

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

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

†.⊙∶∧∧.∪ξ†∫∶∩∶∧.†∫∩∶∫∫∶∩

Département de Pharmacie  
N° D'ordre :

## MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

Présenté et soutenu publiquement le 02 juillet 2018

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

**Evaluation pharmacotoxicologique d'un  
anesthésique local : la lidocaïne.  
Application à un générique et un princeps.**

Réalisé par :

Sonia BATATACHE

Dihia AKKACHA

Encadré par :

Promoteur : Dr Latifa MOUHOUB

Co-promoteur : Dr Omar BENAMARA

Composition du jury :

Dr : Fetta KESSAL

MAHU Faculté de Médecine

UMMTO

Président

Dr : Akram MEKHLOUF

MAHU Faculté de Médecine

LNCPP

Examineur

Année universitaire : 2017/2018



---

# REMERCIEMENTS

---





***Nous adressons nos sincères remerciements :***

**A Monsieur le Professeur Henni CHADER**

**Chef du service de pharmacotoxicologie du laboratoire national de contrôle des produits pharmaceutiques.**

Vos compétences et vos connaissances sont reconnues de tous et resteront pour nous des exemples.

Votre simplicité, votre désir de transmettre le savoir, votre rigueur dans la démarche scientifique et votre modestie font de vous un homme au-delà du maître auquel nous aimerions ressembler.

Vous avez su nous transmettre votre dynamisme et votre passion pour la Pharmacologie.

Nous tenons à vous remercier pour votre accueil chaleureux et votre disponibilité, vous nous avez guidé et soutenu tout au long de notre séjour au sein de votre service malgré vos multiples obligations professionnelles.

Nous tenons à vous témoigner notre plus grande reconnaissance pour tout ce que vous nous avez apporté, tant sur le plan professionnel que personnel.

Trouvez ici cher maître l'expression de notre profond attachement.

**A tout le personnel du service de pharmacotoxicologie du LNCPP**

Votre aide nous a été très précieuse, soyez surs de nos reconnaissances les plus sincères.

Un remerciement spécial à Fahima DERBIL Vous étiez merveilleuse, cela résume tout.



**A notre promoteur le Docteur Latifa MOUHOUB**

**Maitre assistante en pharmacologie**

Nous vous remercions de nous avoir confié ce sujet et d'avoir dirigé ce travail qui a retenu toute notre attention.

Vos conseils et critiques ont beaucoup contribué à l'amélioration de la qualité de ce travail.

Un remerciement spécial pour les corrections expresses, cela est très admirable.

Recevez ici l'expression de notre gratitude et de notre profonde reconnaissance.

**A notre Co-promoteur le Docteur Omar BENAMARA**

**Résident en pharmacologie**

Nous ne saurions jamais trouver assez de mots pour témoigner notre reconnaissance, non seulement pour l'intérêt que vous portez à ce travail, mais aussi, la spontanéité avec laquelle vous avez accepté de le diriger.

Ce travail est le fruit du suivi sans relâche, dont vous avez fait preuve à notre égard.

Votre disponibilité nous a permis d'apprécier en vous vos éminentes qualités humaines et scientifiques.

Veillez accepter cher maître, le témoignage de notre profond respect, véritable admiration et de notre sincère gratitude et soyez assurés de notre profonde reconnaissance.



**A Madame le Docteur Fetta KESSAL**

**Maitre assistante en galénique**

Vous nous faites un grand honneur en acceptant de juger notre travail.

Nous avons beaucoup à apprendre de votre discipline.

Soyez assurées de notre reconnaissance la plus sincère.

**A Monsieur le Docteur Akram MEKHLouF**

**Maitre assistante en pharmacologie**

Nous sommes honorées de vous compter parmi nos juges et vous remercions de l'intérêt que vous avez porté à ce travail.

Soyez assurées de notre plus profond respect.



---

# DEDICACES

---





## *Je dédie ce modeste travail*

### **A mes chers parents ;**

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être. Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours.

Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables sacrifices, bien que je ne vous en acquitterai jamais assez. Puisse Allah, vous accorder santé, bonheur et longue vie et faire en sorte que jamais je ne vous déçoive,  
Je vous aime énormément...

### **A mes grands-parents ;**

Si je suis là aujourd'hui c'est grâce à vous !!

Vous m'avez toujours soutenu et aidé du mieux que vous pouviez, je vous serai éternellement reconnaissante.

Mes grands-parents 3zizen remplis de tendresse, je vous souhaite beaucoup de santé et une longue vie.

### **A khalti Hakima SADI et son cher époux Arezki ARAB ;**

Je ne saurai pas vous remercier pour votre hospitalité lors de ma préparation du BAC, j'ai trouvé chez vous le calme, l'affection et beaucoup d'amour, vous étiez à mes petits soins ! sachez que je n'ai jamais oublié ça !

Je vous aime et j'espère vous rendre un jour la pareille.

### **A mes très chères sœurs :**

#### **A Lamia ;**

Tu as toujours été là pour moi pendant mes moments difficiles, qu'est-ce que je ferai sans toi!

Je sais que sous ton masque se cache la fille la plus douce de la maison.

Merci pour toutes les fois où j'ai séché mes larmes dans tes bras !

Je t'aime ma pupuce !

**A Fatma ;**

Qu'est-ce que je ferai sans toi en Hiver ?? LOL

Merci pour tous les bons moments passés en ta compagnie, pour toute la considération que tu me portes et tout l'amour que je reçois de ta part !...je t'aime

**A Liticia ;**

Je ne saurai jamais trouver les mots pour exprimer toute ma gratitude et ma profonde reconnaissance pour tout le soutien et la considération que je reçois de ta part !

Tu es la parfaite sœur que tout le monde rêverait d'avoir ! ....Je t'aime

**A mes très chers frères :**

**A Mustapha ;**

Tu sais que tu es tout pour moi ! que tu es tout simplement l'homme de ma vie !

Merci pour ton soutien et ta présence, tu as toujours été à mes côtés !! et j'ai toujours pu compter sur toi sauf pour me prendre en voiture MDR.

Tu es mon trésor inestimable !!

**A Zizou ;**

Mon doux frère au grand cœur Sincère, qu'est-ce que la maison aurait été ennuyeuse sans toi !

L'homme de ma vie ! je sais que tu seras toujours là pour moi !

Merci pour le soutien et la grande considération que tu me portes.

Mon trésor inestimable ...je t'aime

**A toi Dihia mon doux binôme ;**

Comme je te le dis toujours, tu es le meilleur choix que j'ai fait de ma vie.

Merci de m'avoir supporté (dans tous les sens du terme !).

**A la famille MOUCHENE ;**

Sans vous nous n'aurions jamais fini à temps notre pratique !

Merci pour votre hospitalité, vous nous avez épargnées les réveils à 4h du matin !

Merci pour les merveilleux moments passés en votre compagnie ! L'ambiance chaleureuse, et la sympathie que vous nous avez témoignée nous ont été droit au cœur.

Une dédicace spéciale pour Anir alias TAGADA ! Tu as illuminé mes journées stressantes, que dieu te bénisse.

*Sonia*



*Je dédie ce modeste travail :*

**A mon très cher Père ;**

Aucun hommage ne saurait transmettre à sa juste valeur ; l'amour, le dévouement et le respect que je porte pour toi. Tu as su m'inculquer le sens de la responsabilité, de l'optimisme et de la confiance en soi face aux difficultés de la vie. Tu as été et tu seras toujours un exemple à suivre pour tes qualités humaines, ta persévérance et ton perfectionnisme.

Je te dois ce que je suis aujourd'hui et ce que je serai demain et je ferai toujours de mon mieux pour rester ta fierté et ne jamais te décevoir. Tu me manque énormément PAPA.....repose en paix.

**A ma très chère mère ;**

Autant de phrases aussi expressives soient-elles ne sauraient montrer le degré d'amour et d'affection que j'éprouve pour toi. Tu m'as comblé avec ta tendresse et affection tout au long de mon parcours.

Tu n'as cessé de me soutenir et de m'encourager durant toutes les années de mes études, tu as toujours été présente à mes côtés pour me consoler quand il fallait. En ce jour mémorable, pour moi ainsi que pour toi, reçoit ce travail en signe de ma vive reconnaissance et mon profond estime. Puisse le tout puissant te donner santé, bonheur et longue vie afin que je puisse te combler à mon tour

**A mon très cher oncle Boualem ;**

Mon conseiller, et ami fidèle, qui m'a assisté dans les moments difficiles et m'a pris doucement par la main pour traverser ensemble des épreuves pénibles.... Je te suis très reconnaissante, et je ne te remercierai jamais assez pour ton amabilité, ta générosité, ton aide précieuse.

À mes yeux tu es l'être le plus cher que j'aime tant, que dieu te bénisse et te protège.

**A mes frères et sœurs**

En souvenir d'une enfance dont nous avons partagé les meilleurs et les plus agréables moments. Pour toute la complicité et l'entente qui nous unissent, j'ai toujours pu compter sur vous quel que soit le moment !! ce travail est un témoignage de mon attachement et de mon amour je vous souhaite une vie pleine de bonheur et de succès, que Dieu, le tout puissant, vous protège et vous garde...

### **A toi Sonia**

Mon tendre binôme, ou plutôt ma sœur tu as illuminé mes jours avec ton enthousiasme et ton énergie, j'ai passé une année inoubliable en ta compagnie, que dieu te protège et je te souhaite beaucoup de réussite

### **A ma famille maternelle et paternelle**

En témoignage de mon attachement et de ma grande considération. J'espère que vous trouverez à travers ce travail l'expression de mes sentiments les plus chaleureux. Que ce travail vous apporte l'estime, et le respect que je porte à votre égard, et soit la preuve du désir que j'avais depuis toujours pour vous honorer. Tous mes vœux de bonheur et de santé.

### **A nana Fetta et la famille MOUCHENE**

Un grand merci pour le merveilleux séjour chez vous !  
L'accueil chaleureux que vous nous avez témoigné me va droit au cœur.  
Soyez sûres de votre grande implication dans l'exécution du mémoire !!

### **A la mémoire de mon grand-père maternel,**

### **la mémoire de ma grand-mère paternelle**

Qui ont été toujours dans mon esprit et dans mon cœur, je vous dédie aujourd'hui ma réussite.  
Que Dieu, le miséricordieux, vous accueille dans son éternel paradis.

### **A mes chers amis**

En souvenir des moments merveilleux que nous avons passés et aux liens solides qui nous unissent. Un grand merci pour votre soutien, vos encouragements, votre aide. J'ai trouvé en vous le refuge de mes chagrins et mes secrets. Avec toute mon affection et estime, je vous souhaite beaucoup de réussite et de bonheur, autant dans votre vie professionnelle que privée.

Je prie Dieu pour que notre amitié soit éternelle.

*Dihia*



**A Samia MOUCHENE**

Merci pour la traduction !! Tu nous as sauvé .

**A Hamid ABDENOURI et Nourredine ASSAM ;**

Merci pour votre aide !

Merci de nous avoir toujours donné la priorité !

Merci malgré les crises cardiaques des tickets de train non payés LOL !

**A Oussama MEHIBEL et Abderrahmane GHALETH ;**

Merci pour votre aide, sans vous on n'aurait jamais appris à faire rentrer les souris dans les boîtes à contention !!

Oussama tu nous as épargné 200km ;) !! Qu'est-ce que nous aurions fait sans toi !!

**A Dada Omar ;**

Merci pour l'impression du mémoire, pour votre gentillesse et de votre humanisme !

*Sonia et Dihia*

# Table de matière

Remerciments ;	
dédicaces;	
Table de matières ;	
Liste des figures ;.....	<b>i</b>
Liste des tableaux ;.....	<b>iv</b>
Liste des abréviations ;.....	<b>vii</b>
Introduction générale et objectifs ;.....	<b>01</b>

## REVUE DE LA LITTERATURE

### Chapitre I : généralités sur l'anesthésie et les anesthésiques

1. Généralité sur l'anesthésie .....	<b>03</b>
1.1. Définition de l'anesthésie.....	<b>03</b>
1.2. Anesthésie générale.....	<b>03</b>
1.3. Anesthésie locorégionale.....	<b>03</b>
1.3.1. Les molécules utilisées en anesthésie locorégionale.....	<b>04</b>
2. Étude des anesthésiques locaux.....	<b>05</b>
2.1.Historique.....	<b>05</b>
2.2.Définition .....	<b>05</b>
2.3.Structure chimique.....	<b>06</b>
2.4.Classification des anesthésiques locaux.....	<b>06</b>
2.4.1. Les amino-amides.....	<b>07</b>
2.4.2. Les amino-esters.....	<b>08</b>
2.5.Relation structure activité.....	<b>08</b>
2.6. Les propriétés physico-chimiques.....	<b>09</b>

2.6.1. Liposolubilité.....	09
2.6.2. pKa (constante d'ionisation) .....	09
2.6.3. Fixation aux proteines.....	10
2.6.4. Chiralité.....	10
2.6.5. Vasomotricité.....	10
2.7. Propriétés pharmacocinétiques.....	10
2.7.1. Absorption.....	11
2.7.2. Distribution.....	11
2.7.3. Métabolisme.....	12
2.7.4. Elimination.....	13
2.8. Pharmacodynamie des anesthésiques locaux.....	13
2.8.1. Rappel d'électrophysiologie cellulaire d'une fibre nerveuse.....	13
2.8.2. Mécanisme d'action des AL.....	15
2.8.3. Autres propriétés pharmacodynamiques des AL.....	15
2.8.4. Les propriétés pharmacologiques des AL.....	16
2.8.5. Les facteurs modifiants l'activité des AL.....	17
2.9. Les propriétés thérapeutiques des anesthésiques locaux.....	17
2.9.1. Usage clinique des AL.....	18
2.9.2. Interférences pathologiques et médicamenteuses.....	20
2.9.3. Les effets indésirables.....	21
2.9.4. Toxicité aigüe et le surdosage.....	22

## **Chapitre II : Etude de la Lidocaïne**

1. Propriétés.....	23
1.1. Formule développée.....	23

1.2. Formes galéniques.....	23
2. Mécanisme d'action.....	24
3. Pharmacocinétique.....	24
3.1. Absorption et distribution.....	24
3.2. Métabolisme.....	24
3.3. Elimination .....	25
4. Indication de la Lidocaïne.....	25
4.1. En anesthésiologie.....	25
4.2. En cardiologie.....	25
5. Contre-indication.....	25

### **Chapitre III : Evaluation pharmaco-toxicologique d'un anesthésique locale**

1. Évaluation de la toxicité des anesthésiques locaux.....	27
1.1.Essai de la toxicité anormale.....	27
1.2.Recherche des endotoxines bactériennes : LAL test.....	27
1.3.Test de la tolérance cutanée.....	28
1.4.Essai des pyrogènes.....	29
2. Évaluation de l'activité des anesthésiques locaux.....	30
2.1.Étude de l'anesthésie de conduction.....	30
2.1.1. Blocage du nerf sciatique chez la souris.....	31
2.1.2. Anesthésie de la queue de souris : Méthode du rayon chauffant de Mack et Nelson.....	31
2.2.Anesthésie d'infiltration .....	31

2.2.1. Anesthésie d'infiltration dans les papules de cobaye : Reflexe peaucier du cobaye.....	31
2.2.2. Essai sur la pulpe dentaire du lapin .....	32
2.3. Anesthésie de surface.....	33
2.3.1. Anesthésie de surface sur la cornée des lapins.....	33
2.3.2. Suppression du réflexe d'éternuement chez le lapin .....	33
2.4. Anesthésie péridurale .....	34
2.4.1. Anesthésie péridurale chez le lapin.....	34
2.5. Anesthésie intrathécale (spinale) .....	35
2.5.1. Anesthésie rachidienne chez le rat .....	35
2.5.2. Blocage du réflexe urétral chez le lapin .....	36

## **PARTIE PRATIQUE**

### **PRESENTATION DU CADRE D'ETUDE**

#### **I. Matériels et méthodes**

1. Évaluation de la toxicité de la Lidocaïne princeps et générique.....	42
1.1. Test de la toxicité anormale.....	42
1.1.1. Objectif et principe.....	42
1.1.2. Locaux et conditions ambiantes.....	42
1.1.3. Matériels.....	42
1.1.4. Mode opératoire.....	43
1.1.5. Mode opératoire.....	46
1.1.6. Interprétation des résultats.....	46
1.2. Essai de recherche des endotoxines bactériennes « LAL test » : méthode A, gélification, essai limite.....	46
1.2.1. Objectif et principe.....	46

1.2.2. Choix de la méthode .....	46
1.2.3. Mécanisme de la réaction de gélification.....	47
1.2.4. Locaux et conditions ambiantes.....	47
1.2.5. Matériels.....	48
1.2.6. Mode opératoire.....	49
1.2.6.1. Validation de la sensibilité du lysat.....	51
1.2.6.2. Essai final : contrôle du produit à tester.....	53
1.2.7. Lecture des résultats.....	57
1.2.8. Interprétation.....	58
2. Évaluation de l'activité anesthésique de la Lidocaïne .....	59
2.1. Méthode du rayon chauffant de Mack et Nelson.....	59
2.1.1. Principe.....	59
2.1.2. Réactifs et matériels.....	59
2.1.3. Protocole expérimental.....	61
2.2. Étude de l'anesthésie de surface : réflexe cornéen du lapin.....	65
2.2.1. Principe.....	65
2.2.2. Réactifs et matériels.....	65
2.2.3. Protocole expérimental.....	67

## **II. RESULTAT**

1. Évaluation de la toxicité de la lidocaïne.....	73
1.1. Test de la toxicité anormale.....	73
1.2. Essai de recherche des endotoxines bactériennes.....	75
1.2.1. Résultats.....	75
2. Évaluation de l'activité de la lidocaïne.....	80

2.1.Méthode du rayon chauffant de Mack et Nelson.....	80
2.1.1. Lidocaïne princeps.....	80
2.1.2. Lidocaïne générique.....	85
2.1.3. Comparaison de la lidocaïne princeps et générique.....	90
2.2.Réflexe cornéen du lapin.....	94
2.2.1. Lidocaïne princeps .....	94
2.2.2. Lidocaïne générique.....	99
2.2.3. Comparaison de la lidocaïne princeps et générique.....	104

### **III. DISCUSSION DES RESULTATS**

1. Évaluation de la toxicité de la lidocaïne princeps et générique.....	109
1.1.Essai de la toxicité anormale.....	109
1.2.Le Test de Limulus « LAL test » .....	110
2. Évaluation de l'activité de la lidocaïne princeps et générique.....	111
2.1.Étude de l'anesthésie de conduction chez la souris (test de la queue de souris) ...	111
2.2.Étude de l'anesthésie de surface : Le réflexe cornéen chez le lapin.....	112

### **CONCLUSION GENERALE ET RECOMMANDATION**

### **REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE**

### **ANNEXES**

---

## Liste des figures

01	Structure chimique des anesthésiques locaux	07
02	Structure chimique des AL amino-amides les plus employés	07
03	Structure chimique des AL amino-esters les plus employés	08
04	Canal sodique voltage dépendant	14
05	Structure chimique de la lidocaïne.	24
06	photographie de limule : <i>Limulus polyphemus</i>	28
07	Unité de contrôle pharmaco toxicologiques des médicaments -Incpp	39
08	Pesée et sélection des souris.	44
09	Préparation des solutions à administrer.	47
10	Administration sous cutanée de la solution de lidocaïne 20 mg/ml, princeps et générique.	47
11	Schéma du mécanisme général d'induction de la gélification par les endotoxines	49
12	Matériels utilisés pour LAL test.	51
13	Flacon de lysat d'amoebocytes de limule	52
14	Flacon de contrôle standard d'endotoxine	53

---

15	Préparation des dilutions de l'essai final	58
16	Incubation des dilutions au bain marie	60
17	Matériels utilisés pour la réalisation de la méthode du rayon chauffant de Mack et Nelson	63
18	Préparation des 3 dilutions de la lidocaïne	65
19	Administration du produit au niveau de la base de la queue	66
20	Focalisation du rayon lumineux sur la partie proximal de la queue	67
21	Crin de cheval	69
22	Coupure des cils supérieurs et inférieurs de l'œil gauche du lapin	71
23	Administration de la solution anesthésique au niveau du sac palpébral de l'œil	73
24	Les lapins néo-zélandais placés dans les boîtes à contention	74
25	Souris du 1 <sup>er</sup> lot 24h après l'administration de la lidocaïne princeps	78
26	Souris du 2 <sup>ème</sup> lot 24h après l'administration de la lidocaïne générique	78
27	Mesure du pH de la lidocaïne princeps	79
28	Résultat de l'essai positif après 1h à 37 °C	80
29	Mesure du pH de la lidocaïne générique	81

---

## Liste des tableaux

I	Interprétation des résultats de l'essai selon la différence entre la température maximale et la température initiale moyenne.	31
II	Séries des dilutions des solutions d'endotoxines, pour la validation initiale	54
III	Préparation des dilutions pour l'essai final du LAL test.	59
IV	Observation des souris 24h après l'administration de la lidocaïne princeps	77
V	Observation des souris 24h après l'administration de la lidocaïne générique	77
VI	Calcul des points finaux et les logarithmes des points finaux	78
VII	Expression des résultats du LAL test pour la lidocaïne princeps	79
VIII	Expression des résultats du LAL test pour la lidocaïne générique	81
IX	Durée d'action de la lidocaïne princeps des 3 lots de souris	83
X	Durée d'action de la lidocaïne princeps des 3 lots de souris en fonction de logarithmes de concentration	83
XI	Résultats de la durée d'action de la lidocaïne princeps	84
XII	Résultats des tests statistiques de la lidocaïne princeps	85

---

XIII	Résultats de la durée d'action de la lidocaïne princeps	86
XIV	Durée d'action de la lidocaïne générique des 3 lots de souris	88
XV	Durée d'action de la lidocaïne générique des 3 lots de souris en fonction des Logarithmes de concentration	89
XVI	Résultats de la durée d'action de la lidocaïne générique	89
XVII	Résultats des tests statistiques de la lidocaïne générique	91
XVIII	Résultats de la durée d'action de la lidocaïne générique	92
XIX	Temps de réaction maximale de chaque souris, obtenu avec la lidocaïne Princeps	94
XX	Temps de réaction maximale de chaque souris, obtenu avec la lidocaïne Générique	94
XXI	Moyennes et variances du temps de réaction maximale des souris sous l'action de la lidocaïne princeps	94
XXII	Moyennes et variances du temps de réaction maximale des souris sous l'action de la lidocaïne générique	95
XXIII	Durée d'action de la lidocaïne princeps des 3 lots de lapins	97
XXIV	Durée d'action de la lidocaïne princeps des 3 lots de lapins en fonction des logarithmes de concentration	97
XXV	Résultats de la durée d'action de la lidocaïne princeps	98
XXVI	Résultats des tests statistiques de la lidocaïne princeps	99
XXVII	Résultats de la durée d'action de la lidocaïne princeps	100

---

---

XXVIII	Durée d'action de la lidocaïne générique des 3 lots de souris	<b>102</b>
XXIX	Durée d'action de la lidocaïne générique des 3 lots de souris en fonction des logarithmes de concentration	<b>103</b>
XXX	Résultats de la durée d'action de la lidocaïne générique	<b>103</b>
XXXI	Résultats des tests statistiques pour la lidocaïne générique	<b>105</b>
XXXII	Résultats de la durée d'action de la lidocaïne générique	<b>106</b>
XXXIII	Durée d'action pour chaque lapin, obtenu avec la lidocaine princeps.	<b>108</b>
XXXIV	Durée d'action pour chaque lapin, obtenu avec la lidocaine générique	<b>108</b>
XXXV	Moyennes et variances de la durée de l'anesthésie locale sous l'action de la lidocaïne princeps	<b>108</b>
XXXVI	Moyennes et variances de la durée de l'anesthésie locale sous l'action de la lidocaïne générique	109

---

---

## Liste des abréviations

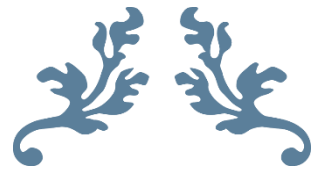
<b>Abréviation</b>	<b>Signification</b>
<b>OMS</b>	<b>Organisation mondiale de la santé</b>
<b>AL</b>	<b>Anesthésiques locaux</b>
<b>ADH</b>	<b>Hormone antidiurétique</b>
<b>PM</b>	<b>Poids moléculaire</b>
<b>mV</b>	<b>Millivolt</b>
<b>ml</b>	<b>Millilitre</b>
<b>Min</b>	<b>Minute</b>
<b>pH</b>	<b>Potentiel hydrogène</b>
<b>DT</b>	<b>Dilution testée</b>
<b>pKa</b>	<b>Constante d'ionisation</b>
<b>LCR</b>	<b>Liquide céphalo-rachidien</b>
<b>ALRIV</b>	<b>Anesthésie locorégionale en intraveineux</b>
<b>IPc</b>	<b>Indice d'irritation primaire cutanée</b>
<b>LAL</b>	<b>Lysat d'amœbocytes de limule</b>
<b>g</b>	<b>Gramme</b>
<b>Kg</b>	<b>Kilogramme</b>
<b>h</b>	<b>Heure</b>

<b>µl</b>	<b>Microlitre</b>
<b>MPE</b>	<b>Pourcentage de l'effet maximal</b>
<b>RCP</b>	<b>Résumé des caractéristiques du produit</b>
<b>DE50</b>	<b>Dose efficace 50</b>
<b>Mg</b>	<b>Milligramme</b>
<b>V</b>	<b>Volume</b>
<b>Cm</b>	<b>Centimetre</b>
<b>S</b>	<b>Seconde</b>
<b>UI</b>	<b>Unité internationale</b>
<b>UE</b>	<b>Unité européenne</b>
<b>Pept.C</b>	<b>Peptide C</b>
<b>CSE</b>	<b>Endotoxine stadard de controle</b>
<b>LE</b>	<b>Concentration limite en endotoxine</b>
<b>PF</b>	<b>Points finaux</b>
<b>MG</b>	<b>Moyenne géométrique</b>
<b>DMS</b>	<b>Dose maximale significative</b>
<b>Ex</b>	<b>Exemple</b>
<b>Mm</b>	<b>Millimetre</b>
<b>W</b>	<b>Watt</b>

---

---

<b>Da</b>	<b>Dalton</b>
<b>PAB</b>	<b>Acide Para-Amino-Benzoïque</b>



---

# INTRODUCTION

---



---

## INTRODUCTION ET OBJECTIFS

L'industrie pharmaceutique est, dans le monde entier, un élément important des systèmes de santé. Elle comprend de nombreux services et entreprises (privés ou publics) qui découvrent, mettent au point, fabriquent et commercialisent des médicaments au service de la santé et qui ont joué un rôle prépondérant dans la hausse de la qualité et l'espérance de vie des populations au cours des derniers siècles [1].

L'industrie pharmaceutique algérienne est confrontée à la nécessité de se mettre au diapason de l'évolution des exigences internationales en matière de recherche et de développement de leurs objectifs, la fabrication de médicament de dernière génération capable de prendre en charge les pathologies les plus fréquentes, et ce à moindre coût, tout en respectant les critères d'efficacité, de qualité, de sécurité et de tolérance [2].

Plusieurs mécanismes pour l'assurance de la qualité des produits pharmaceutiques ont été imposés par différentes instances internationales (pharmacopée européenne, les guidelines) et sont appliqués obligatoirement par la réglementation algérienne pour faire en sorte que, les produits fabriqués localement ou ceux importés correspondent aux normes prescrites et soient sans risque pour le consommateur.

Plusieurs types de médicaments ont été produits jusqu'à maintenant, et des recherches se font pour répondre aux situations de résistance à une molécule donnée, une maladie ou une infection nouvelle.

Parmi toute la panoplie de médicaments connus et ayant prouvé leur efficacité thérapeutique, figurent les anesthésiques locaux. La Lidocaïne, est un anesthésique local qui a été mis au point dans les années 1940 et qui est commercialisé depuis, sans interruption. C'est actuellement l'anesthésique local le plus célèbre et même le plus utilisé dans le monde. En 2013, l'OMS l'a inscrit sur la liste des médicaments essentiels.

Plusieurs secteurs du monde médical utilisent cet anesthésique local pour la gestion de la douleur pendant les traitements interventionnels mineurs et pour les soins postopératoires après les interventions chirurgicales majeures ainsi que pour son action antiarythmique en cardiologie.

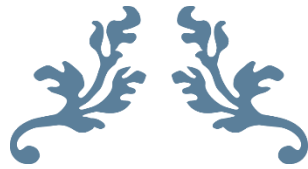
Vu l'importance de ces molécules, nous avons entrepris une étude afin d'évaluer l'activité pharmacotoxicologique d'un princeps et d'un générique de la Lidocaïne pour déterminer leur conformité avec les normes en vigueur.

---

Au cours de ce travail, nous proposerons un rappel pharmacologique des anesthésiques locaux, rappel indispensable permettant de comprendre la pharmacodynamie et la pharmacocinétique de ces molécules.

Dans un second temps, nous analyserons les données de la littérature concernant les méthodes d'évaluation de la sécurité et de l'activité des anesthésiques locaux.

Enfin, dans la troisième partie, nous exposerons les résultats de notre étude sur le princeps et sur le générique de la Lidocaïne, dans le cadre d'un contrôle pharmacotoxicologique par des méthodes *in vitro* (LAL test) et *in vivo* (la toxicité anormale, l'anesthésie de conduction et l'anesthésie de surface) chez le lapin et la souris. Ces méthodes ont été soigneusement codifiées afin d'autoriser des comparaisons quantitatives.



---

# REVUE DE LA LITTERATURE

---



---

## CHAPITRE I : GENERALITE SUR L'ANESTHESIE ET LES ANESTHESIQUES

### 1. Généralité sur l'anesthésie

#### 1.1. Définition de l'anesthésie

L'anesthésie (Étymologiquement : privation de sensibilité) est une perte réversible de la conscience avec abolition de toutes les sensibilités : périphériques, tactiles, kinesthésiques, douloureuses et thermiques [3]. Son domaine d'action s'étend à tous les gestes invasifs, thérapeutiques ou diagnostiques, susceptibles d'être douloureux et à l'analgésie obstétricale. L'anesthésie concerne donc la suspension de la sensibilité, de la douleur et du mouvement, de façon générale ou locale, Elle peut donc être de deux types : générale ou locorégionale [4].

#### 1.2. Anesthésie générale

Il s'agit de plonger le patient dans un état de sommeil profond tout en le privant des sensations douloureuses par l'injection de médicaments et/ou par l'inhalation de vapeurs anesthésiques [5]. Elle combine une perte de conscience (narcose), une absence de sensation douloureuse (analgésie), une amnésie, évite (ou limite) les réactions neuroendocriniennes réflexes à la douleur opératoire : activation sympathique, hypersécrétion d'ADH, cortisol, aldostérone, etc... [6] et entraîne un relâchement musculaire suffisant pour permettre la réalisation de l'acte chirurgical [7].

#### 1.3. Anesthésie locorégionale

L'anesthésie locorégionale consiste en l'administration d'agents chimiques (anesthésiques locaux, opioïdes,  $\alpha$ -2-agonistes...) au contact des neurones moteurs et sensoriels, afin de produire de façon temporaire une perte de mouvements et de sensations [8]. Il existe deux grandes classes :

- **Blocus périphérique** : inhibe la perception sensorielle dans une partie isolée du corps, c'est l'exemple de l'engourdissement d'une dent lors d'une intervention dentaire.
- **Blocus neuraxial (ou blocage central)** : l'anesthésique est administré dans la région du système nerveux central, supprimant ainsi les sensations entrantes de l'extérieur de la zone du bloc. L'anesthésie péridurale et l'anesthésie rachidienne en sont des exemples [8].

---

### 1.3.1. Molécules utilisées en anesthésie locorégionale

#### ➤ Opiïdes

Les opioïdes suppriment la douleur viscérale et somatique en bloquant de façon sélective les influx nociceptifs, sans interférer avec les fonctions sensorielles et motrices ou déprimer le système nerveux sympathique [8]. Ils provoquent moins d'effets systémiques que celle des anesthésiques locaux et une analgésie plus prolongée et plus profonde [9].

