essentielle dans notre parcours de formation. Il nous a permis de découvrir le monde professionnel, une entreprise pharmaceutique et un secteur de contrôle de qualité des produits pharmaceutiques.

Nous nous sommes intégrées avec l'équipe du laboratoire national de contrôle des produits pharmaceutiques LNCPP afin d'effectuer notre contrôle pharmaco-toxicologique que l'on a appliqué sur un AINS : le Diclofénac sous forme de produit fini et de matière première.

Parmi les objectifs de ce travail :

- L'amélioration des connaissances réglementaires et techniques en matière de contrôle qualité des produits pharmaceutiques ;
- L'amélioration des connaissances expérimentales et l'application sur les animaux du laboratoire ;
- La prise de conscience de l'état du contrôle des produits pharmaceutiques en Algérie et le rôle important du LNCPP dans cette tâche ;
- Le but ne se limite pas à juger la conformité ou non du produit testé, mais essentiellement de décrire les différentes méthodes de contrôle de la sécurité et de l'évaluation de l'efficacité des AINS ;
- La mise au point de quelques méthodes approuvées du contrôle toxicologique ainsi que, d'une méthode d'évaluation de l'activité anti-inflammatoire du Diclofénac ;
- Enfin, l'établissement d'une étude comparative entre l'activité anti-inflammatoire d'un générique avec son princeps.

REVUE DE LA LITTERATURE



I-

L'INFLAMMATION

CHAPITRE I : L'INFLAMMATION

Pour mieux comprendre le mécanisme d'action des AINS, il est important de connaître les différents éléments intervenant dans le phénomène de l'inflammation. C'est pourquoi, dans un premier temps, nous ferons un rappel sur les mécanismes et les médiateurs de ce phénomène physiopathologique, ainsi que sur la synthèse et l'action des eicosanoïdes où réside l'effet des AINS.

1. Définition de la réaction inflammatoire

L'inflammation est définie par les signes cardinaux de *Celsius*: color (rougeur), tumor (œdème), calor (chaleur), dolor (douleur). Cette réaction peut s'accompagner d'atteintes fonctionnelles régionales selon la gravité de l'agression [1].

Il s'agit d'un processus physiologique de défense de l'organisme contre les différentes agressions responsables d'une altération tissulaire et d'une perturbation de l'état général.

On parle ici d'un phénomène physiologique bénéfique pour l'organisme, dénommé « **inflammation aigue** ». L'aspect négatif de ce phénomène intervient quand l'inflammation dure et devient chronique. Dans ce cas, elle devient défavorable et doit être contrôlée par des traitements médicamenteux [2].

2. Médiateurs de la réaction inflammatoire

L'inflammation fait intervenir des cellules (granulocytes, mastocytes, macrophages, plaquettes, fibroblastes, lymphocytes et cellules endothéliales), des vaisseaux, des modifications de la matrice extracellulaire et de nombreux médiateurs chimiques qui peuvent être pro ou anti inflammatoires et qui peuvent modifier ou entretenir la réponse inflammatoire en agissant sur les différentes cellules impliquées dans cette dernière [3].

Dans ce chapitre, nous s'intéressons aux médiateurs solubles de l'inflammation, qui proviennent du plasma ou des cellules ;

- **Les médiateurs d'origine plasmatique** : sont présents dans le plasma sous forme de précurseurs qui doivent être activés pour acquérir leurs propriétés, ce sont les facteurs de la coagulation ; les kinines et le complément.
- **Les médiateurs d'origine cellulaire** : sont soit préformés et séquestrés dans des granules intracellulaires qui se libèrent suite à un stimulus inflammatoire, ce sont la sérotonine et l'histamine.

Soit synthétisés de novo en réponse à un stimulus, tel que : les cytokines et les autacoides.

Les autacoides : médiateurs lipidiques qui dérivent des phospholipides membranaires, deux familles des autacoides ont été identifiées :

- Le PAF (Facteur d'activation plaquettaire) ;
- Les eicosanoïdes.

Dans les conditions physiologiques, la régulation du déroulement de la réaction inflammatoire implique que les médiateurs soient rapidement détruits ou inactivés par un ou plusieurs inhibiteurs [4].

3. Biosynthèse des eicosanoïdes

Les eicosanoïdes ; sont des dérivés d'acides gras issus des phospholipides membranaires et classés en prostaglandines, prostacyclines, thromboxanes et leucotriènes [5].

Pour la majorité d'entre eux, il s'agit de dérivés de l'acide arachidonique ou eicosatétraénoïque dont la structure comporte 20 atomes de carbone et 4 doubles liaisons [6].

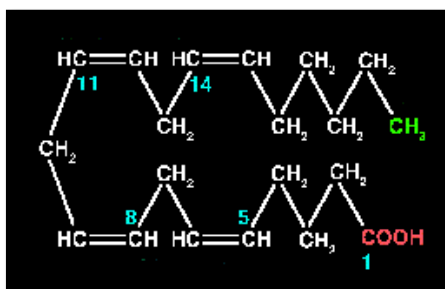


Figure 1 : Structure chimique de l'acide arachidonique

L'acide arachidonique est libéré des phospholipides membranaires sous l'influence de la phospholipase A2 activée, au cours de l'inflammation, par des stimuli chimiques ou mécaniques. Cet acide sert de substrat à la cyclooxygénase et aux lipooxygénases [8]. (Voir annexe I).

3.1. Voie de la lipooxygénase

Les lipooxygénases ; sont des dioxygénases non héminiques intervenants dans l'oxydation de l'acide arachidonique, ce qui conduit à des hydroperoxyacides et des leucotriènes (LTB₄, LTC₄, LTD₄ et LTE₄), ainsi qu'à d'autres composés dont la structure et les propriétés ressemblent à celles des leucotriènes (lipoxines et hépoxylines) [6].

Les leucotriènes ; augmentent la perméabilité vasculaire et exercent une action chimiotactique sur les polynucléaires neutrophiles. En association avec les prostaglandines, ils peuvent déclencher l'ensemble des symptômes caractéristiques de l'inflammation [8].

Ils provoquent une agrégation plaquettaire, ainsi qu'une bronchoconstriction avec hypersécrétion bronchique [6].

3.2. Voie de la cyclooxygénase

On distingue deux iso enzymes de la cyclooxygénase :

➤ La cyclooxygénase de type 1 ou COX1 : constitutive, présente au niveau de l'estomac, du rein et des thrombocytes, elle permet la synthèse des prostaglandines au niveau d'estomac et des reins, des prostacyclines au niveau de la muqueuse gastrique et des cellules endothéliales et du thromboxane A₂ au niveau plaquettaire.

➤ La cyclooxygénase de type 2 ou COX2 : inductible par des cytokines comme l'IL-1 et le TNF- α et les substances mitogènes. Présente au niveau des fibroblastes, des macrophages, des chondrocytes et de l'utérus. Leur expression est inhibée par les glucocorticoïdes.

L'oxydation de l'acide arachidonique par ces cyclooxygénases conduit à la formation des endoperoxydes PGH₂ et PGB₂ qui seront à l'origine des prostaglandines (PGE₂, PGF₂, PGI₂) et des thromboxanes TXA₂ [6].

NB : Le terme PG désigne une prostaglandine, les lettres majuscules E, F, I, H ect, dépendent de substituants fixés au cycle cyclopentanique et le chiffre qui suit désigne le nombre de doubles liaisons présentes au niveau des deux chaînes fixées au cycle. Les lettres α et β caractérisent les isomères [6].

Le tableau 1 ci-dessous résume les principaux effets des prostaglandines et des thromboxanes.

Tableau I : Principaux effets des prostaglandines et des thromboxanes [5, 6, 8].

Organes	Effets	Prostaglandines et Thromboxanes
Vaisseaux	Vasoconstriction Vasodilatation	PGF ₂ , TXA ₂ PGI ₂ (le plus actif), PGE ₂
Plaquettes	Pro-agrégant Anti-agrégant	TXA ₂ PGE ₂ , PGI ₂
Bronches	Contraction Dilatation	PGF ₂ , TXA ₂ PGE ₂ , PGI ₂
Intestin	Nausées, diarrhée	PGE ₂ , PGF ₂
Estomac	Diminution de la sécrétion gastrique	PGE ₂ , PGI ₂
Utérus	Contraction Nécrose ischémique de l'endometre avant les menstruation.	PGE ₂ , PGF ₂ PGF ₂ α
SNC	Hyperthermie, hyperalgie	PGE ₂
Rein	Augmentation du débit sanguin rénal	PGE ₂ , PGI ₂

4. La thérapeutique anti-inflammatoire

4.1. Définition des médicaments anti-inflammatoires

Les médicaments anti-inflammatoires sont des médicaments utilisés dans le traitement local ou général de l'inflammation. Ce sont des médicaments symptomatiques, qui n'agissent pas sur l'étiologie de l'inflammation, ils sont indiqués quand ce processus physiologique devient gênant, notamment à cause de la douleur qu'il provoque [9].

4.2. Classification des médicaments anti-inflammatoires

a. Médicaments anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS)

Les anti-inflammatoires stéroïdiens ou corticoïdes, sont des dérivés des hormones stéroïdes de la corticosurrénale. Ils agissent sur toutes les composantes de l'inflammation en s'opposant à l'action de la phospholipase A2 qui est l'enzyme catalysant la libération de l'acide arachidonique, à partir de la membrane cellulaire. Ils bloquent donc, la libération de l'acide arachidonique et exercent une action globale et rapide sur l'inflammation [10].

b. Médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)

La famille des AINS comporte de nombreuses substances appartenant à plusieurs familles chimiques, dont le point commun est d'être des acides faibles [11].

Ils n'agissent que sur une partie de la composante inflammatoire. Ils bloquent la dégradation de l'acide arachidonique par la voie de la cyclooxygénase, ils s'opposent donc à la production des prostaglandines et du thromboxanes A2. Les AINS peuvent agir également sur la composante cellulaire de l'inflammation en bloquant la mobilité des cellules [10]. (voir annexe II).

II-

**GENERALITE SUR LES ANTI INFLAMMATOIRES
NON STEROIDIENS**

CHAPITRE II : GENERALITE SUR LES MEDICAMENTS ANTI INFLAMMATOIRES NON STEROIDIENS

1. Classification des AINS

Les AINS constituent une classe thérapeutique chimiquement hétérogène, correspondant à un vaste groupe de molécules qui possèdent des propriétés fondamentales: **antipyrétiques, anti-inflammatoires et antalgiques**.

Ils peuvent être classés selon leur structure chimique, selon le risque lié à leur utilisation, selon leur sélectivité inhibitrice vis-à-vis de COX-1/COX-2 ou selon la demi-vie d'élimination.

1.1 Classification selon la structure chimique

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens sont des acides faibles liposolubles, selon leur noyau chimique de base, sont répartis en 7 groupes: salicylés, indoliques, fénamates, arylcarboxyliques, enoliques, sulfonanilides et coxibs [5, 11, 12, 13, 14]. (Voir annexe III).

1.2. Classification selon le risque lié à leur utilisation

Selon le niveau de risque lié à leur utilisation, les AINS peuvent être classés en 3 situations administratives :

- **Liste I** : présentent des risques plus importants, avec une demi-vie longue et des indications limitées ;
- **Liste II** : présentent des risques acceptables ;
- **Hors liste** : semblent présenter un risque suffisamment limité et contrôlable pour pouvoir être utilisés sans prescription médicale par exemple : les salicylés et certains AINS à dose antalgique (Ibuprofène et kétoprofène) [12]. (voir annexe III)

1.3. Classification selon leur sélectivité

Un ratio COX-1/COX-2 est défini pour chaque AINS pour comparer leur activité inhibitrice relative sur la COX-1 et la COX-2.

$$\text{COX-1/COX-2} = \text{IC}_{50}\text{COX-1} / \text{IC}_{50}\text{COX-2}$$

Avec :

- $\text{IC}_{50}\text{COX-1}$ = Concentration d'AINS inhibant 50% de l'activité enzymatique de la COX-1
- $\text{IC}_{50}\text{COX-2}$ = Concentration d'AINS inhibant 50% de l'activité enzymatique de la COX-2

Les AINS sont classés selon leur sélectivité en 4 groupes :

- Les inhibiteurs non sélectifs : inhibition des deux COX aux posologies usuelles, Aspirine et AINS classiques aux doses thérapeutiques ;
- Les inhibiteurs sélectifs de la COX-1 : uniquement l'aspirine à faible dose;
- Les inhibiteurs préférentiels de la COX-2 : inhibent préférentiellement à dose faible la COX-2, mais perdent leur sélectivité à plus forte dose et inhibent aussi la COX-1: Nimésulide® et Méloxicam ;
- Les inhibiteurs sélectifs de la COX-2 : les COXIBS [15, 16].

1.4. Classification selon la demi-vie d'élimination

- AINS à demi-vie courte (<6 heures) : Ibuprofène, kétoprofène, Acide Niflumique, Furbiprofène, Fénoprofène, Diclofénac, Nimésulide ;
- AINS à demi-vie intermédiaire (entre 6 et 24h) : Sulindac, Naproxène, Méloxicam ;
- AINS à demi-vie longue (>24 heures) : Phénylbutazone, Piroxicam [17, 18].

2. Mécanisme d'action

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens présentent un mécanisme d'action commun. En inhibant les cyclo-oxygénases, entraînent une diminution de la production des prostaglandines, de la prostacycline et du thromboxane.

➤ Il existe 4 modes d'inhibition de la cyclo-oxygénase :

- **Une inhibition compétitive réversible** : l'AINS se fixent dans le site catalytique de la COX en empêchant ainsi la liaison de son substrat naturel (l'acide arachidonique) ;
- **Une inhibition irréversible** : l'inhibition enzymatique est définitive, une nouvelle synthèse de protéines est nécessaire pour que l'activité enzymatique réapparaisse ;
- **Une inhibition compétitive réversible dont l'activité est liée à la capture des radicaux libre** : la COX est couplée à une peroxydase pour former la PGH₂ (plaque tournante de la synthèse des prostaglandines, du thromboxane et de la prostacycline). cette réaction nécessite la présence de radicaux libre. En présence des capteurs de radicaux libres (AINS dérivés phénoliques), la réaction enzymatique est bloquée ;
- **Une inhibition irréversible par l'acétylation d'un résidu sérine** : l'acide acétylsalicylique est un inhibiteur irréversible de l'activité de la COX par une acétylation permanente du résidu sérine en position 530 (Ser-530) pour la COX-1, et en position 516 (Ser-516) pour la COX-2, prévient ainsi l'accès de l'AA au site catalytique des COX.

Alors que l'acide salicylique : produit de la désacétylation hépatique de l'aspirine, est un inhibiteur réversible des COX [18].

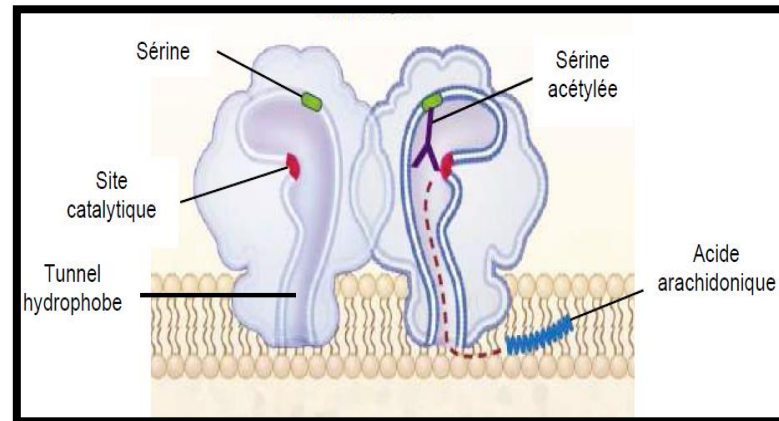


Figure 2 : Inhibition irréversible de la cyclo-oxygénase par acétylation du résidu sérine [19].

- Les AINS inhibent tous l'activité des COX mais avec une sélectivité COX-1/ COX-2 différente :
- **Les AINS non sélectifs :** bloquent l'entrée du site actif de la COX-1 et la COX-2 en se liant via leur groupement carboxyle à un résidu arginine en position 120 (Arg-120) des COX, empêchant ainsi l'AA d'atteindre le site catalytique de l'enzyme [14].
- **Les AINS inhibant préférentiellement ou sélectivement la COX-2 :** une poche annexe existant dans le site catalytique de la COX-2, par la présence du résidu valine en position 523 au lieu du résidu isoleucine plus volumineux à la même position dans la COX-1. Les coxibs pénètrent dans le site actif de la COX-2 mais ne réagissent pas avec l'Arg-120. Elles se lient par leur groupement phényl-sulfonamide à cette poche latérale de manière lente, irréversible et temps-dépendante, empêchant l'AA d'atteindre le site catalytique de l'enzyme [19].

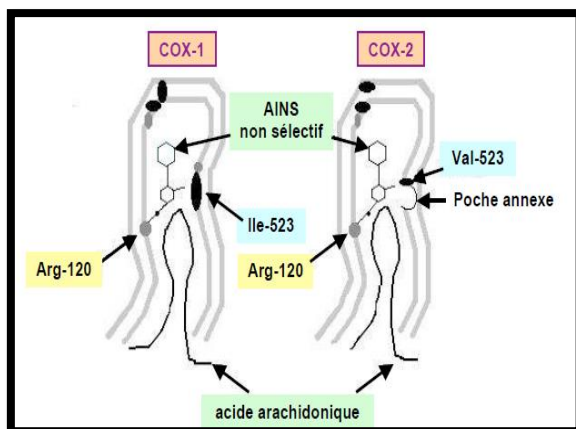


Figure 3 : Inhibition des COX par un AINS non sélectif [19].

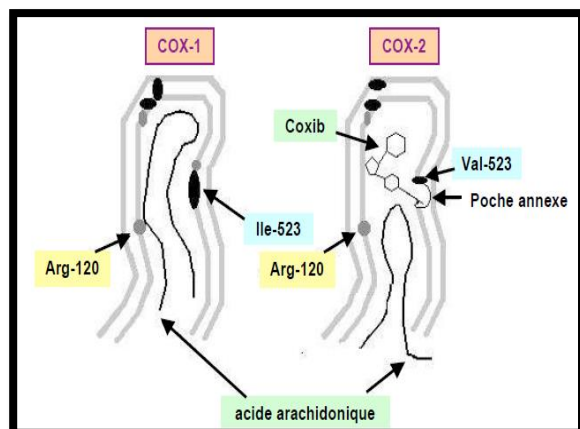


Figure 4: Inhibition de la COX-2 par un coxib [19].

3. Propriétés pharmacologiques

L'ensemble des effets pharmacologiques des AINS sont la conséquence de l'inhibition de la synthèse des prostaglandines et vont donc à l'inverse des actions de ces substances [20].

3.1. Action antalgique

Les prostaglandines E_2 déclenchent un influx douloureux en sensibilisant les nocicepteurs périphériques à l'action des substances algogènes (Bradykinine, IL-1...) libérées lors de l'inflammation.

L'inhibition de la synthèse de ces prostaglandines par les AINS conduit à une diminution, voire à une suppression de la douleur d'intensité faible à modérée, lorsqu'ils sont utilisés à des doses relativement inférieures à des doses anti-inflammatoires [21].