Les molécules les plus couramment utilisées sont : Fentanyl, Sufentanil, Péthidine et Alfentanil [8].

#### ➤ Morphine

La morphine reste la molécule la plus employée de part sa grande activité, sa longue durée d'action (du fait de son hydrosolubilité) ainsi que son prix modéré [10]. Son principal intérêt réside dans la gestion de la douleur péri- et postopératoire. Elle est utilisée pour l'anesthésie épidurale et l'anesthésie intra-articulaire [11].

#### ➤ $\alpha$ -2-agonistes

Les  $\alpha$ -2-agonistes sont uniquement utilisés pour l'anesthésie épidurale. Leur emploi est cependant peu courant ; mais actuellement ils sont de plus en plus utilisés en association à d'autres drogues telles que les AL et les opioïdes dont ils potentialisent l'effet.

Les molécules les plus couramment utilisées sont : Xylazine, Clonidine, Détomidine, et Médétomidine [8].

#### ➤ Anesthésiques locaux

Depuis la découverte et l'utilisation de la Cocaïne, les anesthésiques locaux restent les drogues les plus employées aujourd'hui, même si de nouvelles molécules (opioïdes,  $\alpha$ -2-agonistes) sont de plus en plus utilisées en anesthésie locorégionale [8].

#### ➤ Association anesthésiques locaux/opioïdes

Des combinaisons d'anesthésiques locaux et d'opioïdes ont été administrées, dans le but d'optimiser l'analgésie produite et de réduire les doses de chaque molécule [10]. Cette combinaison s'accompagne de peu d'effets hémodynamiques et respiratoires, mais d'une profonde analgésie [12].

L'association morphine/ bupivacaïne est la combinaison la plus couramment employée [8].

---

## 2. Etude des anesthésiques locaux

### 2.1. Aperçu historique

L'idée de provoquer une anesthésie locale, sans que le patient ne perde connaissance, ne fut jamais tout à fait étrangère aux chirurgiens. Dans le passé, les égyptiens utilisaient la pierre de memphis trempée dans du vinaigre pour obtenir une anesthésie locale, d'autres ont cherché à provoquer l'insensibilité en comprimant les nerfs au moyen d'un garrot, ou en refroidissant la région où l'on devait opérer [13, 14].

Le premier anesthésique local, la Cocaïne, a été découvert fortuitement vers la fin du 19<sup>ème</sup> siècle. En 1860, Albert Niemann isola, à partir d'un extrait de feuilles de coca, un alcaloïde qu'il baptisa [Cocaïne](#) et qui fut considéré comme un simple stimulant, voisin de la caféine. Cette découverte fait suite à des siècles d'utilisation par les indigènes andins qui mâchaient un extrait alcalin de ces feuilles pour ses actions stimulantes et euphorisantes[15]. Sigmund Freud fut le premier à connaître le pouvoir narcotique de cette plante mais c'est le chirurgien viennois Karl Koller en 1884 qui démontra son effet et l'introduisit dans la pratique clinique comme anesthésique topique pour la chirurgie ophtalmologique [16].

Les chimistes commencèrent alors à créer des substituts pour avoir un médicament ayant les mêmes fonctions que la Cocaïne mais avec des effets toxiques moindres (troubles psychiques et une dépendance extrêmement importante)[17]. Différents analogues furent alors synthétisés, dont l'Eucaïne, la Benzocaïne, la Procaïne ainsi que la Tétracaïne. Cependant, ces molécules sont des esters, pouvant induire des réactions allergiques et dont la durée d'action est trop courte. Les recherches se sont donc orientées vers des dérivés amides et notamment la Lidocaïne qui fut synthétisée en 1943 dont la durée d'action est beaucoup plus prolongée que la Procaïne ou la Tétracaïne. La synthèse de la Bupivacaïne en 1963 constitue un autre jalon important dans l'histoire des anesthésiques locaux. Finalement, des recherches démontrant la cardiotoxicité de la Bupivacaïne ont mené à la découverte de la Ropivacaïne en 1996 et la Lévocabupivacaïne en 1999 [18].

### 2.2. Définition

Un anesthésique local est une substance qui, appliquée au contact des fibres nerveuses, à une concentration appropriée bloque la conduction axonale.

Il agit de façon spécifique, temporaire et réversible sur toutes les fibres motrices, sensibles, sensorielles et autonomes à tous les niveaux du système nerveux.

---

Un anesthésique local est destiné à supprimer toute sensation douloureuse, sans perte de la conscience, après application locale, infiltration locorégionale ou injection à proximité de structures conductrices [6].

Un bon anesthésique local doit présenter les propriétés suivantes :

✓ **Qualités pharmacologiques (efficacité)**

- Interrompre spécifiquement et complètement la conduction nerveuse ;
- Délai d'installation rapide, temps de latence court, durée d'action suffisamment longue ;
- Présenter un effet réversible.

✓ **Qualités toxicologiques (innocuité)**

- Sans causticité pour les fibres nerveuses ;
- Sans toxicité systémique dans les conditions d'utilisation courante ;
- Non irritant, non allergisant pour les tissus.

✓ **Qualités pharmaceutiques**

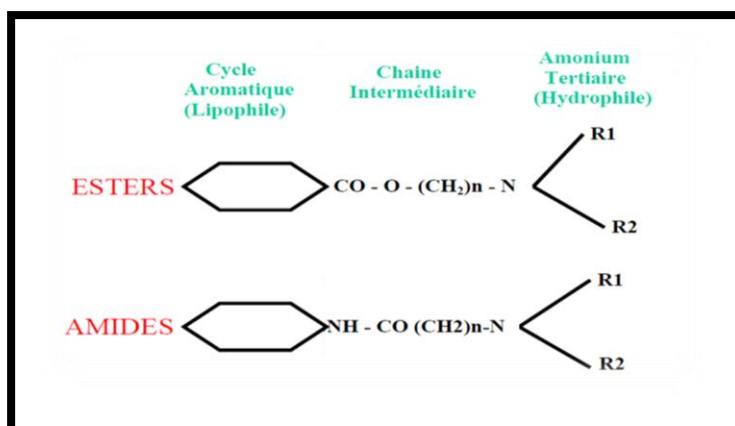
- Soluble dans l'eau, stable en solution et compatible avec les vasoconstricteurs courants (Adrénaline) [19].

### **2.3. Structure chimique des anesthésiques locaux**

Les AL sont des alcaloïdes composés d'un noyau aromatique relié par une chaîne intermédiaire à un groupement aminé. Cette structure qui associe dans la molécule un pôle lipophile (groupement aromatique) à un pôle hydrophile et ionisable (groupement amine) est commune à tous les composés et paraît nécessaire au développement de l'activité anesthésique [20].

### **2.4. Classification des anesthésiques locaux**

La nature chimique de la liaison entre le pôle hydrophile et le pôle lipophile permet d'individualiser deux classes d'anesthésiques locaux, selon qu'il s'agit d'une liaison ester CO-O (amino-ester) ou d'une liaison amide NH-CO (amino-amide).

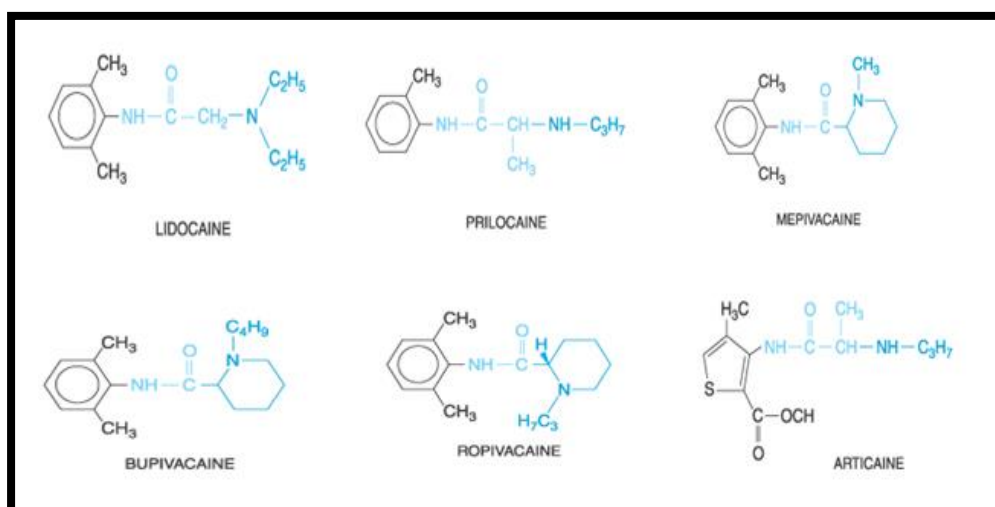


**Figure 1** : Structure chimique des anesthésiques locaux [21].

### 2.4.1. Amino-amides

Les AL amino-amides montrent d'incontestables avantages par rapport aux AL amino-esters dans le domaine des effets secondaires, aussi de nos jours, pratiquement seuls les AL amino-amides sont utilisés en anesthésie [19]. Les substances les plus employées sont les suivantes :

- La Lidocaïne ;
- La Prilocaine ;
- La Mépivacaïne ;
- La Bupivacaïne ;
- La Ropivacaïne ;
- L'Articaïne.



**Figure 2** : Structure chimique des AL amino-amides les plus employés [22].

### 2.4.2. Les amino-esters

La plupart sont des dérivés d'esters de l'acide para-amino-benzoïque, possédant une fonction amine en para. Leur stabilité chimique est plus faible que celle des amides[19]. Les substances les plus employées sont :

- La Cocaïne ;
- La Tétracaïne ;
- La Procaïne ;
- La Chloroprocaïne.

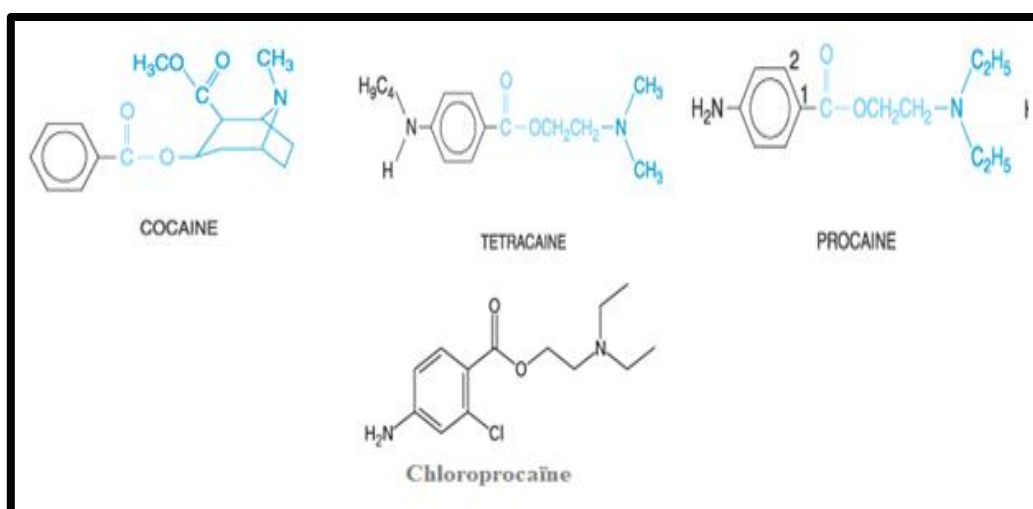


Figure 3 : Structure chimique des AL amino-esters les plus employés [22].

### 2.5. Relation structure activité

De la structure moléculaire des AL, vont dépendre étroitement la puissance intrinsèque et la demi-vie de l'AL.

- **Pôle lipophile (cycle aromatique type acide benzoïque ou para-aminobenzoïque)**

Confère à la molécule ses propriétés anesthésiques. Il conditionne la liposolubilité et donc la pénétration au travers de la gaine de myéline et de la membrane axonale ; la latence et la durée d'action en dépendent aussi [23].

- **Pôle hydrophile (amine tertiaire, rarement secondaire)**

Conditionne l'hydrosolubilité et donc la répartition sanguine, la diffusion et la fixation protéique [23].

---

---

- **Chaîne intermédiaire (fonction ester, éther, ou amide)**

Sa longueur influence la liposolubilité (allongement de la chaîne intermédiaire) ou l'hydrosolubilité (raccourcissement de la chaîne intermédiaire) et par conséquent détermine la puissance ainsi que la toxicité de la molécule.

La nature de la chaîne intermédiaire conditionne le métabolisme de ces médicaments :

- Les amino- amides subissent un métabolisme hépatique lent, leur conférant une stabilité et une durée d'action prolongée.
- Les amino-esters sont rapidement hydrolysés dans le plasma, ce qui explique leur faible toxicité systémique [6, 23].

## **2.6. Propriétés physicochimiques**

Les anesthésiques locaux sont des bases faibles de poids moléculaire (PM) compris entre 200 et 300 Da. Leurs structures chimiques variées leur confèrent des propriétés physicochimiques différentes et conditionnent leurs caractéristiques pharmacodynamiques, telles que leur liposolubilité, leur constante de dissociation (pKa) ou leur liaison aux protéines [20].

### **2.6.1. Liposolubilité**

La liposolubilité est une caractéristique primordiale d'un AL. Un degré élevé d'hydrophobicité favorise l'accumulation tissulaire des anesthésiques locaux près de leurs sites d'action et leur affinité pour leurs cibles moléculaires. Ainsi, la puissance, la durée d'action et la toxicité potentielle des anesthésiques locaux augmentent avec le degré d'hydrophobicité et de liposolubilité de la molécule [24].

### **2.6.2. pKa (constante d'ionisation)**

L'état d'ionisation dépend du pKa de la molécule et du pH du milieu.

$$\log \frac{[\text{forme ionisée}]}{[\text{forme non ionisée}]} = \text{pKa} - \text{pH}$$

Les anesthésiques locaux sont des amines faiblement basiques, peu solubles et instables en solution aqueuse. Chaque solution d'anesthésique local possède une constante de dissociation (pKa) propre à elle. L'ionisation influence la solubilité et l'activité des AL ainsi que leur

---

distribution tissulaire. Dans la solution injectable l'AL est en partie sous forme ionisée il est commercialisé sous forme de sels chlorhydrates.

Seule la forme basique liposoluble peut traverser les membranes nerveuses et atteindre le récepteur mais c'est la forme ionisée douée de l'activité anesthésique qui s'y fixe [25].

### **2.6.3. Fixation aux protéines**

Les AL se fixent sur les protéines plasmatiques : l'albumine et surtout l' $\alpha$ 1- glycoprotéine. Ces protéines plasmatiques étant rapidement saturées, les AL se fixent également sur les protéines tissulaires et c'est l'importance de cette affinité qui conditionne leur redistribution [25, 26].

### **2.6.4. Chiralité**

De nombreuses molécules comportent un carbone asymétrique. Ce carbone asymétrique conduit à distinguer des isomères que l'on appelle énantiomères ou isomères optiques.

Les propriétés physico-chimiques sont identiques mais les effets pharmacologiques peuvent être différents selon l'isomère. Le plus souvent c'est des mélanges racémiques qui se trouvent dans le marché (50% de forme S et 50% de forme R) (ex : Mèpivacaïne, Prilocaine, Bupivacaïne) sauf la Lidocaïne qui ne comporte pas de carbone asymétrique et donc pas d'énantiomères (achirale). La Ropivacaïne et la Lévocabupivacaïne sont des énantiomères S purs, tous deux lévogyres.

Les énantiomères R semblent être plus toxiques que les énantiomères S [27–29].

### **2.6.5. Vasomotricité**

La plupart des AL ont un effet vasoconstricteur à faible concentration et une activité vasodilatatrice à forte concentration. Les énantiomères S de la Ropivacaïne et de la Lévocabupivacaïne, sont légèrement vasoconstricteurs [30].

## **2.7. Propriétés pharmacocinétiques**

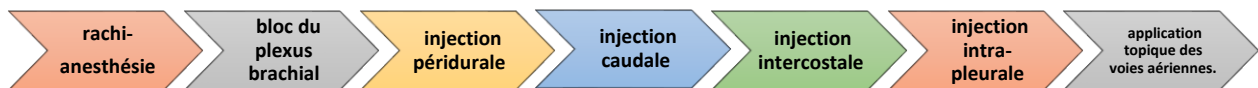
Dans le cas des anesthésiques locaux et contrairement aux autres médicaments, c'est l'effet au niveau du site d'injection qui est recherché. La diffusion du produit et sa résorption sanguine sont des phénomènes non souhaités (sauf lors de l'utilisation de la Lidocaïne pour le traitement des troubles du rythme).

Le devenir d'un anesthésique local dans l'organisme dépend de sa résorption sanguine, de son métabolisme et de son élimination [31].

### 2.7.1. Absorption

L'absorption peut être monophasique, comme après une injection sous-arachnoïdienne, ou biphasique avec une phase initiale rapide suivie d'une phase plus lente, correspondant aux sites d'injection riches en graisses, comme lors du bloc du plexus brachial et d'injection péridurale.

La vitesse d'absorption sanguine varie essentiellement avec la richesse en tissus graisseux, le débit sanguin local et les propriétés physicochimiques de l'AL, ainsi l'ordre croissant des vitesses d'absorption est comme suit :



Après injection, une partie de la dose rejoint sa cible, tandis qu'une autre partie rejoint la circulation systémique par une diffusion aisée à travers l'endothélium vasculaire en raison de la liposolubilité élevée des AL. Une densité capillaire importante, un débit sanguin local et un coefficient de partage sang/tissus élevés sont des facteurs d'accroissement de l'absorption systémique.

Cette absorption peut être modifiée par l'addition de vasoconstricteurs, mais aussi par l'effet propre des AL ; la Lidocaïne, la Bupivacaïne et l'Étidocaïne induiraient une vasodilatation favorisant leur absorption systémique. La Prilocaine, la Mépivacaïne et la Ropivacaïne induiraient plutôt une vasoconstriction (l'addition de vasoconstricteurs n'offre, dans ce cas, aucun intérêt thérapeutique) [22, 24].

### 2.7.2. Distribution

#### ➤ Distribution locale

Elle dépend d'une multitude de facteurs : la nature et la viscosité de l'excipient, le volume injecté, la concentration de l'anesthésique, la vitesse et le site de l'injection, ainsi que l'addition éventuelle d'adjuvants.

Une fraction de la dose injectée peut se fixer soit au niveau des tissus adipeux (AL lipophiles) soit au niveau des protéines des tissus voisins, ce qui peut retarder l'installation du bloque et

---

diminuer son efficacité et sa toxicité et ainsi par relargage accroître la durée d'exposition aux AL [32].

➤ **Distribution systémique**

Dans le plasma, les AL se retrouvent sous 3 formes :

- Une forme fixée principalement aux protéines plasmatiques ;
- Une forme libre ionisée, fortement influencée par le pH et le pKa de l'AL ; c'est la forme active ;
- Une forme libre non dissociée, qui est la seule fraction capable de diffuser hors du secteur vasculaire.

Les AL sont transitoirement captés par le poumon puis relargués dans le torrent circulatoire, ce qui explique le risque neurotoxique accru en cas d'injection intra-artérielle accidentelle par absence d'épuration pulmonaire.

Tous les anesthésiques locaux franchissent la barrière placentaire, puisque ce sont des molécules liposolubles et de faible poids moléculaire [32].

### 2.7.3. Métabolisme

➤ **Esters**

Les esters comme la Succinylcholine, la Cocaïne ou l'Héroïne sont hydrolysés dans le sérum et les hématies par des estérases non spécifiques ou pseudo-cholinestérases. Seule la Cocaïne possède un métabolisme hépatique de relative importance.

Les esters ont longtemps été considérés comme des agents très sûrs à cause de la dégradation plasmatique rapide. En effet, leurs métabolites sont inactifs et non toxiques et seul l'acide para-amino-benzoïque peut induire des réactions toxiques, principalement d'origine allergique.

Malgré tout, certains patients présentent une déficience en pseudo-cholinestérases, et sont ainsi à risque de présenter des réactions toxiques, en particulier avec la Tétracaïne [27].

➤ **Amides**

Les dérivés amides sont nettement plus stables que les dérivés esters, le métabolisme est presque exclusivement hépatique (enzymes microsomiales).

---

Les réactions de phase I conduisent à des métabolites ionisés hydrosolubles, elles sont suivies de réaction de phase II (conjugaison à l'acide glucuronique et accessoirement à la glycine et à la cystéine).

A la différence des AL esters, la biotransformation des AL amides ne forme pas de PAB, une allergie aux AL amides est dans ce cas extrêmement rare [31].

#### **2.7.4. Elimination**

Essentiellement rénale, sous forme dégradée (libre et conjuguée) pour la plus grande partie et sous forme inchangée pour une faible fraction de la dose initiale (5%).

L'élimination biliaire est négligeable (cycle entéro-hépatique).

Les altérations de la fonction rénale ne modifient pas la clairance des anesthésiques locaux mais il existe un risque d'accumulation de leurs métabolites actifs [31].

### **2.8. Pharmacodynamie des anesthésiques locaux**

#### **2.8.1. Rappel d'électrophysiologie cellulaire d'une fibre nerveuse**

##### **a) Potentiel de repos**

Au repos les membranes cellulaires sont polarisées, une charge positive sur la phase externe et une charge négative sur la phase interne de telle sorte que le potentiel de membrane ait une valeur stable de  $-90$  mV [30].

##### **b) Potentiel seuil, potentiel d'action**

L'excitation de la membrane cellulaire par exemple par un stimulus électrique, crée une dépolarisation partielle caractérisée par l'apparition d'un pré-potentiel, non propagé. Quand celui-ci atteint la valeur seuil de  $-55$  mV, il se produit une brusque dépolarisation membranaire qui correspond au potentiel d'action, avec une phase de :

- **Dépolarisation** : ouverture des canaux sodiques et entrée rapide de  $\text{Na}^+$  dans la cellule, créant un transfert intracellulaire de charge positive et une inversion de la différence de potentiel.
- **Repolarisation** : fermeture des canaux sodiques et ouverture des canaux potassiques avec sortie de potassium à l'extérieur de la cellule.

- **Hyperpolarisation** : correspond à une sortie en excès d'ions  $K^+$  lors de la repolarisation ce qui entraîne une augmentation de la différence de potentiel membranaire, plus importante que la différence de potentiel présente au repos. Il y a alors intervention des pompes  $Na^+/K^+$  pour rétablir les concentrations ioniques et retour au potentiel de repos.

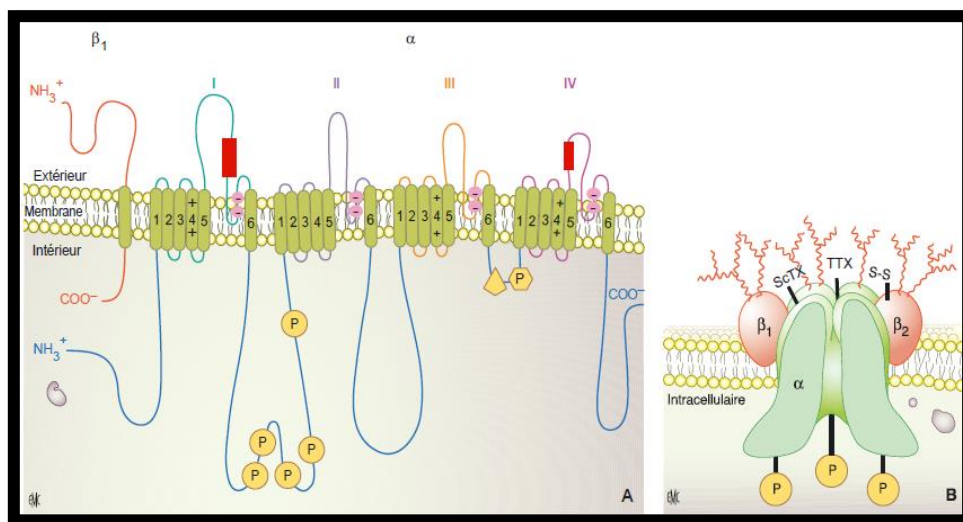
Ce phénomène de vague de dépolarisation se propage le long de la fibre nerveuse, il est responsable de la conduction de l'influx nerveux le long de cette fibre [33].

### c) Canaux sodiques voltage dépendants

Ce sont des complexes hétéromériques de protéines glycosylées formés de 3 sous unités  $\alpha$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ . La grande sous unité du canal  $Na^+$  contient 4 domaines homologues (I à IV). Chaque domaine est constitué de 6 domaines transmembranaires ou segments en hélice  $\alpha$  (S1 à S6).

Le pore transmembranaire  $Na^+$  dépendant du canal est localisé au centre des 4 domaines homologues. L'ouverture voltage dépendant du canal, reflète des changements de conformation par mouvements de charges formant sa couronne interne (modifications du potentiel membranaire) qui conduit à son ouverture.

Les hélices S4 hydrophobes et chargées positivement, se déplacent perpendiculairement au plan de la membrane initiant des modifications conformationnelles des 4 domaines.



**Figure 4** : Canal sodique voltage dépendant [34].

Après ouverture, le canal est inactivé par fermeture d'une porte d'inactivation formée par une boucle protéique intracellulaire qui se lie aux domaines homologues III et IV.

A l'état « inactivé » le canal est insensible à toute stimulation [27].

---

### 2.8.2. Mécanisme d'action des anesthésiques locaux

L'action des AL au niveau d'un nerf est dose-dépendante et réversible, ils empêchent la formation et la conduction de l'influx nerveux, en diminuant ou en empêchant l'importante augmentation de la perméabilité membranaire au sodium, qui est normalement provoquée par une légère dépolarisation membranaire. Cette action des anesthésiques locaux résulte de leur interaction directe avec les canaux  $\text{Na}^+$  voltage-dépendants[35].

Lors de la progression de l'effet anesthésiant dans un nerf, le seuil d'excitabilité électrique augmente progressivement, la vitesse de dépolarisation diminue, la conduction neuronale est ralentie et la période réfractaire est allongée.

Le blocage du canal sodique résulte de l'interaction de l'AL avec un récepteur sans doute situé à sa face interne. On aura de ce fait une inhibition de l'entrée voltage-dépendante de  $\text{Na}^+$  dans la cellule, et donc une stabilisation du potentiel de repos, ce qui rend plus difficile puis impossible l'atteinte du seuil nécessaire au déclenchement d'un potentiel d'action. La conduction nerveuse est inhibée, le potentiel d'action ne peut plus se propager. Le bloc de conduction des AL est dépendant de la fréquence de stimulation ; plus la fréquence de stimulation est élevée, plus le canal sodique demeure ouvert, et plus l'AL diffuse dans la cellule. L'opportunité pour l'AL de diffuser dans la cellule et d'agir au niveau du site interne des canaux sodique est ainsi particulièrement importante pour les stimulations à haute fréquence [6, 31].

#### ☒ Remarque

Les anesthésiques locaux sont également de puissants bloqueurs des canaux potassiques et, à un moindre degré, des canaux calciques. Ces effets n'apparaissent qu'à des concentrations supérieures à celles où s'observent les effets du blocage des canaux sodiques, mais il se pourrait que le blocage des canaux potassiques participe aux effets arythmogènes des anesthésiques locaux et que le blocage des canaux calciques favorise leurs effets inotropes négatifs [36].

### 2.8.3. Autres propriétés pharmacodynamiques des AL

#### ➤ Effets Cardiovasculaires

Les anesthésiques locaux bloquent puissamment les canaux sodiques et donc ralentissent la vitesse de conduction intraventriculaire. Le tableau clinique après injection intravasculaire

---

massive est d'abord un élargissement majeur du QRS, des arythmies de type tachycardie ventriculaire, torsade de pointes ou bradycardie extrême peuvent survenir. Ces troubles du rythme sont souvent suivis de fibrillation ventriculaire ou d'asystolie. L'hypoxie, l'acidose, l'hypothermie, les désordres électrolytiques (hyponatrémie sévère ou hyperkaliémie) augmentent le risque cardiotoxique [36–38].

➤ **Effets sur le système nerveux central**

Les anesthésiques locaux sont des antiépileptiques à basse concentration. Mais à des concentrations supérieures, ils induisent des convulsions puis un coma. Les accidents neurologiques (convulsions) sont en général bénins lorsqu'ils surviennent au bloc opératoire. Il n'en est pas de même lorsque le patient n'est pas dans une structure adaptée à la réanimation cardiorespiratoire d'urgence [27].

#### **2.8.4. Propriétés pharmacologiques des AL**

La qualité d'un bloc nerveux est en fonction de la posologie utilisée et de la disponibilité de l'AL au site d'injection. Les effets cliniques propres des AL dépendent en grande partie des propriétés pharmacologiques suivantes :

➤ **Puissance anesthésique**

La puissance du bloc est en fonction de la liposolubilité de la molécule qui favorise la diffusion, et dans une moindre mesure de son poids moléculaire (un poids moléculaire élevé augmente la latence d'action et ralentit fortement la vitesse de dissociation entre l'AL et le récepteur) [39, 40].

➤ **Durée d'action des AL**

Compte tenu de leurs propriétés pharmacocinétiques, les AL sont classés en durée d'action intermédiaire (Lidocaïne, Mépivacaïne), et en durée d'action longue (Bupivacaïne, Lévocabupivacaïne, Ropivacaïne).

La durée d'action varie en fonction de la nature de l'AL, de la voie d'administration ainsi que de divers facteurs, dont la vitesse de dissociation du complexe récepteur-AL et le pourcentage de liaison.

En général plus l'AL est puissant, plus sa durée d'action est longue, et plus son métabolisme est lent et plus sa toxicité est importante [41, 42].

### ➤ **Latence d'action**

L'installation du bloc dans un nerf isolé (in-vitro) dépend des propriétés physicochimiques de l'AL et notamment de son pKa (qui détermine le délai d'action d'un AL). Ainsi, les AL ayant un pKa proche du pH ambiant (Mépipvacaine, Lidocaïne) auront un rapport forme ionisée/forme non ionisée plus faible comparé aux AL avec un pKa plus élevé. Or, c'est la forme non ionisée qui diffuse plus facilement à travers les membranes.

La latence est également corrélée in-vivo à la dose et à la concentration de la solution administrée. Mais les variations interindividuelles sont nombreuses, notamment en fonction de la voie d'administration et de la grosseur du nerf à bloquer et donc du site d'injection [43, 44].

### **2.8.5. Facteurs modifiants l'activité des anesthésiques locaux**

- **Dose** : L'augmentation de la dose d'AL administrée, raccourcit la latence et prolonge la durée du bloc anesthésique [19].
- **Site d'administration** : Les voies sous arachnoïdienne et sous-cutanée se caractérisent par une latence et une durée d'action plus courtes. Alors que la latence et la durée d'action les plus longues sont observées lors des blocs du plexus brachial [19].
- **Adjuvants** : La raison principale de l'utilisation d'adjuvants aux anesthésiques locaux est de prolonger la durée de l'analgésie préopératoire et postopératoire tout en diminuant les doses d'anesthésiques locaux pour en limiter les effets indésirables, c'est l'exemple de l'Adrénaline, la Clonidine et la Néostigmine [40, 45].
- **Modifications du pH** : L'effet des AL sur la conduction nerveuse est renforcé in-vitro par la présence de bicarbonate (alcalinisation). L'effet se traduit par une latence raccourcie et une diminution de la concentration minimale inhibitrice d'AL permettant l'installation du bloc. L'acidité locale, à l'inverse, augmente la fraction ionisée de l'AL, diminuant ainsi leur diffusion transmembranaire et retardant leur action. Ceci explique l'inefficacité totale des AL au niveau des tissus infectés [40, 46].

## **2.9. Propriétés thérapeutiques des anesthésiques locaux**

### **2.9.1. Usage clinique des AL**

---

**a) Anesthésie de surface****➤ Anesthésie locale par infiltration**

Elle est réalisée au moyen d'une ou plusieurs injections sous-cutanées, intradermiques ou intramuqueuses. L'injection ne doit pas être intravasculaire.

Les anesthésiques utilisés sont : la Lidocaïne, la Mèpivacaïne, la Bupivacaïne, la Ropivacaïne et la Lévobupivacaïne.

La durée d'action dépend surtout de l'adjonction ou non d'adrénaline.

Le principal inconvénient de cette méthode est la nécessité de recourir à des quantités importantes d'anesthésiques pour traiter une surface peu étendue.

Ce type d'anesthésie est réservé à des gestes chirurgicaux mineurs localisés [47].

**➤ Anesthésie topique Cutanée**

L'anesthésique est appliqué sur la peau, la conjonctive et les muqueuses. L'augmentation de la dose diminue la latence d'action et prolonge l'anesthésie néanmoins l'utilisation de vasoconstricteur est pratiquement sans effet.

Plusieurs anesthésiques sont disponibles sur le marché. La Lidocaïne est l'anesthésique le plus utilisé en anesthésie par contact [47].

**b) Anesthésie locorégionale intraveineuse (ALRIV)**

L'anesthésique, sans vasoconstricteur, est injecté dans la veine d'un membre dont la circulation sanguine est momentanément interrompue à l'aide d'un garrot artériel.

L'indication principale de cette technique est la chirurgie d'urgence de l'avant bras et du bras d'une durée de 30 à 60 minutes.

Des accidents de type systémique dus à des taux élevés d'anesthésique local dans la circulation générale sont à craindre lorsque le garrot est dégonflé avant la 30<sup>ème</sup> minute.

Le seul anesthésique local dont l'utilisation est recommandée pour cette technique est la Lidocaïne en concentration maximale de 0.5% et sans dépasser une dose totale de 200 mg.

La Bupivacaïne n'est pas utilisable compte tenu de sa forte toxicité cardiovasculaire en cas de lâchage accidentel du garrot [47].

---

**c) Blocs péri médullaires (rachianesthésie et péridurale)****➤ Anesthésie péridurale**

L'anesthésique est injecté dans l'espace péridural, soit entre le ligament jaune et la dure mère au contact des racines nerveuses. On obtient un bloc, d'abord sensitif, puis moteur des racines spinales correspondant au niveau de l'injection, on distingue ainsi :

- L'anesthésie thoracique : chirurgie abdominale, haute et thoracique ;
- L'anesthésie lombaire : chirurgie de membres inférieurs, du bas de l'abdomen périnéale et obstétrique ;
- L'anesthésie caudale : chirurgie pelvienne, périnéale et obstétrique.

On procède à une injection ou à des injections répétées grâce à un cathéter introduit dans l'espace péridural et laissé en place.

Pour éviter un nombre de réinjections important, il est préférable d'avoir recours à des anesthésiques de longue durée d'action (Bupivacaïne, Ropivacaïne et Lévocabivacaïne) [47].

**➤ Anesthésie rachidienne : rachianesthésie**

L'injection de l'anesthésique se fait dans le LCR, au niveau de la région lombaire (L4-L5). L'étendue de l'anesthésie dépend de :

- La densité de la solution ;
- Du volume injecté ;
- De la position du patient après l'injection[47].

**d) Blocs périphériques (plexiques et tronculaires)**

La conduction d'un nerf est bloquée en injectant l'anesthésique à son contact.

On distingue les blocs nerveux ou tronculaires, dans lesquels l'anesthésique est injecté à proximité d'un nerf périphérique et les blocs plexiques, pour lesquels l'anesthésique est injecté à proximité d'un ensemble de nerfs constituant un plexus nerveux.

La difficulté principale réside dans le repérage des nerfs ; plusieurs techniques existent ; la plus complexe et en même temps la plus précise est la stimulation électrique du nerf grâce à une aiguille reliée à un générateur d'impulsions.

Les indications de cette technique d'anesthésie sont les actes chirurgicaux sur des parties spécifiques et limitées du membre supérieur, inférieur, ou de la tête et du cou.

La Lidocaïne et la Mèpivacaïne sont choisies pour des durées d'anesthésie de 1h 30 à 2h, la Bupivacaïne, la Ropivacaïne et la Lévocabupivacaïne pour des durées plus longues (supérieures à 3heures).

L'adjonction d'Adrénaline est recommandée pour allonger le temps d'anesthésie [47].

#### **e) Anesthésie locorégionale pour l'art dentaire**

Elle est indiquée pour les avulsions de dents, Actes chirurgicaux intra buccaux et très largement pour le traitement des caries et pose de prothèse.

Les techniques utilisées sont l'anesthésie de surface au niveau de la gencive et l'anesthésie par infiltration. La Lidocaïne, la Mèpivacaïne et la Prilocaine sont les agents les plus utilisés.

L'adjonction d'un vasoconstricteur (Adrénaline) est recommandée pour allonger la durée d'action [48].

#### **2.9.2. Interférences pathologiques et médicamenteuses**

En pratique, il existe peu de risque d'accident lié exclusivement à une interférence entre les taux systémiques thérapeutiques d'anesthésiques locaux et une maladie ou un médicament. Certains facteurs augmentent le risque de cardiotoxicité de la Bupivacaïne : l'acidose qui augmente la fraction libre, l'hyperkaliémie, l'hypoxie myocardique ainsi que les troubles de la conduction intraventriculaire préexistantes sur une cardiomégalie.

Les interférences entre les anesthésiques locaux et certains médicaments peuvent survenir selon trois modalités :

- Baisse de la clairance hépatique ;
- Déplacement mutuel compétitif au niveau des protéines du sérum ;
- Interaction au niveau du récepteur [5].

#### **➤ Interférences au niveau de la fixation aux protéines sériques**

Le risque de déplacement mutuel avec d'autres médicaments est faible. Seule la liaison avec l'Orosomucoïde est à prendre en compte.

Les médicaments concernés sont d'autres bases faibles : propranolol, vérapamil et autres anesthésiques locaux.

➤ **Interférence au niveau du récepteur**

Parmi les médicaments susceptibles d'interférer avec les anesthésiques locaux, seul le Vérapamil est actuellement à craindre.

➤ **Interférence avec le Diazépam**

Lorsque le Diazépam est administré avant la Bupivacaïne, il favorise les arythmies induites par celle-ci. Ses propriétés hypotensives et modérément adrénolytiques pourraient expliquer ces effets [49].

### 2.9.3. Effets indésirables

➤ **Réactions allergiques**

Leur prévalence est difficile à préciser et elles peuvent être liées à l'AL ou aux conservateurs utilisés dans les préparations contenant de l'Adrénaline.

Les manifestations générales à type de choc anaphylactique restent rares et s'observent surtout avec les dérivés esters (elles sont imputées à la formation d'acide para-amino-benzoïque lors du catabolisme).

Les manifestations cutanées (éruption érythémateuse, urticaire) sont vraisemblablement dues aux conservateurs dans les préparations contenant de l'Adrénaline (sulfites).

Cependant, les dérivés esters (Procaïne, Tétracaïne) peuvent déterminer des eczémas de contact ou des éruptions parfois étendues [49].

➤ **Méthémoglobinémie**

Une méthémoglobinémie peut se développer dans les heures qui suivent l'administration de la Prilocaine, mais aussi plus Rarement de la Lidocaïne. Les enfants de moins de 1 an sont particulièrement sensibles. Chez les patients prédisposés, un métabolite, l'orthotoluidine peut s'accumuler, cet agent oxydant puissant inhibe la méthémoglobine réductase (dont le taux est plus bas chez le nourrisson que chez l'adulte) [5].

➤ **Nécrose**

Elle découle toujours d'une erreur technique lors de l'administration dans une région dépourvue de circulation collatérale (œil, doigt, verge).

L'utilisation de formes pharmaceutiques contenant un vasoconstricteur dans ces régions sont proscrite [5].

➤ **Infection**

Comme pour la nécrose, elle est le fait d'une erreur technique et du non respect des règles d'asepsie [5].

➤ **Effets indésirables liés à la présence de vasoconstricteurs**

Les vasoconstricteurs, comme l'Adrénaline, peuvent entrainer des effets secondaires systémiques sous forme de troubles du rythme rapides, d'une crise hypertensive ou d'une ischémie myocardique et locaux sous forme d'une ischémie au niveau du site d'administration.

Les solutions Adrénalisées contiennent l'antioxydant métabisulfite de sodium, qui peut provoquer une histamino-libération non spécifique [5].

#### **2.9.4. Toxicité aiguë et surdosage**

L'administration de quantités excessives (doses répétées) ou intravasculaire directe accidentelle peuvent déterminer l'apparition d'effets indésirables graves cardiovasculaires ou neurologiques. Face à ce risque toujours possible, les indications doivent être posées avec soin surtout lors de l'utilisation dans des indications à risque (anesthésie péridurale, bloc intercostal) [5].

## CHAPITRE II: ETUDE DE LA LIDOCAÏNE

### 1. Propriétés

La Lidocaïne (d'abord appelée Lignocaïne) est le chef de file des AL de type amino-amide. Elle doit son nom au fait qu'elle rendait les membres insensibles comme du bois, ce qui explique en fonction des origines grecque ou latine les noms de Xylocaïne et de Lignocaïne [50].

#### 1.1. Formule développée

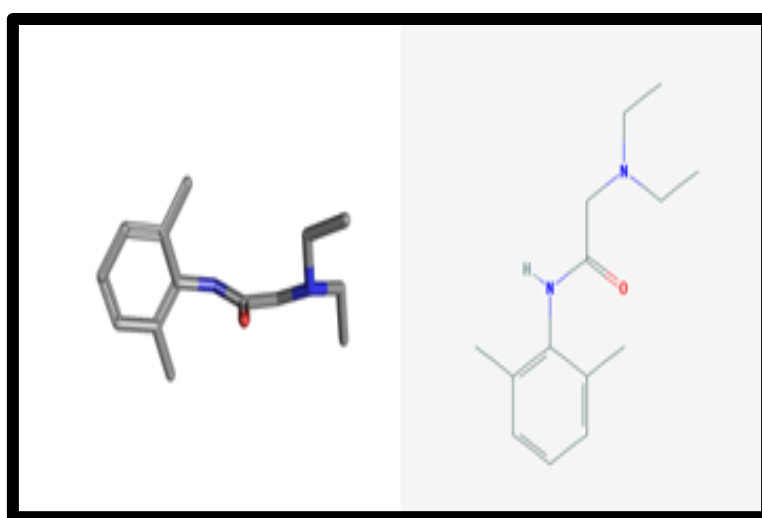


Figure 5: Structure chimique de la Lidocaïne [51].

Formule chimique brute :  $C_{14}H_{23}ClN_2O$

Masse molaire : 234,3 g/ mol [52]

#### 1.2. Formes galéniques

- Solution injectable ;
- Nébuliseur ;
- Gel oral ;
- Solution pour application muqueuse ;
- Gel urétral ;
- Pâte gingivale, Crème (Emla®), Patch (Emlapatch®);
- Gel périodontal (Oraqix®) [21].

## **2. Mécanisme d'action**

La Lidocaïne provoque une perte réversible des sensations en empêchant ou en diminuant la conduction des signaux nerveux sensoriels à proximité de leur site d'action.

En plus de leur activité anesthésique locale, la Lidocaïne et les substances analogues peuvent agir sur le fonctionnement de certains organes dans lesquels il y a une conduction ou une transmission de signaux nerveux (tels que système nerveux central ou système cardiovasculaire) [53].

## **3. Pharmacocinétique**

### **3.1. Absorption et distribution**

La Lidocaïne est facilement absorbée à partir des sites d'injection, dont le muscle, et à partir du tractus gastro-intestinal, des muqueuses et de la peau lésée; elle est faiblement absorbée à travers une peau saine.

Après une injection intraveineuse, les concentrations plasmatiques baissent rapidement avec une demi-vie initiale inférieure à 30 minutes et une demi-vie d'élimination de une à deux heures.

La fixation de la Lidocaïne aux protéines plasmatiques est de l'ordre de 66 %.

La Lidocaïne traverse le placenta et la barrière hémato-encéphalique et est excrétée dans le lait maternel [33].

### **3.2. Métabolisme**

Le métabolisme dans le foie est rapide, environ 90% de la dose administrée subit une désalkylation et est transformé en monoethylglycine xylidide puis en glycine xylidide. Ces deux métabolites sont actifs et sont responsables d'effets pharmacologiques mais également indésirables.

Ainsi, la monoethyl glycine xylidide conserve une grosse partie de l'action cardiovasculaire de la Lidocaïne et possède un pouvoir convulsivant sensiblement équivalent.

La glycine xylidide pose surtout des problèmes lorsque les taux plasmatiques sont élevés, par exemple lors de perfusions prolongées (taux plasmatiques parfois supérieurs à ceux de la Lidocaïne), ceci explique que des convulsions sont possibles, alors que des taux critiques de Lidocaïne ne sont pas atteints.

Ce risque d'accumulation en cas d'administration prolongée, en particulier de glycine xylidide, est en rapport avec une demi-vie plus longue que celle de la lidocaïne. Dans ce cas, un déplacement compétitif de la lidocaïne par ce métabolite peut apparaître au niveau des sites spécifiques, provoquant une réduction de l'efficacité de la Lidocaïne, d'où un risque de devoir augmenter les posologies et par là les effets indésirables potentiels [22].

### **3.3. Elimination**

La clairance totale de la Lidocaïne est de 0,95 l/minute, la demi-vie d'élimination est de 1,6 h, le taux d'extraction hépatique est estimé à 0,65. Chez les nouveau-nés, la demi-vie d'élimination est double de celle des adultes.

La clairance de la lidocaïne est presque entièrement tributaire du métabolisme hépatique, et dépend du flux sanguin au niveau du foie et de l'activité des enzymes. Le volume de distribution à l'équilibre est de 91 l [33].

## **4. Indications de la lidocaïne**

### **4.1. En anesthésiologie**

Toutes les techniques d'anesthésie locale sont réalisables avec la Lidocaïne :

- Infiltration ;
- Blocs périphériques ;
- Péridurale ;
- Rachianesthésie ;
- Anesthésie de contact [54].

### **4.2. En cardiologie**

La Lidocaïne possède en plus de ses propriétés d'anesthésique local connues de longue date, une action antiarythmique lorsqu'elle est administrée par voie parentérale.

La Lidocaïne est un antiarythmique de la classe IB et ses mécanismes d'action sont ceux des substances à effet stabilisant de membrane [55].

## **5. Contres indications**

- Hypersensibilité connue à la Lidocaïne, aux anesthésiques locaux à liaison amide ou à l'un des excipients (sulfites) ;

- Patients atteints de porphyries récurrentes ;
- Association aux bêtabloquants dans l'insuffisance cardiaque ;
- Administration par voie intraveineuse.

Les formes Adrénalisées ont de plus comme contre-indications :

- Voie intravasculaire ;
- Insuffisance coronarienne ;
- Troubles du rythme ventriculaire ;
- Hypertension artérielle sévère ;
- Cardiomyopathie obstructive ;
- Hyperthyroïdie ;
- Anesthésie par infiltration locale au niveau des extrémités (doigt, verge) [56].

### **6. Effets indésirables**

Ils peuvent résulter d'un surdosage, d'une injection intravasculaire accidentelle, ou encore de l'injection dans un tissu fortement vascularisé.

Le début de l'intoxication est marqué par des sensations ébrieuses, des vertiges, des troubles de l'accommodation, de l'agitation, des tremblements et parfois des convulsions. Ces signes sont rapidement suivis par une somnolence, une perte de conscience et une insuffisance respiratoire. La dépression cardiovasculaire et l'hypotension peuvent provoquer une hypoxie, une acidose, un bloc cardiaque et un arrêt cardiaque.

Des réactions allergiques et d'hypersensibilité sont également possibles [57].

---

## CHAPITRE III : EVALUATION PHARMACOTOXICOLOGIQUE D'UN ANESTHESIQUE LOCALE

L'évaluation de la qualité d'un médicament nécessite une combinaison d'essais organoleptiques, physicochimiques, microbiologiques et pharmacotoxicologiques.

Dans notre travail nous nous intéressons au contrôle de la qualité pharmacotoxicologique.

### 1. Evaluation de la toxicité des anesthésiques locaux

#### 1.1. Essai de la toxicité anormale

Cet essai consiste à observer chez 5 souris saines pesant chacune de 17 à 23 g la mortalité et les signes de morbidité, après administration d'une dose efficace non toxique du médicament à analyser et ceci afin de vérifier l'absence d'une toxicité anormale qui serait due à une toxicité surajoutée lors du processus de fabrication, de stockage et /ou du conditionnement [58].

#### 1.2. Recherche des endotoxines bactériennes : LAL test

L'essai des endotoxines bactériennes est destiné à la détection et à la quantification des endotoxines produites par des bactéries gram négatif, en utilisant un lysat d'amoebocytes de limule (*Limulus polyphemus* ou *Tachypleus tridentatus*), arthropode marin de la classe des mérostomes.

Cet arthropode au sang bleu, contient de l'hémocyanine à la place de l'hémoglobine qui se coagule au contact des endotoxines bactériennes.



**Figure 6** : photographie de limule : *Limulus polyphemus* [59].

Cet 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 (coagulagène) ;
- **Colorimétrie** : développement d'une coloration par clivage d'un complexe peptide-chromogène ( 5-aminoacide-polypeptide lié à la p-nitroaniline) en un peptide et un chromogène synthétique : p-nitroaniline de couleur jaune, par la coagulase formée dans le lysat en présence des endotoxines [60].

Six méthodes sont décrites :

- Méthode A-Gélification : essai limite ;
- Méthode B-Gélification : essai semi-quantitatif ;
- Méthode C-Turbidimétrie cinétique ;
- Méthode D-Colorimétrie cinétique ;
- Méthode E-Colorimétrie en point final ;
- Méthode F-Turbidimétrie en point final.

L'essai est effectué dans des conditions permettant d'éviter toute contamination par des endotoxines [61].

### 1.3. Test de la tolérance cutanée

Cet essai 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.

L'essai est réalisé sur des lapins, 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 [52].

#### 1.4. Essai des pyrogènes

##### ➤ Principe

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

##### ➤ Procédure

- Des groupes de 3 lapins, en bonne santé, mâles ou femelles, de poids corporel entre 1,5- 4 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 d'eau pendant tout 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 3h 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

- Si pour les 3 lapins la somme des écarts de températures est supérieure à 1.15°C mais inférieure à 2.65°C il faut poursuivre l'essai avec 6 lapins.
- Si pour les 6 lapins la somme des écarts de la température est supérieure à 2.80°C mais inférieure à 4.30°C il faut poursuivre l'essai avec 9 lapins.
- Si pour 9 lapins la somme des écarts de températures est supérieure à 4.45°C mais

inférieure à 5.65°C il faut poursuivre l'essai avec 12 lapins [52, 62, 63].

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

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

## **2. Evaluation de l'activité des anesthésiques locaux**

La nature de l'effet pharmacologique produit par les médicaments anesthésiques locaux dépend de l'espèce animale utilisée pour les essais, de la méthode employée et de la technique d'application du médicament.

### **2.1. Etude de l'anesthésie de conduction**

#### **2.1.1. Blocage du nerf sciatique chez la souris**

##### **➤ Principe**

C'est une méthode simple et facile, elle permet de déterminer l'activité anesthésique locale et le pouvoir bloquant neuromusculaire ainsi que la durée d'action des AL chez la souris [64].

##### **➤ Procédure**

- Des souris mâles Swiss-Webster pesant entre 25 à 27 g ont été utilisées pour l'expérience ;
- Les drogues sont injectées dans l'espace poplité (en arrière du genou) du membre postérieur droit ;

- Une activité anesthésique locale positive est enregistrée lorsqu'une souris ne peut marcher qu'avec trois membres sur un grillage métallique inversé et que le membre où l'injection a été réalisée pend en l'air ;
- Un blocus neuromusculaire positif est enregistré lorsqu'une souris peut marcher normalement sur le dessus du grillage métallique, mais n'est pas en mesure de s'agripper et de marcher sur la grille inversée.

#### ➤ **Evaluation**

- D'après les données, les moyennes pour le début et la durée de l'action sont calculées, et les fréquences des blocs sont notées ;
- Utilisation de diverses doses du composé d'essai et de l'étalon ;
- Des courbes dose-réponse peuvent être établies et les rapports de puissance calculés [65].

### **2.1.2. Anesthésie de la queue de souris : Méthode du rayon chauffant de Mack et Nelson**

#### ➤ **Principe**

Il s'agit d'un test dérivé de l'essai d'Amour et Smith utilisé pour les analgésiques. On mesure le temps de réaction de la souris dont la queue est placée sous un rayon lumineux chaud (rayon calorifique). Pour éviter la chaleur, la souris déplace sa queue, mais sous l'effet de l'anesthésique local, injecté dans le derme de la queue, le temps de réaction s'allonge [65].

**NB : (Méthode utilisée dans notre étude, elle sera détaillée ultérieurement).**

## **2.2. Anesthésie d'infiltration**

### **2.2.1. Anesthésie d'infiltration dans les papules de cobaye : Reflexe peaucier du cobaye**

#### ➤ **Principe**

Il consiste en un prick test (pique d'épingle) réalisé d'une part au niveau de la papule formée au site d'administration sous cutanée de l'anesthésique, et d'autre part en dehors de la papule (zone non traitée). Le réflexe de frémissement immédiat en dehors de la zone injectée devient itératif au niveau de la papule (méthode standard pour tester les anesthésiques locaux ) [66].

#### ➤ **Procédure**

- L'essai est réalisé sur des cobayes adultes mâles et femelles pesant entre 250 et 300 g ;

- Le jour précédant l'essai, le poil du dos est coupé et deux zones de 4-5 cm de diamètre sont rasées ;
- Après injection de l'anesthésique local en sous cutanée, il se forme une papule qui sera marquée à l'encre ;
- 5 minutes après, on réalise un prick test (piqûre d'épingle) sur la papule et en dehors de la papule ;
- On stimule chaque 3 secondes et on ne dépasse pas 6 piqûres, puis on dénombre les prick pour lesquels l'animal réagit ;
- On répète le prick test toutes les 5 minutes jusqu'à la 30<sup>ème</sup> minutes suivant l'administration.

#### ➤ **Evaluation**

- Le nombre de fois où la piqûre ne provoque pas de réponse pendant la période de 30 min est additionnée, et la somme, sur les 36 absences de réponses possibles, donne une indication du degré d'anesthésie ;
- À l'aide de diverses doses, on peut établir des courbes dose-réponse ;
- Pour les courbes temps-réponse, les tests de piqûres sont répétés toutes les 10 min [65].

### **2.2.2. Essai sur la pulpe dentaire du lapin**

#### ➤ **Principe**

C'est une méthode utilisée pour détecter l'antinociception des anesthésiques locaux après infiltration dans les tissus maxillaires.

Elle est relativement simple sur le plan technique et permet de comparer la puissance antinociceptive, l'efficacité et la durée des anesthésiques locaux. De plus, comme il a été démontré que le test de la pulpe dentaire chez le lapin était très reproductible, il nécessite peu d'animaux pour un test donné [67].

#### ➤ **Procédure**

- Exposer la pulpe dentaire des 2 incisives centrales supérieures du lapin mâle albinos de race Néo-Zélandais pesant entre 1,5 et 2,0 kg à l'aide d'une perceuse dentaire, immédiatement après l'administration intraveineuse de 30 mg/kg de kétamine pour soulager la douleur de cet acte invasif ;

- On dépose l'anesthésique local au niveau de la pulpe ;
- La stimulation se fait par un courant électrique appliqué sur la pulpe via des électrodes dont la tension est croissante à une vitesse de 0,33V/s jusqu'à apparition d'une réaction de l'animal : léchage, mastication.

### ➤ **Evaluation**

Le pourcentage de l'effet maximal pour chaque période d'observation est calculé à partir de l'équation suivante:

$$\text{MPE} = (\text{TV} - \text{CV}) / (10\text{V} - \text{CV}) \times 100$$

- TV = la tension après traitement,
- CV = la tension de commande,
- 10V = volts maximums appliqués.

La tension qui provoque une réponse est enregistrée à 0, 5, 10, 15, 30, 60, 120 et 180 min après l'injection puis le MPE est calculé pour chaque temps d'observation.

Des graphiques des valeurs MPE en fonction du temps sont construits, l'effet maximal et le temps de l'effet maximal sont enregistrés [65].

## **2.3. Anesthésie de surface**

### **2.3.1. Anesthésie de surface sur la cornée des lapins**

#### ➤ **Principe**

Il consiste en la mise en évidence d'une activité anesthésique locale sur l'œil du lapin et ceci par l'appréciation de l'abolition du réflexe cornéen. (Méthode standard pour tester les AL).

**NB : Méthode utilisée dans notre étude et qui sera détaillée ultérieurement [65].**

### **2.3.2. Suppression du réflexe d'éternuement chez le lapin**

#### ➤ **Principe**

L'effet topique des anesthésiques locaux est étudié sur la muqueuse nasale du lapin selon la méthode de Nieschultz, Hoffman et Pependiker.

Après application de la solution d'essai, un crayon fin est introduit dans la narine à des intervalles réguliers, et le bloc du réflexe d'éternuement est enregistré [68].

➤ **Procédure**

- Des groupes de lapins mâles pesant 3 kg sont utilisés ;
- À l'aide d'un coton imbibé de solution anesthésique, la solution test est appliquée sur la muqueuse d'une narine ;
- La solution d'un anesthésique local standard est appliquée à la muqueuse nasale de l'autre narine ;
- Après 2 min, la muqueuse est stimulée par un crayon fin ;
- La perte du réflexe d'éternuement est considérée comme un signe d'anesthésie complète ;
- La stimulation est répétée après 3, 6, 10 et 15 minutes et se poursuit toutes les 5 minutes jusqu'à ce que le réflexe d'éternuement réapparaisse ;
- Différentes concentrations du composé d'essai et de l'étalon sont appliquées.

➤ **Evaluation**

En utilisant la perte du réflexe d'éternuement comme paramètre après l'application de différentes doses, on peut établir des courbes dose-réponse et calculer les rapports de puissance par rapport à la norme. De plus, la durée de l'activité peut être évaluée [65].

## **2.4. Anesthésie péridurale**

### **2.4.1. Anesthésie péridurale chez le lapin**

➤ **Principe**

Le lapin est un modèle simple pour l'évaluation et la vérification des agents anesthésiques locaux administrés par voie épidurale.

La technique consiste en l'administration en une seule injection du produit, dans l'espace lombo-sacré facilement identifiable chez le lapin conscient.

➤ **Procédure**

- Une "technique de perte de résistance" semblable à celle utilisée pour l'injection péridurale caudale chez les humains est utilisée ;
- Des lapins d'environ 2 kg sont utilisés ;

- Une courte aiguille spinale est introduite à angle droit par rapport à la peau dans la ligne médiane au niveau spinal L7, le biseau étant aligné longitudinalement ;
- Une fois correctement placée, l'aiguille est à une profondeur d'environ 0,75 à 1,0 cm et maintenue fermement par le ligament ;
- Le stylet est ensuite retiré pour détecter la présence de sang ou de liquide céphalo-rachidien ;
- En cas d'absence de sang, l'aiguille est tournée de 90° pour diriger le biseau en direction caudale, une seringue de 1,0 ml est fixée et 0,1 ml d'air est injecté ;
- Une seringue contenant la dose désirée de l'anesthésique local est fixée et la solution est injectée sur une période de 5 à 10 secondes.

### ➤ **Evaluation**

Les réponses pharmacodynamiques sont évaluées par :

- une perte sensorielle ;
- une perte de la capacité portante ;
- une parésie flasque.

Le temps moyen de l'apparition du bloc et la durée moyenne du bloc sont calculés à partir du nombre de membres bloqués [65].

## **2.5. Anesthésie intrathécale (spinale)**

### **2.5.1. Anesthésie rachidienne chez le rat**

#### ➤ **Principe**

La méthode consiste à l'étude de l'activité anesthésique locale après injection intrathécale du produit chez le rat afin de prédire les deux paramètres de l'anesthésie rachidienne (subarachnoïdienne) chez les patients.

#### ➤ **Procédure**

- Sont utilisés des rats mâles Sprague-Dawley pesant de 50 à 75 g ;
- Le rat est tenu fermement par la ceinture pelvienne ;
- Une aiguille est insérée au niveau spinal L5 ou L6 à un angle d'environ 20° ;
- La drogue à tester est diluée dans du sérum physiologique ou de l'eau et un volume de 5µl est administré ;

- La queue du rat est placée sous une source de chaleur radiante ;
- L'antinociception est déterminée lors de l'immobilisation de la queue.

#### ➤ **Evaluation**

Le degré d'antinociception est défini comme le pourcentage d'effet maximal possible. Ce pourcentage est déterminé pour chaque dose, ce qui permet de calculer les valeurs DE50 [65].

### **2.5.2. Blocage du réflexe urétral chez le lapin**

#### ➤ **Principe**

L'étude de l'anesthésie rachidienne chez le lapin est évaluée par la réapparition du réflexe urétral. Ceci est provoqué par l'injection soudaine d'eau froide dans l'urètre au moyen d'un cathéter. Cette brusque dilatation réflexe provoque une contraction du sphincter externe et urétral. La vitesse de pénétration de l'anesthésique peut être estimée par l'intervalle entre l'injection et la disparition du réflexe urétral [69].

#### ➤ **Procédure**

- Les lapins mâles Chinchilla pesant de 3,0 à 3,5 kg sont utilisés ;
- Le volume administré par voie intrathécale est de 0,02 ml par centimètre de longueur de la colonne vertébrale, il est injecté à raison de 1 ml par minute ;
- L'aiguille est introduite entre la sixième et la septième vertèbre lombaire, et non à travers l'espace lombo-sacrée ;
- L'aiguille, maintenue aussi légèrement que possible entre le pouce et l'index, est introduite lentement jusqu' à ce qu'une secousse soudaine et brusque typique se produise, ceci indique la pénétration dans l'espace sous-arachnoïdien ;
- Très peu de pression est nécessaire pour l'injection de 0,4 à 0,6 ml de la solution anesthésique pendant que l'animal est retenu dans un hamac en toile ;
- Un cathéter est inséré dans l'urètre, où il est maintenu sans pression, à un intervalle de 15 ou 20 s, 2 à 3 ml d'eau, à température ambiante, sont injectées rapidement dans le cathéter ;
- Cela provoque le "réflexe urétral", qui consiste en une rétraction du pénis et une contraction du sphincter anal ;
- Après la perte du réflexe urétral, le test est répété toutes les minutes ou toutes les deux minutes pendant 15 minutes, puis à intervalles plus longs.

**➤ Evaluation**

La durée de l'aréflexie urétrale est le temps de la première lecture positive (réflexe absent) au milieu de l'intervalle entre la dernière lecture positive et la première lecture négative. Cette durée varie linéairement avec le logarithme de concentration.

En utilisant le temps de perte du réflexe urétral comme paramètre après l'application de différentes doses, des courbes dose-réponse peuvent être établies et des rapports de puissance par rapport à la norme calculée [65, 69].



---

# PARTIE PRATIQUE

---





**Figure 7** : Unité de contrôle pharmaco-toxicologique des médicaments –LNCP.

Notre travail a été réalisé au niveau du service de pharmaco-toxicologie du laboratoire national de contrôle des produits pharmaceutiques (LNCP) qui se situe à Dely Ibrahim, Alger, il a porté sur le contrôle de l'activité et de la toxicité du **princeps** et du **générique** de chlorhydrate de **Lidocaïne** 20 mg/ml, solution injectable sans conservateurs.

Pour l'évaluation de la toxicité de nos produits nous avons eu recours à deux méthodes :

- Le LAL test ;
- L'essai de la toxicité anormale.

Pour l'évaluation de l'activité de la **Lidocaïne princeps et générique** nous avons utilisé deux méthodes in vivo :

- La méthode du rayon chauffant de Mack et Nelson : Anesthésie de la queue de souris ;
- La méthode de Regnier : Anesthésie de surface sur la cornée de lapin.

**Le Laboratoire National de Contrôle des Produits Pharmaceutiques est un établissement public à caractère administratif, doté d'un statut de personnes morales et d'une autonomie financière, et placé sous la tutelle du ministère chargé de la santé, de la population et de la réforme hospitalière.**

**Le LNCPP à pour mission :**

- L'étude des dossiers scientifiques et techniques des produits pharmaceutiques soumis à l'enregistrement ;
- L'élaboration de méthodes et de techniques de référence à l'échelle nationale ;
- La tenue et la mise à jour d'une banque de données techniques relatives aux normes et aux méthodes de prélèvement, d'échantillonnage et de contrôle de la qualité des produits pharmaceutiques ;
- La surveillance de l'innocuité, de l'efficacité et de la qualité des produits pharmaceutiques commercialisés ;
- La recherche technique et scientifique.