3.2. Action anti-inflammatoire

L'action anti-inflammatoire porte principalement sur la composante vasculaire de la réaction inflammatoire, responsable de la classique tétrade : œdème, douleur, rougeur, chaleur.

Cette action requiert généralement à des posologies d'AINS plus élevées que celles nécessaires dans les autres variétés de douleurs ou dans la fièvre [17].

3.3. Action antipyrétique

Les pyrogènes provoquent la libération d'IL-1 par les macrophages, ce qui induit la formation des prostaglandines E_2 dans l'hypothalamus, provoquant ainsi l'augmentation de la température corporelle. L'inhibition de la formation de ces médiateurs par les AINS, abaisse le seuil du thermostat hypothalamique et permet le retour à la normale de la température corporelle [11].

3.4. Action antiagrégante

Tous les AINS anti COX-1 interfèrent avec les fonctions plaquettaires par l'inhibition de la cyclo-oxygénase plaquettaire, ce qui inhibe la formation de la TXA_2 (pro-agrégante). Cependant, les anti COX-2 sélectifs présenteraient moins d'interférences [20].

4. Pharmacocinétique

4.1. Absorption

Les AINS sont des acides faibles lipophiles, leur absorption est rapide et quasi complète.

L'alimentation n'affecte pas habituellement la biodisponibilité.

4.2. Distribution

Dans le plasma, 95% des AINS existent sous forme liée de façon réversible à l'albumine.

Ils interfèrent avec d'autres médicaments acides faibles, en se fixant sur les mêmes sites protéiques.

Les AINS franchissent le placenta, la barrière hémato-encéphalique et passent dans le lait maternel.

4.3. Métabolisme

Pour la majorité des AINS, il existe un métabolisme hépatique aboutissant à la formation de métabolites inactifs à l'exception de ces deux :

- La phénylbutazone est transformée en oxyphenbutazone qui possède une activité anti-inflammatoire.
- Le sulindac est un pro-médicament, se métabolise en produit actif au niveau du foie.

4.4. Elimination

Les AINS sont principalement éliminés par les reins sous forme des métabolites actifs et des métabolites inactifs. Cependant, certains possèdent une élimination biliaire avec ou sans un cycle entéro-hépatique [14, 15]. (Voir annexe IV).

5. Indications

5.1. Utilisation de courte durée

Les AINS de liste II sont utilisées en :

- Traumatologie (entorse) ;
- Gynécologie (dysménorrhée primitive) ;
- Urologie (colique néphrétique) ;
- Traitement adjuvant des manifestations inflammatoires en ORL et en stomatologie [17, 22].

La phénylbutazone (liste I) et certains AINS de liste II sont utilisés dans le traitement symptomatique de courte durée (inférieure à 7 jours) des poussées aiguës de rhumatisme articulaire, d'accès microcristalline et de spondyl-arthropathies inflammatoires [17].

5.2. Utilisation prolongée

Les AINS sont utilisés dans le traitement symptomatique à longue durée des rhumatismes inflammatoires chroniques (polyarthrite rhumatoïde, spondylarthrite ankylosante, rhumatisme psoriasique). Ainsi dans certaines arthroses douloureuses et invalidantes [17, 22].

6. Effets indésirables

6.1. Effets digestifs

Les prostaglandines protègent la muqueuse gastro-intestinale par la production du mucus, la régulation de l'acidité et de la vascularisation locale [23].

Les AINS en s'opposant à l'action des prostaglandines peuvent provoquer selon l'état physiopathologique de l'individu : des gastralgies, des nausées, des dyspepsies, un ulcère gastroduodéal avec ou sans présence de saignements ou de perforations [13].

6.2. Effets rénaux

Les prostaglandines interviennent dans la régulation du flux sanguin rénal et la filtration glomérulaire. L'inhibition de l'action des prostaglandines par les AINS, s'oppose à ces mécanismes en favorisant l'installation d'une insuffisance rénale aigue, en particulier en cas d'antécédent d'hypovolémie et chez les personnes âgées ou traitées par un diurétique [23].

Les AINS perturbent aussi l'équilibre hydro-électrolytique ; une rétention hydro-sodée qui se traduit par une augmentation de la pression artérielle, l'apparition d'œdème des membres inférieurs et la décompensation d'une insuffisance cardiaque congestive [13].

6.3. Effets hématologiques

Les AINS inhibiteurs de la COX-1 plaquettaire perturbent les tests d'agrégation plaquettaire. Mais seulement l'aspirine à faible dose allonge le temps de saignement.

L'action anti-thrombotique de l'aspirine, ne dispense pas de la co-administration d'un AINS classique avec l'aspirine à faible dose si le terrain cardiovasculaire du malade l'impose [13].

6.4. Effets cardiovasculaires

Les coxibs accroissent le risque d'accidents cardiovasculaires par l'augmentation de la pression artérielle systolique, en induisant un déséquilibre de la balance TXA_2/PGI_2 chez les patients présentant des antécédents cardiovasculaires récents. Alors que les AINS non sélectifs, présenteraient ce risque à des posologies élevées et lors d'utilisation à long terme [17].

6.5. Autres effets

a. Le syndrome de Fernand Widal

Ce syndrome se manifeste par un asthme, une rhinite et une polypose naso-sinusienne, il est dû à une hyperactivité de la voie de la lipooxygénase, donc une surproduction des leucotriènes pulmonaires lors de l'inhibition de la voie de la cyclooxygénase avec les AINS [18].

b. Syndrome de Reye

Se caractérise par une encéphalopathie associée à une dégénérescence hépatique survenant suite à l'administration de l'aspirine chez un enfant atteint d'une pathologie virale [20].

7. Contre-indications

7.1. Absolue

- Allergie à la même classe chimique ;
- Insuffisance hépatique, rénale et cardiaque sévère ;
- Ulcère gastroduodénal évolutif (compliqué) ;
- Syndrome de Widal ;
- Maladie hémorragique constitutionnelle ou acquise ;
- Femmes enceintes et allaitantes [14, 20, 24].

7.2. Relative

- Antécédents ulcéreux ;
- Reflux gastro-œsophagien sévère ;
- Néphropathie, insuffisance rénale ;
- Age > 70 ans (en traitement chronique) ;
- Hépatopathie ;
- Enfant atteint d'une pathologie virale [14, 20, 24].

➤ Certaines contre-indications sont spécifiques aux COXIBS :

- Artériopathie coronarienne ;
- Artériopathie cérébrale ;
- Entérocolopathie inflammatoire ;
- Chez les sujets allergiques aux sulfamides (celecoxib contient un radical sulfamidé) ;
- Chez les femmes à l'âge de procréer et au début de la grossesse (célecoxib a un effet tératogène expérimental) ;
- L'Etoricoxib est contre-indiqué lors d'hypertension artérielle non contrôlée [15].

8. AINS chez l'enfant et les personnes âgées

8.1. Chez l'enfant

Pour traiter la douleur et/ou la fièvre chez les enfants de moins de 15 ans, seuls 5 AINS sont autorisés par l'Afssaps : l'ibuprofène, le kétoprofène, l'acide méfénamique, l'acide niflumique et l'acide tiaprofénique [15, 25, 26]. (Voir annexe V).

8.2. Chez les personnes âgées

Le vieillissement peut s'accompagner de modifications des paramètres pharmacocinétiques et pharmacodynamiques des médicaments. Les effets indésirables des AINS peuvent être

prévenus, en suivant ces règles de prescription et de surveillance rigoureuses chez le sujet âgé :

- Choisir les molécules les moins toxiques, en préférant les molécules à demi-vie brève ;
- Proposer la posologie la plus faible possible et la durée de traitement la plus courte possible ;
- La recherche des contre-indications relatives ou absolues des AINS par voie systémique ;
- En cas d'insuffisance rénale, il faut faire une estimation du débit de filtration glomérulaire de façon systématique et quand c'est nécessaire, ajuster les doses des AINS dont l'élimination est essentiellement rénale ;
- La prescription doit systématiquement s'accompagner d'un protecteur gastrique même en dehors d'antécédent d'ulcère gastroduodénal ;
- La prise des médicaments potentiellement délétères en cas d'association aux AINS doivent être systématiquement recherchées avant toute prescription chez un sujet âgé ;
- Les AINS en gel ou pommade peuvent être ponctuellement utiles pour les douleurs au niveau d'une articulation périphérique [23, 27].

9. Grossesse et allaitement

9.1. Grossesse

Les AINS sont contre-indiqués chez la femme enceinte à partir du début du 6^{ème} mois de la grossesse (c'est-à-dire à partir de la 24^{ème} semaine d'aménorrhée), y compris par voie cutanée.

- Au cours de la grossesse, le taux de PGF2 α augmente pour déclencher l'accouchement. En utilisant un AINS, ce taux de PGF2 α augmente moins rapidement ce qui va allonger la durée de la grossesse et de la délivrance.
- Chez le fœtus, la prise d'un AINS par la mère inhibe la synthèse des prostaglandines fœtales et peut provoquer une fermeture prématurée du canal artériel du fœtus [15, 28].

9.2. Allaitement

La prise d'AINS par la mère qui allaite doit être évitée en raison d'un passage important de ces molécules dans le lait maternel [15].

10. Interactions médicamenteuses

Le tableau ci-dessous regroupe les principales interactions qui peuvent avoir lieu entre les AINS et autres classes thérapeutiques ;

Tableau II : Interactions d'ordre pharmacodynamique [13, 15, 20, 29] et d'ordre pharmacocinétique [20] entre les AINS et d'autres médicaments.

	Médicaments / Nature de l'interaction	AINS impliqués	Conséquence
D'ordre pharmacodynamique	Anticoagulants oraux, AVK : - Association déconseillée - Contre-indication	- Tous les AINS - pyrazolés	Favoriser le saignement des lésions ulcéreuses induites par les AINS.
	Antihypertenseurs : - β -bloquants : à prendre en compte. - Diurétiques : précaution d'emploi - IEC : Précaution d'emploi	Tous les AINS	Diminution de l'effet anti-hypertenseur, de la natriurèse et de la diurèse. Les IEC et les diurétiques augmentent le risque de l'insuffisance rénale.
	Ciclosporine : précaution d'emploi Tacrolimus : précaution d'emploi	Tous les AINS	Néphrotoxicité augmentée.
	Acide acétylsalicylique : - Association déconseillée à doses anti-inflammatoires, antalgiques ou antipyrétiques - A prendre en compte à doses antiagrégantes	Tous les AINS	Risque ulcérogène et hémorragique digestives augmenté.
	Lithium : Association déconseillée	Tous les AINS (sauf l'aspirine)	Entravent l'excrétion urinaire, aboutissant parfois à une intoxication.
D'ordre pharmacocinétique	Anticoagulants oraux, sulphonylurées, phénytoïne, acide valproïque, warfarine	Pyrazolés	L'AINS inhibe le métabolisme du 2 ^{ème} médicament associé.
	Digoxine, lithium, aminoglycosides, Méthotrexate	Nombreux AINS	Les AINS diminuent l'excrétion rénale du 2 ^{ème} médicament.
	Warfarine, acétazolamide, acide valproïque	Aspirine (forte dose)	- Potentialisation de l'anticoagulant - Diminution de la sécrétion tubulaire rénale - Inhibition de l'oxydation
	Phénytoïne, acide valproïque, acétazolamide	Salicylés	Compétition sur les sites de fixation protéique plasmatique.

III-

DICLOFENAC

CHAPITRE III : LE DICLOFENAC

1. Propriétés

Le Diclofénac est un dérivé de l'acide anilino-phénylacétique. Il présente les mêmes indications que les autres anti-inflammatoires non stéroïdiens : les lombalgies, les douleurs rhumatismales et les états inflammatoires post-traumatiques dont il est administré aux doses orales quotidiennes de 0,075 à 0,150 g [5].

1.1. Formule développée

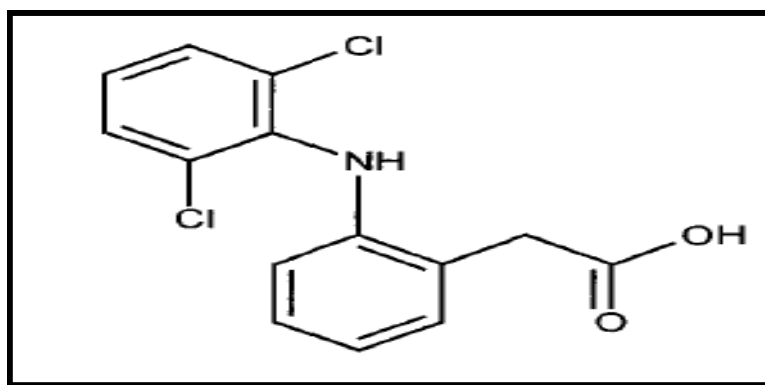


Figure 5 : Structure chimique du Diclofénac [30].

Formule: $C_{14}H_{11}NCl_2O_2$

Poids molaire : 296,148 g/mol.

1.2. Formes galéniques

Le Diclofénac existe sous plusieurs formes galéniques destinées à être administrées par différentes voies. (Voir annexe VI).

2. Mécanisme d'action du Diclofénac

Le mécanisme d'action exact est mal connu, mais reste que le mécanisme principal responsable de son action anti-inflammatoire, antipyrétique et antalgique est l'inhibition de la synthèse des prostaglandines par inhibition de la cyclooxygénase.

Le Diclofénac a une préférence faible à modérée pour bloquer la COX-2 (environ 10 fois), il a une incidence gastro-intestinale un peu plus faible que l'indométacine et l'aspirine [30].

3. Pharmacocinétique

a. Absorption

L'administration répétée du Diclofénac, ne conduit à aucune accumulation dans le plasma.

L'absorption diffère suivant la forme administrée.

Tableau III: Profil d'absorption des différentes formes du Diclofénac [32].

Forme galénique	Biodisponibilité	Pic plasmatique
Comprimé à 25 et 50mg	L'absorption est rapide et totale, elle est de 50%.	Atteint en environ 2h. Il est de 0.8mg/l pour un Cp à 25 mg, et de 1.5mg/l pour un Cp à 50mg.
Suppositoire à 25 et 100mg	L'absorption est rapide et totale, elle est de 50%.	Atteint en 1h. Il est de 2mg/l pour un suppositoire à 100mg.
Comprimé LP à 75 et 100mg	L'absorption est rapide et totale, elle est de 40%.	Atteint en 4h. Il est de 0.4mg/l pour un Cp à 75mg et de 0.5mg/l pour un Cp à 100mg.
Solution injectable à 75mg/3ml	L'absorption est rapide.	Atteint en environ 20min. Il est de 2.5mg/l.

b. Distribution

Dans le plasma, 99% de la dose administrée se trouve sous forme liée aux protéines plasmatiques. La diminution des concentrations plasmatiques est biphasique. Elle correspond à une phase rapide de distribution tissulaire et à une phase plus lente d'élimination.

Le Diclofénac passe faiblement dans le lait maternel. Il diffuse aussi dans le liquide synovial où les concentrations maximales sont mesurées 2 à 4 heures après le pic plasmatique [32].

c. Métabolisme

Le Diclofénac subit un métabolisme essentiellement hépatique, rapide et pratiquement total. Les principales voies métaboliques sont l'hydroxylation et la glycuconjugaison, qui conduisent à des métabolites inactifs [32].

d. Elimination

L'excrétion est à la fois urinaire et biliaire avec un cycle entéro-hépatique. Dans les urines, moins de 1% de la quantité administrée est éliminée sous forme inchangée alors qu'environ 60% est éliminée sous forme de métabolites.

La demi-vie d'élimination plasmatique du Diclofénac inchangé se situe autour de 1 à 2 heures. La clairance plasmatique totale est d'environ 263 ml/minute [32].

4. Indications

Elles sont réservées au traitement symptomatique ;

➤ De courte durée des :

- Rhumatismes inflammatoires en poussées ;
- Lombalgies aiguës ;
- Radiculalgies ;
- Crises de coliques néphrétiques ;
- Œdèmes postopératoires et post-traumatiques.

➤ Au long cours :

- Rhumatismes inflammatoires chroniques ;
- Certaines arthroses douloureuses et invalidantes [33].

5. Contre-indications

- Grossesse, en particulier à partir de 6^{ème} mois ;
- Antécédent de crise d'asthme liés à la prise d'anti-inflammatoires non stéroïdiens ;
- Ulcère gastroduodénal en évolution ;
- Insuffisance hépatique, cardiaque ou rénale sévère ;
- Trouble de l'hémostase et patient sous anticoagulant [31,33].

6. Surdosage

Une prise sur-dosée (>150 mg/ jour) de Diclofénac se manifeste par les symptômes suivants :

- Céphalées, agitation motrice, secousses musculaires, irritabilité accrue, ataxie, vertiges ;
- Convulsions, surtout chez l'enfant en bas âge ;
- Douleurs épigastriques, nausées, vomissements, diarrhée, ulcère gastroduodénal ;
- Troubles de la fonction hépatique.

➤ **Conduite à tenir**

- Transfert immédiat en milieu hospitalier spécialisé ;
- Traitement symptomatique :
 - Accélération d'élimination, dialyse en cas d'intoxication grave s'accompagnant d'insuffisance rénale ;
 - Diazépam ou phénobarbital en cas de convulsion [33].

IV-

**EVALUATION PHARMACO-TOXICOLOGIQUE
D'UN ANTI-INFLAMMATOIRE**

CHAPITRE IV : EVALUATION PHARMACO-TOXICOLOGIQUE D'UN ANTI-INFLAMMATOIRE

L'évaluation de la qualité d'un médicament nécessite une combinaison d'essais organoleptique, physicochimique, microbiologique et pharmaco-toxicologique. Dans notre travail, nous s'intéressons au contrôle de la qualité pharmaco-toxicologique.

1. L'évaluation de la toxicité

1.1. Test de la toxicité anormale

Le test de toxicité anormale est aussi appelé test d'innocuité selon la nomenclature de l'OMS.

C'est un test in vivo réalisé sur 5 souris saines pesant chacune de 17 à 23 g. Il consiste à injecter par voie intra-péritonéale, un volume donné de produit à tester à dose thérapeutique maximale connue comme non toxique. Les souris seront mises sous observation pendant une période de 24 heures.

1.2. Recherche des endotoxines bactériennes « LAL test »

L'essai des endotoxines bactériennes a pour objectif la détection et la quantification des endotoxines produites par les bactéries gram négatif, en utilisant un lysat d'amœbocytes de limule «*Limulus polyphemus*» (un arthropode marin de sang bleu qui contient de l'hémocyanine au lieu d'hémoglobine) qui se coagule en contact des endotoxines bactériennes [34].



Figure 6: Photographie de limule : *Limulus polyphemus*.

L'essai peut être réalisé par 3 techniques :

- **Gélification** : coagulation du lysat en gel lorsque la concentration des endotoxines dans l'échantillon à tester est supérieure à la sensibilité du réactif ;
- **Turbidimétrie** : développement d'une turbidité par clivage d'un substrat endogène ;

- **Colorimétrie** : développement d'une coloration par clivage d'un complexe en un peptide et un chromogène synthétique : p-nitroaniline de couleur jaune lorsque il est scindé par la coagulase formée dans le lysat en présence des endotoxines [35].