---

# MATERIELS ET METHODES

---



## I. MATERIELS ET METHODES

### ➤ Objectif

Le but de notre travail est d'évaluer et de comparer l'activité pharmacotoxicologique anesthésique locale d'un **générique** et d'un **princeps** de la **Lidocaïne** en solution injectable.

### ➤ Choix des molécules à tester

Nous avons eu recours aux produits finis présents au sein du laboratoire national de contrôle des produits pharmaceutiques.

Nous avons choisi dans un but comparatif un **générique** et un **princeps** de la **Lidocaïne** en solution injectable.

Les doses de ces molécules seront choisies en référence aux doses maximales utilisées chez l'homme indiquées dans les monographies (Vidal).

### ➤ Choix du model animal

En recherche biomédicale, un modèle animal est un modèle permettant l'étude de données de référence sur la biologie ou le comportement, ou chez lequel on peut étudier un processus pathologique spontané ou induit, celui-ci ayant un ou plusieurs aspects communs avec un phénomène équivalent chez l'humain ou d'autres espèces animales [70].

Cette modélisation est possible parce que les principes biologiques fondamentaux comme les voies métaboliques, régulatrices, et développementales, et les gènes qui déterminent ces processus, sont proches de ceux observés dans des cellules humaines.

La modélisation informatique ou l'expérimentation sur cellules unitaires sont des avènements précieux qui n'autorisent cependant pas un affranchissement complet au modèle animal lorsqu'il s'agit d'appréhender des processus très complexes relevant de la physiologie ou du développement des maladies.

Le modèle animal reste donc un moyen pertinent pour investiguer les causes de la maladie et comprendre la pathologie afin d'investir les pistes de thérapies et mettre au point de nouveaux traitements.

En pharmacotoxicologie la modélisation animale a plusieurs objectifs dont le screening pharmacologique qui a pour but le développement de nouvelles molécules actives, les études

pharmacocinétiques et pharmacodynamiques des molécules déjà connue afin d'en améliorer l'utilisation (mode d'action, indication, effets indésirables, contre indication...) et les études concernant la sécurité d'emploi des médicaments (essais de toxicité anormale, aigue, subaiguë, chronique, essai des pyrogènes, essais de tératogénèse et de fœtotoxicité) qui ont pour but de démontrer la parfaite innocuité des traitements destinés à l'homme.

Les modèles animaux employés en recherche biomédicale, et particulièrement ceux qui servent à l'étude en pharmacotoxicologie, peuvent être classifiés comme suit :

- **Modèles spontanés ou naturels** : qui présentent naturellement des maladies ou conditions identiques à des maladies ou affections humaines. Le diabète, l'hypertension et les déficits immunitaires en sont quelques exemples.
- **Modèles induits ou expérimentaux** : Modèles chez lesquels les scientifiques reproduisent expérimentalement une affection ou une maladie, c'est exemple de la streptozocine qui est une substance chimique permettant de provoquer le diabète en endommageant les cellules productrices d'insuline du pancréas.
- **Modèles génétiquement modifiés** : c'est un groupe particulier de modèles expérimentaux dont on a manipulé le code génétique pour provoquer la maladie à étudier.
- **Modèles négatifs** : Certains animaux sont résistants à une affection ou maladie donnée, en étudiant les causes de cet état, on peut trouver des indices sur la résistance à la maladie et ses fondements physiologiques, on cite en exemple les lapins insensibles à l'infection gonococcique et chimpanzés très peu sensibles à la maladie d'Alzheimer.
- **Modèle orphelin** : Un animal chez lequel une affection ou une maladie apparait naturellement mais pour laquelle il n'existe pas d'équivalent chez l'homme, nous avons comme exemple la tremblante du mouton, qui constitue un modèle utile pour l'étude des encéphalopathies spongiformes humaines (maladie de la vache folle, maladie de Creutzfeld-Jacob) [71].

## 1. Evaluation de la toxicité de la Lidocaïne princeps et générique

### 1.1. Test de la toxicité anormale

#### 1.1.1. Objectif et principe

L'essai de toxicité anormale est aussi appelé test d'innocuité selon la nomenclature de l'OMS. Ce test a pour but de vérifier l'absence d'une toxicité anormale, qui serait due à une toxicité surajoutée par les conditions de fabrication, de conditionnement ou de stockage du médicament.

Il consiste à observer chez 05 souris saines pesant chacune de 17 à 23 g des signes de mortalité ou de morbidité après administration unique d'une dose maximale efficace non toxique de la **Lidocaïne** sous forme de solution injectable.



**Figure 8:** Pesée et sélection des souris.

#### 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. Matériel

##### ➤ Equipement

- Cages pour souris ;
- Grilles d'agrippement ;
- Balance de précision.

➤ **Consommables et verreries**

- Seringues jetables apyrogènes de 1 ml, 2.5 ml et 5 ml ;
- Bêchers ;
- Fioles jaugées ;
- Pipettes ;
- Gants stériles ;
- Compresses stériles ;
- Coton ;
- Alcool.

➤ **Réactif animal**

- Espèce : Souris *Mus musculus*
- Sous-ordre : Myomorphes
- Famille : Muridae
- Souche : NMRI
- Sexe : mâles et femelles
- Poids : 17 - 23 gr

➤ **Réactif chimique**

- Eau physiologique (NaCl 9 pour 1000).

➤ **Produits à tester**

- **Le princeps** : solution injectable de chlorhydrate de **Lidocaïne** 20 mg/ml, sans conservateurs, flacon de 20 ml.
- **Le générique** : solution injectable de Chlorhydrate de **Lidocaïne** 20 mg/ml, sans conservateurs, ampoule de 10 ml.

#### 1.1.4. Mode opératoire

L'essai est réalisé sur 10 souris (5 souris pour l'essai de la toxicité anormale de la **Lidocaïne princeps** et 5 souris pour l'essai de la toxicité anormale de la **Lidocaïne générique**) marquées pour permettre leurs identifications.

**a) Préparation des solutions à administrer pour chaque souris**

A partir des données sur la dose maximale efficace utilisée chez l'homme on détermine celle à administrer aux souris, en multipliant la première par un facteur de sécurité (facteur d'innocuité).

$$\left. \begin{array}{l} \text{Chez l'homme : } 200 \text{ mg} \longrightarrow 60.10^3 \text{ g} \\ \text{Chez la souris : } X \longrightarrow 20 \text{ g} \end{array} \right\} X = \frac{D_h \times P_s}{P_h}$$

- $D_h$  = Dose maximale chez l'homme : 200 mg/ 24h.
- $P_h$  = Poids moyen chez l'homme :  $60.10^3$  g
- $P_s$  = Poids moyens chez la souris : 20 g
- $X$  = Dose administrée par souris.

$$X = \frac{D_h \times P_s}{P_h} \longrightarrow X = \frac{20 \times 200}{60 \times 10^3} \longrightarrow \boxed{X = 0.066 \text{ mg}}$$

Le facteur d'innocuité est de  $f = 10$

$$X = 0.066 \times 10 \longrightarrow \boxed{X = 0.66 \text{ mg}}$$

**Calcul de la dilution**

$$\left. \begin{array}{l} 20 \text{ mg} \longrightarrow 1 \text{ ml} \\ 0.66 \text{ mg} \longrightarrow V_{\text{lidocaïne}} \end{array} \right\} V_{\text{lidocaïne}} = \frac{0.66 \times 1}{20} \longrightarrow \boxed{V_{\text{lidocaïne}} = 0.033 \text{ ml}}$$

On injecte 0.5 ml de dilution par souris ; de ce fait le volume de l'eau physiologique à ajouter est :

$$V = 0.5 - 0.033 \longrightarrow \boxed{V_{\text{eaux physiologique}} = 0.47 \text{ ml}}$$

On prélève **0.033 ml** de la solution mère de **Lidocaïne** de concentration 20 mg/ml et on complète avec de l'eau physiologique jusqu'à **0.5 ml**.

La solution ainsi obtenue est administrée aux souris.



**Figure 9** : Préparation des solutions à administrer.

### b) Administration du produit

- La voie d'administration est celle utilisée chez l'homme, excepté la voie intramusculaire difficile à réaliser chez les souris et qui est remplacée par la voie intrapéritonéale, la voie utilisée dans notre travail est la voie sous cutanée ;
- Remplir une seringue de 1 ml avec 0.5 ml 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 ;
- Désinfecter la zone d'injection à l'aide d'un coton imbibé d'alcool ;
- Insérer l'aiguille sous la peau de l'abdomen ;
- Injecter lentement la solution et retirer délicatement l'aiguille en exerçant une contre-pression sur la peau au moyen d'un coton.



**Figure 10** : Administration sous cutanée de la solution de **Lidocaïne** 20 mg/ml, **princeps** et **générique**.

### **1.1.5. Lecture des résultats**

Les souris sont mises en observation pendant 24 heures, dans les conditions habituelles de température en présence de nourriture selon les indications portées dans 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 un des animaux présente des signes de morbidité ou une mortalité, répéter l'essai ;
- Le résultat est satisfaisant si aucun des animaux du second groupe ne présente ni des signes de morbidité ni une mortalité au cours de la période d'observation prescrite ;
- Si des animaux du second groupe présentent des signes de morbidité ou une mortalité, le produit examiné n'est pas conforme [58, 63, 72].

## **1.2. Essai de recherche des endotoxines bactériennes « LAL test » : méthode A, gélification, essai limite**

### **1.2.1. Objectif et principe**

Selon le SRT N°872 de l'OMS l'essai des endotoxines bactériennes est l'une des étapes du contrôle qualité des produits à usage parentérale sur le produit final vrac et le produit fini [73]. Il 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.

### **1.2.2. Choix de la méthode**

Notre choix s'est porté sur le LAL test pour la détection des endotoxines dans nos produits. Ce choix est justifié par les résultats de l'étude comparative du LAL test et du test des pyrogènes chez le lapin faite par BLECHOVA et PIVODOVA qui ont conclu que l'essai des pyrogènes chez le lapin avait beaucoup de désavantages, et que le coût était particulièrement élevé par rapport au test LAL qui était plus sensible, plus précis, d'exécution facile et de moindre coût. De plus, plusieurs solutions parentérales qu'on ne pouvait pas soumettre à l'essai des pyrogènes chez le lapin pouvaient être testées avec le test LAL [74].

Parmi les six méthodes du test LAL notre choix s'est porté sur la méthode de gélification A-essai limite qui a le statut de méthode de référence. Les auteurs JOINER, KRAUS et

KUPIEC écrivent que la méthode par gélification est la plus précise et la plus sensible des procédures de recherche d'endotoxines dans les préparations injectables parce qu'on obtient dans les résultats moins de faux-négatifs et de faux-positifs [75].

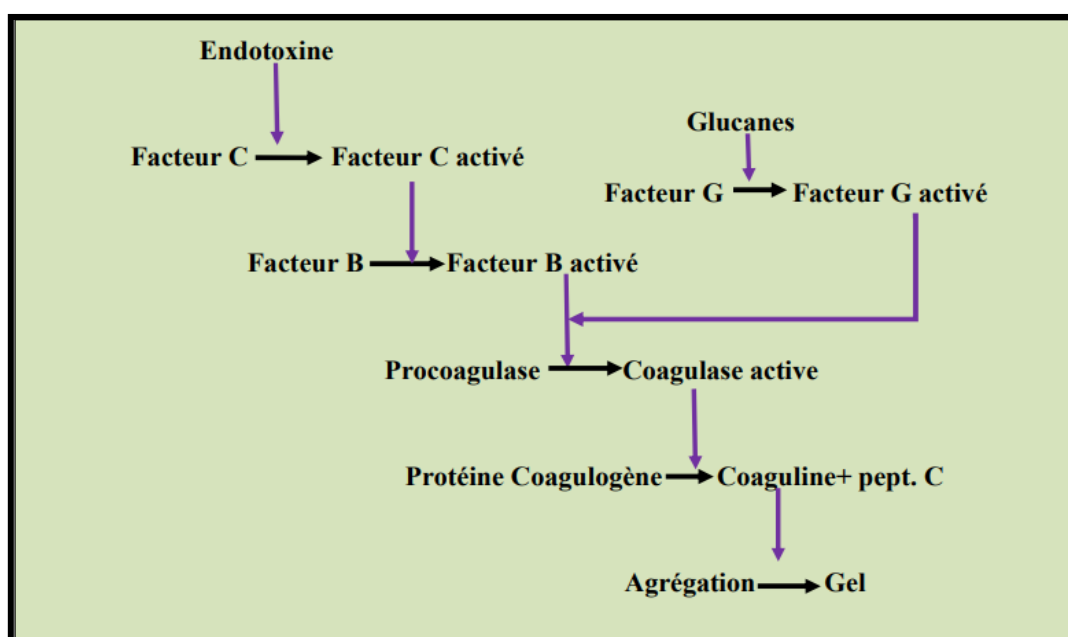
### 1.2.3. Mécanisme de la réaction de gélification

L'endotoxine réagit avec les enzymes présentes dans les amœbocytes de limule, ces enzymes sont arrangées en trois cascades enzymatiques.

Au niveau de la cascade principale, l'endotoxine active le facteur C (facteur initiateur de la réaction), qui va à son tour activer le facteur B, celui-ci va alors activer une autre enzyme : la procoagulase.

Cette enzyme se transforme par la suite en coagulase, et va scinder le coagulogène en coaguline insoluble et former un gel.

Cette cascade enzymatique permet l'amplification du stimulus original ; par conséquent, des concentrations très minimes en endotoxines sont détectables par cette méthode.



**Figure 11** : Schéma du mécanisme général d'induction de la gélification par les endotoxines [76].

### 1.2.4. Locaux et conditions ambiantes

- L'essai est réalisé dans une salle propre réservée uniquement à la recherche des endotoxines, à l'abri des courants d'airs et des déplacements du personnel ;

- La paillasse, les micropipettes et les portoirs sont soigneusement javellisés avant et après l'essai ;
  - Travailler sous hotte à flux laminaire vertical ;
  - Absence de toute vibration ou magnétisme ;
  - Utiliser un matériel exempt d'endotoxines dont la teneur est inférieure à 0.005 EU/ml.
- **Selon la pharmacopée européenne 7.0**

Il faut dépyrogénéiser dans un four à air chaud, par une méthode validée, toute la verrerie et les autres éléments d'appareillage résistants à la chaleur. La durée et la température minimale de chauffage sont généralement de 30 mn à 250 °C.

### 1.2.5. Matériel

#### a) Equipements

- Agitateur type vortex ;
- Bain à sec réglé à 37 °C ;
- Chronomètre ;
- Pipette automatique (10-200 µl) ;
- Portoir pour tubes ;
- Thermomètre ;
- Hotte à flux laminaire vertical.

#### b) Consommables

- Embouts en polypropylène exempts d'endotoxines ;
- Embouts pour pipettes automatiques exempts d'endotoxines ;
- Papier pH ;
- Gants stériles ;
- Rouleau de film protecteur ;
- Tubes à dilution en verre silex de 13x100 mm exempts d'endotoxines à usage unique ;
- Tubes à réaction en verre exempts d'endotoxines de 10x75 mm à fond rond, avec un bouchon à vice en polypropylène, à usage unique.

#### c) Réactifs

- Eau qualité LAL ;

- Lysat d'amoebocytes de limule (LAL) ;
- Endotoxine standard de contrôle (CSE) ;
- NaOH et HCl 0.1 N exempts d'endotoxines ;
- Produits à tester :
  - **Le princeps** : solution injectable de chlorhydrate de **Lidocaïne** 20 mg/ml, sans conservateurs, flacon de 20 ml.
  - **Le générique** : solution injectable de Chlorhydrate de **Lidocaïne** 20 mg/ml, sans conservateurs, ampoule de 10 ml.



Figure 12 : Matériels utilisés pour LAL test.

### 1.2.6. Mode opératoire

#### a) Reconstitution du lysat

- Décapsuler le flacon et faire descendre le maximum de lyophilisat au fond du flacon ;
- Avec un instrument stérile (embout 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 à la main avec des mouvements en 8 (il faut éviter la formation de mousse) ;

- Répartir la solution ainsi reconstituée dans des tubes à réaction à raison de 100 µl par tube ;
- Incréments sur ces tubes, la date de reconstitution du lysat, ainsi que sa sensibilité ;
- Conserver ces tubes à une température de 2 à 8°C pendant 24h, ou au congélateur pendant 28 jours ;
- Avant chaque utilisation, retirer le(s) tube(s) et décongeler le lysat à température ambiante afin d'éviter toute destruction protéique.



**Figure 13** : Flacon de lysat d'amoebocytes de limule.

#### **b) Reconstitution de l'endotoxine**

- Décapsuler le flacon de CSE et faire descendre le maximum de lyophilisat au fond du flacon ;
- Avec un instrument stérile exempt d'endotoxines, soulever lentement le bouchon pour casser le vide et reconstituer l'endotoxine avec un volume d'eau qualité LAL ;
- Fermer le flacon avec un carré de film protecteur ;
- Agiter au vortex la solution d'endotoxines ainsi reconstituée et conserver entre +2 et +8 °C.

**NB** : Avant chaque manipulation, la solution mère d'endotoxines doit être agitée au vortex car les endotoxines adhèrent aux parois du flacon.



**Figure 14** : Flacon de contrôle standard d'endotoxine.

### 1.2.6.1. Validation de la sensibilité du lysat

La qualification initiale est obligatoire en cas de changement 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.

#### a) 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 100  $\mu$ l/ tube.

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

#### b) Reconstitution de l'endotoxine

- Reconstituer la solution de l'endotoxine avec de l'eau qualité LAL de façon à obtenir une solution standard d'endotoxines de concentration CSE = 20 UI/ml, à partir de laquelle on prépare une solution de concentration CSE = 0.24 UI/ml soit 8  $\lambda$  ;

$$\begin{array}{l}
 20 \text{ UI} \longrightarrow 1 \text{ ml} \\
 0.24 \text{ UI} \longrightarrow V
 \end{array}
 \left. \vphantom{\begin{array}{l} 20 \text{ UI} \\ 0.24 \text{ UI} \end{array}} \right\}
 \quad
 V = \frac{0.24 \times 1}{20}
 \longrightarrow
 \boxed{V = 0.012 \text{ ml}}$$

- Pour préparer 2ml de la solution 8 $\lambda$ , prélever 2V soit 0.024 ml de la solution CSE et compléter avec de l'eau qualité LAL jusqu'à 2ml ;
- Agiter au vortex la lyophilisation ainsi reconstituée et la conserver à une température comprise entre +2 et +8 °C.

➤ **Préparation de la gamme d'endotoxines dans l'eau qualité LAL**

- A partir de la solution à 0.24 UI/ml soit 8 $\lambda$ , effectuer des dilutions aux  $\frac{1}{2}$  soit 4 $\lambda$ , 2 $\lambda$ ,  $\lambda$ ,  $\lambda/2$ ,  $\lambda/4$  correspondant respectivement à 0.12, 0.06, 0.03, 0.015, 0.0075 UI/ml ;
- Chaque dilution d'endotoxines est agitée pendant 1 min au vortex ;
- Constituer 4 séries de 100  $\mu$ l de la gamme des dilutions à 4  $\lambda$ , 2  $\lambda$ ,  $\lambda$ ,  $\lambda/2$ ,  $\lambda/4$  ;
- Ajouter à chaque série un tube témoin négatif, constitué de 100  $\mu$ l d'eau LAL ;
- A chaque 100  $\mu$ l de la solution ou d'eau LAL contenus dans le tube à réaction, ajouter 100  $\mu$ l de lysat ;
- Incuber pendant  $60 \pm 2$  min les tubes à réaction dans le bain à sec réglé à  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ .

**Tableau II** : Séries des dilutions des solutions d'endotoxines, pour la validation initiale.

Tubes	Solution à ajoutée	Eau qualité LAL	Concentration d'endotoxine
8 $\lambda$	0.024 ml de CSE	1.967 ml	0.24 UI/ml
4 $\lambda$	1 ml de 8 $\lambda$	1 ml	0.12 UI/ml
2 $\lambda$	1 ml de 4 $\lambda$	1 ml	0.06 UI/ml
$\lambda$	1 ml de 2 $\lambda$	1 ml	0.03 UI/ml
$\lambda/2$	1 ml de $\lambda$	1 ml	0.015 UI/ml
$\lambda/4$	1 ml de $\lambda/2$	1 ml	0.0075 UI/ml

**▪ Résultat**

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 (PF) 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 (MG) des points finaux.

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

- Calculer la sensibilité du lysat

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

**▪ Evaluation**

Le technicien, les réactifs et le consommable sont validés vis-à-vis du test si la sensibilité calculée est comprise entre  $\lambda/2$  et  $2\lambda$ .

**1.2.6.2. Essai final : contrôle du produit à tester****a) Caractérisation de l'échantillon****➤ DMS = Dilution Maximale Significative**

La DMS est une 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 une concentration d'endotoxines suffisante pour entrainer des effets indésirables.

$$\mathbf{DMS} = \frac{\mathbf{LE}}{\lambda} \times \mathbf{C} \quad \mathbf{Avec :} \quad \mathbf{LE} = \frac{\mathbf{K}}{\mathbf{M}}$$

- ✓ **LE** : concentration limite en endotoxine 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 = 5 UI/ kg/ h ;
  - Produits radio pharmaceutiques administrés par voie IV = 2.5 UI/ kg/ h ;
  - Voie intrarachidienne : k = 0.2 UI/ kg/ h.
- ✓ **M** : dose maximale humaine de produit (pour un homme de 60kg) en mg ou UI/ kg/ h par kg, administré par la voie prévue.
- ✓ **C** : concentration du produit en mg/ ml, UI/ ml ou ml/ ml.
- ✓ **λ** : sensibilité du lysat exprimé en UI/ ml.

#### Calcul de la dilution maximale significative

$$\mathbf{DMS} = \frac{\mathbf{LE}}{\lambda} \times \mathbf{C} \quad \mathbf{Avec :} \quad \mathbf{LE} = \frac{\mathbf{K}}{\mathbf{M}}$$

- ✓ **M** : dose maximale du produit testé = 200 mg chez un homme de poids moyen de 60 kg  
M = 3.33 mg/ kg/ h.
- ✓ **C** : concentration du produit = 20 mg/ ml.
- ✓ **K** = 5 UI/ kg/ h.
- ✓ **λ** = 0.03 UI/ ml.

$$\mathbf{LE} = \frac{5}{3.33} \quad \longrightarrow \quad \boxed{\mathbf{LE} = 1.50 \text{ UI/mg}}$$

$$\mathbf{DMS} = \frac{1.5}{0.03} \times 20 \quad \longrightarrow \quad \boxed{\mathbf{DMS} = 1000}$$

**Calcul de la dilution testée (DT)**

$$DT = \frac{1}{DMS/2} \quad \longrightarrow \quad \boxed{DT = \frac{1}{500}}$$

**b) Préparation de la dilution**

La préparation de la dilution testée  $\frac{1}{500}$  pour chaque molécule (**Lidocaïne princeps** et **Lidocaïne générique**) a été effectuée en deux étapes (deux dilutions).

✓ **Dilution 1 :  $\frac{1}{50}$** 

- Mélanger 10  $\mu$ l du produit à tester avec 490  $\mu$ l de l'eau qualité LAL ;
- Agiter au vortex.

✓ **Dilution 2 :  $\frac{1}{10}$** 

- Prélever 100  $\mu$ l de la dilution 1 et compléter avec 900  $\mu$ l de l'eau qualité LAL.

**c) Mesure du pH**

Le pH de la dilution de chaque échantillon est mesuré à l'aide de papier pH, il doit être compris entre 6 et 8.

Dans le cas contraire le pH est ajusté avec du NaOH ou du HCL à 0.1 N exempts d'endotoxines bactériennes car selon la pharmacopée européenne la gélification est optimale lorsque le mélange présente un pH compris entre 6,0 et 8,0.

**d) Préparation de la surcharge**

Nous avons préparé une solution surchargée à 2  $\lambda$ /ml soit 0.06 UI/ml, à partir de notre contrôle standard d'endotoxines à 20 UI/ ml.

▪ **Le volume à prélever du CSE :**

$$\left. \begin{array}{l} 20 \text{ UI} \longrightarrow 1 \text{ ml} \\ 0.06 \text{ UI} \longrightarrow V \end{array} \right\} \quad V = \frac{0.06 \times 1}{20} \quad \longrightarrow \quad \boxed{V = 3 \mu\text{l}}$$

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

e) **Essai proprement dit**

- Préparer les tubes comme suit :
  - Un tube contrôle négatif (Eau LAL + Lysat) afin de vérifier la qualité de l'eau LAL ;
  - Un tube contrôle positif surchargé à 2 $\lambda$  d'endotoxines dans l'eau LAL + Lysat, pour tester la sensibilité du lysat ;
  - Deux tubes de la **lidocaïne princeps** à la dilution testée DT + Lysat : pour tester le produit ;
  - Deux tubes de la **lidocaïne générique** à la dilution testée DT + Lysat : pour tester le produit ;
  - Deux tubes de **Lidocaïne princeps** à la dilution testée surchargés par 2  $\lambda$  d'endotoxines + Lysat, afin de vérifier s'il n'induit pas une inhibition de la réaction ;
  - Deux tubes de **Lidocaïne générique** à la dilution testée surchargés par 2  $\lambda$  d'endotoxines + Lysat, 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 :** Préparation des dilutions de l'essai final.

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

**Tableau III** : Préparation des dilutions pour l'essai final du LAL test.

Réactif Tubes	Lysat	Eau qualité LAL	Echantillon	Surcharge
<b>Contrôle négatif</b>	100 µl	100 µl	-	-
<b>Contrôle positif</b>	100 µl	100 µl	-	10 µl
<b>Produit surchargé Lidocaïne princeps</b>	100 µl	-	100 µl	10 µl
<b>Produit surchargé Lidocaïne princeps</b>	100 µl	-	100 µl	10 µl
<b>Produit surchargé Lidocaïne générique</b>	100 µl	-	100 µl	10 µl
<b>Produit surchargé Lidocaïne générique</b>	100 µl	-	100 µl	10 µl
<b>Lidocaïne princeps à contrôler à la DT</b>	100 µl	-	100 µl	-
<b>Lidocaïne princeps à contrôler à la DT</b>	100 µl	-	100 µl	-
<b>Lidocaïne générique à contrôler à la DT</b>	100 µl	-	100 µl	-
<b>Lidocaïne générique à contrôler à la DT</b>	100µl	-	100µl	-

### 1.2.7. Lecture des résultats

Après 1 heure d'incubation au bain marie à 37°C, Sortir les tubes, les retourner lentement et juger d'une :

- Réaction positive : si formation d'un gel qui ne se casse pas lorsqu'on retourne le tube.
- Réaction négative : si absence de gel ou formation d'un gel mou qui se casse lors du retournement.



Figure 16 : Incubation des dilutions au bain marie

### 1.2.8. Interprétation

- L'essai est valable si :
  - Le contrôle négatif ne forme pas de gel ;
  - Le contrôle positif et les tubes produits surchargés donnent un résultat positif.
- Si tous les 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 les deux tubes produits à contrôler non surchargés donnent une réaction positive : l'échantillon testé, renferme plus de la valeur limite d'endotoxines (LE) : le produit est **non conforme**.
- Si un seul des tubes produits à contrôler non surchargés est positif, répéter l'essai :
  - Si les deux tubes produits à contrôler non surchargés sont positifs, le produit est **non conforme** ;
  - Si un des tubes produits à contrôler non surchargés est positif, le produit est **non conforme** ;
  - Si les deux tubes produits à contrôler non surchargés sont négatifs, le produit est **conforme** [61, 77, 78].

## 2. Evaluation de l'activité anesthésique de la Lidocaïne

### 2.3. Méthode du rayon chauffant de Mack et Nelson

#### 2.4.1. Principe

L'essai permet d'étudier l'impact des anesthésiques locaux sur la sensibilité thermique des souris.

Il consiste à mesurer le temps de réaction de la souris dont la queue est placée sous un rayon lumineux chaud (rayon calorifique).

Pour éviter la chaleur, la souris témoin déplace sa queue et se met à tourner sur elle-même dans les 6s suivant son exposition au rayon.

Sous l'effet de l'anesthésique local, injecté dans le derme de la queue, le temps de réaction devient deux fois supérieur au témoin.

#### 2.4.2. Réactifs et matériels

##### a) Réactifs

###### ▪ Réactif animal

- Espèce : Souris *Mus musculus*
- Sous-ordre : Myomorphes
- Famille : Muridae
- Souche : NMRI
- Sexe : mâles et femelles
- Poids : 21 - 23 g
- Conditions d'élevage :
  - Nourriture : granulés ad libitum (origine : fabrication locale) ;
  - Eau : eau de ville ad libitum ;
  - Température : 19-25 ° C ;
  - Lumière : éclairage 12h par jour.

###### ▪ Réactif chimique

- Eau physiologique (NaCl 9 pour 1000).

**▪ Produits à tester**

- **Le princeps** : solution injectable de chlorhydrate de **Lidocaïne** 20 mg/ml, sans conservateurs, flacon de 20 ml.
- **Le générique** : solution injectable de Chlorhydrate de **Lidocaïne** 20 mg/ml, sans conservateurs, ampoule de 10 ml.

**b) Consommable**

- Seringues (1ml, 5ml) ;
- Gants ;
- Compresses stériles ;
- Alcool.

**c) Matériels**

- Boîte à contention pour souris ;
- Chronomètre ;
- Lampe 100W ;
- Verrerie (bêcher, fiole, pipettes) ;
- Balance de précision ;
- Cages pour souris ;
- Grilles d'agrippement.



**Figure 17** : Matériels utilisés pour la réalisation de la méthode du rayon chauffant de Mack et Nelson.

### 2.4.3. Protocole expérimental

#### a) Constitution des lots

- Pour l'étude de chaque molécule, on constitue 3 lots homogènes à raison de 7 souris par lot. Chaque souris représente son propre témoin, on n'aura donc pas besoin d'un lot témoin recevant de l'eau physiologique ;
- Les souris sont numérotées au niveau de la queue ;
- Les animaux inclus dans cette étude sont sélectionnés selon leur correspondance aux critères d'inclusion et de non-inclusion :

#### → Critères d'inclusion

- Souris de même souche : NMRI
- Toutes les souris doivent peser entre 21 et 23 g
- Toutes les souris doivent être indemnes de maladies.

#### → Critères de non inclusion et d'exclusion

- Souris montrant des signes d'agressivité ou un comportement ne permettant pas l'approche clinique et les manipulations (critère de non inclusion).
- Souris réagissant après 6 secondes à l'action du rayon calorifique en l'absence d'anesthésie (critère d'exclusion).

#### b) Manipulation

Les souris d'expérimentation, sont faciles à manipuler si on les aborde correctement. Elles doivent être soulevées en les prenant par la base de la queue (jamais par le bout de la queue) et en les déposant sur une surface sur laquelle leurs griffes ont prise [79].

#### c) Conditions de l'essai

La mise à jeun n'est pas nécessaire, Puisque l'action de l'anesthésique est locale.

#### d) Préparation des solutions de Lidocaïne princeps et générique à administrer

Chaque lot recevra une dose différente du produit à tester (3 doses pour le **princeps** et 3 doses pour le **générique**).

La dose thérapeutique maximale de **Lidocaïne** chez un sujet normal de poids moyen de 60 Kg est de 400 mg selon le RCP du produit.



La dose de **Lidocaïne** à administrer aux souris de poids moyen de 22.32 g est de :

$$\begin{array}{l} \text{Dose maximale : 400 mg} \longrightarrow \text{Adulte 60000 g} \\ \text{X} \longrightarrow \text{22,32 g} \end{array}$$

**X= 0,15 mg, à injecter dans une solution de 0,1ml.**

$$C_1 = \frac{0,15 \text{ mg}}{0,1 \text{ ml}} = 1,5 \text{ mg/ml} \longrightarrow \boxed{\text{Solution 1 : } C_1 = 1,5 \text{ mg/ml}}$$

$$C_0 V_0 = C_1 V_1$$

$$\text{Pour } V_1 = 10 \text{ ml} \longrightarrow V_0 = 0.75 \text{ ml}$$

On prélève **0.75 ml** de la solution mère de **Lidocaïne** de concentration 20mg/ml et on complète avec de l'eau physiologique jusqu'à **10 ml**. La solution 1 ainsi obtenue est administrée aux souris du lot n°=1.

$$C_2 = \frac{C_1}{1,25} = 1,2 \text{ mg/ml} \longrightarrow \boxed{\text{Solution 2 : } C_2 = 1,2 \text{ mg/ml}}$$

$$\frac{C1}{C2} = \frac{V2}{V1} = 1,25 = 10/8$$

Pour  $V_1=8\text{ml} \Rightarrow V_2= 10\text{ml}$

On prélève **8ml** de la solution **1** et on complète avec de l'eau physiologique jusqu'à **10 ml**. La solution **2** ainsi obtenue est administrée aux souris du lot n°=2.

$$C3 = \frac{C2}{1,25} = 0.96\text{mg/ml} \quad \longrightarrow \quad \boxed{\text{Solution 3 : } C_3 = 0.96 \text{ mg/ml}}$$

$$\frac{C2}{C3} = \frac{V3}{V2} = 1,25 = 10/8$$

Pour  $V_2=8\text{ml} \Rightarrow V_3= 10\text{ml}$

On prélève **8ml** de la solution **2** et on complète avec de l'eau physiologique jusqu'à **10 ml**. La solution **3** est ainsi obtenue et est administrée aux souris du lot n°=3.

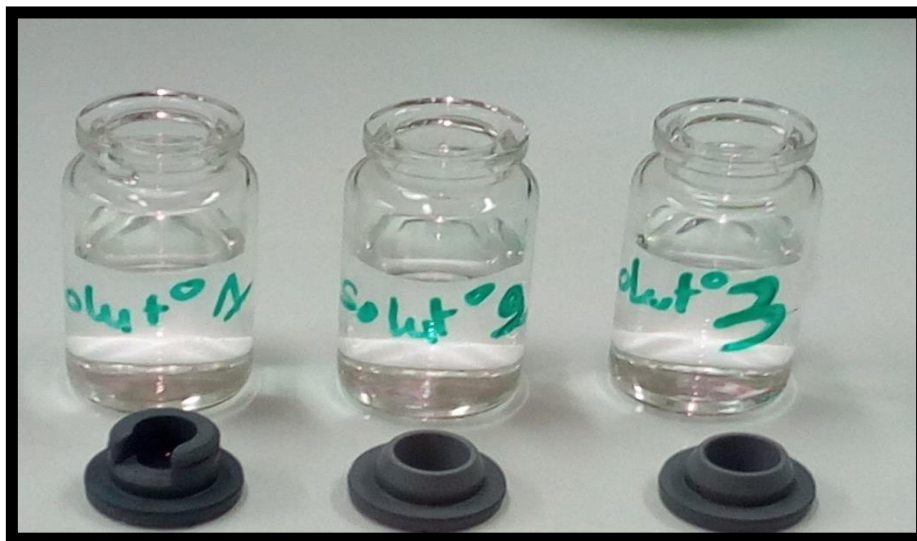


Figure 18 : Préparation des 3 dilutions de la Lidocaïne

#### e) Administration du produit

On administre par voie intradermique un volume de 0.1 ml des solutions au niveau de la base de la queue.



**Figure 19:** Administration du produit au niveau de la base de la queue.

#### f) Mode opératoire

Les souris sont placées dans des boîtes à contention individuelles.

- Avant l'administration du produit, on détermine d'abord le temps standard normal de réaction, la queue est prise doucement et un rayon lumineux est focalisé sur le tiers proximal de la queue ;
- La souris essaye d'écartier la queue et de tourner la tête en moins de 6 secondes, les souris qui réagissent en plus de 6 secondes sont écartées ;
- On administre ensuite 0,1 ml de l'anesthésique au niveau de la base de la queue en intradermique.

#### ➤ Stimulation

- 10 minutes après l'administration, les animaux sont soumis à l'action du rayon lumineux focalisé à 1cm du lieu de l'injection.

#### ➤ Évaluation

- Le temps de réaction de chaque animal est noté, on le compare avec son temps standard normal de réaction ;
- On considère l'animal anesthésié si la réponse est obtenue au bout de **12 secondes** ou **deux fois** le temps standard normal de réaction ;
- On répète la stimulation toutes les 10 minutes jusqu'à disparition de l'effet pour apprécier la durée d'anesthésie [65].



**Figure 20** : Focalisation du rayon lumineux sur la partie proximale de la queue.

## **2.5. Etude de l'anesthésie de surface : réflexe cornéen du lapin**

### **2.5.1. Principe**

Cette méthode vise à mesurer la capacité d'un anesthésique de surface à pénétrer et à paralyser les terminaisons sensorielles superficielles de la cornée du lapin in vivo.

Elle consiste à mettre une quantité de l'anesthésique dans le sac palpébral du lapin et déclencher par la suite un réflexe de clignement en touchant la cornée avec un crin de cheval, l'absence de ce réflexe est révélatrice d'une activité anesthésique locale.

On dénombre les attouchements nécessaires pour entraîner la fermeture de l'œil en utilisant différentes concentrations de la solution test.

Les conditions pour tester le pouvoir anesthésique superficiel d'un anesthésique local sont une stimulation minimale constante associée à un intervalle de temps fixe approprié.

### **2.5.1. Réactifs et matériel**

#### **a) Réactifs**

##### **▪ Réactif animal**

- Espèce : *Oryctolagus cuniculus*
- Super-ordre : Glires
- Famille : Léporidés
- Variété : albinos des lapins américains colorés (lapin néo-zélandais)

- Sexe : mâles
- Poids : 2 - 2.5kg
- Conditions d'élevage :
  - Nourriture : granulés ad libitum (origine : fabrication locale) ;
  - Eau : eau de ville ad libitum ;
  - Température : 19-25 °C ;
  - Lumière : éclairage 12h par jour.
- **Réactif chimique**
  - Eau physiologique (NaCl 9 pour 1000).
- **Produits à tester**
  - **Le princeps** : solution injectable de chlorhydrate de **Lidocaïne** 20 mg/ml, sans conservateurs, flacon de 20 ml.
  - **Le générique** : solution injectable de Chlorhydrate de **Lidocaïne** 20 mg/ml, sans conservateurs, ampoule de 10 ml.
- b) Consommable**
  - Seringues (5ml) ;
  - Gants.
- c) Matériel**
  - Boite à contention pour lapins ;
  - Balance ;
  - Ciseaux ;
  - Chronomètre ;
  - Crin de cheval ;
  - Fiole ;
  - Bêcher ;
  - Micropipette (50µl, 1000 µl).



**Figure 21 :** Crin de cheval.

### 2.5.2. Protocole expérimental

#### a) Constitution des lots

- Pour l'étude de chaque molécule, on constitue 3 lots homogènes à raison de 6 lapins par lot ;
- Chaque lapin représente son propre témoin, on n'aura donc pas besoin d'un lot témoin recevant de l'eau physiologique ;
- Les animaux inclus dans cette étude sont sélectionnés selon leur correspondance aux critères d'inclusion et de non-inclusion :

#### → Critères d'inclusion

- Lapins de même race : néo-zélandais ;
- Tous les lapins doivent peser entre 2 et 2.5 kg ;
- Tous les lapins doivent être indemnes de maladies.

#### → Critères de non inclusion et d'exclusion

- Animal montrant des signes d'agressivité ou un comportement ne permettant pas l'approche clinique et les manipulations (critère de non inclusion) ;
- Lapin tolérant la stimulation en l'absence d'anesthésie (critère d'exclusion).

#### b) Manipulation

Lorsqu'on doit sortir un lapin de sa cage ou le prendre, une main doit empoigner la peau flasque entre les épaules alors que l'autre main fait de même avec la peau du dos chez les gros lapins et pour les petits lapins, on leur supporte l'abdomen avec la main.

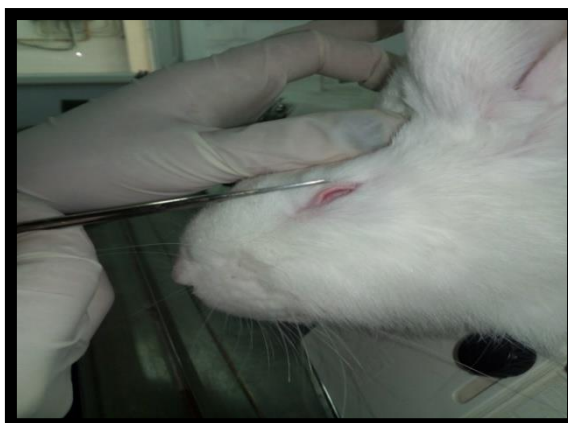
On ne doit jamais prendre les lapins par les oreilles car elles sont très sensibles et sujettes aux blessures; les oreilles sont des organes sensibles qui jouent un rôle dans la régulation de la température corporelle aussi bien que dans l'audition chez les animaux de cette famille.

Les lapins qui ne sont pas manipulés correctement peuvent se débattre vigoureusement et ce faisant s'infliger des blessures ou blesser le porteur.

Les os des lapins sont très légers et friables et en conséquence se fracturent facilement. Des blessures traumatiques peuvent se produire chez le lapin qui se débat violemment causant ainsi une fracture du dos (habituellement au niveau des vertèbres lombaires) ayant pour conséquence une paralysie des membres postérieurs et un dysfonctionnement urinaire et intestinal [79, 80].

### c) Les conditions de l'essai

- Les cils supérieurs et inférieurs des yeux du lapin sont coupés au moins 24 heures avant l'expérience puisque les cils interfèrent avec le réflexe cornéen [81];
- Le jeûne n'est pas conseillé plus d'une heure avant l'anesthésie, du fait du métabolisme rapide du lapin et du risque limité de vomissement. Les risques d'hypoglycémie et les dérèglements du métabolisme acido-basique seraient plus à craindre [82];
- Le local doit être à une température de 23 à 25 °C [82];
- Variation entre les cornées droites et gauches : Des études ont démontré que les yeux droits et gauches peuvent avoir des durées d'anesthésie différentes pour la même dose d'un même anesthésique. Regnier recommande que chaque œil soit traité comme une seule expérience et qu'en accumulant suffisamment de données, les résultats moyens puissent être analysés [83].



**Figure 22** : Coupure des cils supérieurs et inférieurs de l'œil gauche du lapin.

**d) Préparation des solutions de Lidocaïne princeps et générique à administrer**

Chaque lot recevra une dose différente du produit à tester (3 doses pour le **princeps** et 3 doses pour le **générique**).

**➤ Solution 1**

Pour le 1<sup>er</sup> lot on administre directement la solution mère de **Lidocaïne** à 20 mg/ml.

**Solution 1 :  $C_1 = 20 \text{ mg/ml}$**

**➤ Solution 2**

$$C_2 = \frac{C_1}{1,25 \text{ ml}} = 16 \text{ mg/ml}$$

$$\frac{C_1}{C_2} = \frac{V_2}{V_1} = 1,25 = 10/8$$

Pour  $V_1 = 8 \text{ ml} \Rightarrow V_2 = 10 \text{ ml}$

**Solution 2 :  $C_2 = 16 \text{ mg/ml}$**

On prélève **8ml** de la solution **1** et on complète avec de l'eau physiologique jusqu'à **10 ml**. La solution **2** ainsi obtenue est administrée aux lapins du lot n°=2.

➤ **Solution 3**

$$C3 = \frac{C2}{1,25} = 12.8 \text{ mg/ml}$$

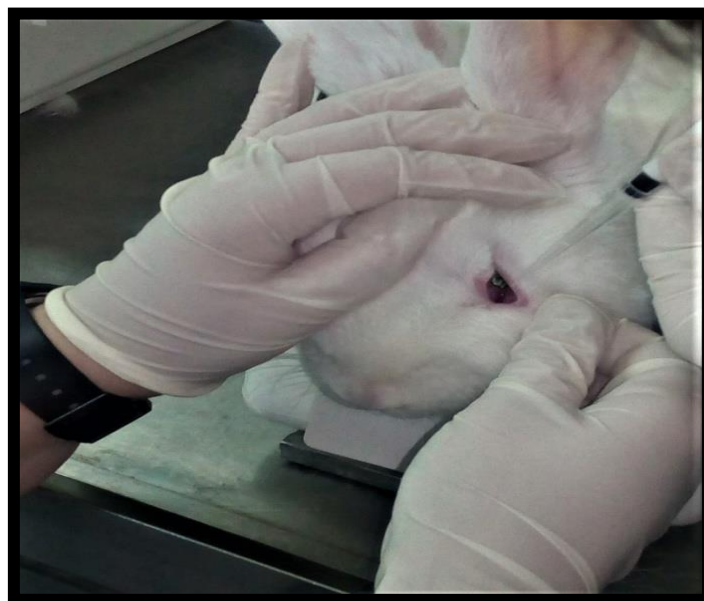
$$\frac{C2}{C3} = \frac{V3}{V2} = 1,25 = 10/8$$

**Solution 3 : C<sub>3</sub> = 12.8 mg/ml**

On prélève **8ml** de la solution **2** et on complète avec de l'eau physiologique jusqu'à **10 ml**. La solution **3** est ainsi obtenue et est administrée aux lapins du lot n°=3.

**e) Administration du produit**

On administre par voie oculaire 3 gouttes de 50µl chacune de la solution anesthésique dans la poche palpébrale de l'œil gauche (le quadrant inferiéro-postérieur est plus fiable que les autres parties de la cornée) [84] tout en respectant un intervalle de 20 secondes entre chaque goutte. L'inondation totale de l'œil est nécessaire [84, 85].



**Figure 23** : Administration de la solution anesthésique au niveau du sac palpébral de l'œil.

**f) Mode opératoire**

- Les lapins sont placés dans des boîtes à contention individuelles bien ajustées mais confortables, en laissant la tête libre. Les animaux peuvent être un peu agités au début, mais ils s'habitueront rapidement au traitement et resteront tranquilles par la suite ;
- Avant l'administration de l'AL le réflexe du clin d'œil est confirmé en touchant la cornée avec un crin de cheval : le lapin ferme son œil au bout d'un seul attouchement [65] ;
- Le sac conjonctival de l'œil gauche est maintenu ouvert, formant ainsi une poche ;
- Avec une micropipette, 0.05 ml de la solution anesthésique est appliquée dans le sac conjonctival de façon à ce que l'espace entre les paupières contienne un film bien visible de la solution [86];
- Après 20 secondes la procédure est répétée, de sorte que 0.15 ml soient appliqués en 1 minute ;
- La solution anesthésique locale est ainsi maintenue au contact de la cornée pendant exactement une minute [85].



**Figure 24** : Les lapins néo-zélandais placés dans les boîtes à contention.

**➤ Nature du stimulus**

- 2 min après l'administration, le réflexe clignotant est testé en pressant contre le centre de la cornée un crin de cheval de façon à ce que le poil soit plié approximativement au même degré à chaque application [84].
- On pratique **13 séries de 100 attouchements par minute** :
  - 4 séries à des intervalles de 2 min 30 sec ;
  - 9 séries à des intervalles de 5 min.

- Si l'anesthésie dure, on poursuit les stimulations toutes les 5 minutes jusqu'à ce que l'anesthésie disparaisse ;
- Il faut veiller à ne pas toucher les paupières supérieures ou inférieures [87] ;
- Si la main est amenée par devant, l'animal visualise la main et ferme l'œil. La stimulation des points cornéens périphériques où la vision est fortement réduite aide à minimiser ce problème [83].

➤ **Évaluation**

- Si le clignement se produit au premier contact léger, le résultat est considéré comme négatif en ce qui concerne l'anesthésie ;
- Si le clignement se produit, mais seulement lentement et après des pressions répétées et assez sévères, il est interprété comme une anesthésie partielle ;
- L'absence de clignement constitue le signe d'une anesthésie complète ;
- Si après la fin de la première période l'anesthésie est absente ou seulement partielle, le sac conjonctival est à nouveau rempli de la solution; mais le lapin n'est pas retenu pendant une minute, relâché immédiatement [87];
- Le temps entre la disparition et la réapparition du réflexe cornéen est enregistré : c'est la durée totale de l'anesthésie.



---

# RESULTATS

---



## II. RESULTATS

### 1. Evaluation de la toxicité de la lidocaïne

#### 1.1. Test de la toxicité anormale

##### a. Résultats

**Tableau IV :** Observation des souris 24h après l'administration de la **Lidocaïne princeps**.

Souris	Signes de morbidité	Mortalité
01	Absence	Non
02	Absence	Non
03	Absence	Non
04	Absence	Non
05	Absence	Non

**Tableau V :** Observation des souris 24h après l'administration de la **Lidocaïne générique**.

Souris	Signes de morbidité	Mortalité
01	Absence	Non
02	Absence	Non
03	Absence	Non
04	Absence	Non
05	Absence	Non

Après 24 h d'observation, aucune mortalité, ni signes de morbidité ont été constatés pour les 10 souris.



**Figure 25** : Souris du 1<sup>er</sup>lot 24h après l'administration de la **Lidocaïne princeps**.



**Figure 26** : Souris du 2<sup>ème</sup> lot 24h après l'administration de la **Lidocaïne générique**.

### **b. Interprétation**

D'après le résultat de l'observation, nous pouvons déduire que la dose maximale efficace 200 mg / jour de la **Lidocaïne princeps et générique**, ne présente pas de toxicité surajoutée, ce qui prouve l'**innocuité** de notre médicament.

## 1.2. Essai de recherche des endotoxines bactériennes

### 1.2.1. Résultats

#### a) Résultat de la qualification initiale

#### ➤ Résultat de la détermination du point final

**Tableau VI :** Calcul des points finaux et les logarithmes des points finaux.

UI/m Séries	4λ 0.12	2λ 0.06	λ 0.03	½ λ 0.015	¼ λ 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

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

$$MG = \frac{-1.5228 - 1.5228 - 1.5228 - 1.5228}{4} \Rightarrow MG = -1.5228$$

#### ▪ Calcul de la sensibilité du lysat

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

$$\lambda = \text{anti log}(-1.5228) \Rightarrow \lambda = 0.03 \text{ UI/ml}$$

La sensibilité du lysat calculée expérimentalement est de **0.03 UI/ml**, elle est identique à la 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.

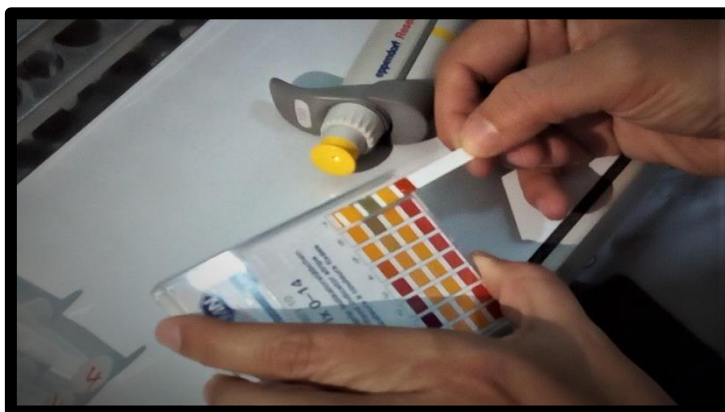
**NB** : La sensibilité de notre lysat est de 0.03 UI/ml, cela veut dire que si on met un lysat en contact avec un produit au même volume 100  $\mu$ l et que ce dernier contient plus de 0.03 UI/ml d'endotoxines, il y'aura formation de gel.

Par la validation de notre lysat, nous avons validé donc les 5M : méthode, matériel, matière milieu et manipulateur.

## b) Résultat du contrôle de la Lidocaïne princeps

### ➤ Résultat de la mesure du pH

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

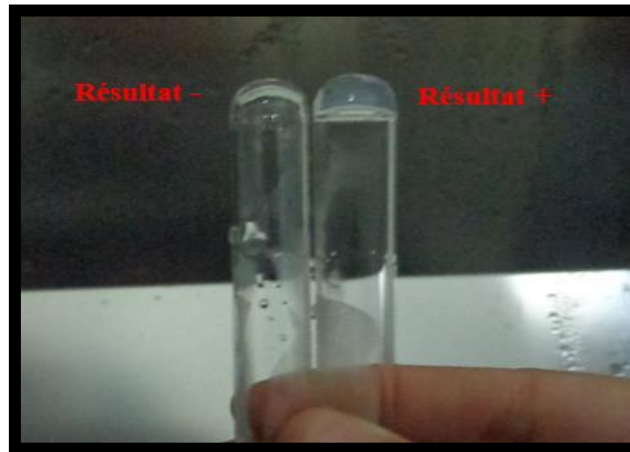


**Figure 27** : Mesure du pH du de la Lidocaïne princeps.

### ➤ Résultat de l'essai proprement dit

**Tableau VII** : Expression des résultats du LAL test pour la Lidocaïne princeps.

Produit	Formation du gel	Résultat
<b>Contrôle négatif</b>	Absence de formation de gel	Résultat négatif
<b>Contrôle positif</b>	Formation de gel	Résultat positif
<b>Produit surcharge</b>	Formation de gel	Résultat positif
<b>Produit surcharge</b>	Formation de gel	Résultat positif
<b>Produit à contrôler à la DT</b>	Absence de Formation de gel	Résultat négatif
<b>Produit à contrôler à la DT</b>	Absence de Formation de gel	Résultat négatif



**Figure 28** : Résultat de l'essai positif après 1h à 37 °C.

## 2. Interprétation

- Le contrôle négatif donne un résultat négatif, ne forme pas de gel : l'eau qualité LAL ne contient pas d'endotoxines et ne présente aucune contamination ;
- Le contrôle positif donne un résultat positif, formation de gel 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 UE/mg d'endotoxines qui doit être inférieure à la dose limite d'endotoxine (LE).

$$X\lambda = \frac{15 \text{ UE/ml}}{20 \text{ mg/ml}}$$

Avec :

→ **X** = facteur de dilution

→ **λ** = sensibilité du lysat

$$X\lambda = 500 \times 0.03 \quad X\lambda = 15 \text{ UE/ml} \quad \longrightarrow \quad X\lambda = 0.75 \text{ UE/mg}$$

$$X\lambda = 0.75 \text{ UE/mg} < LE = 1.5 \text{ UE/mg}$$

→ Donc : La **Lidocaïne princeps** est **conforme**.

### c) Résultat du contrôle de la Lidocaïne générique

#### ➤ Résultat de la mesure du pH

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



Figure 29 : Mesure du pH de la **Lidocaïne générique**.

#### ➤ Résultat de l'essai proprement dit

Tableau VIII : Expression des résultats du LAL test pour la **Lidocaïne générique**.

Produit	Formation du gel	Résultat
<b>Contrôle négatif</b>	Absence de formation de gel	Résultat négatif
<b>Contrôle positif</b>	Formation de gel	Résultat positif
<b>Produit surcharge</b>	Formation de gel	Résultat positif
<b>Produit surcharge</b>	Formation de gel	Résultat positif
<b>Produit à contrôler à la DT</b>	Absence de Formation de gel	Résultat négatif
<b>Produit à contrôler à la DT</b>	Absence de Formation de gel	Résultat négatif

### 3. Interprétation

- Le contrôle négatif donne un résultat négatif, ne forme pas de gel : l'eau qualité LAL ne contient pas d'endotoxines et ne présente aucune contamination ;

- Le contrôle positif donne un résultat positif, formation de gel 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 UE/mg d'endotoxines qui doit être inférieure à la dose imite d'endotoxine (LE).

$$X\lambda = \frac{15 \text{ UE/ml}}{20 \text{ mg/ml}}$$

**Avec :**

→ X = facteur de dilution.

→ λ = sensibilité du lysat.

$$X\lambda = 500 \times 0.03 \quad X\lambda = 15 \text{ UE/ml} \quad \longrightarrow \quad X\lambda = 0.75 \text{ UE/}$$

$$X\lambda = 0.75 \text{ UE/mg} < LE = 1.5 \text{ UE/mg}$$

→ La **Lidocaïne générique** est conforme.

## 2. Evaluation de l'activité de la Lidocaïne

### 2.1. Méthode du rayon chauffant de Mack et Nelson

#### 2.1.1. Lidocaïne princeps

##### a) Résultats

##### ➤ Temps de réactions

Les résultats de temps de réactions des souris de chaque lot sous l'action du rayon calorifique ainsi que la moyenne de ces temps sont résumés dans des tableaux et sont exprimés en secondes (Voir annexe I, II, III).

##### ➤ Durée d'anesthésie

La durée de l'anesthésie est représentée par le temps pour lequel la réaction des souris est obtenue après 12 secondes.

Cette durée diffère avec la dose administrée à l'animal :

**Tableau IX** : Durée d'action de la **Lidocaïne princeps** des 3 lots de souris.

Lot	Dose (mg/kg)	Durée d'anesthésie (min)
1	6.66	140
2	5.33	110
3	4.26	80

##### b) Analyse statistique des résultats : étude de la relation dose-effet

##### ➤ Etablissement de la courbe dose-effet

**Tableau X** : Durée d'action de la **Lidocaïne princeps** des 3 lots de souris en fonction de logarithmes de concentration.

Lot	C (mg/ml)	X = Log C	Y = durée d'anesthésie (min)
1	1.5	0.18	140
2	1.2	0.08	110
3	0.96	-0.02	80

**Détermination de l'équation de la droite**

L'équation de la droite est :  $Y = bX + a$

Avec :

- La pente (b) :  $b = \frac{\sum x_i y_i - \sum x_i \sum y_i / n}{\sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n}}$

- L'ordonnée à l'origine (a) :  $a = m_y - b \times m_x$

**Tableau XI:** Résultats de la durée d'action de la **Lidocaïne princeps**.

Lot	$X_i$	$X_i^2$	$Y_i$	$Y_i^2$	$X_i Y_i$
1	0.18	0.03	140	19600	25.2
2	0.08	0.0064	110	12100	8.8
3	-0.02	0.0004	80	6400	-1.6
<b>Somme</b>	$\sum X_i = 0.24$	$\sum X_i^2 = 0.0368$	$\sum Y_i = 330$	$\sum Y_i^2 = 38100$	$\sum X_i Y_i = 32.4$

▪ **La pente (b) :**

$$b = \frac{\sum x_i y_i - \sum x_i \sum y_i / n}{\sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n}} \longrightarrow \boxed{b = 840.6}$$

Avec :

$$n = n_1 + n_2 + n_3 = 7 + 7 + 7 = 21$$

$k = 3$  (3 lots essais)

▪ **L'ordonnée à l'origine (a) :**

$$a = m_y - b \times m_x \longrightarrow \boxed{a = 42.75}$$

Avec :

$$m_y = \frac{\sum y_i}{k} = 110$$

$$m_x = \frac{\sum x_i}{k} = 0.08$$

L'équation de la droite est :  $Y = 840.6X + 42.752$

### Test de linéarité

Nous avons effectué ce test dans le but de démontrer l'existence d'une corrélation linéaire dose-effet.

On pose l'hypothèse nulle  $H_0$  : la courbe de régression vraie est une droite, contre l'hypothèse alternative  $H_1$  : la courbe de régression vraie n'est pas une droite.

On calcule les sommes des carrés des écarts : due au facteur A ou intergroupe (SCEA), de la régression, de la déviation (SCED), et de la résiduelle (SCER), ainsi que les variances respectives.

On détermine le  $F_0$  de Fisher que l'on compare au F théorique lu sur la table de Fisher

**Tableau XII : Résultats des tests statistiques de la Lidocaïne princeps.**

Source de variation	Somme des carrés des écarts	Ddl	Variance
Due au facteur A ou intergroupe	SCEA = $\sum n_i y_i^2 - n m_y^2$ SCEA = 12600	k-1= 2	$s^2_A = \frac{SCEA}{k-1}$ $s^2_A = 6300$
Régression	$R = b^2 \times (\sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n})$ R = 24065.06		
Ecart à la linéarité ou Déviation	SCED = $ SCEA - b^2 \times (\sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n}) $ SCED = 11465.06	k-2= 1	$s^2_D = \frac{SCED}{k-2}$ $s^2_D = 11465.06$
Résiduelle	SCER = $\sum (n_i - 1) \times s^2_{y_i}$ SCER = 67628.52	n-k= 18	$s^2_R = \frac{SCER}{n-k}$ $s^2_R = 3757.14$

### Comparaison de « $F_0$ » et « $F$ » lu sur la table de Fisher

- $F_0 = \frac{s^2_D}{s^2_R} = 3.05$
- $F_{n-k}^{k-2} = F_{18}^1 = 4.41$  (lu sur la table de Fisher, voir annexe XVI)

Avec :  $n = 21$  ;  $n_i = 7$  et  $k = 3$  (3 lots essais).

$F_0 < 4.41$  Ho n'est pas rejetée. Ceci nous permet de conclure à l'absence d'écart à la linéarité.

### Test de la pente

Le test de la pente permet de démontrer, l'existence d'un lien significatif entre deux variables X et Y.

Dans notre étude ce test nous permet de démontrer, la variation dose dépendante de la durée d'anesthésie.

On teste l'hypothèse nulle  $H_0 : \beta = 0$ , contre l'hypothèse alternative  $H_1 : \beta \neq 0$  (existence d'un lien significatif entre X et Y)

On calcule :  $t_0 = \frac{b}{\sqrt{s^2_b}}$  Avec :  $s^2_b = \frac{\frac{s^2_y}{n} - b^2}{(n-2)}$

**Tableau XIII** : Résultats de la durée d'action de la Lidocaïne princeps

Lot	$X_i$	$X_i^2$	$Y_i$	$Y_i^2$	$X_i Y_i$
1	0.18	0.03	140	19600	25.2
2	0.08	0.0064	110	12100	8.8
3	-0.02	0.0004	80	6400	-1.6
<b>Somme</b>	$\Sigma X_i = 0.24$	$\Sigma X_i^2 = 0.0368$	$\Sigma Y_i = 330$	$\Sigma Y_i^2 = 38100$	$\Sigma X_i Y_i = 32.4$

$$S^2_b = \frac{\frac{s^2_y - b^2}{s^2_x} - b^2}{(n-2)} \longrightarrow \boxed{s^2_b = 4352.99}$$

Avec :

$$S^2_x = \frac{\sum xi^2 - \frac{(\sum xi)^2}{ni}}{ni-1} = 0.00476$$

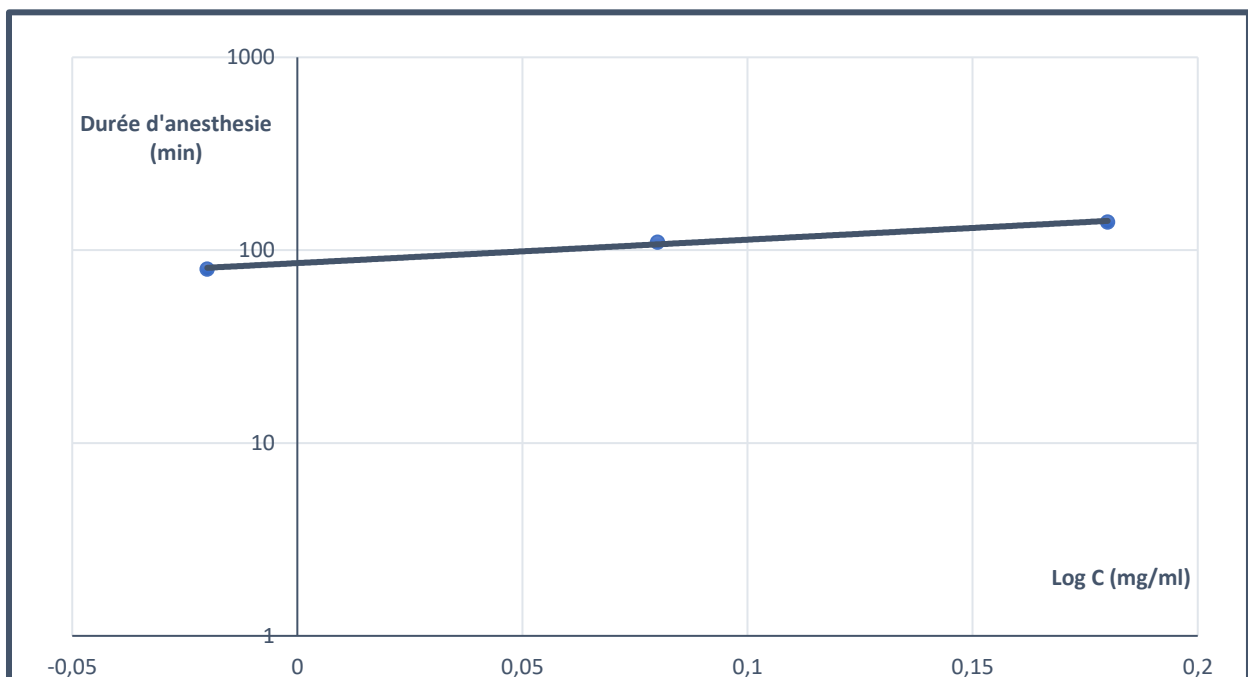
$$S^2_Y = \frac{\sum yi^2 - \frac{(\sum yi)^2}{ni}}{ni-1} = 3757.14$$

Comparaison de «  $t_0$  » et «  $t$  » lu sur la table de Student (voir annexe XIII)

- $t_0 = \frac{b}{\sqrt{s^2_b}} = 12.74$
- $t_{\alpha/2} (n-2) ; ddl \longrightarrow t_{0.025 ; 19} ddl = 2.093$

$t_0 > 2.093$ ,  $H_0$  est rejetée. La pente de la droite est significativement différente de zéro (avec un degré de signification  $p < 1\%$ ).