1.3. Test de la tolérance cutanée

Ce test fait partie des tests de l'évaluation de la toxicité in vivo, il a pour objectif d'évaluer le risque apporté par l'utilisation d'un produit chimique et /ou d'un médicament chez l'homme, en se basant sur les résultats des essais sur l'animal.

Il se pratique sur des lapins, chez lesquels le produit à tester est appliqué directement au niveau du dos sur des zones préalablement épilées. Deux lectures (à 24 heures puis à 72 heures) permettent d'apprécier l'éventuel érythème et/ou œdème.

Par un système de cotation, un indice d'irritation primaire cutanée (IPc) est calculé. Il permet de classer le produit en 4 catégories :

- Non irritant ;
- Légèrement irritant ;
- Irritant ;
- Très irritant [34].

1.4. Essai des pyrogènes

➤ Principe

L'essai consiste à mesurer l'élévation de la température provoquée par injection intraveineuse chez les lapins, d'une solution stérile d'un produit à examiner.

➤ Procédure

Des groupes de 3 lapins, en bonne santé, mâles ou femelles, de poids corporel supérieur ou égal à 1,5 kg sont utilisés.

Les lapins sont maintenus dans des boîtes individuelles, immobilisés par la nuque à l'aide d'un collier spécial non serré, dans un lieu tranquille pour ne pas exciter les animaux.

Les lapins sont privés de nourriture seulement pendant la nuit précédant l'essai et de nourriture et de l'eau pendant l'essai.

L'échantillon à examiner doit être chauffé au préalable à 38,5 °C environ, et injecté lentement dans la veine marginale de l'oreille du lapin.

A l'aide d'un thermomètre électrique avec une précision de 0,1 °C introduit dans le rectum du lapin à une profondeur de 5 cm environ, déterminer la température initiale moyenne avant l'injection et la température maximale dans les 3 heures qui suivent l'injection.

La température individuelle est mesurée chaque 30 min dans les 90 min qui précèdent l'injection de la solution à examiner puis dans les 3 h qui suivent.

➤ **Evaluation**

La somme de la différence entre la température maximale et la température initiale moyenne de chaque lapin est calculée pour chaque groupe.

L'interprétation des résultats de l'essai se fait selon le tableau suivant :

Tableau IV: Interprétation des résultats de l'essai selon la différence entre la température maximale et la température initiale moyenne.

Nombre de lapins	Le produit satisfait à l'essai Si la somme des réponses n'est pas supérieure à :	Le produit ne satisfait pas à l'essai si la somme des réponses est supérieure à :
3	1.15 °C	2.65 °C
6	2.80 °C	4.30 °C
9	4.45 °C	5.95 °C
12	6.60 °C	6.60 °C

Si la somme des réponses se situe entre la valeur de la deuxième colonne et la valeur de la troisième colonne du tableau, répétez l'essai comme indiqué ci-dessus [34].

2. L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire

2.1. Méthodes in vivo

2.1.1. Œdème de la patte

➤ **Principe**

Le principe de cette méthode est basé sur l'aptitude d'un agent anti-inflammatoire à inhiber l'œdème produit au niveau de la patte postérieure du souris ou du rat après l'injection d'un agent phlogogène (la levure de bière, le formaldéhyde, le dextran, l'albumine d'œuf, les polysaccharides tel que la carragénine) [36].

L'effet peut être mesuré de plusieurs façons ; on mesure le diamètre de l'articulation tibiotarsienne à l'aide d'un pied à coulisse, on estime le volume dans un pléthysmomètre, ou on pèse la patte sectionnée à l'articulation [5].

➤ **Procédure**

Le test est réalisé sur des souris de poids corporel compris entre 17 et 23g ou sur des rats pesants entre 100 et 150g, de sexe mâles ou femelles. Les animaux sont mis à jeûne pendant la nuit pour assurer une hydratation uniforme.

- A l'aide d'une sonde gastrique, les animaux reçoivent un volume d'eau physiologique (lot témoin) ou de médicament à tester dissous ou en suspension dans le même volume d'eau (lot test) ;
- Après 30 minutes, la substance phlogogène est injectée en sous cutanée dans le coté plantaire de la patte postérieure droite [36].

➤ **Evaluation**

Pour chaque animal, l'augmentation du volume et/ou du poids de la patte postérieure droite après 3 ou 6 heures est calculée en pourcentage et comparé au volume mesuré immédiatement après l'injection de l'agent phlogogène ou au poids de la patte postérieure gauche.

La différence entre les valeurs moyennes des animaux du lot test et ceux du lot témoin est calculée pour chaque intervalle de temps et évaluée statistiquement [36].

2.1.2. Œdème de l'oreille

➤ **Principe**

L'œdème de l'oreille induit par l'oxazolone chez la souris est un modèle des hypersensibilités retardées de contact, il permet l'évaluation quantitative de l'activité topique et systémique d'un anti-inflammatoire à administration locale.

➤ **Procédure**

Des souris de sexe mâle et femelle pesant 25 g sont utilisées. Dix animaux pour chaque groupe (test et témoin).

Préparer une solution de 2% de l'oxazolone dans de l'acétone et l'appliquer à l'intérieur de deux oreilles des souris sous anesthésie.

Réappliquer la solution d'oxazolone huit jours plus tard pour le groupe témoin et la solution d'oxazolone dans laquelle le composé d'essai est dissout pour le groupe d'essai.

Après 24 heures, les animaux sont sacrifiés sous anesthésie, les oreilles sont enlevées et les disques sont immédiatement pesés à l'aide d'une balance. La différence de poids est un indicateur de l'œdème inflammatoire.

➤ **Evaluation**

Les valeurs moyennes de l'augmentation de poids sont calculées pour chaque groupe, les résultats du groupe traité sont comparés statistiquement avec ceux du groupe témoin [36].

2.1.3. Erythème aux rayons ultraviolets

➤ **Principe**

Le test a pour but d'apprécier l'intensité d'un érythème de la peau épilée du cobaye albinos exposée aux rayons ultraviolets prétraitées par voie systémique avec un AINS.

➤ **Procédure**

Des cobayes albinos de 2 sexes ayant un poids corporel moyen de 350 g sont utilisés.

Quatre animaux sont utilisés pour chaque groupe (test et témoin).

- Les animaux sont rasés au niveau du dos dix-huit heures avant l'essai.
- Le lendemain, le composé à tester est dissous dans un véhicule, la moitié de la quantité de ce composé est administrée par gavage aux animaux du groupe test 30 minutes avant l'exposition aux ultraviolets, alors que le groupe témoin est traité avec le véhicule seul.
- La lampe à ultraviolets est placée à une distance constante de 20 cm au-dessus de l'animal pendant 2 min. Puis la moitié restante du composé à tester est administrée.
- L'érythème est marqué 2 et 4 h après l'exposition.

➤ **Évaluation**

Le degré d'érythème est évalué visuellement par 2 différents manipulateurs. Les scores suivants sont donnés:

- 0 = Pas d'érythème,
- 1 = Faible érythème,
- 2 = Fort érythème,
- 4 = Très fort érythème.

Les animaux avec un score de 0 ou 1 sont considérés comme protégés [5, 36].

2.1.4. Perméabilité capillaire

➤ Principe

Le test est utilisé pour évaluer l'activité inhibitrice d'un anti inflammatoire contre l'augmentation de la perméabilité vasculaire induite par l'injection intradermique d'une substance irritante provoquant la dégranulation des mastocytes donc une libération des médiateurs de l'inflammation, Cela conduit à une dilatation des artérioles et veinules et à une perméabilité vasculaire accrue.

➤ Procédure

Des rats mâles Sprague-Dawley ayant un poids corporel entre 160 et 200 g sont utilisés. Dix animaux pour chaque groupe (test et témoin).

- Les faces ventrales des animaux sont rasées. Une solution à 1% de bleu d'Evan est injectée par voie intraveineuse.
- Une heure plus tard, les animaux sont traités avec le composé d'essai.
- Une solution à 0,01% du composé irritant est injectée 30 minutes plus tard par voie intradermique sur 3 sites.
- Les animaux sont sacrifiés 90 minutes après l'injection du composé irritant. La peau abdominale est enlevée et les zones colorées sont mesurées.

➤ Évaluation

Le diamètre des zones du colorant infiltré est mesuré en millimètres suivant deux directions perpendiculaires et les valeurs moyennes de tous les sites d'injection chez le même animal sont calculées.

Le pourcentage d'inhibition chez les animaux traités est calculé par rapport au groupe témoin [5, 36].

2.1.5. Technique de la poche granulomateuse

➤ Principe

La méthode a pour objectif le dépistage d'une inflammation aseptique entraînant la formation de poche granulomateuse rempli d'exsudat hémorragique après injection d'air et d'un irritant. L'anti-inflammatoire est donné pendant l'essai pour empêcher la formation du granulome.

➤ **Procédure**

Des Rats Sprague-Dawley mâles ou femelles à un poids compris entre 150 et 200 g sont utilisés. Dix animaux sont pris pour chaque groupe (test et témoin).

Le dos des animaux est rasé et désinfecté. Avec une aiguille très fine, un pneumoderme est fait au niveau de la peau dorsale par injection de 20 ml d'air sous anesthésie à l'éther.

Dans la Poche d'air obtenue, une solution de la carragénine est injectée en évitant toute fuite d'air. 48 h plus tard, l'air de la poche est retiré.

Le composé d'essai est injecté chaque jour directement dans le sac d'air pour tester l'activité locale.

Après le septième jour, les animaux sont sacrifiés sous anesthésie. La poche est ouverte et l'exsudat est recueilli dans des bouteilles en verre dont on mesure le volume et on dénombre les cellules: polynucléaires, lymphocytes, histiocytes, mastocytes.

➤ **Évaluation**

La valeur moyenne de l'exsudat du groupe témoin et du groupe test est calculée. Une comparaison est faite par des moyens statistiques. Une courbe claire dose-réponse pourrait être établie par injection des doses excessives du médicament testé [5, 36].

2.1.6. Arthrite à l'adjuvant complet de Freund

➤ **Principe**

Ce test est utilisé comme model d'inflammation chronique expérimentale.

L'adjuvant de Freund est une suspension de bacilles tuberculeux atténués ou une émulsion de cire D de bacille tuberculeux, injecté par voie intra-articulaire, induisant une réaction inflammatoire primaire immédiate et une réaction inflammatoire secondaire retardée à distance de site d'injection traduisant une hyper-immunisation.

➤ **Procédure**

Des souris mâle ayant un poids corporel entre 30 et 35g sont utilisées, dont 6 souris par lot.

L'adjuvant complet de Freund à 0.5% est injecté dans la région plantaire de la patte postérieure droite des souris.

Le produit à tester, le produit de référence ainsi que la solution saline sont administrés par la voie orale une fois par jour pendant 2 semaines :

- Le lot témoin négatif a reçu de l'eau distillée ;
- Le lot test a reçu le produit à tester ;
- Le lot témoin positif a reçu le produit de référence.

Les souris vont être examinées tous les 3 jours pour suivre l'évolution de l'inflammation.

L'incidence de l'arthrite est jugée macroscopiquement. Chaque patte sera examinée à la recherche d'un gonflement et d'une rougeur.

➤ **Evaluation**

La gravité de l'arthrite a été classée sur une échelle de 0 à 3 pour chaque patte selon le degré de rougeur et de gonflement :

- Grade 0 = indiqué normale ;
- Grade 1 = un gonflement léger de l'articulation et / ou une rougeur de la patte ;
- Grade 2 = un gonflement évident de l'articulation ;
- Grade 3 = un gonflement sévère et une fixation de l'articulation [5, 38].

2.1.7. Test de pleurésie

➤ **Principe**

La pleurésie est une inflammation exsudative, peut être induite par divers agents irritants.

Dans ce modèle d'essai, le fluide d'extravasation, la migration des leucocytes et les divers paramètres biochimiques impliqués dans la réponse inflammatoire peuvent être mesurés facilement dans l'exsudat.

➤ **Procédure**

Des rats Sprague-Dawley mâles ayant un poids entre 220 et 260g sont utilisés. 10 rats par groupe.

La peau des côtes droites du rat est rasée et frottée avec de l'alcool.

Une petite incision est faite entre la septième et huitième côte, et une autre peu profonde est faite dans le muscle intercostal.

Une solution de carragénine à 2% est injectée dans la cavité pleurale à travers cette incision.

Une heure avant, 24h et 48h après l'injection de carragénine, le groupe test est traité avec le composé d'essai alors que le groupe témoin ne reçoit que le véhicule du médicament.

Les animaux sont sacrifiés 72 h après l'injection de la carragénine. L'exsudat de la cavité pleurale est aspiré à l'aide d'une pipette, et recueilli dans un tube en plastique gradué.

➤ **Evaluation**

Plusieurs paramètres peuvent être mesurés:

- Mesure du nombre de globules blancs dans l'exsudat à l'aide d'un compteur « Coulter ou un hémocytomètre » ;
- Détermination des activités lysosomiales enzymatiques ;

- Détermination de la fibronectine ;
- Détermination de la PGE2 [36].

2.2. Méthodes in vitro

2.2.1. Mesure de l'activité inhibitrice de COX

Ce test se réalise sur le sang total comme source d'enzymes [37]. Les échantillons sanguins sont obtenus par ponction veineuse au pli du coude, avant chaque traitement, après prise unique et à l'état d'équilibre [39]:

- **L'activité inhibitrice sur la COX-1**

Le sang total est incubé 1 heure à 37°C au bain-marie dans un tube en verre. Le sérum est recueilli par centrifugation et conservé à -20°C [39].

L'activité inhibitrice sur la COX-1 est mesurée par immuno-enzymologie dans le sérum par la synthèse plaquettaire de thromboxane B2 ; métabolite stable du thromboxane A2, sous l'action de la thrombine lors de la coagulation spontanée (1 h à 37°C) [37].

- **L'activité inhibitrice sur la COX-2**

Le sang total est recueilli sur 10µl d'héparinate de sodium et pré-incubé 15 minutes à 37 °C en présence de l'aspirine (inactivation de la COX-1 plaquettaire).

Le sang est incubé ensuite 24 heures à 37°C en présence d'endotoxine bactérienne.

Les plasmas sont recueillis par centrifugation et conservés à -20°C [39].

L'activité inhibitrice sur la COX-2 est mesurée par immuno-enzymologie dans le plasma par la synthèse de prostaglandine E2 par les monocytes activés sous l'effet d'endotoxine bactérienne [37].

Par la suite, des courbes doses-réponses peuvent être établies et permettent de calculer les DE50 (dose efficace pour inhiber 50 % d'activité des COX).

L'activité de l'AINS sur COX1 et COX2 est exprimée par le rapport :

$$\boxed{\boxed{\text{L'activité} = \text{DE50 COX1} / \text{DE50 COX2}}}$$

Plus ce rapport est élevé, plus l'AINS sera qualifié comme étant sélectif vis-à-vis de la COX-2 [37].

PARTIE PRATIQUE



Notre travail a été réalisé au niveau de service pharmaco-toxicologie du laboratoire national de contrôle des produits pharmaceutiques (LNCPP) qui se situe à Delly Ibrahim-Alger, il a porté sur le contrôle d'innocuité et de l'activité d'un anti-inflammatoire non stéroïdien : le **Diclofénac**.

Nous avons effectué notre contrôle sur :

- La matière première du Diclofénac ;
- Le produit fini du Diclofénac sous forme de **solution injectable** à la concentration de **75mg/3ml**, et sous forme **topique gel** à **1%**.

Pour atteindre nos objectifs fixés dans ce travail, nous avons eu recours à des méthodes in vivo ainsi que in vitro :

- Test de la toxicité anormale ;
- LAL test (essai de recherche des endotoxines bactériennes) ;
- Test de la tolérance cutanée ;
- Œdème de la patte induit par la carragénine chez les souris.

Le laboratoire National de Contrôle des Produits Pharmaceutique (LNCPP) : est un établissement administratif, doté de l'autonomie financière, placé sous la tutelle du ministère chargé de la santé selon le décret exécutif n° 93-140 du 14 juin 1993.

Il a été désigné le 07 décembre 2003, comme centre collaborateur de l'OMS pour la conformité des médicaments (CECOMED).

Le **LNCPP** a pour mission principale :

- Le contrôle réglementaire et l'expertise des produits pharmaceutiques (les médicaments, les réactifs biologiques ...), les dispositifs médicaux... et tous autres produits nécessaires à la médecine humaine ;
- Le suivi du contrôle de la qualité et de l'inspection ;
- L'évaluation, l'enregistrement des produits pharmaceutiques et l'homologation des dispositifs médicaux ;
- La révision, et le renouvellement de l'autorisation de mise sur le marché [40].

I-

MATERIELS ET METHODES

I. MATERIELS ET METHODES

Evaluation de la toxicité et de l'activité du Diclofénac

1. Evaluation de la toxicité du Diclofénac

1.1. Test de la toxicité anormale

1.1.1. Objectif et principe

Ce test consiste à observer chez les souris des effets indésirables et inattendus (mortalité), après administration en une seule prise d'une dose maximale efficace non toxique du Diclofénac (sous forme de solution injectable), et cela afin de vérifier l'absence d'une toxicité anormale qui serait due à une toxicité surajoutée lors du processus de fabrication, de conditionnement ou de stockage du médicament.

L'essai est réalisé sur 5 souris sélectionnées de poids corporel entre 17 - 23g.

1.1.2. Locaux et conditions ambiantes

- Le test est effectué dans une salle tranquille et propre ;
- A l'abri du déplacement du personnel.

1.1.3. Matériels

a. Equipements

- Cage grillagée pour l'hébergement des souris ;
- Balance pour la pesée des souris.

b. Consommables et verreries

- Seringues jetables apyrogènes : 1ml, 2.5ml, 5ml ;
- Béchers ;
- Gants stériles.

c. Réactifs

▪ Réactifs biologiques

Souris albinos :

- Race : SWISS
- Sexe : femelle
- Poids : 17 – 23g

▪ Réactifs chimiques

- Le produit à tester : Diclofénac solution injectable de concentration 75mg/3ml ;
- Eau physiologique (NaCl 0.9%).

1.1.4. Mode opératoire

a. Calcul de la dose à administrer pour chaque souris

Il s'agit de choisir une dose maximale efficace non mortelle à administrer aux souris à partir des données sur la dose maximale efficace utilisée chez l'homme, en multipliant la première par un facteur de sécurité (facteur d'innocuité).

- D_h = Dose maximale chez l'homme : 150 mg/24h (2 ampoules de 75mg).
- P_h = Poids moyen chez l'homme : 60.10^3 g.
- P_s = Poids moyen chez la souris : 20 g.
- X = Dose administrée par souris :

Chez l'homme : 150 mg $\rightarrow$ 60.10^3 g

Chez la souris : X $\rightarrow$ 20g

$$X = D_h \times P_s / P_h$$

$$X = \frac{20 \times 150}{60.10^3}$$

$$X = 0.05\text{mg}$$

Le facteur d'innocuité est de $f=10$

$$X = 0.05 \times 10$$

$$X = 0.5\text{mg}$$

➤ Calcul de dilution :

75mg → 3ml (1 ampoule)

0.5mg → $V_{\text{Diclofénac}}$

$$V_{\text{Diclofénac}} = \frac{0.5 \times 3}{75}$$

$V_{\text{Diclofénac}} = 0.02\text{ml}$

On injecte 0,5ml de dilution par souris ; de ce fait le volume de l'eau physiologique à ajouter est de V :

$$V = 0.5 - 0.02$$

$V_{\text{eau physiologique}} = 0,48\text{ml}$
--

Pour préparer un volume suffisant pour injecter 0.5 ml pour chaque souris (nombre de souris=5), on va préparer un volume total de 5 ml, pour cela on mélange 0.2 ml de Diclofénac avec 4,8ml d'eau physiologique.

b. Administration du produit

- Sélectionner 5 souris de sexe femelle de poids corporel entre 17 et 23g mises à jeun pendant 12h.
- Remplir une seringue de 1ml avec 0.5ml de la dilution préparée.
- Tenir la souris dans la main gauche, la peau du cou étant tirée entre le pouce et l'index, la queue maintenue contre la paume de la main par les autres doigts.
- Enfoncer l'aiguille en biais (angle de 45°) le biseau de l'aiguille en face le manipulateur.
- Piquer de préférence du côté gauche de l'animal pour éviter le foie et pas trop bas de façon à ne pas atteindre la vessie (administration par voie intra péritonéale).
- Dès que la sensation de résistance est vaincue, ne pas trop pénétrer en profondeur (5 mm seulement) afin de ne pas léser les viscères.
- Après injection, retirer l'aiguille et libérer la souris dans la cage.

NB : La voie d'administration est la voie intra musculaire chez l'homme; qui est difficile à réaliser chez la souris.



Figure 7: Pesée et sélection des souris



Figure 8: Contention des souris.



Figure 9 : Administration intra péritonéale de la solution de Diclofénac.

1.1.5. Lecture des résultats

Les 5 souris sont mises en observation pendant 24h dans les conditions habituelles de température et d'humidité en présence de nourriture selon les indications portées sur le dossier technique ou précisées sur la monographie.

1.1.6. Interprétation des résultats

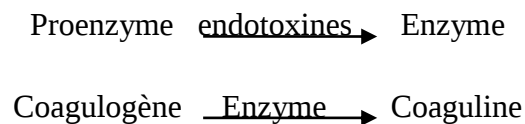
- Le résultat est satisfaisant si aucun des animaux ne présente des signes de morbidité ni de mortalité.
- Si l'un des animaux présente des signes de mortalité ou de morbidité, répétez l'essai :
Le résultat est satisfaisant si aucun des animaux du second groupe ne présente des signes de morbidité ni de mortalité au cours de la période d'observation prescrite.
- Si plus d'un animal présente des signes de mortalité ou de morbidité, le produit examiné n'est pas conforme.

1.2. Essai de recherche des endotoxines bactériennes « LAL test »

1.2.1. Objectif et principe

L'essai de recherche des endotoxines bactériennes a pour but la détection et la quantification des endotoxines des bactéries Gram négatif dans les produits pharmaceutiques à usage parentéral, en utilisant la propriété du lysat d'amœbocytes de limule de se coaguler en présence d'endotoxines.

Une certaine quantité d'endotoxine est nécessaire pour activer une proenzyme du lysat d'amœbocyte de limule en une enzyme gélifiante qui conduit à l'hydrolyse du coagulogène en coaguline insoluble et former un gel.



Cette coagulation résulte d'une cascade de réactions, qu'elle repose sur trois types de sérine-protéases: le facteur C, le facteur G et la pro-coagulase, ainsi que sur le coagulogène (une protéine des arthropodes qui ressemble au fibrinogène, qui est capable de former un gel).

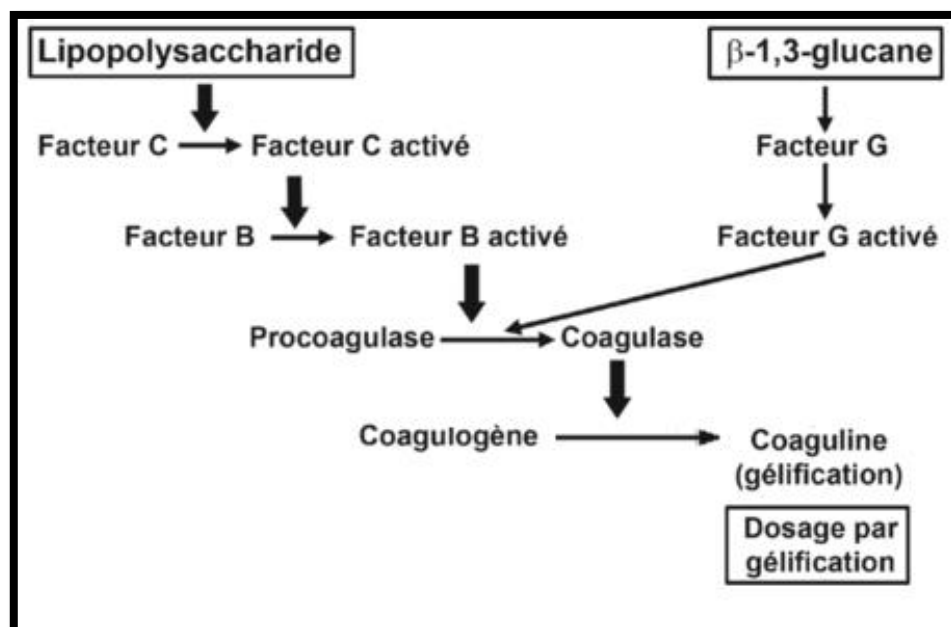


Figure 10 : Schéma réactionnel général des différentes méthodes LAL.

1.2.2. Locaux et conditions ambiantes

- L'essai doit être effectué dans une salle propre réservée uniquement à la recherche d'endotoxines à l'abri des courants d'air et des déplacements du personnel ;
- La paillasse est soigneusement javellisée avant et après l'essai ;
- Utilisation d'un matériel exempt d'endotoxines ;
- Travailler sous hotte à flux laminaire vertical ;
- Absence de toute vibration ou magnétisme.

1.2.3. Matériels

a. Equipements

- Vortex ;
- Bain à sec 37°C $\pm$ 1°C ;
- Hotte à flux laminaire vertical.

▪ Petits matériels

- Distributeur combitips ;
- Chronomètre ;
- Thermomètre ;
- Pipettes automatiques;
- Portoir pour tube.

b. Consommables

- Tubes à réactions en verre exempts d'endotoxines de 10x75mm à fond rond avec un bouchon à vice en polypropylène à usage unique ;
- Tubes à dilutions en verre silex de 13x100mm exempts d'endotoxines à usage unique ;
- Embouts en polypropylène exempts d'endotoxines ;
- Papier pH ;
- Combitips exempts d'endotoxines de 2ml et 5ml à usage unique ;
- Rouleau de parafilm ;
- Gants stériles.

c. Réactifs

▪ Réactifs biologiques

- Lysat d'amœbocytes de limule (LAL).

▪ Réactifs chimiques

- Eau qualité LAL ;
- Contrôle standard d'endotoxine (CSE) ;
- NaOH et HCl 0,1N exempts d'endotoxines ;
- Produit à tester : le Diclofénac solution injectable de concentration 75mg/3ml.

1.2.4. Mode opératoire

➤ Reconstitution du lysat

- Décapsuler le flacon de lysat et faire descendre le maximum de lyophilisat au fond du flacon ;
- Avec un instrument stérile et exempt d'endotoxines, soulever lentement le bouchon pour casser le vide et reconstituer le lysat avec un volume d'eau qualité LAL comme indiqué par le fabricant ;
- Reboucher le flacon immédiatement avec du parafilm coté papier protecteur, puis homogénéiser manuellement par un mouvement de huit (il faut éviter la formation de la mousse) ;
- Aliquoter la solution ainsi reconstituée dans des tubes à réaction à raison de 100 µl /tube ;
- Incrémenter sur ces tubes la date de reconstitution du lysat ainsi que sa sensibilité ;
- Conserver ces tubes au congélateur, selon les recommandations du fabricant ;
- Avant chaque utilisation, retirer le(s) tube(s) et décongeler le lysat à la température ambiante afin d'éviter toute destruction protéique.

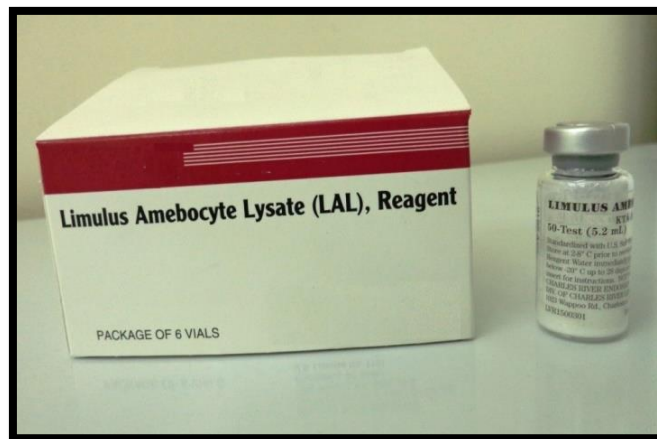


Figure 11 : Flacon de Lysat d'amoebocytes de limule.

➤ Reconstitution de l'endotoxine

- Décapsuler le flacon de CSE et faire descendre le maximum de lyophilisat au fond du flacon ;
- Avec un instrument stérile et sans endotoxines, soulever lentement le bouchon pour casser le vide et reconstituer l'endotoxine avec un volume d'eau qualité LAL ;
- Fermer le flacon par un carré de parafilm du côté papier protecteur. ;
- Selon les recommandations du fabricant, agiter au vortex le lyophilisat d'endotoxines ainsi reconstitué et conserver entre +2°C et +8°C.

NB : Avant et après chaque manipulation, la solution mère d'endotoxines doit être agitée au vortex car les endotoxines adhèrent à la paroi de la bouteille.

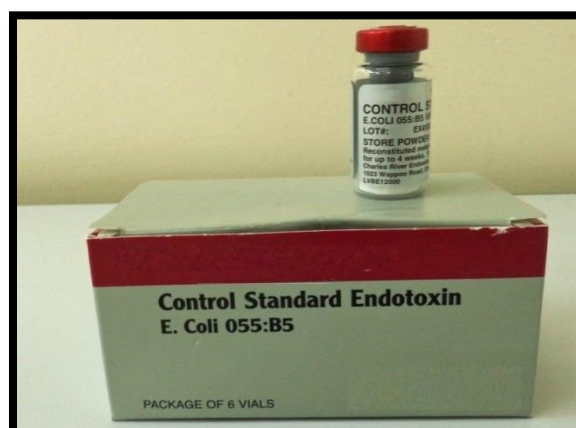


Figure 12 : Flacon de contrôle standard d'endotoxine.

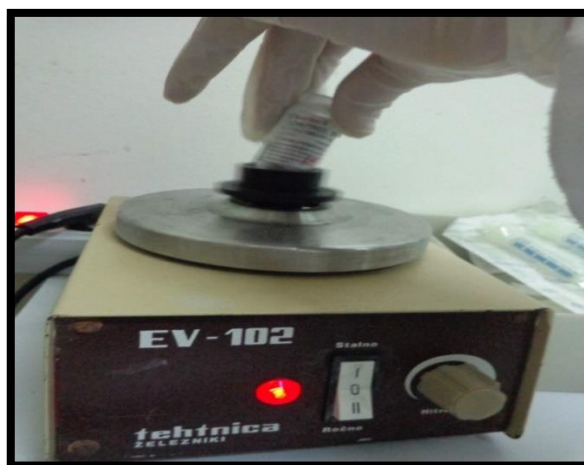


Figure 13: Agitation au vortex de CSE avant et après la manipulation.

1.2.4.1. Qualification initiale ou validation de la sensibilité du lysat

La qualification initiale est obligatoire en cas de changement de l'un des 5M : Méthode, Matériel, Matière, Milieu et Manipulateur.

C'est une étape de validation qui consiste à confirmer la sensibilité du lysat déclarée par le fabricant, donc la confirmation d'absence d'endotoxines dans les réactifs utilisés.

Cette étape permet donc la validation des 5 M. Elle s'effectue comme suit :

- **Reconstitution du lysat**

- Constituer une solution du lysat avec un volume de 5 ml d'eau qualité LAL ;
- Aliquoter cette solution dans des tubes à réaction de 100µl/ tube.

La sensibilité du notre lysat déclarée par le fabricant est de $\lambda = 0.03\text{UI/ml}$, elle est définie comme étant la plus faible concentration d'endotoxines que le lysat peut détecter.

- **Reconstitution de l'endotoxine**

- Reconstituer la solution d'endotoxine avec de l'eau LAL de façon à obtenir une solution standard d'endotoxines de concentration $\text{CSE} = 20\text{UI/ml}$, à partir de laquelle préparer une solution de concentration $\text{CSE} = 0,24\text{UI/ml}$ soit 8λ ;

$$20\text{UI} \longrightarrow 1 \text{ ml}$$

$$0,24\text{UI} \longrightarrow V \text{ ml}$$

$$V = \frac{0,24 \times 1}{20}$$

$$V = 0,012 \text{ ml}$$

- Pour préparer 2ml de la solution 8λ, prélever 2V soit 0,024ml de la solution CSE et compléter avec de l'eau qualité LAL jusqu'à 2ml ;
- Agiter au vortex la lyophilisation d'endotoxines ainsi reconstituée et la conserver à une température comprise entre +2 et +8 °C.

▪ **Préparation de la gamme d'endotoxine dans l'eau LAL**

- A partir de la solution de 8λ= 0,24UI/ml, effectuer des dilutions au 1/2 soit 4 λ, 2 λ, λ, λ/2, λ/4 correspondant respectivement à 0.12, 0.06, 0.03, 0.015, 0.0075 UI/ml ;
- Agiter au vortex chaque dilution d'endotoxines pendant une minute ;
- Constituer 4 séries de 1ml de la gamme des dilutions à 4λ, 2λ, λ, λ/2, λ/4 ;
- Ajouter à chaque série un tube témoin négatif constitué de 100μl d'eau LAL ;
- A chaque 100μl de la dilution ou d'eau LAL contenus dans le tube à réaction, ajouter 1ml de lysat ;
- Incuber pendant 60±2 minutes les tubes à réaction dans le bain à sec réglé à 37±1°C.

Tableau V : Série des dilutions des solutions d'endotoxines pour la validation initiale

Tubes	Solution à ajoutée	L'eau qualité LAL	Concentration d'endotoxine UI/ml
8λ	0,024ml de CSE	1,976ml	0,24
4λ	1ml de 8λ	1ml	0,12
2λ	1ml de 4λ	1ml	0,06
λ	1ml de 2λ	1ml	0,03
λ/2	1ml de λ	1ml	0,015
λ/4	1ml de λ/2	1ml	0,0075

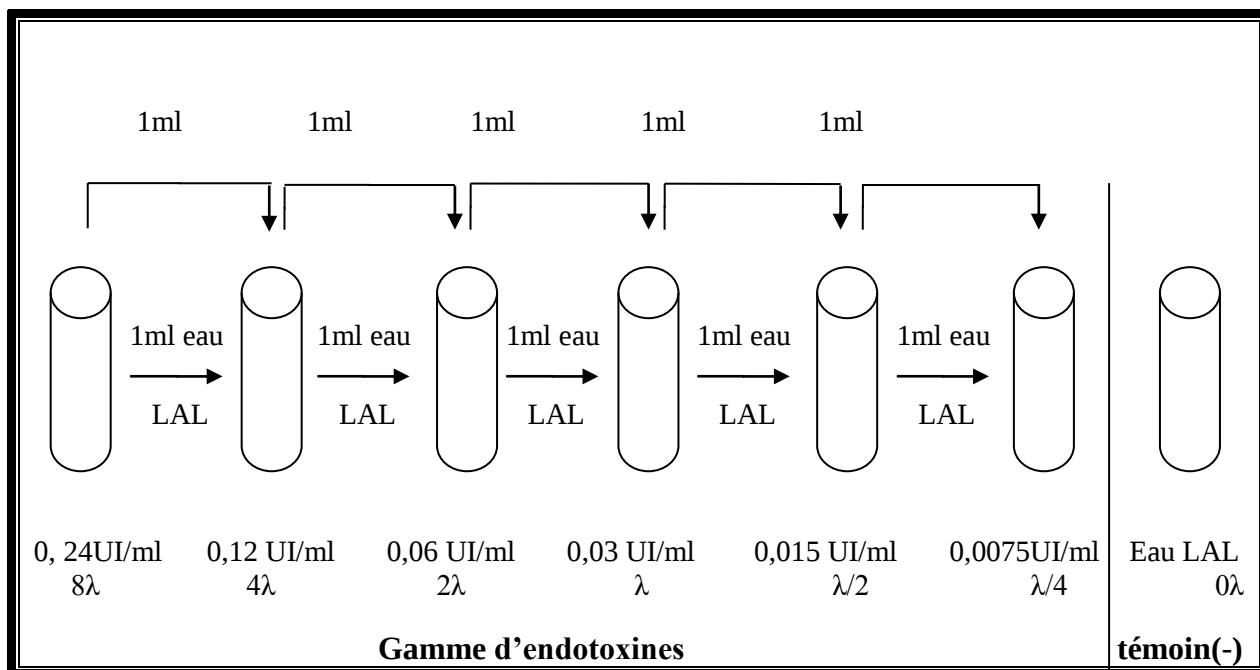


Figure 14 : Schéma récapitulatif de l'étape de validation de la sensibilité de lysat.

➤ Résultats

- A la fin de l'essai, sortir les tubes, les retourner lentement et faire la lecture comme indiqué ci-dessous :
 - Le test est positif si le gel est ferme et ne se casse pas.
 - Le test est négatif si le gel prend un aspect mou ou le mélange reste fluide.

▪ Détermination du point final

Le calcul de la sensibilité est réalisé par la détermination du point final :

- Déterminer les points finaux de chaque série, (le point final correspond à la concentration la plus faible qui donne un résultat positif) ;
- Calculer le logarithme décimal de chaque point final ;
- Calculer la moyenne géométrique des logarithmes à base 10 des points finaux.

$$\text{MG} = \frac{\sum \log \text{PE}}{N} \quad N=4$$

- Calculer la sensibilité du lysat

$$\lambda = \text{anti log MG}$$

Cette sensibilité expérimentale doit être comprise dans l'intervalle $\lambda/2$ et 2λ .