L'intervalle de confiance de la pente est IC de b :  $b \pm t_{\alpha/2, (n-2)ddl} \times \sqrt{s^2_b} = [702.5 - 978.69]$ .



**Courbe concentration-effet de la Lidocaïne princeps.**

### c) Interprétation

L'allongement du temps de réaction au rayon lumineux des animaux par rapport à leur pré-test respectifs rend compte de la diminution de la sensibilité thermique et donc de l'activité anesthésique de **la Lidocaïne princeps**.

La durée d'anesthésie augmente de façon dose-dépendante, et ceci à été démontré par les tests statistiques qui ont prouvé l'existence d'une corrélation linéaire dose-effet dans l'intervalle étudié.

#### 2.1.2. Lidocaïne générique

##### a) Résultats

###### ➤ Temps de réactions

Les résultats de temps de réactions des souris de chaque lot sous l'action du rayon calorifique ainsi que la moyenne de ces temps sont résumés dans des tableaux et sont exprimés en secondes (Voir annexe IV, V, VI).

###### ➤ Durée d'anesthésie

La durée de l'anesthésie est représentée par le temps pour lequel la réaction des souris est obtenue après 12 secondes.

Cette durée diffère avec la dose administrée à l'animal :

**Tableau XIV** : Durée d'action de **la Lidocaïne générique** des 3 lots de souris.

Lot	Dose (mg/kg)	Durée d'anesthésie (min)
1	6.66	140
2	5.33	90
3	4.26	60

##### b) Analyse statistique des résultats : étude de la relation dose-effet

###### ➤ Etablissement de la courbe concentration-effet

**Tableau XV:** Durée d'action de la **Lidocaïne générique** des 3 lots de souris en fonction des logarithmes de concentration.

Lot	C (mg/ml)	X = Log C	Y = durée d'anesthésie (min)
1	1.5	0.18	140
2	1.2	0.08	90
3	0.96	-0.02	60

**Détermination de l'équation de la droite**

L'équation de la droite est :  $Y = bX + a$

Avec :

- La pente (b) :  $b = \frac{\sum xi yi - \sum xi \sum yi / n}{\sum xi^2 - \frac{(\sum xi)^2}{n}}$

- L'ordonnée à l'origine (a) :  $a = m_y - b \times m_x$

**Tableau XVI :** Résultats de la durée d'action de la **Lidocaïne générique**.

Lot	Xi	Xi <sup>2</sup>	Yi	Yi <sup>2</sup>	XiYi
1	0.18	0.03	140	19600	25.2
2	0.08	0.0064	90	8100	7.2
3	-0.02	0.0004	60	3600	-1.2
<b>Somme</b>	$\sum Xi = 0.24$	$\sum Xi^2 = 0.0368$	$\sum Yi = 290$	$\sum Yi^2 = 31300$	$\sum XiYi = 31.2$

- **La pente (b) :**

$$b = \frac{\sum x_i y_i - \frac{\sum x_i \sum y_i}{n}}{\sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n}} \longrightarrow \boxed{b = 818.79}$$

Avec :

$$n = n_1 + n_2 + n_3 = 7 + 7 + 7 = 21$$

$$k = 3 \text{ (3 lots essais)}$$

- **L'ordonnée à l'origine (a) :**

$$a = m_y - b \times m_x \longrightarrow \boxed{a = 31.16}$$

Avec :

$$m_y = \frac{\sum y_i}{k} = 96.66$$

$$m_x = \frac{\sum x_i}{k} = 0.08$$

L'équation de la droite est :  $\boxed{Y = 818.79X + 31.16}$

### Test de linéarité

Nous avons effectué ce test dans le but de démontrer l'existence d'une corrélation linéaire dose-effet.

On pose l'hypothèse nulle  $H_0$  : la courbe de régression vraie est une droite, contre l'hypothèse alternative  $H_1$  : la courbe de régression vraie n'est pas une droite.

On calcule les sommes des carrés des écarts : due au facteur A ou intergroupe (SCEA), de la régression, de la déviation (SCED), et de la résiduelle (SCER), ainsi que les variances respectives.

On détermine le  $F_0$  de Fisher que l'on compare au F théorique lu sur la table de Fisher.

Tableau XVII : Résultats des tests statistiques de la Lidocaïne générique.

Source de variation	Somme des carrés des écarts	Ddl	Variance
Due au facteur A ou intergroupe	SCEA = $\sum ni y_i^2 - nmy^2$ SCEA = 22893.73	k-1= 2	$s^2_A = \frac{SCEA}{k-1}$ $s^2_A = 11446.87$
Régression	$R = b^2 \times (\sum xi^2 - \frac{(\sum xi)^2}{n})$ R = 22832.49		
Ecart à la linéarité ou Déviation	SCED = $\left  SCEA - b^2 \times (\sum xi^2 - \frac{(\sum xi)^2}{n}) \right $ SCED = 61.24	k-2= 1	$s^2_D = \frac{SCED}{k-2}$ $s^2_D = 61.24$
Résiduelle	SCER = $\sum (ni - 1) \times s^2_{y_i}$ SCER = 57857.22	n-k= 18	$s^2_R = \frac{SCER}{n-k}$ $s^2_R = 3214.29$

### Comparaison de « $F_0$ » et « F » lu sur la table de Fisher

- $F_0 = \frac{s^2_D}{s^2_R} = 0.02$
- $F_{n-k}^{k-2} = F_{18}^1 = 4.41$  (lu sur la table de Fisher, voir annexe XIV)

Avec :  $n = 21$  ;  $n_i = 7$  et  $k = 3$  (3 lots essais).

$F_0 < 4.41$  Ho n'est pas rejetée. Ceci nous permet de conclure à l'absence d'écart à la linéarité.

### Test de la pente

Le test de la pente permet de démontrer, l'existence d'un lien significatif entre deux variables X et Y.

Dans notre étude ce test nous permet de démontrer, la variation dose dépendante de la durée d'anesthésie.

On teste l'hypothèse nulle  $H_0 : \beta = 0$ , contre l'hypothèse alternative  $H_1 : \beta \neq 0$  (existence d'un lien significatif entre X et Y)

$$\text{On calcule : } t_0 = \frac{b}{\sqrt{s_b^2}} \text{ Avec : } s_b^2 = \frac{\frac{s_y^2}{n} - b^2}{(n-2)}$$

**Tableau XVIII : Résultats de la durée d'action de la Lidocaïne générique.**

Lot	$X_i$	$X_i^2$	$Y_i$	$Y_i^2$	$X_i Y_i$
1	0.18	0.03	140	19600	25.2
2	0.08	0.0064	90	8100	7.2
3	-0.02	0.0004	60	3600	-1.2
<b>Somme</b>	$\Sigma X_i = 0.24$	$\Sigma X_i^2 = 0.0368$	$\Sigma Y_i = 290$	$\Sigma Y_i^2 = 31300$	$\Sigma X_i Y_i = 31.2$

$$s_b^2 = \frac{\frac{s_y^2}{n} - b^2}{(n-2)} \longrightarrow \boxed{s_b^2 = 255.47}$$

Avec :

$$s_x^2 = \frac{\Sigma x_i^2 - \frac{(\Sigma x_i)^2}{n}}{n-1} = 0.00476$$

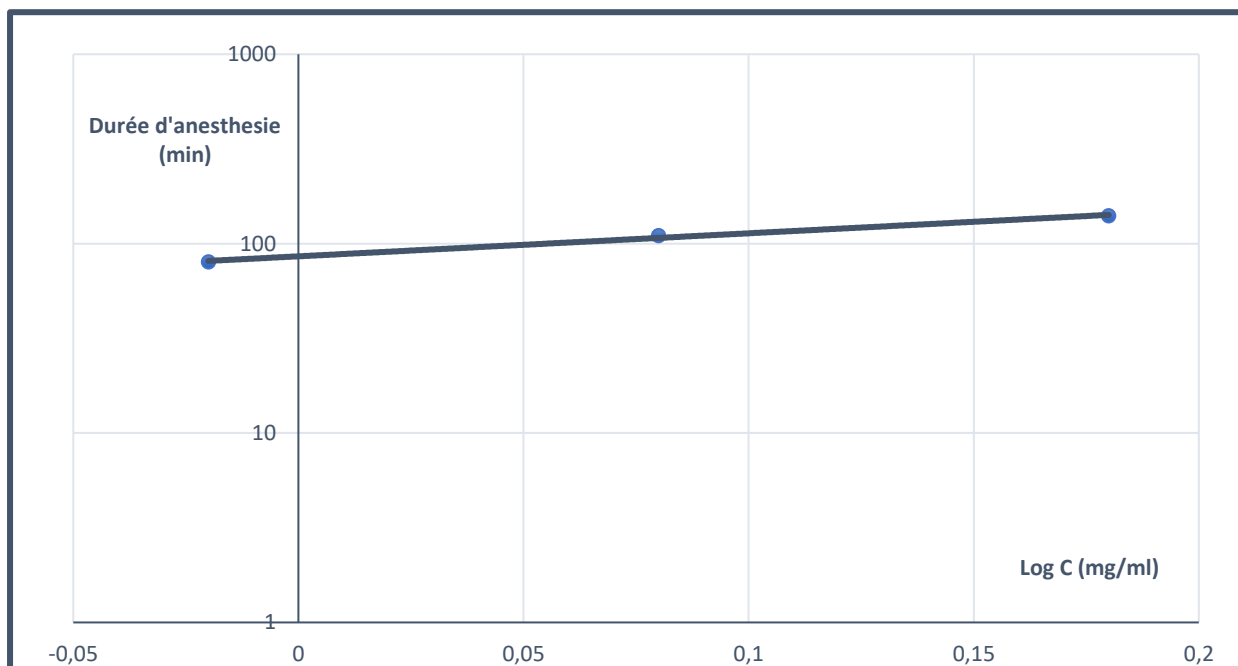
$$s_y^2 = \frac{\Sigma y_i^2 - \frac{(\Sigma y_i)^2}{n}}{n-1} = 3214.29$$

Comparaison de «  $t_0$  » et «  $t$  » lu sur la table de Student (voir annexe XIII)

- $t_0 = \frac{b}{\sqrt{s_b^2}} = 51.23$
- $t_{\alpha/2} (n-2) ; \text{ddl} \longrightarrow t_{0.025} ; 19 \text{ ddl} = 2.093$

$t_0 > 2.093$ ,  $H_0$  est rejetée. La pente de la droite est significativement différente de zéro (avec un degré de signification  $p < 1\%$ ).

L'intervalle de confiance de la pente est IC de  $b$  :  $b \pm t_{\frac{\alpha}{2}, (n-2)ddl} \times \sqrt{s^2_b} = [702.5 - 978.69]$ .



**Courbe concentration-durée de la Lidocaïne générique.**

### c) Interprétation

L'allongement du temps de réaction au rayon lumineux des animaux par rapport à leur pré-test respectifs rend compte de la diminution de la sensibilité thermique et donc de l'activité anesthésique de la **Lidocaïne générique**.

La durée d'anesthésie augmente de façon dose-dépendante, et ceci a été démontré par les tests statistiques qui ont prouvé l'existence d'une corrélation linéaire dose-effet dans l'intervalle étudié.

#### 2.1.3. Comparaison de la Lidocaïne princeps et générique

L'évaluation repose sur la comparaison des réponses maximales obtenues avec chacune des deux molécules. Le tableau suivant résume les temps en secondes correspondant à la réponse maximale des différents lots :

**Tableau XIX:** Temps de reaction maximale de chaque souris, obtenu avec **la Lidocaïne princeps.**

<b>Lidocaïne princeps</b>	<b>Lot N°1</b>	<b>Lot N°2</b>	<b>Lot N°3</b>
<b>Souris 1</b>	52	32	25
<b>Souris 2</b>	46	32	18
<b>Souris 3</b>	43	30	21
<b>Souris 4</b>	41	35	22
<b>Souris 5</b>	39	28	22
<b>Souris 6</b>	49	33	21
<b>Souris 7</b>	50	29	24

**Tableau XX:** Temps de reaction maximale de chaque souris, obtenu avec **la Lidocaïne générique.**

<b>Lidocaïne générique</b>	<b>Lot N°1</b>	<b>Lot N°2</b>	<b>Lot N°3</b>
<b>Souris 1</b>	39	25	22
<b>Souris 2</b>	40	29	20
<b>Souris 3</b>	49	29	20
<b>Souris 4</b>	42	32	18
<b>Souris 5</b>	34	28	21
<b>Souris 6</b>	42	31	20
<b>Souris 7</b>	48	30	16

Les tableaux suivants représentent les moyennes et les variances des réponses maximales des différents lots ayant reçu **la Lidocaïne princeps et générique** :

**Tableau XXI:** Moyennes et variances du temps de réaction maximale des souris sous l'action de **la Lidocaïne princeps.**

<b>Princeps</b>	<b>Lot N°1</b>	<b>Lot N°2</b>	<b>Lot N°3</b>
<b>Moyenne (m)</b>	45.71	31.29	21.86
<b>Variance (s<sup>2</sup>)</b>	23.90	5.90	5.14

**Tableau XXII** : Moyennes et variances du temps de réaction maximale des souris sous l'action de la **Lidocaïne générique**.

Générique	Lot N°1	Lot N°2	Lot N°3
Moyenne (m)	42	29.14	19.57
Variance (s <sup>2</sup> )	27	5.14	3.95

**a) Comparaison des réponses des animaux des lots N°1**

- On teste l'hypothèse nulle **H<sub>0</sub>** :  $\mu_P = \mu_g$  contre l'hypothèse alternative **H<sub>1</sub>** :  $\mu_P \neq \mu_g$

- On estime la variance commune (s<sup>2</sup>) :

$$S^2 = \frac{(np-1)s_p^2 + (ng-1)s_g^2}{(np-1)+(ng-1)} \longrightarrow \boxed{S^2 = 25.45}$$

- On calcule le rapport t :

$$t_0 = \frac{|mp - mg|}{\sqrt{\left(\frac{s_p^2}{np} + \frac{s_g^2}{ng}\right)}} \longrightarrow \boxed{t_0 = 1.38}$$

- On compare « t<sub>0</sub> » et « t » lu sur la table de Student (voir annexe XIII)

▪ t<sub>0</sub> = 1.38

▪ t<sub>α/2</sub> (n<sub>p</sub> + n<sub>g</sub> - 2) ddl = 12  $\longrightarrow$  t<sub>0.025</sub> ; 12 ddl = 2.179

**t < 2.179**, H<sub>0</sub> n'est pas rejetée. La moyenne des réponses des animaux ayant reçu le **princeps** n'est pas significativement différente de la moyenne des réponses des animaux ayant reçu le **générique**.

**b) Comparaison des réponses des animaux des lots N°2**

- On teste l'hypothèse nulle **H<sub>0</sub>** :  $\mu_P = \mu_g$  contre l'hypothèse alternative **H<sub>1</sub>** :  $\mu_P \neq \mu_g$

- On estime la variance commune (s<sup>2</sup>) :

$$S^2 = \frac{(np-1)s_p^2 + (ng-1)s_g^2}{(np-1)+(ng-1)} \longrightarrow \boxed{S^2 = 5.52}$$

- On calcule le rapport t :

$$t_0 = \frac{|m_p - m_g|}{\sqrt{\left(\frac{s_p^2}{n_p} + \frac{s_g^2}{n_g}\right)}} \longrightarrow \boxed{t_0 = 1.71}$$

**On compare « t<sub>0</sub> » et « t » lu sur la table de Student (voir annexe XIII)**

- **t<sub>0</sub> = 1.71**
- **t<sub>α/2</sub> (n<sub>p</sub> + n<sub>g</sub> - 2) ddl = 12       $\longrightarrow$       t 0.025 ; 12 ddl = **2.179****

**t < 2.179**, Ho n'est pas rejetée. La moyenne des réponses des animaux ayant reçu le **princeps** n'est pas significativement différente de la moyenne des réponses des animaux ayant reçu le **générique**.

### c) Comparaison des réponses des animaux des lots N°3

- On teste l'hypothèse nulle **H<sub>0</sub> : μ<sub>P</sub> = μ<sub>G</sub>** contre l'hypothèse alternative **H<sub>1</sub> : μ<sub>P</sub> ≠ μ<sub>G</sub>**

- On estime la variance commune (s<sup>2</sup>) :

$$S^2 = \frac{(n_p - 1)s_p^2 + (n_g - 1)s_g^2}{(n_p - 1) + (n_g - 1)} \longrightarrow \boxed{S^2 = 4.55}$$

- On calcule le rapport t :

$$t_0 = \frac{|m_p - m_g|}{\sqrt{\left(\frac{s^2}{n_p} + \frac{s^2}{n_g}\right)}} \longrightarrow \boxed{t_0 = 2.01}$$

**On compare « t<sub>0</sub> » et « t » lu sur la table de Student (voir annexe XIII)**

- **t<sub>0</sub> = 2.01**
- **t<sub>α/2</sub> (n<sub>p</sub> + n<sub>g</sub> - 2) ddl = 12       $\longrightarrow$       t 0.025 ; 12 ddl = **2.179****

**t < 2.179**, Ho n'est pas rejetée. La moyenne des réponses des animaux ayant reçu le **princeps** n'est pas significativement différente de la moyenne des réponses des animaux ayant reçu le **générique**.

L'étude comparative entre le **princeps** et le **générique** de la **Lidocaïne** ne montre pas de **différence significative**.

## 2.2. Réflexe cornéen du lapin

### 2.2.1. Lidocaïne princeps

#### a) Résultats

##### ➤ Temps de réactions

Les résultats de la durée d'abolition du reflexe cornéen chez le lapin ainsi que le nombre d'attouchements nécessaire pour déclencher ce reflexe sont résumés dans des tableaux (Voir annexe VII, VIII, IX).

##### ➤ Durée d'anesthésie

La durée de l'anesthésie est représentée par le temps pour lequel la réaction des lapins est obtenue après 5 attouchements.

Cette durée diffère avec la dose administrée à l'animal.

**Tableau XXIII** : Durée d'action de la **Lidocaïne princeps** des 3 lots de lapins.

Lot	Dose (mg /ml)	Durée d'anesthésie (min)
1	20	33
2	16	20
3	12.8	12

#### d) Analyse statistique des résultats : étude de la relation dose-effet

##### ➤ Etablissement de la courbe concentration-effet

**Tableau XXIV**: Durée d'action de la **Lidocaïne princeps** des 3 lots de lapins en fonction des logarithmes de concentration.

Lot	C (mg/ml)	X = Log C	Y = durée d'anesthésie (min)
1	20	1.30	33
2	16	1.20	20
3	12.8	1.11	12

**Détermination de l'équation de la droite**

L'équation de la droite est :

$$Y = bX + a$$

Avec :

$$- \text{ La pente (b) : } b = \frac{\sum xi yi - \sum xi \sum yi / n}{\sum xi^2 - \frac{(\sum xi)^2}{n}}$$

$$- \text{ L'ordonnée à l'origine (a) : } a = m_y - b \times m_x$$

**Tableau XXV: Résultats de la durée d'action de la Lidocaïne princeps.**

Lot	Xi	Xi <sup>2</sup>	Yi	Yi <sup>2</sup>	XiYi
1	1.30	1.69	33	1089	42.9
2	1.20	1.44	20	400	24
3	1.11	1.23	12	144	13.32
<b>Somme</b>	<b>ΣXi= 3.61</b>	<b>ΣXi<sup>2</sup> = 4.36</b>	<b>ΣYi = 65</b>	<b>ΣYi<sup>2</sup> = 1633</b>	<b>ΣXiYi= 80.22</b>

▪ **La pente (b) :**

$$b = \frac{\sum xi yi - \sum xi \sum yi / n}{\sum xi^2 - \frac{(\sum xi)^2}{n}} \longrightarrow \boxed{b = 18.48}$$

Avec :

$$n = n_1 + n_2 + n_3 = 6 + 6 + 6 = 18$$

$$k = 3 \text{ (3 lots essais)}$$

▪ **L'ordonnée à l'origine (a) :**

$$a = m_y - b \times m_x \longrightarrow \boxed{a = -0.5}$$

Avec :

$$m_y = \frac{\sum yi}{k} = 21.67$$

$$m_x = \frac{\sum xi}{k} = 1.20$$

L'équation de la droite est :  $Y = 18.48X - 0.5$

### Test de linéarité

Nous avons effectué ce test dans le but de démontrer l'existence d'une corrélation linéaire dose-effet.

On pose l'hypothèse nulle  $H_0$  : la courbe de régression vraie est une droite, contre l'hypothèse alternative  $H_1$  : la courbe de régression vraie n'est pas une droite.

On calcule les sommes des carrés des écarts : due au facteur A ou intergroupe (SCEA), de la régression, de la déviation (SCED), et de la résiduelle (SCER), ainsi que les variances respectives.

On détermine le  $F_0$  de Fisher que l'on compare au  $F$  théorique lu sur la table de Fisher.

**Tableau XXVI** : Résultats des tests statistiques de la **Lidocaïne princeps**.

Source de variation	Somme des carrés des écarts	Ddl	Variance
Due au facteur A ou intergroupe	SCEA = $\sum niy_i^2 - nmy^2$ SCEA = 1345.40	k-1= 2	$s^2_A = \frac{SCEA}{k-1}$ $s^2_A = 672.70$
Régression	$R = b^2 \times (\sum xi^2 - \frac{(\sum xi)^2}{n})$ R = 1241.73		
Ecart à la linéarité ou Déviation	SCED = $ SCEA - b^2 \times (\sum xi^2 - \frac{(\sum xi)^2}{n}) $ SCED = 103.67	k-2= 1	$s^2_D = \frac{SCED}{k-2}$ $s^2_D = 103.67$
Résiduelle	SCER = $\sum (ni - 1) \times s^2_{y_i}$ SCER = 2786.55	n-k= 15	$s^2_R = \frac{SCER}{n-k}$ $s^2_R = 185.77$

**Comparaison de « F<sub>0</sub> » et « F » lu sur la table de Fisher**

- $F_0 = \frac{s_D^2}{s_R^2} = 0.56$
- $F_{n-k}^{k-2} = F_{18}^1 = 4.54$  (lu sur la table de Fisher, voir annexe XIV)

Avec :  $n = 18$  ;  $n_i = 6$  et  $k = 3$  (3 lots essais).

$F_0 < 4.54$  Ho n'est pas rejetée. Ceci nous permet de conclure à l'absence d'écart à la linéarité.

**Test de la pente**

Le test de la pente permet de démontrer, l'existence d'un lien significatif entre deux variables X et Y.

Dans notre étude ce test nous permet de démontrer, la variation dose dépendante de la durée d'anesthésie.

On teste l'hypothèse nulle Ho :  $\beta = 0$ , contre l'hypothèse alternative H1 :  $\beta \neq 0$  (existence d'un lien significatif entre X et Y)

On calcule :  $t_0 = \frac{b}{\sqrt{s_b^2}}$  Avec :  $s_b^2 = \frac{\frac{s_y^2}{n} - b^2}{(n-2)}$

**Tableau XXVII: Résultats de la durée d'action de la Lidocaïne princeps.**

Lot	Xi	Xi <sup>2</sup>	Yi	Yi <sup>2</sup>	XiYi
1	1.30	1.69	33	1089	42.9
2	1.20	1.44	20	400	24
3	1.11	1.23	12	144	13.32
<b>Somme</b>	<b>ΣXi = 3.61</b>	<b>ΣXi<sup>2</sup> = 4.36</b>	<b>ΣYi = 65</b>	<b>ΣYi<sup>2</sup> = 1633</b>	<b>ΣXiYi = 80.22</b>

$$s^2_b = \frac{\frac{s^2_y}{s^2_x} - b^2}{(n-2)} \longrightarrow \boxed{s^2_b = 5.04}$$

Avec :

$$s^2_x = \frac{\sum xi^2 - \frac{(\sum xi)^2}{ni}}{ni-1} = 0.44$$

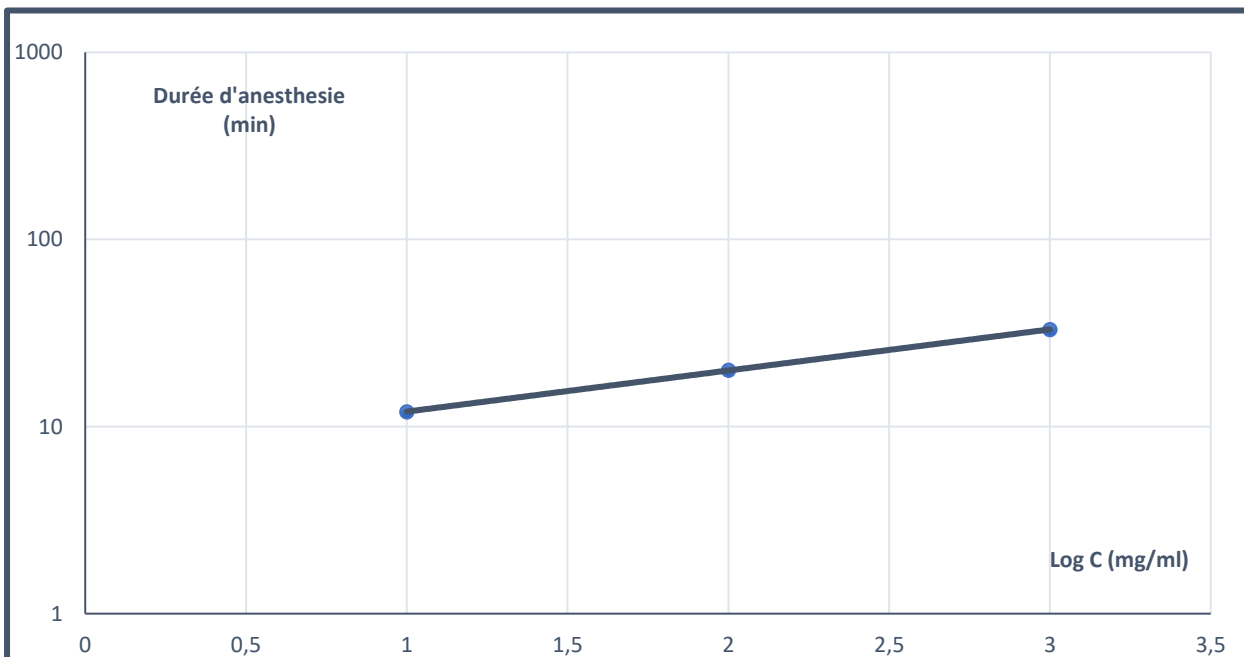
$$s^2_Y = \frac{\sum yi^2 - \frac{(\sum yi)^2}{ni}}{ni-1} = 185.77$$

Comparaison de «  $t_0$  » et «  $t$  » lu sur la table de Student ( voir annexe XIII)

- $t_0 = \frac{b}{\sqrt{s^2_b}} = 8.23$
- $t_{\alpha/2} (n-2) ; ddl \longrightarrow t_{0.025 ; 19} ddl = 2.120$

$t_0 > 2.120$ ,  $H_0$  est rejetée. La pente de la droite est significativement différente de zéro (avec un degré de signification  $p < 1\%$ ).

L'intervalle de confiance de la pente est IC de  $b$  :  $b \pm t_{\frac{\alpha}{2}, (n-2)} ddl \times \sqrt{s^2_b} = [13.72 - 23.24]$ .



**Courbe concentration-durée de la Lidocaïne princeps.**

#### d) Interprétation

L'absence du reflexe cornéen suite aux attouchements oculaires des animaux par rapport à leur pré-test respectifs rend compte de la suppression de la sensibilité cornéenne et donc de l'activité anesthésique de **la Lidocaïne princeps**.

La durée d'anesthésie augmente de façon dose-dépendante, et ceci est démontré par les tests statistiques qui ont prouvé l'existence d'une corrélation linéaire dose-effet dans l'intervalle étudié.

#### 2.1.2. Lidocaïne générique

##### a) Résultats

###### ➤ Temps de réactions

Les résultats de la durée d'abolition du reflexe cornéen chez le lapin ainsi que le nombre d'attouchements nécessaire pour déclencher ce reflexe sont résumés dans des tableaux (Voir annexe X, XI, XII).

###### ➤ Durée d'anesthésie

La durée de l'anesthésie est représentée par le temps pour lequel la réaction des lapins est obtenue après 5 attouchements.

Cette durée diffère avec la dose administrée à l'animal

**TableauXXVIII:** Durée d'action de **la Lidocaïne générique** des 3 lots de souris.

Lot	Dose (mg/ml)	Durée d'anesthésie (min)
1	20	30
2	16	18
3	12.8	12

##### b) Analyse statistique des résultats : étude de la relation dose-effet

###### ➤ Etablissement de la courbe concentration-effet

**XXIX:** Durée d'action de **la Lidocaïne générique** des 3 lots de souris en fonction des logarithmes de concentration.

Lot	C (mg/ml)	X = Log C	Y = durée d'anesthésie (min)
1	20	1.30	30
2	16	1.20	18
3	12.8	1.11	12

### Détermination de l'équation de la droite

L'équation de la droite est de la forme :

$$Y = bX + a$$

Avec :

- La pente (b) :  $b = \frac{\sum xi yi - \sum xi \sum yi / n}{\sum xi^2 - \frac{(\sum xi)^2}{n}}$

- L'ordonnée à l'origine (a) :  $a = m_y - b \times m_x$

**Tableau XXX :** Résultats de la durée d'action de **la Lidocaïne générique**.

Lot	$X_i$	$X_i^2$	$Y_i$	$Y_i^2$	$\sum X_i Y_i$
1	1.30	1.69	30	900	39
2	1.20	1.44	18	324	21.6
3	1.11	1.23	12	144	13.32
<b>Somme</b>	$\sum X_i = 3.61$	$\sum X_i^2 = 4.36$	$\sum Y_i = 60$	$\sum Y_i^2 = 1368$	$\sum X_i Y_i = 73.92$

▪ **La pente (b) :**

$$b = \frac{\sum x_i y_i - \frac{\sum x_i \sum y_i}{n}}{\sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n}} \longrightarrow \boxed{b = 17.02}$$

Avec :

$$n = n_1 + n_2 + n_3 = 6 + 6 + 6 = 18$$

$$k = 3 \text{ (3 lots essais)}$$

▪ **L'ordonnée à l'origine (a) :**

$$a = m_y - b \times m_x \longrightarrow \boxed{a = -0.42}$$

Avec :

$$m_y = \frac{\sum y_i}{k} = 20$$

$$m_x = \frac{\sum x_i}{k} = 1.20$$

L'équation de la droite est :  $\boxed{Y = 17.02X - 0.42}$

### Test de linéarité

Nous avons effectué ce test dans le but de démontrer l'existence d'une corrélation linéaire dose-effet.

On pose l'hypothèse nulle  $H_0$  : la courbe de régression vraie est une droite, contre l'hypothèse alternative  $H_1$  : la courbe de régression vraie n'est pas une droite.

On calcule les sommes des carrés des écarts : due au facteur A ou intergroupe (SCEA), de la régression, de la déviation (SCED), et de la résiduelle (SCER), ainsi que les variances respectives.