1.2.4.2. Essai final : contrôle du produit à tester

a. Caractérisation de l'échantillon

➤ Dilution maximale significative (D.M.S)

La DMS est la dilution maximale qui permet de s'assurer que le produit non dilué ne déclenchera pas de réactions indésirables si le résultat du test mené à cette dilution est négatif, En cas de test positif, le produit non dilué renferme des concentrations d'endotoxines suffisantes pour entraîner des effets indésirables.

$$DMS = \frac{LE}{\lambda} \times C$$

Avec :

$$LE = K/M$$

- **LE** : limite en endotoxines d'une substance administrée par voie parentérale, exprimée en UI /mg ou UI /unité d'activité biologique.
- **K** : dose seuil d'endotoxines en UI /kg/h qu'un patient peut recevoir sans effets toxiques, sa valeur dépend de la voie d'administration.
 - Voie intraveineuse (IV) : $K=5UI /kg /h$.
 - Produits radio pharmaceutiques administrés par voie IV = $2,5UI /kg /h$.
 - Voie intrarachidienne : $K= 0,2UI /kg/h$.
- **M** : dose maximale humaine de produit (pour un homme de 70kg) en mg ou UI /kg /h , administrée par la voie prévue.
- **C** : concentration du produit en mg/ml, UI/ml ou ml/ml.
- **λ** : sensibilité du lysat exprimée en UI/ml.

NB : Une unité internationale (U.I) d'endotoxines est équivalente à une unité d'endotoxines (U.E).

❖ Calcul de la dilution maximale significative :

$$DMS = \frac{LE}{\lambda} \times C$$

Avec : $LE = K/M$

- **M** : dose maximale de produit testé est de 150mg chez un homme de poids moyen 70kg :
 $M = 2,14 \text{ mg/kg/h}$.

- **C** : concentration du produit 75mg / ampoule de 3ml : C = 25mg/ml.
- **K** = 5UI /kg /h.
- λ = 0,03 UI/ml.

Donc : LE = 5 / 2,14

$$\boxed{\text{LE} = 2,33 \text{ UI/mg}}$$

$$\text{DMS} = \frac{2,33}{0,03} \times 25$$

$$\boxed{\text{DMS} = 1947}$$

❖ Calcul de la dilution testée (DT)

$$\text{DT} = \frac{1}{\text{DMS} / 2}$$

$$\boxed{\text{DT} \approx \frac{1}{900}}$$

b. Préparation de la dilution

La préparation de la dilution testée ($\frac{1}{900}$) a été effectuée en 2 étapes (2 dilutions) comme suit :

- Dilution 1 : $\frac{1}{90}$
 - Mélanger 10µl du produit à tester avec 890µl de l'eau qualité LAL ;
 - Agiter au vortex.
- Dilution 2 : $\frac{1}{10}$
 - Prélever 100µl de la dilution 1 et compléter 900 µl de l'eau qualité LAL.

c. Mesure du pH de la dilution

Le pH de la dilution finale du produit à tester est mesuré à l'aide de papier pH, il doit être compris entre 6 et 8 ;

Dans le cas contraire il est ajusté avec de la soude ou de l'acide chlorhydrique 0,1 N exempts d'endotoxines bactériennes.

d. Préparation de la surcharge

Nous avons préparé une solution surchargée à 2λ /ml soit 0,06 UI/ml, à partir de notre contrôle standard d'endotoxines à une concentration de 20 UI /ml.

- Recherche de volume à prélever du CSE :

$$\begin{array}{lcl} 20 \text{ UI} & \longrightarrow & 1 \text{ ml} \\ 0.06 \text{ UI} & \longrightarrow & V \text{ ml} \end{array}$$

$V = 0.003 \text{ ml} = 3 \mu\text{l}$
--

- Prélever $3\mu\text{l}$ de CSE et compléter jusqu'à 1ml pour avoir une solution surchargée à 2λ .
- Agiter au vortex le CSE avant et après l'utilisation.

e. Essai proprement dit

- Préparer les tubes du test comme suit :
- Un tube de contrôle négatif (eau LAL+lysate) : pour vérifier la qualité de l'eau LAL ;
- Un tube de contrôle positif (2λ dans l'eau LAL+lysate) : pour tester la sensibilité du lysate ;
- Deux tubes de produit à la dilution testée (DT) + lysate : pour tester le produit ;
- Deux tubes de produit à la dilution testée surchargé par 2λ + lysate : afin de vérifier s'il n'induit pas une inhibition de la réaction.
- Incuber les tubes à 37°C pendant 1heure dans un bain à sec sans agitation.

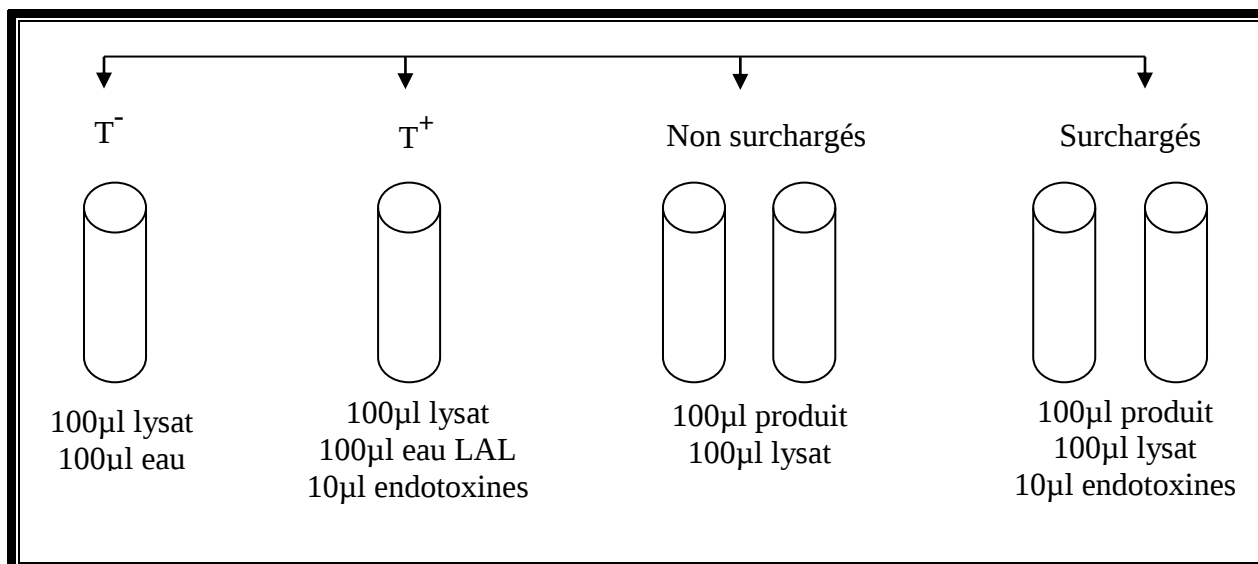


Figure 15 : Schéma récapitulatif de l'essai final.

- L'essai est résumé dans le tableau qui suit :

Tableau VI : Préparation des dilutions.

Réactifs Tubes	Lysat	Eau qualité LAL	Echantillon	Surcharge
Contrôle négatif	100µl	100µl	-	-
Contrôle positif	100µl	100µl	-	10µl
Produit surchargé	100µl	-	100µl	10µl
Produit surchargé	100µl	-	100µl	10µl
Produits à contrôler à la DT	100µl	-	100µl	-
Produits à contrôler à la DT	100µl	-	100µl	-

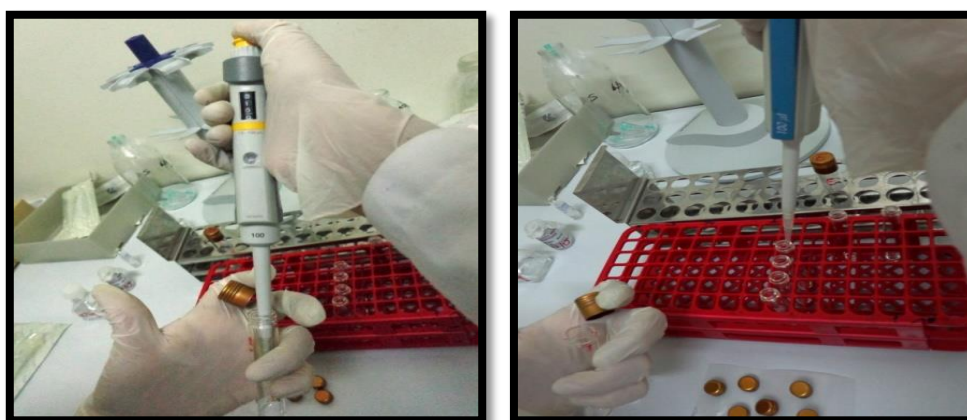


Figure 16 : Préparation des dilutions de l'essai final.

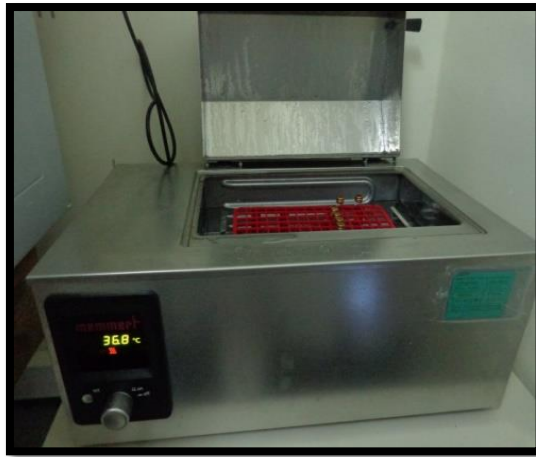


Figure 17 : Incubation des dilutions au bain marie.

1.2.5. Lecture des résultats

- Après 1h d'incubation au bain marie à 37°C, sortir les tubes et faire la lecture immédiatement en les retournant à un angle de 180° :
 - Le test est positif si un gel ferme et ne se casse pas, se forme au fond de tube ;
 - Le test est négatif si pas de formation de gel et le mélange reste fluide.

1.2.6. Interprétation des résultats

- L'essai est valable si :
 - Le contrôle négatif donne un résultat négatif et ne forme pas un gel.
 - Le contrôle positif et les deux tubes produits surchargés donnent un résultat positif.
- Si les deux tubes produits à contrôler non surchargés donnent une réaction négative : l'échantillon testé renferme moins de la valeur limite d'endotoxines (LE) : le produit est conforme ;
- Si l'un ou les deux tubes produit à contrôler non surchargés donnent une réaction positive l'échantillon testé renferme plus de la valeur limite d'endotoxines (LE), dans ce cas refaire le test à la DMS :
 - Si les deux tubes produit à contrôler donnent une réaction négative : le produit contient moins de la valeur limite d'endotoxine (LE) : le produit est conforme ;
 - Si l'un ou les deux tubes produit à contrôler donnent une réaction positive : le produit contient une concentration d'endotoxines supérieure à la valeur limite d'endotoxine (LE) : le produit est non conforme.

1.3. Test de la tolérance cutanée

1.3.1. Objectif et principe

Le test de la tolérance cutanée a pour but de connaître le risque d'un produit à application cutanée d'induire des signes d'irritation : des érythèmes et des œdèmes.

Le produit est appliqué sur une peau épilée saine et scarifiée de 6 lapins de race Néozélandaise.

Des lectures sont faites 24 heures et 72 heures après.

1.3.2. Locaux et conditions ambiantes

L'essai est effectué dans un lieu tranquille où aucune perturbation ne vient stresser les animaux.

1.3.3. Matériels

a. Equipement

- Tondeuse électrique.

- Petits matériels

- Ciseaux.

b. Consommable

- Gants jetables ;
- Lames de bistouris stériles ;
- Pansements stériles (compresse).

c. Réactifs

▪ Réactifs biologiques

Lapins albinos :

- Race : Néozélandaise ;
- Sexe : mâle ;
- Poids : >4kg.

▪ Réactifs chimiques

- Produit à tester : Diclofénac gel 1%.

1.3.4. Mode opératoire

a. Préparation des animaux

- Les 6 lapins ont été épilés au niveau du dos et des flancs, 24 heures avant l'application du produit, à l'aide d'une tondeuse électrique ;
- Les zones épilées, ont été ensuite rincées avec de l'eau pour obtenir une peau saine et glabre.



Figure 18 : Lapin après épilation.

b. Application du produit à tester

- Le jour de l'essai, effectuer sur le flanc droit à l'aide d'une lame bistouri stérile, trois scarifications espacées de 0.5 cm et longues de 3 cm, les scarifications doivent abraser la couche cornée sans provoquer de saignement. D'autre côté, le flanc gauche restant sain sans scarifications ;
- Déposer 0.5 grammes du produit à tester sur une compresse stérile, appliquer la compresse sur la peau glabre (côté scarifié et côté non scarifié) ;
- Couvrir la zone d'application en utilisant de la gaze et d'un pansement non occlusif ;
- Replacer les lapins dans des cages individuelles, en présence de l'eau et de nourriture (conditions habituelles).

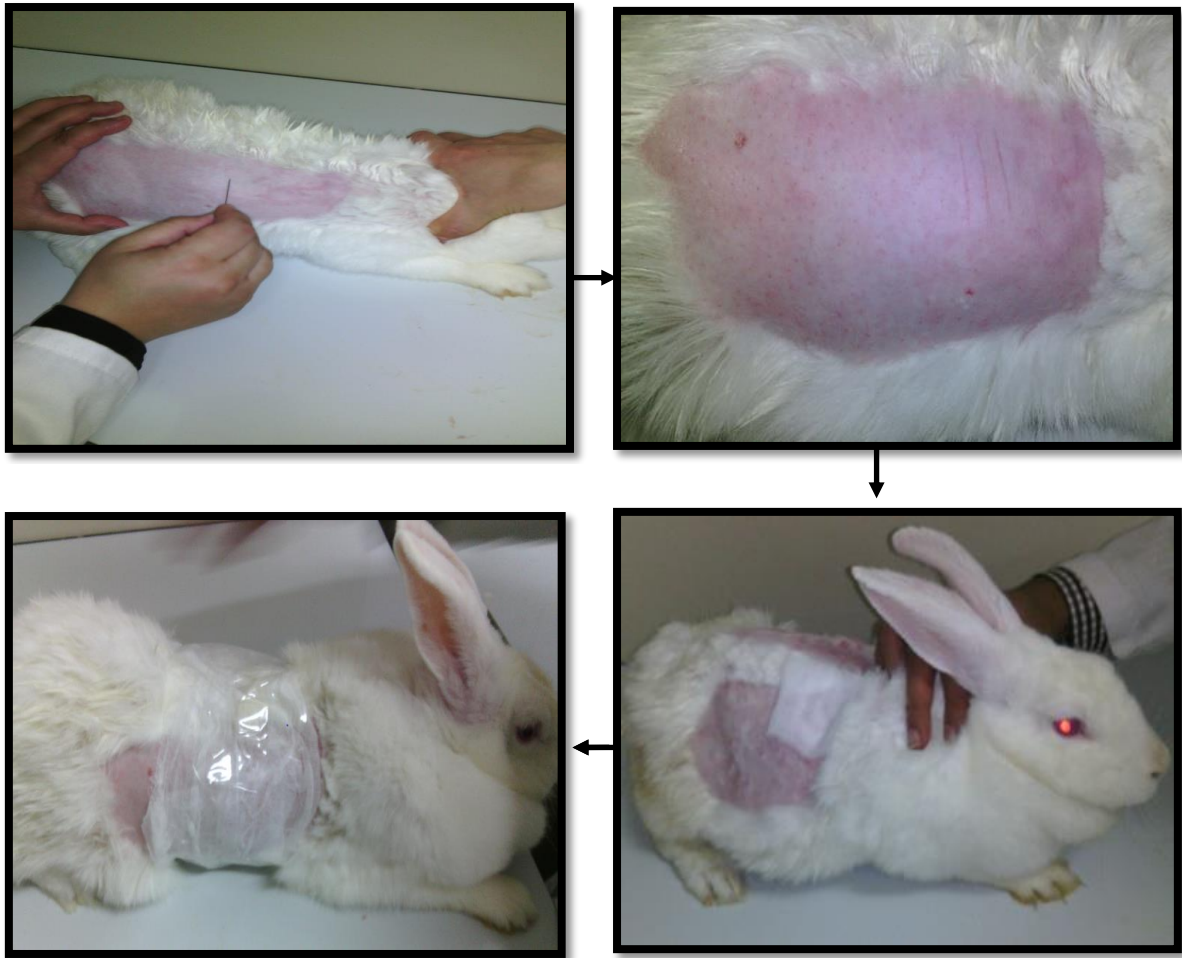


Figure 19 : Etapes de scarification et d'application du produit à tester.

1.3.5. Lecture des résultats

- Les pansements ont été ôtés, 24 heures plus tard. Les résultats sont lus au bout d'une demi-heure par au moins deux personnes distinctes ;
- Une seconde lecture a été faite 72 heures après l'application du produit.

Les lectures consistent à apprécier l'érythème et l'œdème selon l'échelle numérique suivante :

Tableau VII : Echelle numérique des phénomènes à observer

Erythème	Pas d'érythème	0
	Léger érythème (à peine visible)	1
	Erythème bien visible	2
	Erythème important	3
	Erythème grave (rouge pourpre) avec ou sans escarres (lésions profondes)	4
Œdème	Pas d'œdème	0
	Très léger œdème (à peine visible)	1
	Léger œdème (conditions bien définies, gonflement apparent)	2
	Œdème moyen (épaisseur d'environ 1 mm)	3
	Œdème grave (épaisseur supérieure à 1 mm)	4

1.3.6. Interprétation des résultats

Le système de cotation des phénomènes observés permet de calculer «**un indice d'irritation primaire cutanée** » (**IPc**).

$$\text{IPc} = \frac{\sum 24h(E, Oe) + 72h(E, Oe)}{24}$$

Avec :

- **E:** érythème
- **Oe:** œdème

Selon la valeur de l'IPc, les produits testés sont classés en : non irritant, légèrement irritant, irritant et très irritant.

Tableau VIII: Catégories des produits testés selon la valeur d'IPc résultante.

Non irritant	IPc<0.5
Légèrement irritant	0.5 ≤ IPc<2
Irritant	2 ≤ IPc<5
Très irritant	5 ≤ IPc<8

2. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire du Diclofénac

2.1. Œdème de la patte

2.1.1. Objectif et principe

Le but de ce test a été de mettre au point une technique qui permet d'évaluer l'activité anti-inflammatoire du Diclofénac administré préalablement, c'est-à-dire, avant de provoquer expérimentalement la réaction inflammatoire.

Au cours de notre travail, on a pratiqué une méthode *in vivo*, l'œdème de la patte induit par la carragénine, qui est particulièrement conseillée dans l'étude de l'activité anti-inflammatoire.

Le principe consiste à provoquer un œdème chez des souris, par injection d'une solution de carragénine à 1% sous l'aponévrose plantaire de la patte postérieure droite.

L'activité anti-inflammatoire du médicament se traduira par une diminution du poids de la patte, ce qui correspond à la diminution de l'œdème.

2.1.2. Locaux et conditions ambiantes

L'essai doit être effectué dans une salle propre et tranquille pour éviter de stresser les animaux.

2.1.3. Matériels

a. Equipement

- Balance pour la peser des souris;
- Boîte à contention pour souris avec une grille ;
- Agitateur ;
- Balance analytique de haute précision.

▪ Petits matériels

- Sonde gastrique ;
- Ciseau.

b. Consommable et verrerie

- Seringues jetables (1ml, 2.5ml, 5ml) ;
- Gants stériles ;
- Bêchers ;
- Fioles jaugées ;

c. Réactif

▪ Réactifs biologiques

- Souris albinos :
 - Race : SWISS ;
 - Sexe : Femelle ;
 - Poids : 17- 23g.