On détermine le  $F_0$  de Fisher que l'on compare au F théorique lu sur la table de Fisher

**Tableau XXXI:** Résultats des tests statistiques pour la Lidocaïne générique.

Source de variation	Somme des carrés des écarts	Ddl	Variance
<b>Due au facteur A ou intergroupe</b>	$SCEA = \sum niy_i^2 - nmy^2$ <b>SCEA = 1008</b>	$k-1= 2$	$s^2_A = \frac{SCEA}{k-1}$ <b><math>s^2_A = 504</math></b>
<b>Régression</b>	$R = b^2 \times (\sum xi^2 - \frac{(\sum xi)^2}{n})$ <b>R = 1053.28</b>		
<b>Ecart à la linéarité ou Déviation</b>	$SCED =  SCEA - b^2 \times (\sum xi^2 - \frac{(\sum xi)^2}{n}) $ <b>SCED = 196.90</b>	$k-2= 1$	$s^2_D = \frac{SCED}{k-2}$ <b><math>s^2_D = 196.90</math></b>
<b>Résiduelle</b>	$SCER = \sum (ni - 1) \times s^2_{y_i}$ <b>SCER = 2304</b>	$n-k= 15$	$s^2_R = \frac{SCER}{n-k}$ <b><math>s^2_R = 153.6</math></b>

**Comparaison de « F<sub>0</sub> » et « F » lu sur la table de Fisher**

- $F_0 = \frac{s^2_D}{s^2_R} = 1.28$
- $F_{n-k}^{k-2} = F_{18}^1 = 4.54$  (lu sur la table de Fisher, voir annexe XIV)

Avec :  $n = 18$  ;  $n_i = 6$  et  $k = 3$  (3 lots essais).

$F_0 < 4.54$  Ho n'est pas rejetée. Ceci nous permet de conclure à l'absence d'écart à la linéarité.

**Test de la pente**

Le test de la pente permet de démontrer, l'existence d'un lien significatif entre deux variables X et Y.

Dans notre étude ce test nous permet de démontrer, la variation dose dépendante de la durée d'anesthésie.

On teste l'hypothèse nulle  $H_0 : \beta = 0$ , contre l'hypothèse alternative  $H_1 : \beta \neq 0$  (existence d'un lien significatif entre X et Y).

On calcule :  $t_0 = \frac{b}{\sqrt{s^2_b}}$  Avec :  $s^2_b = \frac{\frac{s^2_y}{n} - b^2}{(n-2)}$

**Tableau XXXII:** Résultats de la durée d'action de la Lidocaïne générique.

Lot	$X_i$	$X_i^2$	$Y_i$	$Y_i^2$	$X_i Y_i$
1	1.30	1.69	30	900	39
2	1.20	1.44	18	324	21.6
3	1.11	1.23	12	144	13.32
<b>Somme</b>	$\Sigma X_i = 3.61$	$\Sigma X_i^2 = 4.36$	$\Sigma Y_i = 60$	$\Sigma Y_i^2 = 1368$	$\Sigma X_i Y_i = 73.92$

$$s^2_b = \frac{\frac{s^2_y}{n} - b^2}{(n-2)} \longrightarrow \boxed{s^2_b = 3.71}$$

Avec :

$$s^2_x = \frac{\Sigma x_i^2 - \frac{(\Sigma x_i)^2}{ni}}{ni-1} = 0.44$$

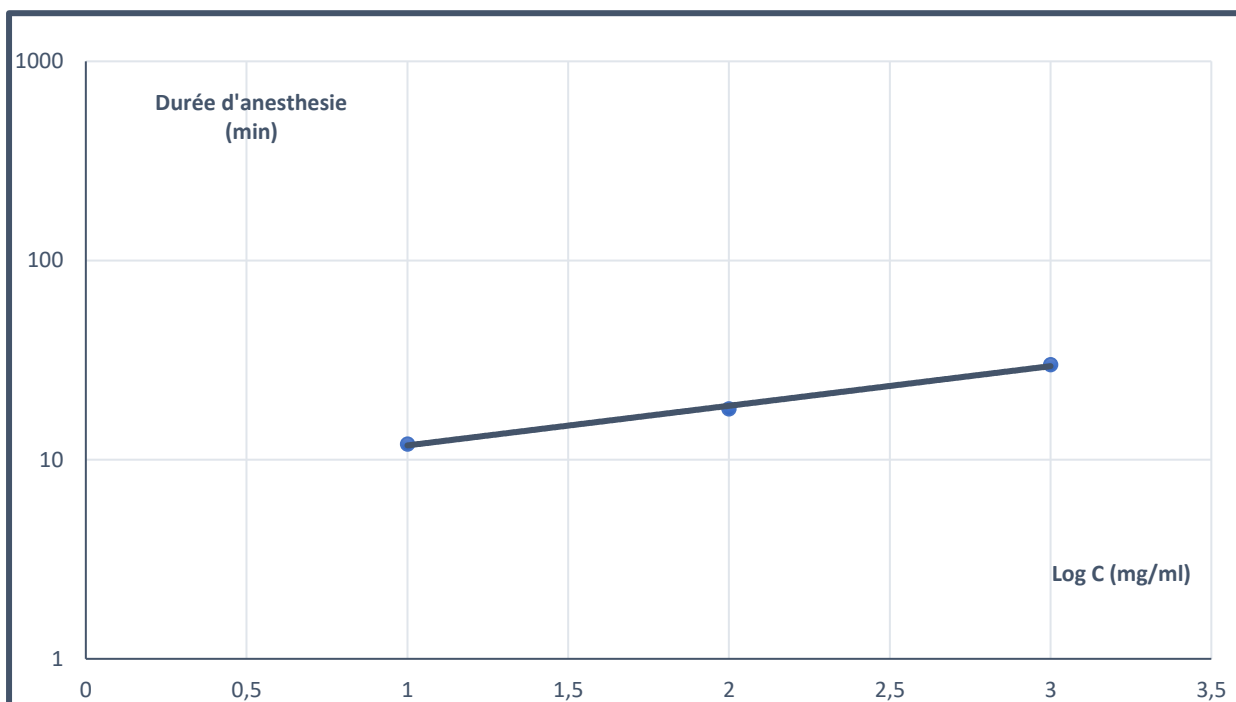
$$s^2_y = \frac{\Sigma y_i^2 - \frac{(\Sigma y_i)^2}{ni}}{ni-1} = 153.6$$

Comparaison de «  $t_0$  » et «  $t$  » lu sur la table de Student (voir annexe XIII)

- $t_0 = \frac{b}{\sqrt{s^2_b}} = 8.84$
- $t_{\alpha/2} (n-2) ; ddl \longrightarrow t_{0.025} ; 19 ddl = 2.120$

$t_0 > 2.120$ ,  $H_0$  est rejetée. La pente de la droite est significativement différente de zéro (avec un degré de signification  $p < 1\%$ ).

L'intervalle de confiance de la pente est IC de b :  $b \pm t_{\frac{\alpha}{2}, (n-2)} \text{ddl} \times \sqrt{s^2_b} = [12.94 - 21.10]$ .



**Courbe concentration-effet de la Lidocaïne générique.**

### c) Interprétation

L'absence du réflexe cornéen suite aux attouchements oculaires des animaux par rapport à leur pré-test respectifs rend compte de la suppression de la sensibilité cornéenne et donc de l'activité anesthésique de **la Lidocaïne générique**.

La durée d'anesthésie augmente de façon dose-dépendante, et ceci est démontré par les tests statistiques qui ont prouvé l'existence d'une corrélation linéaire dose-effet dans l'intervalle étudié.

#### 2.1.4. Comparaison de la Lidocaïne princeps et générique

L'évaluation repose sur la comparaison des durées d'anesthésie obtenues avec chacune des deux molécules.

**Tableau XXXIII:** Durée d'action pour chaque lapin, obtenue avec la **Lidocaïne princeps**.

Lapin	Lot N°1	Lot N°2	Lot N°3
Lapin 1	35	25	7.5
Lapin2	30	20	10
Lapin 3	35	20	15
Lapin 4	30	15	10
Lapin5	35	20	10
Lapin 6	35	20	15
Moyenne	33	20	12

**Tableau XXXIV :**Durée d'action pour chaque lapin, obtenue avec la **Lidocaïne générique**.

Lapin	Lot N°1	LotN°2	Lot N°3
Lapin 1	30	15	15
Lapin2	25	15	15
Lapin 3	35	15	10
Lapin 4	30	20	10
Lapin 5	30	15	10
Lapin 6	30	15	10
Moyenne	30	18	12

Les tableaux suivants représentent les moyennes et les variances des durées d'action des différents lots ayant reçu la **Lidocaïne princeps** et **générique** :

**TableauXXXV:** Moyennes et variances de la durée de l'anesthésie locale sous l'action de la **Lidocaïne princeps**.

Princeps	Lot N°1	Lot N°2	Lot N°3
Moyenne (m)	33	20	12
Variance (s <sup>2</sup> )	6.7	10	7.5

**Tableau XXXVI** : Moyennes et variances de la durée de l'anesthésie locale sous l'action de la **Lidocaïne générique**.

Générique	Lot N°1	Lot N°2	Lot N°3
Moyenne (m)	27	18	12
Variance (s <sup>2</sup> )	10	7.5	6.7

**d) Comparaison des réponses des animaux des lots N°1**

- On teste l'hypothèse nulle **H<sub>0</sub>** :  $\mu_P = \mu_G$  contre l'hypothèse alternative **H<sub>1</sub>** :  $\mu_P \neq \mu_G$

- On estime la variance commune (s<sup>2</sup>) :

$$S^2 = \frac{(np-1)s_p^2 + (ng-1)s_g^2}{(np-1) + (ng-1)} \longrightarrow \boxed{S^2 = 8.33}$$

- On calcule le rapport t :

$$t_0 = \frac{|m_P - m_G|}{\sqrt{\left(\frac{s^2}{np} + \frac{s^2}{ng}\right)}} \longrightarrow \boxed{t_0 = 2}$$

- On compare « t<sub>0</sub> » et « t » lu sur la table de Student (voir annexe XIII) :

▪ **t<sub>0</sub> = 2**

▪  $t_{\alpha/2} (n_P + n_G - 2) \text{ ddl} = 12 \longrightarrow t_{0.025 ; 12 \text{ ddl}} = \mathbf{2.228}$

**t < 2.228**, H<sub>0</sub> n'est pas rejetée. La moyenne des réponses des animaux ayant reçu le **princeps** n'est pas significativement différente de la moyenne des réponses des animaux ayant reçu le **générique**.

**e) Comparaison des réponses des animaux des lots N°2**

- On teste l'hypothèse nulle **H<sub>0</sub>** :  $\mu_P = \mu_G$  contre l'hypothèse alternative **H<sub>1</sub>** :  $\mu_P \neq \mu_G$

- On estime la variance commune (s<sup>2</sup>) :

$$S^2 = \frac{(np-1)s_p^2 + (ng-1)s_g^2}{(np-1)+(ng-1)} \longrightarrow \boxed{S^2 = 8.75}$$

- On calcule le rapport t :

$$t_0 = \frac{|mp - mg|}{\sqrt{\left(\frac{s_p^2}{np} + \frac{s_g^2}{ng}\right)}} \longrightarrow \boxed{t_0 = 1.41}$$

- On compare « t<sub>0</sub> » et « t » lu sur la table de Student (voir annexe XIII) :

- **t<sub>0</sub> = 1.41**

- $t_{\alpha/2} (n_p + n_g - 2) \text{ ddl} = 12 \longrightarrow t_{0.025 ; 12 \text{ ddl}} = \mathbf{2.228}$

**t<sub>0</sub> < 2.228**, H<sub>0</sub> n'est pas rejetée. La moyenne des réponses des animaux ayant reçu le **princeps** n'est pas significativement différente de la moyenne des réponses des animaux ayant reçu le **générique**.

#### f) Comparaison des réponses des animaux des lots N°3

- On teste l'hypothèse nulle **H<sub>0</sub> : μ<sub>P</sub> = μ<sub>G</sub>** contre l'hypothèse alternative **H<sub>1</sub> : μ<sub>P</sub> ≠ μ<sub>G</sub>**

- On estime la variance commune (s<sup>2</sup>) :

$$S^2 = \frac{(np-1)s_p^2 + (ng-1)s_g^2}{(np-1)+(ng-1)} \longrightarrow \boxed{S^2 = 7.1}$$

- On calcule le rapport t :

$$t_0 = \frac{|mp - mg|}{\sqrt{\left(\frac{s_p^2}{np} + \frac{s_g^2}{ng}\right)}} \longrightarrow \boxed{t_0 = 0.22}$$

- On compare « t<sub>0</sub> » et « t » lu sur la table de Student (voir annexe XIII) :

- **t<sub>0</sub> = 0.22**

- $t_{\alpha/2} (n_p + n_g - 2) \text{ ddl} = 12 \longrightarrow t_{0.025 ; 12 \text{ ddl}} = \mathbf{2.228}$

$t_0 < 2.228$ ,  $H_0$  n'est pas rejetée. La moyenne des réponses des animaux ayant reçu le **princeps** n'est pas significativement différente de la moyenne des réponses des animaux ayant reçu le **générique**.

### **Interprétation**

L'étude comparative entre le **princeps** et le **générique** de la **Lidocaïne** ne montre pas de **différence significative** [88].



---

# DISCUSSION

---



### III. DISCUSSION DES RESULTATS

Le contrôle qualité de la **Lidocaïne princeps** et **générique** a été assuré par une évaluation de l'activité pharmacologique par des tests pharmacodynamiques in vivo ainsi qu'une évaluation de la sécurité par l'essai des endotoxines bactériennes et la toxicité anormale.

Les deux anesthésiques locaux utilisés dans cette étude sont la **Lidocaïne princeps** et la **Lidocaïne générique** en solution injectable sans conservateurs.

Tout d'abord nous avons procédé à la détection et à la quantification des endotoxines des bactéries Gram négatif par le LAL test puis nous nous sommes assurée de l'absence d'une toxicité surajoutée par les conditions de fabrication, de conditionnement ou de stockage du médicament par l'essai de toxicité anormale, c'est ainsi que nous avons bouclé l'évaluation de la toxicité de nos produits.

Par la suite nous sommes passées à l'évaluation de l'activité de nos deux molécules par le test du rayon chauffant sur la queue de la souris et le réflexe cornéen chez le lapin, nous avons étudié le délai de réaction ainsi que la durée d'anesthésie des différentes concentrations de la **Lidocaïne princeps** et **générique** sur deux espèces animales : les lapins albinos néo-zélandais et les souris albinos souche NMRI.

Les résultats obtenus ont fait l'objet d'une analyse statistique dans le but d'étudier la relation dose-réponse (durée d'action de l'anesthésie) par le test de linéarité et le test de la pente.

Enfin les réponses maximales observés chez les deux espèces ont été comparés.

#### 1. Evaluation de la toxicité de la **Lidocaïne princeps** et **générique**

##### 1.1. Essai de la toxicité anormale

Nous avons effectué ce test sur un groupe de 10 souris de laboratoire, dans le but de confirmer l'innocuité de nos produits : la **Lidocaïne princeps** et la **Lidocaïne générique** en solution injectable sans conservateurs.

Après injection d'un volume donné de notre produit à tester à dose maximale efficace par voie sous cutanée pour chaque souris et après 24h d'observation les souris n'ont pas présenté de signes de morbidité ni de mortalité pour les deux molécules, ce qui confirme que nos

produits ne présentent pas de toxicité surajoutée à la dose maximale efficace non toxique utilisée chez l'homme et ils ne présentent aucun risque pour le patient à cette dose.

## 1.2. Le test de Limulus « LAL test »

D'après la Pharmacopée l'avantage de cette méthode est sa simplicité, la décision de déclarer le résultat de l'essai positif ou négatif reposant sur la présence ou l'absence de gélification, visible à l'œil nu [89].

Pour notre présente étude la qualification initiale est **valide**. Notre sensibilité expérimentale ( $\lambda_{\text{exp}}$ ) est bien encadrée :  $\lambda/2 \leq \lambda_{\text{exp}} \leq 2\lambda$

$$0,015 \text{ EU/ml} \leq 0,03 \text{ EU/ml} \leq 0,06 \text{ EU/ml}$$

Après la validation des 5M, Matériel, Méthode, Matière, Milieu et Manipulateur nous avons effectué le test sur nos deux produits : **Lidocaïne princeps et générique** sous forme de solution injectable sans conservateur : nos deux produits ont donné un **résultat négatif** : pas de formation de gel au fond du tube.

La **Lidocaïne** sous forme de solution injectable pour le princeps et le générique est **conforme**.

### → Avantages du test

- On a juste besoin d'une petite quantité d'échantillon pour le test LAL ;
- Plusieurs échantillons peuvent être testés le même jour ;
- Un seul manipulateur peut mener à bien le test ;
- Le test LAL est économique ;
- Un faible niveau d'endotoxines peut être mieux détecté avec le test LAL qu'avec l'essai des pyrogènes sur le lapin ;
- Le test est standardisé ;
- Les données pour l'évaluation finale du test peuvent être obtenues rapidement.

### → Limites du test

- L'utilisation d'un matériel précis ;
- Le LAL test permet uniquement la recherche d'endotoxines bactériennes et ne pourrait pas être utilisé pour la recherche d'autres agents pyrogènes.

- La moindre interférence peut influencer sur le résultat du test [89, 90].

## 2. Evaluation de l'activité de la Lidocaïne princeps et générique

### 2.1. Etude de l'anesthésie de conduction chez la souris (test de la queue de souris)

L'utilisation de modèles murins in vivo est particulièrement attrayante en raison de leur petite taille et de leur facilité d'utilisation et de manipulation. Le modèle utilisant les souris évalue principalement les caractéristiques de la conduction provoquée par les anesthésiques locaux [91].

Nous avons utilisé le test de la queue de la souris pour quantifier la durée du bloc de conduction induit par l'anesthésie locale. La durée de l'anesthésie est représentée par le temps pour lequel la réaction des souris est obtenue après 12 secondes, en utilisant la réponse de l'impulsion de la queue suite à la stimulation thermique comme indicateur de la fin de l'action anesthésique.

L'injection d'anesthésique local a été faite sur les côtés opposés de la base de la queue. Nous avons testé trois concentrations différentes de la **Lidocaïne princeps** et **générique** (1.5 mg/ml, 1.2 mg/ml, 0.96 mg/ml).

La méthode d'essai pourrait faire une distinction entre la durée de l'anesthésie des diverses concentrations anesthésiques locales utilisées :

- Pour la concentration de 1.5 mg/ml, la durée du bloc sensoriel a été de 140 min pour la **Lidocaïne princeps** et **générique** ;
- Pour la concentration de 1.2 mg/ml, la durée du bloc sensoriel a été de 110 min pour la **Lidocaïne princeps** et de 90 min pour la **Lidocaïne générique** ;
- Pour la concentration de 0.96 mg/ml, la durée du bloc sensoriel a été de 80 min pour la **Lidocaïne princeps** et de 60 min pour la **Lidocaïne générique**.

Ce test a permis la mise en évidence de l'action anesthésique de la **Lidocaïne princeps** et de la **Lidocaïne générique**, se manifestant par une diminution de la sensibilité thermique de l'animal.

Le test de linéarité a révélé l'absence de l'écart à la linéarité des courbes doses- durées (les pentes sont significativement différentes de zéro) pour les deux molécules.

Les anesthésiques locaux peuvent être comparés pour deux propriétés: concentration efficace et durée de l'effet. Ces deux propriétés peuvent être, et sont souvent en pratique, liées [92].

En effet, la **Lidocaïne princeps** s'est révélée plus puissante aux doses moyennes et faibles, alors qu'aux doses élevées, leurs activités étaient équivalentes.

Toutefois, on ne peut toujours pas dire quel produit possède l'activité la plus élevée, aux doses utilisées, par la simple interprétation des résultats.

L'utilisation d'un nombre plus élevé d'animaux augmentera la puissance statistique du test et permettrait de conclure la différence entre les actions de ces deux anesthésiques locaux.

#### → **Avantages du test**

- Le test du rayon chauffant sur la queue de la souris est une méthode simple et fiable pour évaluer le bloc de conduction anesthésique local [91] ;
- Ce test a une réelle valeur qualitative car il révèle immédiatement si une substance agit ou non dans le corps vivant.

#### → **Limites du test**

- Le petit volume de médicament qui peut être administré à la racine de la queue ;
- Cette méthode n'est pas idéale pour les médicaments dont la solubilité est faible et/ou de faible puissance ;
- Différentes parties de la queue sont plus ou moins sensibles aux stimuli, la base étant la plus sensible et l'extrémité la moins sensible [91].

## **2.2. Etude de l'anesthésie de surface : Le réflexe cornéen chez le lapin**

L'une des méthodes les plus couramment utilisées pour évaluer l'anesthésie locale dans les laboratoires est l'inhibition du réflexe cornéen par application topique de médicaments dans l'œil du lapin. Il est généralement reconnu que l'action d'un anesthésique local, comme celle de nombreux autres médicaments, implique souvent la pénétration d'une interface biologique, et les conditions d'étude semblent particulièrement favorables dans la cornée.

La cornée, est le site idéal pour la mesure de l'action anesthésique superficielle, car elle est exempte de cellules sensorielles spéciales, les terminaisons nerveuses sont libres, non gainées et incrustées dans les couches de la cornée, le médicament a donc une seule membrane

uniforme à pénétrer, après quoi il est en contact direct avec les fibres nerveuses sensorielles [72].

Après l'instillation de l'anesthésique local à des concentrations qui ont induit toute la gamme de réponse. On constate que l'effet est induit deux minutes après l'application de la **Lidocaïne princeps** et **générique**.

La méthode d'essai pourrait faire une distinction entre la durée d'anesthésie des diverses concentrations anesthésiques locales utilisées :

- Pour la concentration de 20 mg/ml, la durée du bloc a été de 33 min pour la **Lidocaïne princeps** et 30 min pour la **Lidocaïne générique** ;
- Pour la concentration de 16 mg/ml, la durée du bloc a été de 20 min pour la **Lidocaïne princeps** et de 18 min pour la **Lidocaïne générique** ;
- Pour la concentration de 12.8 mg/ml, la durée du bloc a été de 12 min pour la **Lidocaïne princeps** et **générique**.

Le test de linéarité a révélé l'absence de l'écart à la linéarité des courbes doses- durées (les pentes sont significativement différentes de zéro) pour les deux molécules.

L'augmentation du nombre d'attouchements nécessaires pour déclencher le clignement des yeux des lapins ayant reçu la **Lidocaïne princeps** ou la **Lidocaïne générique** s'explique par l'activité anesthésique de ces molécules, et se manifeste par l'abolition du réflexe cornéen du lapin.

Ce test a permis la mise en évidence d'une action plus marquée avec la **Lidocaïne princeps** comparée à celle de la **Lidocaïne générique** se manifestant par une abolition plus durable du réflexe cornéen du lapin.

Toutefois, on ne peut toujours pas dire quel produit possède l'activité la plus élevée, aux doses utilisées, par la simple interprétation des résultats.

L'utilisation d'un nombre plus élevé d'animaux augmentera la puissance statistique du test et permettrait de conclure la différence entre les actions de ces deux anesthésiques locaux.

#### → **Avantages du test**

- L'application d'anesthésiques à l'œil est un cas typique d'anesthésie de surface. Il implique, non seulement l'action sur les éléments nerveux, mais aussi sur les facteurs de

pénétration à travers la muqueuse ; le sac conjonctival est exceptionnellement bien arrangé pour maintenir la solution en contact avec la muqueuse ;

- Le réflexe du clin d'œil fournit un simple critère objectif de sensation.
- La méthode est également attrayante parce que ses résultats peuvent être transférés directement à la pratique clinique [87] ;
- Ce test a une réelle valeur qualitative car il révèle immédiatement si une substance agit ou non dans le corps vivant ;
- L'application d'anesthésiques à la cornée est une méthode satisfaisante pour comparer leur efficacité en tant qu'anesthésiques de surface [92].

→ **Limites du test**

- Durée de contact de la solution anesthésique locale [84] ;
- Il y a des variations individuelles marquées chez les lapins, en effet, il y a des lapins qui tolèrent la stimulation en l'absence d'anesthésie, alors que d'autres, habituellement ceux qui résistent à la manipulation, clignent prématurément [84].



---

# CONCLUSION

---



### CONCLUSION GENERALE ET RECOMMANDATION

Ce travail de fin d'étude a été une étape essentielle dans notre parcours de formation, il nous a permis de découvrir le monde professionnel, et d'acquérir une vision réelle du fonctionnement d'une entreprise pharmaceutique et notamment du secteur de contrôle qualité des produits pharmaceutiques.

Nous nous sommes intégrées avec l'équipe du LNCPP afin d'effectuer notre contrôle pharmaco-toxicologique que l'on a appliqué sur le **princeps** et sur le **générique** de la **Lidocaïne** en solution injectable sans conservateurs.

Ce travail nous a permis de :

- Avoir un aperçu sur l'état du contrôle des produits pharmaceutiques en Algérie et le rôle important du LNCPP dans cette tâche ;
- D'améliorer nos connaissances réglementaires et techniques en matière de contrôle qualité du produit pharmaceutique ;
- D'améliorer l'expérience expérimentale et l'application sur les animaux du laboratoire ;
- Mise en pratique de quelques méthodes approuvées du contrôle toxicologique ainsi que deux méthodes d'évaluation de l'activité anesthésique locale de la **Lidocaïne** ;
- Etablir une étude comparative entre l'activité anesthésique locale d'un **générique** avec son **princeps**.

Cette étude nous a permis d'effectuer un contrôle toxicologique qui permet de s'assurer de l'innocuité des produits pharmaceutiques, le **princeps** et le **générique** de la **Lidocaïne** ont présenté une conformité par rapport à l'essai de recherche des endotoxines bactériennes « LAL test » et l'essai de la toxicité anormale

Toutefois Lors de sa 159<sup>ème</sup> session, qui s'est déroulée à Strasbourg les 21-22 novembre 2017, la Commission européenne de Pharmacopée a entériné la suppression totale de l'essai de toxicité anormale dans la Pharmacopée Européenne.

En effet, cet essai, à l'origine conçu pour détecter la présence de contaminants externes dans les produits biologiques, a peu à peu perdu de sa pertinence en raison de la mise en place des bonnes pratiques de laboratoire (BPL), des bonnes pratiques de fabrication (BPF) et de

## CONCLUSION GENERALE ET RECOMMANDATION

---

l'assurance qualité (AQ). Les données scientifiques actuelles indiquent que, compte tenu de son utilité contestable, l'essai pourrait être supprimé sans que l'innocuité des médicaments biologiques en soit compromise[93].

Concernant le contrôle pharmacologique il nous a permis de mettre en évidence l'efficacité de l'action anesthésique de la **Lidocaïne princeps** et **générique**. Cette action s'est manifestée par une analgésie avec diminution de la sensibilité à la chaleur (test de la queue de souris), ainsi qu'une abolition du réflexe cornéen chez le lapin.

Nous avons pu démontrer une variation dose-dépendante de la durée d'anesthésie avec les deux médicaments. Néanmoins, ces tests n'ont pas permis la mise en évidence d'écart de la durée entre les deux molécules.

La durée d'action de la **Lidocaïne princeps** s'est avérée légèrement plus élevée que la **Lidocaïne générique** dans le test du réflexe cornéen chez le lapin ainsi que dans le test du rayon chauffant chez la souris, cependant cette durée est proche de la durée de la **Lidocaïne princeps**.

Le but ne se limite pas à juger la conformité ou non des produits testés, mais essentiellement de décrire les différentes méthodes de contrôle de la sécurité et de l'évaluation de l'efficacité des anesthésiques locaux.

L'expérimentation animale est la principale source de progrès dans les disciplines médicales, elle reste de nos jours, absolument indispensable à l'amélioration des traitements anticancéreux, à la compréhension des maladies neuropsychiatriques ainsi que des techniques de greffe[94]. Cependant l'expérimentation animale présente plusieurs contraintes :

- La limite de la transposition à l'homme des résultats expérimentaux obtenus chez l'animal ;
- Le nombre élevé d'animaux sacrifiés pour un faible taux de retombées scientifiques (screening) ;
- Les contraintes techniques et économiques ;
- La souffrance infligée aux animaux lors de l'expérimentation[95].

De ce fait des méthodes alternatives à l'utilisation animale ont été introduites en expérimentation, celles-ci ont permis de diminuer voire remplacer le recours à l'animal. Parmi ces méthodes nous citons :

### ➤ **Méthodes In Vitro**

- Organe Isolé ou partie d'organe (Méthodes Ex Vivo)
- Méthode In Ovo, Ex : HET-CAM
- Culture Cellulaire
- Méthodes biochimiques et Polymériques
- Méthodes physico-chimiques, Ex : Chromatographique
- Méthodes immunochimiques

### ➤ **Méthodes In Silico** : Méthodes bio-informatiques utilisant la base de données des essais In Vivo et In Vitro, Ex : QSAR (voir annexe XV).

Ces méthodes se basent sur le principe des trois R qui constitue un fondement de la démarche éthique liée à l'expérimentation animale.

- Raffinement (limitation de la douleur et du stress) ;
- Réduction (utilisation du minimum d'animaux sans qu'il y ait une perte d'information utile) ;
- Remplacement (obligation d'utilisation d'autres méthodes dites "alternatives" quand cela s'avère possible: cellules cultivées in vitro, organes ou tissus maintenus en survie ex vivo, modèles informatiques de prédiction in silico) [96].

Les principes éthiques structurés par les « 3R » servent de base à la Directive 2010/63/UE du 22 septembre 2010 sur la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques.

Néanmoins, l'adoption de méthodes alternatives est un problème à la fois scientifique et juridique, en effet, pour pouvoir être pris en compte, ces tests doivent avoir été validés par un organisme de référence, par exemple le Centre Européen pour la Validation de Méthodes Alternatives (ECVAM) et avoir reçu une acceptation réglementaire (les « lignes directrices » de l'OCDE recensent les tests reconnus à l'échelle internationale) [97].



---

# REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE

---



## REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE

- [1] S.Boughara. Analyse du cycle de vie environnemental des médicaments.
- [2] Le Hir A. *Pharmacie galénique: bonnes pratiques de fabrication des médicaments*. 8. éd, révisée et augmentée. Paris: Masson, 2001.
- [3] valerie RODDIER, Michèle TORRES, Annie SOUKOFF. Histoire de l'anesthésie. 2010.
- [4] Sébastien FAURE. Actualités pharmaceutiques. 2015, 2015, p. 53.
- [5] Samii K, Senard J-M. CHAPITRE 13 ANESTHESIE LOCALE, LOCO-REGIONALE ET GENERALE. 2010; 14.
- [6] Marc TALBERT, Gérard WILLOQUET, Roselyne GERVAIS. *Guide Pharmaco Clinique*. GROUPE LIAISONS, 2009.
- [7] Saïd ZABI. *Modélisation et commande de l'anesthésie en milieu clinique*. l'Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier), 2016.
- [8] Bertrand MD, Jean-Louis MP, Pascal MF, et al. *ANESTHESIE LOCOREGIONALE CHEZ LES CARNIVORES DOMESTIQUES : HISTORIQUE, ACTUALITES ET PERSPECTIVES*. ÉCOLE NATIONALE VETERINAIRE D'ALFORT, 2006.
- [9] THURMAN JC, TRANQUILLI WJ, BENSON GJ,. *Local and Regional Anesthetic and Analgesic Techniques: Dogs*. 3 ème édition. Lumb and Jone's Veterinary Anesthesia, 1996.
- [8] TRONCY E, DISS N, COUPAT P, CUVELLIEZ S, GENEVOIS JP. Anesthésie locorégionale chez les carnivores domestiques. *Point Vét* 1999; 30: 437–450.
- [11] Local and Regional Anesthesia and Analgesia. *Semin Vet Med Surg* 1997; 12: 94–104.
- [12] TORSKE KE, DYSON DH. Epidural Analgesia and Anesthesia. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*; 30: 839–857.
- [13] L'anesthésie de l'Antiquité jusqu'à la Renaissance. *anesthesie-tpe.forumactif.org*, <http://anesthesie-tpe.forumactif.org/f1-l-anesthesie-de-l-antiquite-jusqu-a-la-rennaissance> (accessed 23 March 2018).
- [14] Syllabus d'anesthésie - réanimation. *Inst Supér Tech Médicales En Répub Démocr Congo* 2004; 2: 14.
- [15] Ruetsch, Y.A., T. Boni, and A. Borgeat. From cocaine to ropivacaine: the history of local anesthetic drugs. *Curr Top Med Chem* 2001; 1: 82–175.
- [16] Hall, M. 'Coca koller'. The beginning of local anesthesia. *Anesth Prog* 1972; 19: 65–7.
- [17] Denson DD, Mazoit JX. Acute pain mechanisms and management. In: *Physiology and pharmacology of local anesthetics*. Sinatara RS, 1992, pp. 124–39.
- [18] Gordh T. Lidocaine: the origin of a modern local anesthetic. 1949. *Anesthesiology* 2010; 113: 1433–1437.