▪ Réactifs chimiques

- Eau physiologique ;
- Poudre de matière première: produit à tester (Générique) ;
- Poudre de matière première: Produit de référence (Princeps) ;
- Poudre de Carragénine.

2.1.4. Mode opératoire

a. Constitution des lots

Le test a été réalisé sur 24 souris femelles pesant entre 17 et 23g et réparties en trois lots de 8 souris chacun, les animaux ont été privés de nourriture et d'eau 12 heures avant la période d'expérimentation.

Chaque lot reçoit par voie orale une solution :

- Le lot témoin négatif : reçoit l'eau physiologique ;
- Le lot témoin positif ou lot référence : reçoit le Diclofénac princeps ;
- Le lot test : reçoit le Diclofénac générique.



Figure 20 : Répartition des souris à essai en trois lots.

Le poids des souris qui constituent les 3 lots est noté dans le tableau suivant :

Tableau IX : Poids des souris et poids moyen de chaque lot.

Souris \ Lot	Témoin négatif	Témoin positif (reference)	Test
1	19.9	19.8	19.1
2	19.6	21	19.6
3	20.7	18.7	17.8
4	19.7	21.3	17.8
5	17.2	21	20.1
6	18.9	20.5	21.7
7	21	17.7	19.5
8	17.5	17.4	20.5
Poids moyen (PM)	19.3125	19.675	19.5125

b. Préparation des solutions

La dose maximale de Diclofénac à administrer chez un individu de poids moyen de 70kg est de 150mg/jour. C'est à partir de cette dose qu'on pourra calculer la dose maximale à administrer par souris et par la suite, la concentration et le volume de la solution à préparer.

b.1. Solution du produit test et / ou référence

$$\begin{array}{lcl}
 150 \text{ mg} & \longrightarrow & 70000 \text{ mg} \\
 D_t \text{ mg} & \longrightarrow & PM_t = 19.5125 \text{ mg} \\
 D_t = \frac{150 \times 19.5125}{70000} ; & &
 \end{array}$$

$$D_t = 0.041 \text{ mg/Souris}$$

$$\begin{array}{lcl}
 150 \text{ mg} & \longrightarrow & 70000 \text{ mg} \\
 D_R \text{ mg} & \longrightarrow & PM_R = 19.675 \text{ mg} \\
 D_R = \frac{150 \times 19.675}{70000} ; & &
 \end{array}$$

$$D_R = 0.042 \text{ mg/Souris}$$

Avec :

- **PM_t** : Poids moyen de test ;
- **PM_R** : Poids moyen de référence ;
- **D_t** : Dose maximale à administrer pour chaque souris test ;
- **D_R** : Dose maximale à administrer pour chaque souris référence.

Le volume à administrer pour une souris est de 1 ml, pour préparer un volume de 100 ml :

$$\begin{array}{lcl} 0.041 \text{ mg} & \longrightarrow & 1 \text{ ml} \\ M_t \text{ mg} & \longrightarrow & 100 \text{ ml} \end{array}$$

$$M_t = \frac{0.041 \times 100}{1} ;$$

$$M_t = 4.1 \text{ mg}$$

$$\begin{array}{lcl} 0.042 \text{ mg} & \longrightarrow & 1 \text{ ml} \\ M_R \text{ mg} & \longrightarrow & 100 \text{ ml} \end{array}$$

$$M_R = \frac{0.042 \times 100}{1} ;$$

$$M_R = 4.2 \text{ mg}$$

Avec :

- **M_t** : Dose de produit test à dissoudre dans 100 ml
- **M_R** : Dose de produit référence à dissoudre dans 100 ml

- A l'aide d'une balance analytique, peser la matière première à la masse calculée pour chaque produit ;
- Verser la poudre de chaque produit dans 2 fioles propres ;
- Mélanger chaque produit avec 100 ml d'eau physiologique ;
- Agiter manuellement jusqu'à dissolution complète ;
- Etiqueter les deux solutions.



Figure 21 : Solutions des produits à tester (test et référence).

b.2. Solution de carragénine à 1%

On veut préparer un volume suffisant pour 24 souris, soit 10 ml (un volume facile à préparer)

1 g $\longrightarrow$ 100 ml

M $\longrightarrow$ 10 ml

$$M = \frac{1 \times 10}{100} ;$$

$$M = 0.1g$$

Avec :

- **M** : La masse de carragénine à dissoudre dans 10 ml.
- A l'aide d'une balance analytique, peser 0.1 g de carragénine ;
- Dans un bécher, faire dissoudre cette poudre dans 10 ml d'eau physiologique ;
- A l'aide d'un agitateur électrique, agiter bien la solution obtenue ;
- Étiqueter la solution.

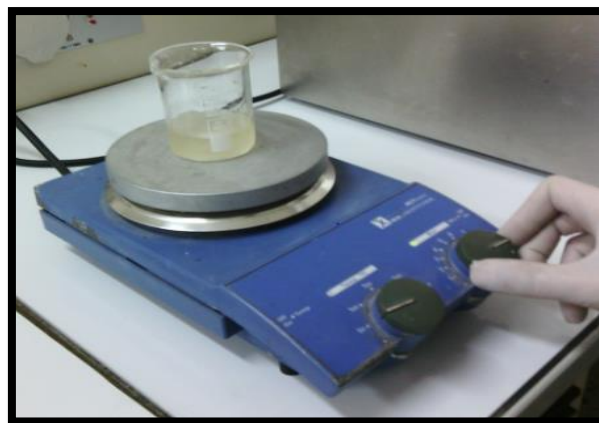


Figure 22 : Agitation de la solution de carragénine.

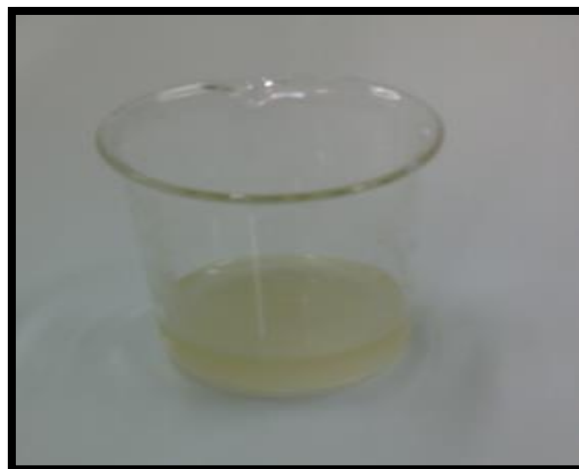


Figure 23: Solution de carragénine à injecter.

c. Essai proprement dit

Le protocole de l'essai a été réalisé en trois temps successifs :

- **A t_0**

Administration des solutions par gavage (voie per os) à l'aide d'une sonde gastrique ;

- Lot témoin négatif : 1 ml d'eau physiologique ;
- Lot Référence : 1 ml de produit référence (Diclofénac princeps) ;
- Lot test : 1 ml de produit test (Diclofénac générique).



Figure 24 : Sonde gastrique.

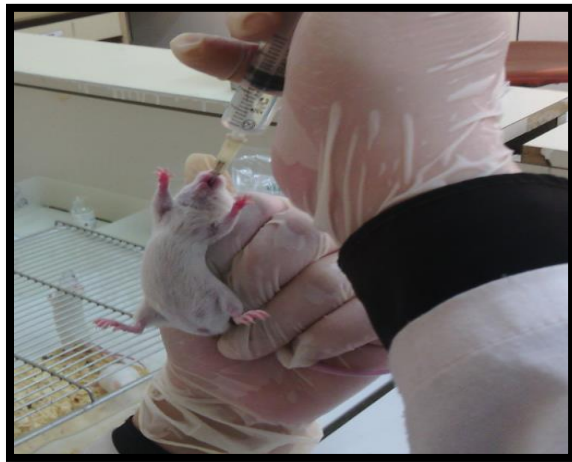


Figure 25: Administration per os de l'AINS et de l'eau physiologique.

- **A $t = 30mn$**

A l'aide d'une seringue jetable, injecter 50 μ l de la solution de carragénine à 1% sous l'aponévrose plantaire de la patte postérieure droite.



Figure 26 : Injection intra-plantaire de la solution de carragénine.

- **A t = 6 h**

Après 6 heures de la première administration, sacrifier les souris par rupture de la nuque, couper leurs pattes postérieures droites et gauches à la hauteur de l'articulation et les peser à l'aide d'une balance analytique de haute précision.

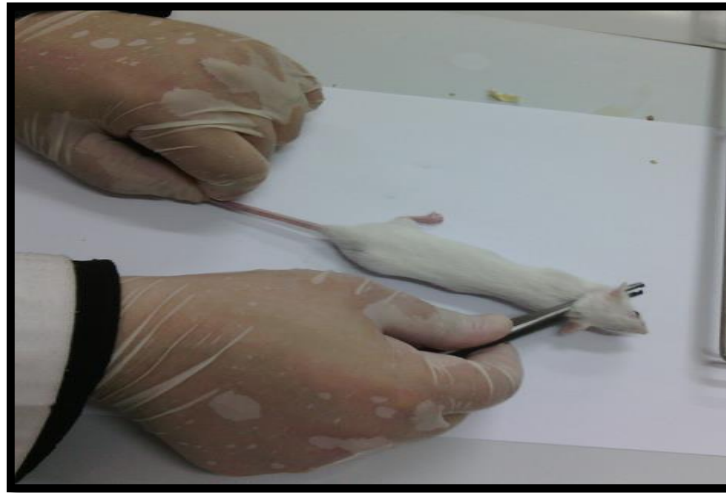


Figure 27: Sacrifice des souris.



Figure 28 : Ablation des pattes.

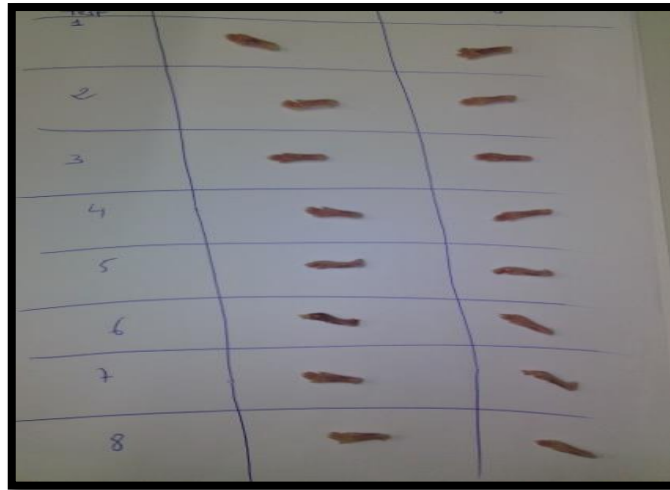


Figure 29: Ensemble des Pattes coupées pour chaque lot.



Figure 30 : Pesée des pattes.

2.1.5. Lecture des résultats

La valeur de l'œdème est appréciée en calculant la différence des poids des pattes ayant reçus l'injection de carragénine et celle ne l'ayant pas reçue.

2.1.6. Interprétation des résultats

- La moyenne de la différence de poids des animaux traités (préalablement par Diclofénac princeps et générique) est comparée à celle des animaux témoins négatifs (non traités) ;
- L'activité anti-inflammatoire est exprimée en pourcentage de réduction de l'œdème provoqué par la carragénine.

II- RESULTATS

II. RESULTATS

1. Evaluation de la toxicité du Diclofénac

1.1. Test de la toxicité anormale

a. Résultats

Tableau X : Observation des souris après 24h.

Souris	Signes de morbidité	Mortalité
01	Aucun signe	non
02	Aucun signe	non
03	Aucun signe	non
04	Aucun signe	non
05	Aucun signe	non

Après 24h d'observation, aucune mortalité, ni signes de morbidité ont été constatés pour les 5 souris.

b. Interprétation

D'après le résultat d'observation, nous pouvons déduire que la dose maximale efficace « 150mg /jour » ne présente pas de toxicité surajoutée, ce qui prouve l'innocuité de notre médicament.



Figure 31: Résultat du test de la toxicité anormale après 24h.

1.2. Essai de recherche des endotoxines bactériennes

a. Résultats

➤ Résultats de la qualification initiale

▪ Résultats de la détermination du point final

Tableau XI: Calcul des points finaux et log points finaux.

UI/ml Series	4 λ 0,12	2 λ 0,06	λ 0,03	½λ 0,015	¼λ 0,0075	0	Point final	Log point final
01	+	+	+	-	-	-	0,03	-1,5228
02	+	+	+	-	-	-	0,03	-1,5228
03	+	+	+	-	-	-	0,03	-1,5228
04	+	+	+	-	-	-	0,03	-1,5228

▪ Calcul de la moyenne géométrique des points finaux :

$$MG = \frac{\sum \log PE}{N} \quad N = 4$$

$$MG = \frac{-1,5228 - 1,5228 - 1,5228 - 1,5228}{4}$$

$$MG = -1,5228$$

▪ Calculer la sensibilité du lysat

$$\lambda = \text{anti log } MG$$

$$\lambda = \text{anti log } (-1,5228)$$

$$\lambda = 0,03 \text{ UI/ml}$$

- La sensibilité du lysat calculé expérimentalement est de 0,03 UI/ml, elle est la même sensibilité déclarée par le fabricant.
- La sensibilité de notre lysat est comprise entre $\lambda / 2 < 0,03 \text{ UI/ml} < 2\lambda$ donc elle est valide.

NB : La sensibilité de notre lysat est de 0,03 UI/ml, cela veut dire que : si on met le lysat en contact avec notre produit au même volume (100µl) et que ce dernier contient plus de 0,03 UI/ml d'endotoxines, il y aura formation de gel.

- Par la validation de notre lysat, nous avons validé donc les 5M : Méthode, Matériel, Matière, Milieu et Manipulateur.

➤ Résultats de contrôle du produit à tester

▪ Résultat de mesure du pH

Le pH de notre dilution finale est un pH neutre $\text{pH} = 7$



Figure 32 : Vérification du pH de la dilution finale du produit.

▪ Résultat de l'essai proprement dit

Tableau XII : Expression des résultats du LAL test.

Contrôle négatif	Absence de formation de gel	Résultat négative
Contrôle positif	Formation de gel	Résultat positif
Produit surcharge	Formation de gel	Résultat positif
Produit surcharge	Formation de gel	Résultat positif
Produits à contrôler à la DT	Absence de formation de gel	Résultat négative
Produits à contrôler à la DT	Absence de formation de gel	Résultat négative



Figure 33 : Résultats de l'essai après 1h à 37 °C.

b. Interprétation

- Le contrôle négatif donne un résultat négatif, ne forme pas de gel : l'eau qualité LAL est exempt d'endotoxines et ne présente aucune contamination.
- Le contrôle positif donne un résultat positif ; formation de gel tenant au fond du tube : la surcharge est de bonne qualité.
- Les deux tubes du produit surchargé donnent des résultats positifs : le produit est non inhibiteur de la réaction.
- Les deux tubes produits à contrôler donnent des résultats négatifs, absence de formation de gel : l'échantillon testé renferme moins de $X \lambda$ UE/mg d'endotoxines qui doit être inférieure à la dose limite d'endotoxine (LE).

Avec :

- **X** : facteur de dilution ;
- λ : sensibilité du lysat.

$$XY = 900 \times 0,03$$

$$XY = 27 \text{ UE/ml}$$

$$XY = \frac{27 \text{ UE/ml}}{25 \text{ mg}}$$

$$XY = 1,08 \text{ UE/mg}$$

$$XY = 1,08 \text{ UE/mg} < LE = 2,33 \text{ UE/mg}$$

- Donc notre produit est **conforme**.

1.3. Test de la tolérance cutanée

a. Résultats

Les résultats obtenus après les deux observations (24h et 72h) sont regroupés dans le tableau suivant :

Tableau XIII : Résultats d'observation après 24h et 72h.

Lapins	Erythème		Œdème	
	24h	72h	24h	72h
1	Pas d'érythème	Pas d'érythème	Pas d'œdème	Pas d'œdème
2	Léger érythème	Pas d'érythème	Pas d'œdème	Pas d'œdème
3	Pas d'érythème	Pas d'érythème	Pas d'œdème	Pas d'œdème
4	Pas d'érythème	Pas d'érythème	Pas d'œdème	Pas d'œdème
5	Pas d'érythème	Pas d'érythème	Pas d'œdème	Pas d'œdème
6	Léger érythème	Pas d'érythème	Pas d'œdème	Pas d'œdème

Le système de cotation des phénomènes observés dégage le tableau ci-dessous

Tableau XIV: Résultats de cotation des phénomènes observés.

Lapins	Erythème		Œdème	
	24h	72h	24h	72h
1	0	0	0	0
2	1	0	0	0
3	0	0	0	0
4	0	0	0	0
5	0	0	0	0
6	1	0	0	0



Figure 34: Lapin après 72h d'observation.

Les résultats de cotation des phénomènes observés permet de calculer l'indice d'irritation primaire cutanée (IPc), en additionnant les chiffres relevés pour l'érythème et l'œdème sur les zones scarifiées et non scarifiées des 6 lapins, pour chaque lecture (à 24h et à 72h après l'application) puis on calcule la moyenne des résultats observés.

$$IPc = \frac{24h(0+1+0+0+0+1)+(0+0+0+0+0+0)+72h(0+0+0+0+0+0)+(0+0+0+0+0+0)}{24}$$

$$IPc = \frac{2+0}{24}$$

$$IPc = 0.083$$

b. Interprétation

Selon le résultat obtenu : $IPc = 0.083$

Avec : $0.083 < 0.5$

Donc notre produit Le Diclofénac est classé comme étant **un produit non irritant**, ce qui permet de prouver l'innocuité du médicament.

2. Evaluation de l'activité du Diclofénac

2.1. Test de l'œdème de la patte de la souris

a. Résultats

Après six heures de la première administration, les souris des trois lots ont développé un œdème visualisé au niveau de leurs pattes après injection de la carragénine.

Les résultats de poids des pattes droites et gauches, la différence de poids entre les deux pattes ainsi que la moyenne de cette différence, sont regroupés pour chaque lot dans les tableaux suivants :

Tableau XV : Résultats du lot témoin négatif.

Lot témoin	Patte droite	Patte gauche	Différence X_T	$(X_T - m_T)$	$(X_T - m_T)^2$
1	159,3	127,2	32,1	-13,4125	179,8951
2	211,4	150,4	61	15,4875	239,8626
3	168,7	136,9	31,8	-13,7125	188,0326
4	193,9	127,6	66,3	20,7875	432,1201
5	192,6	147,9	44,7	-0,8125	0,6601
6	196,6	144,0	52,6	7,0875	50,2326
7	180,7	146,3	34,4	-11,1125	123,4876
8	172,6	131,4	41,2	-4,3125	18,5976
Moyenne de la différence (m_T) = 45.5125				$\Sigma(X_T - m_T)^2 = 1232,8883$	

Tableau XVI : Résultats du lot référence (témoin positif).

Lot reference	Patte droite	Patte gauche	Différence X_R	$(X_R - m_R)$	$(X_R - m_R)^2$
1	150,9	135,6	15,3	0.4363	0.1903
2	161,8	148,2	13.61	-1.2537	1.5717
3	159,1	143,1	16	1.1363	1.2911
4	140,5	126,0	14.5	-0.3637	0.1322
5	155.6	139,3	16.3	1.4363	2.0629
6	158	145,1	12.9	-1.9637	3.8561
7	167	152,4	14.6	-0.2637	0.0695
8	160,7	145,0	15.7	0.8363	0.6993
Moyenne de la différence (m_R) = 14.8637				$\Sigma (X_R - m_R)^2 = 9.8731$	

Tableau XVII : Résultats du lot test.

Lot test	Patte droite	Patte gauche	Différence X_t	$(X_t - m_t)$	$(X_t - m_t)^2$
1	169.2	153,0	16.2	1.2625	1.5939
2	160.5	146,2	14.3	-0.6375	0.4064
3	155.5	139,9	15.6	0.6625	0.4389
4	164.7	150,9	13.8	-1.1375	1.2939
5	164.5	149,0	15.5	0.5625	0.3164
6	161.8	145,7	16.1	1.1625	1.3514
7	171.4	158,2	13.2	-1.7375	3.0189
8	152.9	138,1	14.8	-0.1375	0.0189
Moyenne de la différence (m_t) = 14.9375				$\Sigma(X_t - m_t)^2 = 8.4387$	

Avec :

- X_T, X_R, X_t : différence entre les deux pattes de chaque souris respectivement pour le lot témoin, référence et test.
- m_T, m_R, m_t : moyenne de la différence de poids respectivement pour le lot témoin, référence et test.

b. Analyse statistique des résultats

1. Comparaison des deux moyennes T/R

- Calcule de la variance S^2 pour chaque lot :
- Lot Témoin : $S^2_T = \frac{1}{n-1} \sum (X_T - m_T)^2$
- Lot reference : $S^2_R = \frac{1}{n-1} \sum (X_R - m_R)^2$

Avec :

n : nombre de souris par lot, n=8

On pose l'hypothèse $H_0 : m_T = m_R$ contre l'hypothèse $H_1 : m_T \neq m_R$

- Lot Témoin: $S^2_T = \frac{1}{8-1} (1232,8883)$

$$S^2_T = 176.1269$$

- Lot référence: $S_R^2 = \frac{1}{8-1} (9.8731)$

$$S_R^2 = 1.4104$$

- Calcule de la variance commune :

$$S_{T/R}^2 = \frac{(n_T-1)S_T^2 + (n_R-1)S_R^2}{n_T + n_R - 2}$$

$$S_{T/R}^2 = \frac{7 \times 176.1269 + 7 \times 1.4104}{14}$$

$$S_{T/R}^2 = 88.4686$$

- Calcule du t de student:

$$t_{T/R} = \frac{m_T - m_R}{\sqrt{s^2 \left(\frac{1}{n_T} + \frac{1}{n_R} \right)}}$$

$$t_{T/R} = \frac{45.5125 - 14.8637}{\sqrt{88.4686 \left(\frac{1}{8} + \frac{1}{8} \right)}}$$

$$t_{T/R} = \frac{30.6488}{\sqrt{22.1171}}$$

$$t_{T/R} = 6.5171$$

2. Comparaison des deux moyennes T/t

- Calcule de la variance S^2 pour chaque lot :

- Lot Témoin : $S_T^2 = \frac{1}{n-1} \sum (X_T - m_T)^2$

- Lot test: $S_t^2 = \frac{1}{n-1} \sum (X_t - m_t)^2$

On pose l'hypothèse H_0 : $m_T = m_t$ contre l'hypothèse H_1 : $m_T \neq m_t$

- Lot Témoin : comme nous l'avons calculé avant ;

$$S_T^2 = 176.1269$$

- Lot test: $S_t^2 = \frac{1}{8-1}(8.4387)$

$$S_t^2 = 1.2055$$

- Calcule de la variance commune :

$$S_{T/t}^2 = \frac{(nT-1)ST^2 + (nt-1)St^2}{nT+nt-2}$$

$$S_{T/t}^2 = \frac{7 \times 176.1269 + 7 \times 1.2055}{14}$$

$$S_{T/t}^2 = 88.6662$$

- Calcule du t de student:

$$t_{T/t} = \frac{mT - mt}{\sqrt{s^2 \left(\frac{1}{nT} + \frac{1}{nt} \right)}}$$

$$t_{T/t} = \frac{45.5125 - 14.9375}{\sqrt{88.6662 \left(\frac{1}{8} + \frac{1}{8} \right)}}$$

$$t_{T/t} = \frac{30.575}{\sqrt{22.1665}}$$

$$T_{T/t} = 6.4941$$

3. Calcule du pourcentage de réduction de l'œdème par l'anti-inflammatoire

❖ Pour le produit référence (Diclofénac princeps)

$$PR_R = \frac{mT - mR}{mT} \times 100$$

$$PR_R = \frac{45.5125 - 14.8637}{45.5125} \times 100$$

$$PR_R = 67.34\%$$

❖ **Pour le produit test (Diclofénac générique)**

$$PR_t = \frac{m_T - m_t}{m_T} \times 100$$

$$PR_t = \frac{45.5125 - 14.9375}{45.5125} \times 100$$

$PR_t = 67.18\%$

c. Interprétation

A l'aide de la table de student, $t_{\alpha/2}$ à ddl=14 ; (Voir Annexe VI)

$t_{0.025 \text{ tabulé}} = 2.145$

Avec :

- $\alpha = 0.05 = \text{l'erreur}$
- $Ddl = n_T + n_R - 2$
- $n_T = \text{nombre de souris du lot témoin} = 8$
- $n_R = \text{nombre de souris du lot référence} = 8$

- En comparant les t calculés ($t_{T/R}$ et $t_{T/t}$) avec le t tabulé :
 - La valeur de $t_{T/R}$ est $>$ à $t_{\alpha/2}$ ($6.5171 > 2.145$) ; ce qui signifie qu'il y a une différence statistiquement significative entre le lot témoin et le lot référence : donc rejet de l'hypothèse $H_0 (m_T = m_R)$.

 - De même, la valeur de $t_{T/t}$ est $>$ à $t_{\alpha/2}$ ($6.4941 > 2.145$) ; ce qui signifie qu'il y a une différence statistiquement significative entre le lot témoin et le lot test : donc rejet de l'hypothèse $H_0 : (m_T = m_t)$.

Le traitement préalable des souris du lot test et du lot référence par 1ml de Diclofénac respectivement générique et princeps, induit une diminution significative de l'inflammation, ce qui confirme l'activité anti-inflammatoire de notre produit : le Diclofénac.

L'activité anti-inflammatoire du Diclofénac (générique et princeps) est évaluée par le pourcentage d'inhibition de l'œdème, elle est de 67,18% avec le générique et de 67.34% avec le princeps, ce qui est suffisant pour s'assurer de l'efficacité du Diclofénac (à dose thérapeutique).

III- DISCUSSION

III. DISCUSSION DES RESULTATS

Evaluation de la toxicité du Diclofénac

Test de la toxicité anormale

Nous avons effectué ce test sur un groupe de 5 souris de laboratoire, dans le but de confirmer l'innocuité de notre produit le **Diclofénac sous forme solution injectable**.

Après injection d'un volume donné de notre produit à tester à dose maximale efficace de 150mg/24h par voie intra-péritonéale pour chaque souris et après 24h d'observation, les souris n'ont pas présenté de signes de morbidité ni de mortalité, ce qui confirme que notre produit **ne présente pas de toxicité surajoutée** à la dose maximale efficace non toxique utilisée chez l'homme « 150mg/24h » et il ne présente aucun risque pour le patient à cette dose.

Test de recherche des endotoxines bactériennes

Pour la recherche d'endotoxines bactériennes, nous avons choisi le LAL test par la méthode de gélification qui est une méthode sensible, facile, moins coûteuse et n'utilise pas les animaux de laboratoire, contrairement à l'essai des pyrogènes qui présente beaucoup d'inconvénients.

Le LAL test repose sur la propriété que possède le lysat d'entraîner la formation d'un gel solide lorsqu'il est mélangé avec une solution contenant des endotoxines bactériennes.

Après la validation des 5M : Méthode ; Matériel ; Matière ; Milieu et Manipulateur, nous avons effectué le test sur notre produit à tester le **Diclofénac sous forme solution injectable** et après 1h d'incubation à 37°C au bain marie, nous avons fait la lecture.

Notre produit donne un **résultat négatif** : ne forme pas un gel ferme au fond du tube. Donc notre produit le Diclofénac sous forme solution injectable est **conforme**.

Test de la tolérance cutanée

Nous avons réalisé ce test sur un groupes de 06 lapins sains, notre but est de confirmer que notre produit le **Diclofénac sous forme topique gel 1%** ne présente pas de risque d'irritation de la peau.

Après épilation du dos des lapins et application du produit sur la zone épilée saine et scarifiée, nous avons fait la lecture 24 heures et 72 heures après.

Nous avons remarqué l'absence d'œdème et d'érythème sur les deux zones de la peau, ce qui permet de juger que notre produit le Diclofénac sous forme topique gel 1% est **un produit non irritant**.

Evaluation de l'activité du Diclofénac

Nous avons effectué le test de « l'œdème de la patte » pour évaluer l'activité anti-inflammatoire de notre produit le **Diclofénac sous forme de matière première**.

Après un traitement préalable des souris de laboratoire par le Diclofénac à tester (générique) et le Diclofénac référence (princeps), nous avons induit l'un des signes de l'inflammation : l'œdème, dans les pattes postérieures droites par injection d'une substance irritante : la carragénine.

A l'issue de ce test, nous avons sacrifié les animaux et pesé leurs pattes postérieures (gauche et droite) afin de calculer le pourcentage de réduction de l'œdème par rapport à un témoin négatif (non traité).

Notre produit le Diclofénac présente une **activité anti-inflammatoire significative et comparable à l'activité de son médicament princeps** en diminuant l'œdème par un pourcentage supérieur à 60%.

En conclusion : notre produit le Diclofénac est conforme, présente une **innocuité** et une **efficacité confirmée**

CONCLUSION

CONCLUSION GENERALE ET RECOMMANDATIONS

Dans l'industrie pharmaceutique, le contrôle pharmaco-toxicologique est un moyen efficace pour s'assurer de la triade « qualité, efficacité et innocuité » et par conséquent préserver la santé du consommateur.

Au terme de notre travail qui a porté sur l'évaluation de l'activité et de la sécurité du Diclofénac, nous pouvons dire que :

- Nous avons constaté la sécurité du Diclofénac en démontrant sa conformité par rapport au test de la toxicité anormale, au LAL test et au test de la tolérance cutanée.
- Pour l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire, nous avons constaté une activité importante et comparable entre le produit générique et le princeps qui ont montré une réduction de l'œdème de plus de 60%.

Par ailleurs l'essai de l'évaluation de l'activité pharmaceutique in vivo présente des difficultés car la fiabilité de ses résultats nécessite un nombre assez important d'animaux pour pallier à la variabilité interindividuelle. De même, sa réalisation nécessite une maîtrise de la manipulation des animaux de laboratoire afin d'assurer une administration et une application correcte du produit à tester.

En perspectives, il reste utile d'introduire de telles études dans le programme de formation pédagogique des étudiants, afin d'améliorer leurs connaissances en matière de contrôle de la qualité des produits pharmaceutiques.

Il est souhaitable que les autorités de santé organisent des campagnes de formation et des journées d'études.

D'autre part, le recours des patients à l'utilisation des anti-inflammatoires comme auto médicament doit être placé sous la responsabilité du pharmacien d'officine, qui aura la charge de contrôler au cas par cas la consommation de ce remède, en assurant la sensibilisation du patient en ce qui concerne les effets indésirables, les contre indications et les interactions médicamenteuses, dans le but d'éviter l'usage inapproprié et garantir la sécurité d'utilisation des médicaments anti-inflammatoires.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE

- [1] Russo-Marie F, Peltier A, Polla S B. L'inflammation. Paris : John Libbey Eurotext ; 1998.
- [2] Weill B, Batteux F. Immunopathologie et réactions inflammatoires. 1^{re} éd. Bruxelles : De Boeck ; 2003.
- [3] Mansour S. Evaluation de l'effet anti inflammatoire de trois plantes médicinales : *Artemisia absinthium* L, *Artemisia herba alba* Asso et *Hypericum scarboide*-étude in vivo [Thèse]. Oran : Université des Sciences et de la Technologie d'Oran Mohamed Boudiaf ; 2015.
- [4] Rousselet M C, Vignaud J M, Hofman P, Chatelet F P. Inflammation et pathologie inflammatoire. Copyright AFECAP ; mai 2005.
- [5]Cohen Y, Jacquot C. Abrégé Pharmacologie. 6^e édition. Paris : ELSEVIER MASSON ; 2008.
- [6]Allain P. Les médicaments. 3^{ème} édition. Paris.
- [7] Hellal M. Phtalazinones et 2,3-benzodiazépinones dérivées de l'azélastine : Synthèses et activités anti-cytokine [Thèse]. Strasbourg : Université Louis Pasteur ; 2007.
- [8] Lüllmann H, Mohr K, Ziegler A. Atlas de poche de pharmacologie. 2^{ème} édition. Paris : Flammarion ; 2001.
- [9] Moussaoui A, Dahman M. Contrôle physico-chimique, microbiologique et pharmacotoxicologique d'un anti-inflammatoire Kétoprofène [Mémoire]. Blida : Université Saad Dahlab ; 2012.
- [10] Souaga K, Adou A, Amantchi D, Angoh Y. Plaidoyer pour une utilisation raisonnée des anti-inflammatoires en odontostomatologie. Service de Pathologie et Chirurgie odontostomatologique et Maxillo-faciales. C.H.U Cocody – Abidjan.
- [11] Dangoumau J, Moore N, Molimard M, Latry K, Haramburu F, TitierK, et al. Pharmacologie générale. Bordeaux: Université Victor Segalen ; 2006.
- [12] Lechat P. Pharmacologie niveau DCEM. Paris: Université pierre et marie curie; 2006.
- [13] Bannwarth B. Place des AINS classiques et des coxibs. Traitements anti-inflammatoires. EMC- Médecine. Oct2005; 2(5):524–531.
- [14] Maison P. PHARMACOLOGIE Prescription et surveillance des anti-inflammatoires Stéroïdiens et non stéroïdiens. Paris : La collection hippocrate ; 2005.
- [15] Grandin M. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens, utilisation et conseils dans la pratique officinale quotidienne [Thèse]. Angers : Université Angers; 2013.
- [16] Tréchet P, Jouzeau J Y. Bases chimiques et pharmacologiques des AINS. Revue française d'allergologie. 2014; 54(3) : 212–217.
- [17] Collège Français des Enseignants de Rhumatologie. Prescription et surveillance des anti-inflammatoires stéroïdiens et non stéroïdiens ; 2011.
- [18] Monassier L. LES ANTI-INFLAMMATOIRES NON-STEROIDIENS. Module de Pharmacologie Clinique DCEM3. Faculté de Médecine de Strasbourg; 2013.

- [19] Girgis H K. Anti-inflammatoires non stéroïdiens : une vieille classe innovante pour le traitement du traumatisme crânien [Thèse]. Paris : Université Paris Descartes; 2012.
- [20] Faure S. Anti-inflammatoires non stéroïdiens. Actualités Pharmaceutiques; Oct 2009;48(489) : 53–58.
- [21] Langlade A, Bonnet F. Efficacité comparée des anti-inflammatoires non stéroïdiens. Mises Au Point en Anesthésie-Réanimation (MAPAR); 1997.
- [22] Talbert, Willoquet, Gervais. Guide pharmacoclinique. Paris : Le moniteur des pharmacies ; 2011.
- [23] Capet C, Bentot C, Druesne L, Chassagne PH, Doucet J. Les effets indésirables des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) chez le sujet âgé. La Revue de Gériatrie. 2001; 26(5) : 379-384.
- [24] Muster D. Médicaments de l'inflammation. EMC-Stomatologie. Mar 2005; 1(1): 21–29.
- [25] Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé (afssaps). MISE AU POINT SUR LA PRISE EN CHARGE DE LA FIEVRE CHEZ L'ENFANT. Lettres aux professionnels de santé ; 2004.
- [26] Descroix V. La prescription médicamenteuse chez l'enfant. L'information dentaire. 3 Mar 2010;9.
- [27] Lafuente-Lafuente C, Baudry E, Paillaud E, Piette F. Pharmacologie clinique et vieillissement. La Presse Médicale. Fév2013;42(2):171–180.
- [28] Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé (afssaps). Rappel sur la contre-indication des AINS à partir du début du 6^{ème} mois de la grossesse, quelle que soit la voie d'administration. Lettres aux professionnels de santé; fév 2009.
- [29] Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé (afssaps).Thesaurus des interactions médicamenteuses ; juin 2007.
- [30] Swarnlata S. NON-STEROIDAL ANTI-INFLAMMATORY DRUG. Sultan Bazar : PharmaMedPress ; 2008.
- [31] Pinel J, Weiss F, Henkens M, GrouzardV. Guide pratique d'utilisation des médicaments essentiels. 4^{ème} édition ; 2006.
- [32] Dictionnaire Vidal ; 2010. Diclofénac ; p. 2355-2356.
- [33] Dictionnaire des médicaments Sidal. Algérie : CDR ; 2005. Diclofénac ; p. 207-227.
- [34] Pharmacopée européenne.6^{ème} édition. Allemagne : Druckerei C. H. Beck; 2008.
- [35] Chaby R. Techniques de dosage des LPS. Des endotoxines aux lipopolysaccharides. Paris : Editions TEC & DOC; 2010.
- [36] Gerhard Vogel H. Drug Discovery and Evaluation: Pharmacological Assays. 2^{ème} edition. Germany: Springer; 2008.
- [37] Repère médical n°46. Méthodes d'étude des AINS [En ligne]. Disponible sur <http://www.repere-medical.com/article-258.html>
- [38] Tag H M, Kelany O E, Tantawy H M, Fahmy A A. Potential anti-inflammatory effect of lemon and hot pepper extracts on adjuvant-induced arthritis in mice. The Journal of Basic& Applied Zoology. 2014 Mar 4; 67(5):149–157.

[39] Blain H. Exploration in vitro et in vivo du pouvoir inhibiteur des anti-inflammatoires non stéroïdiens vis-à-vis des iso-enzymes de la cyclo-oxygénase [Thèse]. Nancy : Université Henri Poincare – Nancy1; 2002.

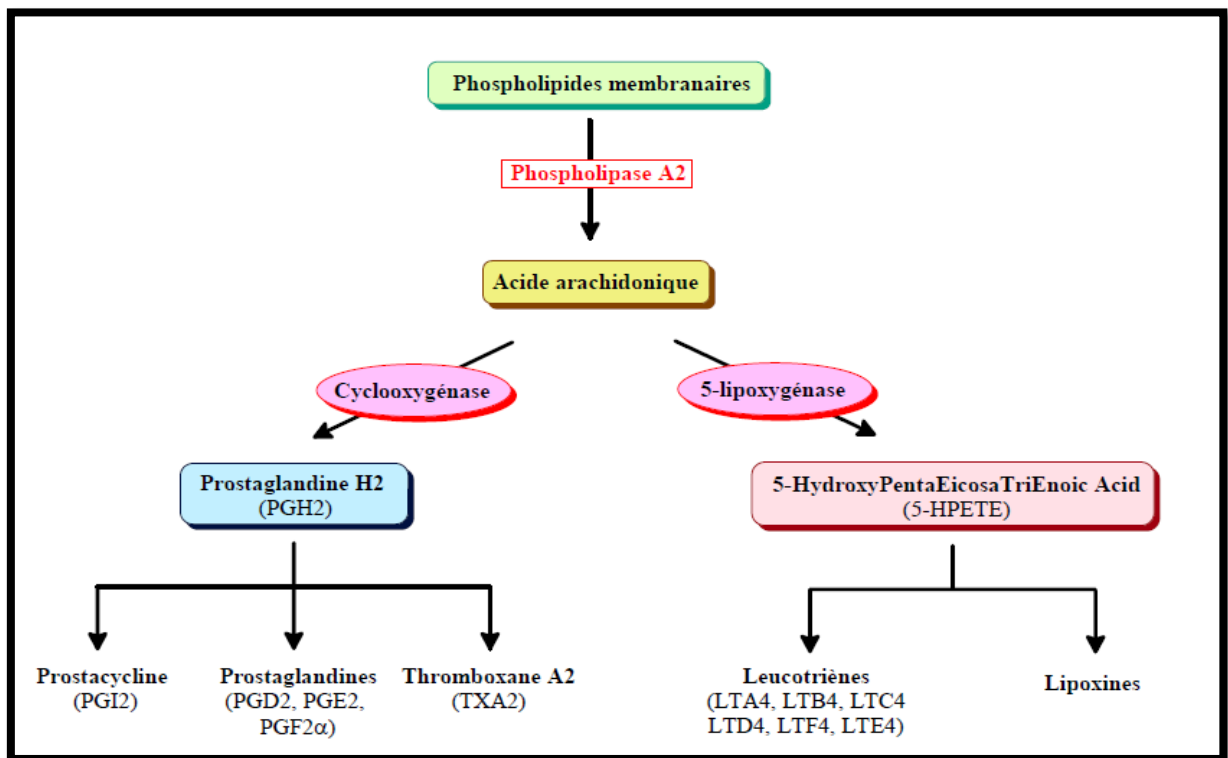
[40] Organisation mondiale de la santé bureau pays-Algérie. Trait d'union. Bulletin d'information. Juil 2014; 3.

ANNEXES

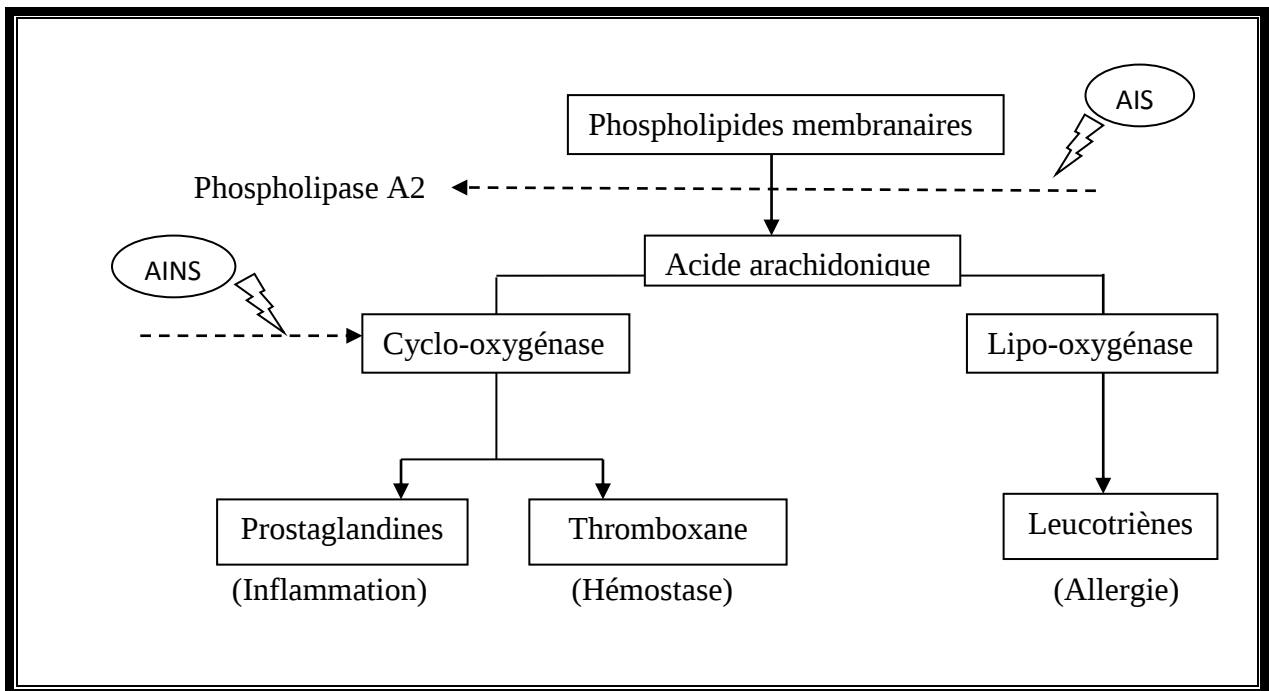
Liste des annexes

ANNEXE I	Schéma récapitulatif de la biosynthèse des eicosanoïdes.
ANNEXE II	Sites d'action des anti-inflammatoires stéroïdiens et non stéroïdiens.
ANNEXE III	Classification des anti-inflammatoires non stéroïdiens selon leur structure chimique et selon le risque lié à leur utilisation.
ANNEXE IV	Voies d'élimination des AINS.
ANNEXE V	Présentation des différents AINS prescrits chez les enfants.
ANNEXE VI	Formes galéniques et voies d'administration du Diclofénac.
ANNEXE VII	Table de Student.

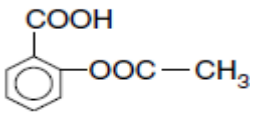
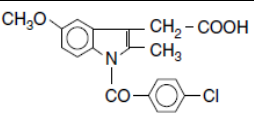
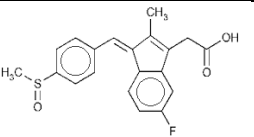
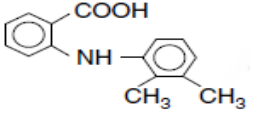
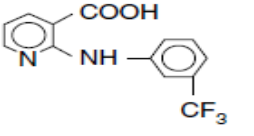
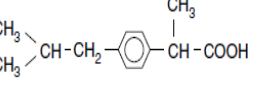
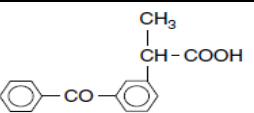
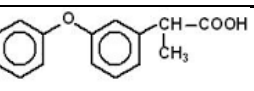
ANNEXE I : Schéma récapitulatif de la biosynthèse des eicosanoïdes [7].

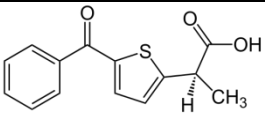
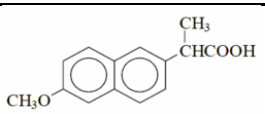
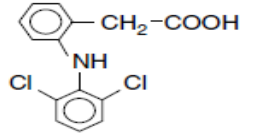
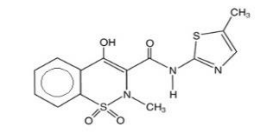
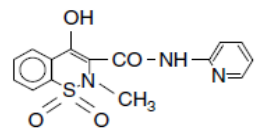
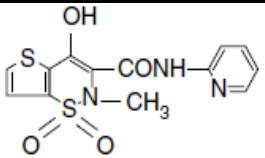
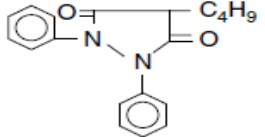
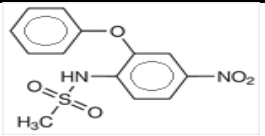
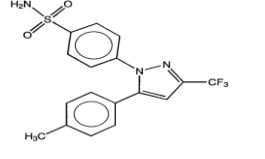
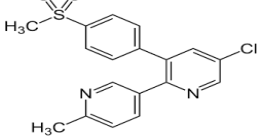


ANNEXE II : Sites d'action des anti-inflammatoires stéroïdiens et non stéroïdiens [10].



ANNEXE III: Classification des anti-inflammatoires non stéroïdiens selon leur structure chimique et selon le risque lié à leur utilisation [5, 11, 12, 13, 14].

Classe chimique	Sous classe	DCI	Structure	Liste
Salicylés	Acide salicylique	- Acide acétylsalicylique (aspirine)		Hors liste
		- Acétylsalicylate de sodium (aspégic)		Hors liste
Dérivés indoliques	Acide indolacétique	Indométacine		Liste I
	Acide pyrrolacétique	Sulindac		Liste I
Fénamates	Acides anthraniliques/fénamates	Acide méfénamique		Liste II
		Acide Niflumique		Liste II
Dérivés Arylcarboxylique	Acide phénylpropionique	Ibuprofène		Liste II
		Kétoprofène		Liste II
		Fénoprofène		Liste II

		l'acide tiaprofénique		Liste II
		Naproxène		Liste II
	Acide phénylacétique	Diclofénac		Liste II
Dérivés enoliques	Oxicams	Méloxicam		Liste I
		Piroxicam		Liste I
		Tenoxicam		Liste I
	Pyrazolés	Phénylbutazone		Liste I
Sulfonanilides		Nimésulide		Liste I
Coxibs		Célécoxib		Liste I
		Étoricoxib		Liste I

ANNEXE IV : Voies d'élimination des AINS [15].

Classe	Sous classe	Voies d'élimination
Les salicylés	Acide acétylsalicylique et salicylates	urinaire
Fénamates	Acide méfénamique	50% urinaire 20% fécale
	Acide niflumique	70% urinaire 30% fécale
Dérivés Arylcarboxyliques	Diclofénac	65% urinaire 35% biliaire
	Ibuprofène	90% urinaire
	Kétoprofen	Urinaire
	Naproxène	Urinaire
Indoliques	Indométacine	Urinaire, biliaire et fécale
	Sulindac	Urinaire et fécale
Oxicams	Méloxicam	50% fécale 50% urinaire
	Piroxicam	Urinaire et fécale
Coxibs	Etoricoxib	Essentiellement rénale
Sulfonanilides	Nimésulide	80% Urinaire

ANNEXE V : Présentation des différents AINS prescrits chez les enfants [28].

Molécule	AMM âge	Formes	Posologie
Ibuprofène	3 mois	Suspension buvable, Comprimé, suppositoire	7,5 mg/kg/prise 30 mg/kg/j
Kétoprofène	6 mois	Sirop	0,5 mg/kg/prise 2 mg/kg/j
Acide tiaprofénique	4 ans	Comprimé	3 mg/kg/prise 10 mg/kg/j
Acide niflumique	6 mois	Suppositoire	40 mg/kg/j
Acide méfénamique	12 ans	Gélule Suppositoire	500 mg/prise 150 mg/j

ANNEXE VI : Voies d'administration et formes galéniques du Diclofénac [24, 31, 33].

Voie d'administration	Présentation	Posologie	Durée du traitement
Parentérale	Ampoules à 75mg (25mg/ml, 3ml) pour injection IM ou en perfusion.	Adulte : 75mg/injection IM profonde ; compléter si nécessaire par 50mg par voie orale. Dans les douleurs postopératoires, le Diclofénac peut être utilisé en perfusion: 75mg administrés en 30 à 120 minutes; répéter après 4 à 6 heures si nécessaire.	2 à 3 jours maximum ; prendre le relais par voie orale dès que possible.
Orale	- Comprimés gastrorésistants 25 et 50 mg. - Comprimés enrobés LP 75 et 100mg.	- Enfant : 2 à 3 mg/kg/jour, à répartir en 2 ou 3 prises - Adulte : 75 à 150 mg/jour.	A court terme : max 7 jours. A longue terme : Selon la prescription médicale.
Rectale	- Suppositoire enfant à 25 mg. - Suppositoire adulte à 100 mg.	- Enfant Rhumatisme inflammatoire 2 à 3 mg/kg/jour, à répartir en 2 ou 3 prises. - Adulte • Traitement d'attaque : 150 mg par jour en 2 prises, soit 1 suppositoire à 100 mg à compléter avec une forme orale. • Traitement d'entretien : 1 suppositoire à 100 mg par jour le soir au coucher.	L'utilisation de la voie rectale doit être la plus courte possible en raison du risque de toxicité locale.
Locale	Gel 1% ou 3% pour application locale, réservé à l'adulte.	- Entorses : 2 à 4 applications par jour. - Tendinites : 3 à 4 applications par jour	5 jours, en l'absence de prescription médicale.

ANNEXE VII: Table de Student.

v \ P	0,50	0,40	0,30	0,20	0,10	0,05	0,025	0,010	0,005	0,001	0,0005	$\alpha = 1 - P$
	0,50	0,60	0,70	0,80	0,90	0,95	0,975	0,990	0,995	0,999	0,9995	
1	0,000	0,325	0,727	1,376	3,078	6,314	12,71	31,82	63,66	318,3	636,6	
2	0,000	0,289	0,617	1,061	1,886	2,920	4,303	6,965	9,925	22,33	31,60	
3	0,000	0,277	0,584	0,978	1,638	2,353	3,182	4,541	5,841	10,22	12,94	
4	0,000	0,271	0,569	0,941	1,533	2,132	2,776	3,747	4,604	7,173	8,610	
5	0,000	0,267	0,559	0,920	1,476	2,015	2,571	3,365	4,032	5,893	6,859	
6	0,000	0,265	0,553	0,906	1,440	1,943	2,447	3,143	3,707	5,208	5,959	
7	0,000	0,263	0,549	0,896	1,415	1,895	2,365	2,998	3,499	4,785	5,405	
8	0,000	0,262	0,546	0,889	1,397	1,860	2,306	2,896	3,355	4,501	5,041	
9	0,000	0,261	0,543	0,883	1,383	1,833	2,262	2,821	3,250	4,297	4,781	
10	0,000	0,260	0,542	0,879	1,372	1,812	2,228	2,764	3,169	4,144	4,587	
11	0,000	0,260	0,540	0,876	1,363	1,796	2,201	2,718	3,106	4,025	4,437	
12	0,000	0,259	0,539	0,873	1,356	1,782	2,179	2,681	3,055	3,930	4,318	
13	0,000	0,259	0,538	0,870	1,350	1,771	2,160	2,650	3,012	3,852	4,221	
14	0,000	0,258	0,537	0,868	1,345	1,761	2,145	2,624	2,977	3,787	4,140	
15	0,000	0,258	0,536	0,866	1,341	1,753	2,131	2,602	2,947	3,733	4,073	
16	0,000	0,258	0,535	0,865	1,337	1,746	2,120	2,583	2,921	3,686	4,015	
17	0,000	0,257	0,534	0,863	1,333	1,740	2,110	2,567	2,898	3,646	3,965	
18	0,000	0,257	0,534	0,862	1,330	1,734	2,101	2,552	2,878	3,611	3,922	
19	0,000	0,257	0,533	0,861	1,328	1,729	2,093	2,539	2,861	3,579	3,883	
20	0,000	0,257	0,533	0,860	1,325	1,725	2,086	2,528	2,845	3,552	3,850	
21	0,000	0,257	0,532	0,859	1,323	1,721	2,080	2,518	2,831	3,527	3,819	
22	0,000	0,256	0,532	0,858	1,321	1,717	2,074	2,508	2,819	3,505	3,792	
23	0,000	0,256	0,532	0,858	1,319	1,714	2,069	2,500	2,807	3,485	3,767	
24	0,000	0,256	0,531	0,857	1,318	1,711	2,064	2,492	2,797	3,467	3,745	
25	0,000	0,256	0,531	0,856	1,316	1,708	2,060	2,485	2,787	3,450	3,725	
26	0,000	0,256	0,531	0,856	1,315	1,706	2,056	2,479	2,779	3,435	3,707	
27	0,000	0,256	0,531	0,855	1,314	1,703	2,052	2,473	2,771	3,421	3,690	
28	0,000	0,256	0,530	0,855	1,313	1,701	2,048	2,467	2,763	3,408	3,674	
29	0,000	0,256	0,530	0,854	1,311	1,699	2,045	2,462	2,756	3,396	3,659	
30	0,000	0,256	0,530	0,854	1,310	1,697	2,042	2,457	2,750	3,385	3,646	
40	0,000	0,255	0,529	0,851	1,303	1,684	2,021	2,423	2,704	3,307	3,551	
60	0,000	0,254	0,527	0,848	1,296	1,671	2,000	2,390	2,660	2,232	3,460	
80	0,000	0,254	0,527	0,846	1,292	1,664	1,990	2,374	2,639	3,195	3,415	
100	0,000	0,254	0,526	0,845	1,290	1,660	1,984	2,365	2,626	3,174	3,389	
200	0,000	0,254	0,525	0,843	1,286	1,653	1,972	2,345	2,601	3,131	3,339	
∞	0,000	0,253	0,524	0,842	1,282	1,645	1,960	2,326	2,576	3,090	3,291	

RESUME

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

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

Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou

Faculté de Médecine

Département de Pharmacie

Mémoire de Fin d'Etude

Promotion : 2015 – 2016

Résumé

Le médicament, dans l'industrie pharmaceutique doit répondre à des exigences particulières dont la sécurité et l'efficacité, afin d'améliorer la santé du patient.

Dans notre travail, nous avons choisi un médicament de forte consommation notamment dans l'automédication : le Diclofénac qui appartient à la classe thérapeutique des anti-inflammatoires. Dans le but de confirmer les exigences suscitées, nous avons appliqué les méthodes suivantes sur notre médicament : pour évaluer la sécurité nous avons utilisé le test de la toxicité anormale, l'essai de la recherche d'endotoxines bactériennes (LAL test) et le test de tolérance cutanée. Pour son efficacité anti-inflammatoire, nous avons exécuté l'essai de l'œdème de la patte appliquée sur des souris de laboratoire. Ainsi nous avons comparé son activité anti-inflammatoire avec son princeps.

Les résultats de notre travail étaient satisfaisants : notre produit le Diclofénac est un produit sûr et efficace ; présente une activité anti-inflammatoire significative et comparable à celle de son princeps.

Mots clés : anti-inflammatoire, toxicité, endotoxines, tolérance cutanée, œdème.

Abstract

The drug, in the pharmaceutical industry, must respond to particular requirements, including safety and efficiency, to improve the patient's health.

In our work, we have chosen a drug of high consumption especially in self-medication: Diclofenac which belongs to the therapeutic class of anti-inflammatory. In order to confirm the raised requirements, we applied the following methods on our medication: to assess the safety we used the test of abnormal toxicity, testing research of bacterial endotoxins (LAL test) and test of skin tolerance. For its anti-inflammatory efficacy, we performed testing of the paw edema applied to laboratory mice. So we compared its anti-inflammatory activity against its original drug.

The results of our work were satisfactory: our product Diclofenac is a safe and efficient product; has a significant anti-inflammatory activity comparable to that for its princeps.

Keywords: anti-inflammatory, toxicity, endotoxins, tolerance, edema.