- [19] Y. COHEN, C. JACQUOT. *ABREGES Pharmacologie*. 6 ème édition. ELSEVIER MASSON, 2008.
- [20] P.Duvaldestin. ANESTHESIQUES LOCAUX. In: *Pharmacologie en pratique anesthesiologique*. MASSON, 1986, pp. P131-132.
- [21] \*Anesthésiques locaux : Les points essentiels. *Le Collège National de Pharmacologie Médicale*, <https://pharmacomedicale.org/medicaments/par-specialites/item/42-2> (accessed 23 March 2018).
- [22] Randa Hilal-Dandan, Laurence L. Brunton. local anesthetics. In: *Goodman and Gilman's Manual of Pharmacology and Therapeutics*. McGraw-Hill Medical, 2014.
- [23] Pr J. Taoufik. *Précis de chimie thérapeutique*. Médika, 2007.
- [24] C. Loichot, M. Grima. Introduction à la pharmacocinétique – passages transmembranaires, [http://udsmed.u-strasbg.fr/pharmaco/pdf/DCEM1\\_Pharmacologie](http://udsmed.u-strasbg.fr/pharmaco/pdf/DCEM1_Pharmacologie) (2004).
- [25] Francis BONNET, Nadège LEMBERT, Anne SALENGRO. Anesthésiologie. In: *livre de l'interne : anesthesiologie*. LAVOISIER MSP, 2012, p. 265.
- [26] Michel VAUBOURDOULE. *Médicaments Pharmacie – Biologie*. 3 ème édition. Le Moniteur INTERNAT, 2007.
- [27] Beloeil H, Mazoit J.-X. Pharmacologie des anesthésiques locaux. Epub ahead of print 2010. DOI: 10.1016/S0246-0289(10)44745-3.
- [28] Francis BONNET, Nadège LEMBERT, Anne SALENGRO. Anesthésiologie. In: *livre de l'interne : anesthesiologie*. LAVOISIER MSP, 2012, pp. 131–132.
- [29] Nau C, Strichartz GR. Drug chirality in anesthesia. In: *Anesthesiology*. 2002.
- [30] Francis BONNET, Nadège LEMBERT, Anne SALENGRO. Anesthésiologie. In: *livre de l'interne : anesthesiologie*. LAVOISIER MSP, 2012, p. 266.
- [31] Georges Mathé, Gaston Meyniel, Jean-Paul Giroud. *Pharmacologie clinique bases de la thérapeutique*. 2nd ed. Expansion scientifique française, <https://doi.org/10.1177/096032718900800523> (1988).
- [32] Régis FUZIER. *thèse effets indésirables des anesthésiques locaux en 2008 : étude pharmaco-épidémiologique 2009*. Pharmacologie, Toulouse III- Paul Sabatier, 2009.
- [33] Philippe Duvaldestin. *Pharmacologie en pratique anesthésique*. 2 ème édition. Masson, 1989.
- [34] PULCINI DA. PHARMACOLOGIE DES ANESTHESIQUES LOCAUX. 51.
- [35] GABRIEL KL. *The Action and Toxicity of Local Anaesthetic Agents*. Baltimore : Williams & Wilkins. In : SOMA LR: Textbook of Veterinary Anesthesia, 1977.
- [36] Brochu RM. Block of peripheral nerve sodium channels selectively inhibits features of neuropathic pain in rats. *Mol Pharmacol*. Epub ahead of print 21 November 2005. DOI: 10.1124/mol.105.018127.

- [37] Huet O, Eyrolle LJ, Mazoit JX, et al. Cardiac arrest after injection of ropivacaine for posterior lumbar plexus blockade. *J Am Soc Anesthesiol* 2003; 99: 1451–1453.
- [38] Stewart J, Kellett N, Castro D. The central nervous system and cardiovascular effects of levobupivacaine and ropivacaine in healthy volunteers. *Anesth Analg* 2003; 97: 412–416, table of contents.
- [39] Sanchez V, Arthur GR, Strichartz GR. Fundamental properties of local anesthetics. I. The dependence of lidocaine's ionization and octanol:buffer partitioning on solvent and temperature. *Anesth Analg* 1987; 66: 159–165.
- [40] Tranquilli WJ, Thurmon JC, Grimm KA, et al. (eds). *Lumb & Jones' veterinary anesthesia and analgesia*. 4th ed. Ames, Iowa: Blackwell Pub, 2007.
- [41] Courtney KR. Mechanism of frequency-dependent inhibition of sodium currents in frog myelinated nerve by the lidocaine derivative GEA. *J Pharmacol Exp Ther* 1975; 195: 225–236.
- [42] Covino BG. Pharmacology of local anaesthetic agents. *Br J Anaesth* 1986; 58: 701–716.
- [43] Fischer C, Blanié P, Jaouën E, et al. Ropivacaine, 0.1%, Plus Sufentanil, 0.5 µg/ml, versus Bupivacaine, 0.1%, Plus Sufentanil, 0.5 µg/ml, Using Patient-controlled Epidural Analgesia for Labor A Double-blind Comparison. *Anesthesiol J Am Soc Anesthesiol* 2000; 92: 1588–1593.
- [44] C Bernard. *étude expérimentale de l'intérêt de l'anesthésie locale dans la castration du cheval sous anesthésie générale*. ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE LYON, 2005.
- [45] Verborgh C, Claeys MA, Camu F. Onset of epidural blockade after plain or alkalinized 0.5% bupivacaine. *Anesth Analg* 1991; 73: 401–404.
- [46] Chassard D, Berrada K, Boulétreau P. Alcalinisation des anesthésiques locaux: théoriquement justifiée mais inutile cliniquement. *Can J Anaesth* 1996; 43: 384–393.
- [47] André Muller, Pierre Gauthier-Lafaye, Elisabeth Gaertner. *Anesthésie locorégionale et traitement de la douleur*. 4<sup>ème</sup> édition. Elsevier Masson.
- [48] Marc TALBERT, Gérard WILLOQUET, Roselyne GERVAIS. *Pharmacoclinique*. 8<sup>ème</sup> édition. Le Moniteur INTERNAT, 2009.
- [49] KARMAN Samii. *Traité d'Anesthésie et de Réanimation*. 4<sup>ème</sup> édition. LAVOISIER MSP, 2014.
- [50] Lidocaine. *Dictionnaires et Encyclopédies sur 'Academic'*, <http://fracademic.com/dic.nsf/frwiki/1022117> (accessed 23 March 2018).
- [51] Pubchem. Lidocaine, M(desethyl-), AC, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6429759> (accessed 3 July 2018).
- [52] Conseil de l'Europe. *Pharmacopée européenne: publiée selon la Convention relative à l'élaboration d'une pharmacopée européenne*. Strasbourg: Conseil de l'Europe, 2007.
- [53] LIDOCAINE AGUETTANT S/C - Lidocaïne - Posologie, Effets secondaires, Grossesse - Doctissimo, <http://www.doctissimo.fr/medicament-LIDOCAINE-AGUETTANT-S-C.htm>.

- [54] Fiches modèles OMS d'information à l'usage des prescripteurs: Médicaments utilisés en anesthésie: Anesthésiques locaux: Lidocaïne, <http://apps.who.int/medicinedocs/fr/d/Jh2962f/5.2.html>.
- [55] Vital Durand D, Le Jeune C, Dorosz P. *Guide pratique des médicaments Dorosz*. Paris: Maloine, 2010.
- [56] VIDAL - Fiches médicaments.
- [57] Deglin JH, Vallerand AH, Archambault N, et al. *Guide des médicaments*. 2<sup>ème</sup> édition. Montréal: Éditions du Renouveau pédagogique (ERPI), 2003.
- [58] India, Indian Pharmacopoeia Commission (eds). BIOLOGICALMETHODS : AbnormalToxicity. In: *Indian pharmacopoeia, 2010*. Ghaziabad: Indian Pharmacopoeia Commission, 2010, p. 53.
- [59] Classe Merostomata (Mérostomes) : description et ordres, <https://www.aquaportail.com/taxonomie-classe-34-merostomata.html> (accessed 3 July 2018).
- [60] Chaby R. *Des endotoxines aux lipopolysaccharides structures, activités cellulaires et effets physiopathologiques*. Paris: Éd. Tec & Doc : Lavoisier, 2010.
- [61] India, Indian Pharmacopoeia Commission (eds). BIOLOGICALMETHODS :Bacterial Endotoxins. In: *Indian pharmacopoeia, 2010*. Ghaziabad: Indian Pharmacopoeia Commission, 2010, pp. 54–59.
- [62] India, Indian Pharmacopoeia Commission (eds). BIOLOGICALMETHODS :Pyrogens. In: *Indian pharmacopoeia, 2010*. Ghaziabad: Indian Pharmacopoeia Commission, 2010, pp. 62–63.
- [63] Dr.O.BENAMARA. *Techniques de contrôle pharmaco-toxicologique des produits pharmaceutiques*. LNCPP, 2000.
- [64] Krystyna Leszczynska, Sen T. Kau. A Sciatic Nerve Blockade Method to Differentiate Drug-Induced Local Anesthesia From Neuromuscular Blockade in Mice. *JPM* 1992; 27: 83–93.
- [65] Vogel HG. Drug discovery and evaluation pharmacological assays.
- [66] Adams HJ, Kronberg GH, Takman BH. Local Anesthetic Activity and Acute Toxicity of (±) –2-(N-Ethylpropylamino) –2',6'-butyroxylidide, a New Long-Acting Agent. *J Pharm Sci* 1972; 61: 1829–1831.
- [67] Paul D. Thut, Richard L. Wynn, Conrad T. Cordes, et al. A Rabbit Tooth-Pulp Assay to Quantify Efficacy and Duration of Antinociception by Local Anesthetics Infiltrated Into Maxillary Tissues. *August 1995* 1995; 33: 230–236.
- [68] A. ASTROM, N. H. PERSSON. SOME PHARMACOLOGICAL PROPERTIES OF o-METHYL-a-PROPYLAMINOPROPIONANILIDE, A NEW LOCAL ANAESTHETIC. *1961*, 1960.
- [69] Luduena FP, Hoppe JO. 2-Phenyl-4-Thiazolidone Derivatives as Local Anesthetics. *J Am Pharm Assoc Sci Ed* 1951; 40: 132–137.
- [70] American National Research Council Committee on Animal, Models for Research and Aging. *Définition du Modèle animal*.

- [71] ARAAR Asma encadré par Pr. CHADER Henni. Le modèle animal expérimental en pharmacotoxicologie.
- [72] Procédure interne du Laboratoire National de Contrôle des Produits Pharmaceutiques.
- [73] WHO. *Procurement of vaccine for public sector programmes*. Technical Report Series N°872, 1999.
- [74] Blechová R, Pivodová D. Limulus Amoebocyte Lysate (LAL) Test - An Alternative Method for Detection of Bacterial Endotoxins. *Acta Vet Brno* 2001; 70: 291–296.
- [75] Joiner Timothy J, Kraus Paul F, Kupiec Thomas C. Comparison of endotoxin testing methods for pharmaceutical products. *International journal of pharmaceutical compounding*, December 2002, pp. 408–409.
- [76] Sylvie Gaymard. 15ème congrès d’A3P Biarritz.
- [77] Pradeau D, Association de Pharmacie Hospitalière de l’Île-de France (eds). Recherche et dosage des endotoxines bactériennes par le lysat d’amoebocytes. In: *L’analyse pratique du médicament*. Cachan: Éd. Médicales Internationales, 1992, pp. 803–811.
- [78] RINJARD P, GAILLANDRE A, GALLET F. Le test LAL : guide pour l’essai des endotoxines bactériennes - Rapport d’une commission SFSTP. *STP PHARMA Prat Tech REGLEMENTATIONS* 1994; 4: 233–264.
- [79] CCAC - Canadian Council on Animal Care: Guidelines, <https://www.ccac.ca/en/standards/guidelines/> (accessed 7 June 2018).
- [80] FLATT, R.E., WEISBROTH, S.H. and KRAUS, A.L. Metabolic, Traumatic, Mycotic and Miscellaneous Diseases. In: *The Biology of the Laboratory Rabbit*. New York: Elsevier, 1994, pp. 435–451.
- [81] study the effect of local anaesthetics on rabbit cornea. *Scribd*, <https://www.scribd.com/doc/73807316/stud%C5%B8-the-effect-of-local-anaesthetics-on-rabbit-cornea> (accessed 5 April 2018).
- [82] Boucher S, Nouaille L. *Maladies des lapins*. Paris: Groupe France agricole, 2002.
- [83] Geddes IC. STUDIES WITH LOCAL ANAESTHETICS: A Review of the Literature concerning the methods of comparing Local Anaesthetica Properties. *Br J Anaesth* 1955; 27: 609–615.
- [84] M. R. A. CHANCE, H. LOBSTEIN. THE VALUE OF THE GUINEA-PIG CORNEAL REFLEX FOR TESTS OF SURFACE ANAESTHESIA. *June 1, 1944*.
- [85] PETER A. YOUNG. THE DURATION OF COCAINE ANAESTHESIA IN THE RABBIT CORNEA. A STATISTICAL EXAMINATION.
- [86] Caliendo G, Fiorino F, Grieco P, et al. Preparation and local anaesthetic activity of benzotriazinone and benzoyltriazole derivatives. *Eur J Med Chem* 1999; 34: 1043–1051.
- [87] TORALD SOLLMANN. COMPARISON OF ACTIVITY OF LOCAL ANESTHETICS’ IV. ANESTHESIA OF RABBIT’S CORNEA. *Novemb 8 1917*.

- [88] Bouyer J. *Méthodes statistiques: médecine - biologie*. Paris: Estem, 2008.
- [89] Council of Europe. Essai des endotoxines bactériennes. In: *Pharmacopée européenne: addendum 2001*. Strasbourg [France: Conseil de l'Europe, 2001, pp. 24–38.
- [90] Council of Europe. Essai des endotoxines bactériennes. In: *Pharmacopée européenne: addendum 1999*. Strasbourg [France: Conseil de l'Europe, 1999, pp. 43–51.
- [91] Gilbert J. Grant, Boris Piskoun, Mylarrao Bansinath, et al. An in vivo method for the quantitative evaluation of local anesthetics. *6 April 2000* 2000; 43: 69± 72.
- [92] Alfonso CG. *Anestesia local en veterinaria*. Real Academia Nac. Medicina, 1947.
- [93] Suppression de l'essai de toxicité anormale dans la Pharmacopée Européenne | EDQM - Direction européenne de la qualité du médicament, <https://www.edqm.eu/fr/actualites/suppression-de-lessai-de-toxicite-anormale-dans-pharmacopee-europeenne> (accessed 25 January 2018).
- [94] L'expérimentation animale, un mal nécessaire. *La Croix*, 3 September 2012, /Ethique/Sciences-Ethique/Sciences/L-experimentation-animale-un-mal-necessaire-\_NP\_-2012-09-03-849165 (3 September 2012, accessed 6 April 2018).
- [95] CHADER DH, Slimane PMB. Contribution de la Pharmaco-Toxicologie cellulaire dans le développement et le contrôle de la qualité des médicaments. 39.
- [96] Libre.be L. L'expérimentation animale reste indispensable (OPINION), <http://www.lalibre.be/debats/opinions/l-experimentation-animale-reste-indispensable-opinion-5a145787cd70fa5a065712cd> (accessed 6 April 2018).
- [97] cours de residanat. Les méthodes alternatives à l'expérimentation animale en pharmacotoxicologie.



---

# ANNEXES

---



**ANNEXE I: Résultats du 1<sup>er</sup> lot recevant 1.5 mg/ml de lidocaïne princeps**

<b>Lot N°1</b>															
<b>Temps</b>	T0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140
<b>Souris 1</b>	06	39	33	28	38	24	42	<u>52</u>	28	32	28	30	18	28	06
<b>Souris 2</b>	06	31	21	29	24	25	27	39	31	37	<u>46</u>	21	20	22	06
<b>Souris 3</b>	04	<u>43</u>	28	25	27	34	16	28	36	39	33	20	25	18	05
<b>Souris 4</b>	06	29	19	28	23	38	32	<u>41</u>	25	36	35	39	28	23	06
<b>Souris 5</b>	05	37	30	37	26	28	30	35	28	35	<u>39</u>	23	21	17	06
<b>Souris 6</b>	04	25	24	26	25	32	18	<u>49</u>	24	25	20	18	26	22	05
<b>Souris 7</b>	04	27	23	30	36	40	<u>50</u>	35	30	46	37	30	25	20	06
<b>Moyenne</b>	5	33	30	29	28.5	31.5	31	40	29	36	31	26	23	21.5	06

**ANNEXE II: Résultats du 2<sup>ème</sup> lot recevant 1.2 mg/ml de lidocaïne princeps**

<b>Lot N°2</b>															
<b>Temps</b>	<b>T0</b>	<b>10</b>	<b>20</b>	<b>30</b>	<b>40</b>	<b>50</b>	<b>60</b>	<b>70</b>	<b>80</b>	<b>90</b>	<b>100</b>	<b>110</b>	<b>120</b>	<b>130</b>	<b>140</b>
<b>Souris 1</b>	06	24	23	<u>34</u>	25	15	18	09	23	20	15	09	09	07	05
<b>Souris 2</b>	04	18	22	20	23	25	<u>31</u>	18	15	14	17	08	07	07	05
<b>Souris 3</b>	06	21	15	23	25	13	32	27	24	<u>35</u>	10	10	08	06	06
<b>Souris 4</b>	06	20	09	09	<u>30</u>	15	15	16	14	18	14	08	07	07	05
<b>Souris 5</b>	05	17	16	15	24	<u>31</u>	11	26	22	26	18	09	08	08	06
<b>Souris 6</b>	05	23	20	25	26	<u>38</u>	20	24	14	19	31	11	10	09	06
<b>Souris 7</b>	06	<u>29</u>	21	17	23	18	24	14	16	22	09	11	09	06	06
<b>Moyenne</b>	5.5	22	18	20.5	25	20	22	19	18	22	16	9.5	08	07	5.5

**ANNEXE III : Résultats du 3<sup>ème</sup> lot recevant 0.96 mg/ml de lidocaïne princeps**

<b>Lot N°3</b>															
<b>Temps</b>	<b>T0</b>	<b>10</b>	<b>20</b>	<b>30</b>	<b>40</b>	<b>50</b>	<b>60</b>	<b>70</b>	<b>80</b>	<b>90</b>	<b>100</b>	<b>110</b>	<b>120</b>	<b>130</b>	<b>140</b>
<b>Souris 1</b>	05	20	<u>25</u>	14	21	22	16	12	08	07	06	06	06	06	05
<b>Souris 2</b>	04	09	17	12	16	13	<u>18</u>	10	09	09	06	05	05	05	04
<b>Souris 3</b>	06	15	18	17	10	16	<u>21</u>	14	13	10	06	06	06	06	06
<b>Souris 4</b>	06	19	20	18	15	<u>22</u>	14	18	07	07	05	05	05	05	05
<b>Souris 5</b>	06	<u>22</u>	21	20	21	18	20	16	07	08	05	05	05	05	05
<b>Souris 6</b>	05	17	<u>21</u>	19	13	16	11	20	10	07	06	05	05	05	05
<b>Souris 7</b>	06	13	14	<u>24</u>	21	19	14	13	08	07	06	06	06	06	06
<b>Moyenne</b>	5	16.5	19.5	18	17	18	16	15	09	08	06	5.5	5.5	5.5	5

**ANNEXE IV : Résultats du 1<sup>er</sup> lot recevant 1.5 mg/ml de lidocaïne générique**

<b>Lot N°1</b>															
<b>Temps (min)</b>	<b>T0</b>	<b>10</b>	<b>20</b>	<b>30</b>	<b>40</b>	<b>50</b>	<b>60</b>	<b>70</b>	<b>80</b>	<b>90</b>	<b>100</b>	<b>110</b>	<b>120</b>	<b>130</b>	<b>140</b>
<b>Souris 1</b>	06	25	25	24	37	31	25	25	<u>39</u>	23	32	24	25	25	15
<b>Souris 2</b>	06	25	21	24	<u>40</u>	18	24	19	26	20	14	21	10	20	21
<b>Souris 3</b>	05	35	20	22	25	21	<u>49</u>	21	37	28	29	21	47	15	10
<b>Souris 4</b>	05	24	<u>42</u>	21	16	14	27	28	16	30	21	16	14	16	18
<b>Souris 5</b>	04	45	25	32	20	23	37	33	11	15	11	24	<u>34</u>	19	13
<b>Souris 6</b>	05	24	30	22	18	26	40	<u>42</u>	17	35	13	25	11	18	09
<b>Souris 7</b>	04	22	33	15	22	19	<u>48</u>	47	31	34	21	24	24	22	15
<b>Moyenne</b>	05	29	28	23	20	22	35.5	31	25	24	20	22	24	19	14.5

**ANNEXE V: Résultats du 2<sup>ème</sup> lot recevant 1.2 mg/ml de lidocaïne générique**

<b>Lot N°2</b>														
<b>Temps (min)</b>	<b>T0</b>	<b>10</b>	<b>20</b>	<b>30</b>	<b>40</b>	<b>50</b>	<b>60</b>	<b>70</b>	<b>80</b>	<b>90</b>	<b>100</b>	<b>110</b>	<b>120</b>	<b>140</b>
<b>Souris 1</b>	05	<u>30</u>	15	17	20	20	17	19	23	11	09	06	05	05
<b>Souris 2</b>	06	13	11	09	<u>27</u>	15	12	20	12	10	09	06	06	06
<b>Souris 3</b>	06	22	34	<u>29</u>	28	15	15	09	13	08	08	05	04	04
<b>Souris 4</b>	05	26	20	12	18	23	<u>30</u>	18	16	10	07	05	05	05
<b>Souris 5</b>	05	15	18	24	24	21	20	<u>24</u>	14	11	10	06	06	06
<b>Souris 6</b>	04	18	23	13	26	<u>31</u>	22	18	20	08	07	06	06	05
<b>Souris 7</b>	06	28	<u>29</u>	25	20	17	23	24	19	07	07	05	05	05
<b>Moyenne</b>	5	22	21	21.5	23	20	20	19	17	09	08	5.5	5	5

**ANNEXE VI : Résultats du 3<sup>ème</sup> lot recevant 0.96 mg/ml de lidocaïne générique**

<b>Lot N°3</b>														
<b>Temps (min)</b>	<b>T0</b>	<b>10</b>	<b>20</b>	<b>30</b>	<b>40</b>	<b>50</b>	<b>60</b>	<b>70</b>	<b>80</b>	<b>90</b>	<b>100</b>	<b>110</b>	<b>120</b>	<b>140</b>
<b>Souris 1</b>	06	20	<u>22</u>	16	14	18	11	10	06	06	06	06	05	05
<b>Souris 2</b>	06	<u>20</u>	18	18	17	18	11	09	06	06	06	04	04	04
<b>Souris 3</b>	04	18	19	20	<u>20</u>	14	08	07	05	05	05	04	04	04
<b>Souris 4</b>	06	16	<u>18</u>	14	15	13	10	08	06	06	06	06	06	06
<b>Souris 5</b>	05	15	20	15	16	<u>21</u>	12	10	06	06	04	04	04	04
<b>Souris 6</b>	04	13	<u>20</u>	18	09	09	06	06	05	05	05	05	05	05
<b>Souris 7</b>	04	12	15	11	<u>16</u>	13	09	06	05	05	04	04	04	04
<b>Moyenne</b>	03	16	18	16	15	15	10	08	5.5	5.5	5	4.5	4.5	4.5

**ANNEXE VII : Résultats du 1<sup>er</sup> lot recevant 20 mg/ml de lidocaïne princeps**

<b>Lot N°1</b>														
<b>Temps (min)</b>	T0	2.5	5	7.5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55
<b>Lapin 1</b>	01	100	90	44	38	20	17	08	06	03	01	01	01	01
<b>Lapin 2</b>	01	100	89	55	25	12	10	07	03	01	01	01	01	01
<b>Lapin 3</b>	01	100	100	100	100	90	100	77	23	04	01	01	01	01
<b>Lapin 4</b>	01	100	100	78	51	39	44	20	04	01	01	01	01	01
<b>Lapin 5</b>	01	100	100	66	57	40	39	22	09	01	01	01	01	01
<b>Lapin 6</b>	01	100	88	71	33	29	24	10	06	02	01	01	01	01

**ANNEXE VIII : Résultats du 2<sup>ème</sup> lot recevant 16 mg/ml de lidocaïne princeps**

<b>Lot N°2</b>														
<b>Temps (min)</b>	T0	2.5	5	7.5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55
<b>Lapin 1</b>	01	100	79	65	48	33	12	01	01	01	01	01	01	01
<b>Lapin 2</b>	01	100	96	88	57	30	04	03	01	01	01	01	01	01
<b>Lapin 3</b>	01	100	100	55	48	39	03	01	01	01	01	01	01	01
<b>Lapin 4</b>	01	72	100	100	34	04	02	01	01	01	01	01	01	01
<b>Lapin 5</b>	01	90	95	100	56	42	04	03	01	01	01	01	01	01
<b>Lapin 6</b>	01	100	100	100	44	25	03	01	01	01	01	01	01	01



**ANNEXE X : Résultats du 1<sup>er</sup> lot recevant 20 mg/ml de lidocaïne générique**

<b>Lot N°1</b>														
<b>Temps (min)</b>	T0	2.5	5	7.5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55
<b>Lapin 1</b>	01	100	66	40	32	19	11	07	01	01	01	01	01	01
<b>Lapin 2</b>	01	100	98	100	88	70	06	01	01	01	01	01	01	01
<b>Lapin 3</b>	01	28	50	100	70	40	34	12	08	02	01	01	01	01
<b>Lapin 4</b>	01	100	100	100	57	42	23	10	01	01	01	01	01	01
<b>Lapin 5</b>	01	34	54	100	76	22	15	12	03	01	01	01	01	01
<b>Lapin 6</b>	01	100	95	45	33	49	17	09	01	01	01	01	01	01





**ANNEXE XIII : Table de Student**

k	$\gamma$										
	0.25	0.20	0.15	0.10	0.05	0.025	0.010	0.005	0.0025	0.0010	0.0005
1	1.000	1.376	1.963	3.078	6.314	12.71	31.82	63.66	127.3	318.3	636.6
2	0.816	1.061	1.386	1.886	2.920	4.303	6.965	9.925	14.09	22.33	31.60
3	0.765	0.978	1.250	1.638	2.353	3.182	4.541	5.841	7.453	10.21	12.92
4	0.741	0.941	1.190	1.533	2.132	2.776	3.747	4.604	5.598	7.173	8.610
5	0.727	0.920	1.156	1.476	2.015	2.571	3.365	4.032	4.773	5.893	6.869
6	0.718	0.906	1.134	1.440	1.943	2.447	3.143	3.707	4.317	5.208	5.959
7	0.711	0.896	1.119	1.415	1.895	2.365	2.998	3.499	4.029	4.785	5.408
8	0.706	0.889	1.108	1.397	1.860	2.306	2.896	3.355	3.833	4.501	5.041
9	0.703	0.883	1.100	1.383	1.833	2.262	2.821	3.250	3.690	4.297	4.781
10	0.700	0.879	1.093	1.372	1.812	2.228	2.764	3.169	3.581	4.144	4.587
11	0.697	0.876	1.088	1.363	1.796	2.201	2.718	3.106	3.497	4.025	4.437
12	0.695	0.873	1.083	1.356	1.782	2.179	2.681	3.055	3.428	3.930	4.318
13	0.694	0.870	1.079	1.350	1.771	2.160	2.650	3.012	3.372	3.852	4.221
14	0.692	0.868	1.076	1.345	1.761	2.145	2.624	2.977	3.326	3.787	4.140
15	0.691	0.866	1.074	1.341	1.753	2.131	2.602	2.947	3.286	3.733	4.073
16	0.690	0.865	1.071	1.337	1.746	2.120	2.583	2.921	3.252	3.686	4.015
17	0.689	0.863	1.069	1.333	1.740	2.110	2.567	2.898	3.222	3.646	3.965
18	0.688	0.862	1.067	1.330	1.734	2.101	2.552	2.878	3.197	3.610	3.922
19	0.688	0.861	1.066	1.328	1.729	2.093	2.539	2.861	3.174	3.579	3.883
20	0.687	0.860	1.064	1.325	1.725	2.086	2.528	2.845	3.153	3.552	3.850
21	0.686	0.859	1.063	1.323	1.721	2.080	2.518	2.831	3.135	3.527	3.819
22	0.686	0.858	1.061	1.321	1.717	2.074	2.508	2.819	3.119	3.505	3.792
23	0.685	0.858	1.060	1.319	1.714	2.069	2.500	2.807	3.104	3.485	3.767
24	0.685	0.857	1.059	1.318	1.711	2.064	2.492	2.797	3.091	3.467	3.745
25	0.684	0.856	1.058	1.316	1.708	2.060	2.485	2.787	3.078	3.450	3.725
26	0.684	0.856	1.058	1.315	1.706	2.056	2.479	2.779	3.067	3.435	3.707
27	0.684	0.855	1.057	1.314	1.703	2.052	2.473	2.771	3.057	3.421	3.690
28	0.683	0.855	1.056	1.313	1.701	2.048	2.467	2.763	3.047	3.408	3.674
29	0.683	0.854	1.055	1.311	1.699	2.045	2.462	2.756	3.038	3.396	3.659
30	0.683	0.854	1.055	1.310	1.697	2.042	2.457	2.750	3.030	3.385	3.646
40	0.681	0.851	1.050	1.303	1.684	2.021	2.423	2.704	2.971	3.307	3.551
50	0.679	0.849	1.047	1.299	1.676	2.009	2.403	2.678	2.937	3.261	3.496
60	0.679	0.848	1.045	1.296	1.671	2.000	2.390	2.660	2.915	3.232	3.460
80	0.678	0.846	1.043	1.292	1.664	1.990	2.374	2.639	2.887	3.195	3.416
100	0.677	0.845	1.042	1.290	1.660	1.984	2.364	2.626	2.871	3.174	3.390
120	0.677	0.845	1.041	1.289	1.658	1.980	2.358	2.617	2.860	3.160	3.373
$\infty$	0.674	0.842	1.036	1.282	1.645	1.960	2.326	2.576	2.807	3.090	3.291

Nb :

- k degrés de liberté,
- quantiles d'ordre  $1-\gamma$

### ANNEXE XIV : Table de Fisher

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	161.4	199.5	215.7	224.6	230.2	234.0	236.8	238.9	240.5	241.9
2	18.51	19.00	19.16	19.25	19.30	19.33	19.35	19.37	19.38	19.40
3	10.13	9.552	9.277	9.117	9.013	8.941	8.887	8.845	8.812	8.786
4	7.709	6.944	6.591	6.388	6.256	6.163	6.094	6.041	5.999	5.964
5	6.608	5.786	5.409	5.192	5.050	4.950	4.876	4.818	4.772	4.735
6	5.987	5.143	4.757	4.534	4.387	4.284	4.207	4.147	4.099	4.060
7	5.591	4.737	4.347	4.120	3.972	3.866	3.787	3.726	3.677	3.637
8	5.318	4.459	4.066	3.838	3.687	3.581	3.500	3.438	3.388	3.347
9	5.117	4.256	3.863	3.633	3.482	3.374	3.293	3.230	3.179	3.137
10	4.965	4.103	3.708	3.478	3.326	3.217	3.135	3.072	3.020	2.978
11	4.844	3.982	3.587	3.357	3.204	3.095	3.012	2.948	2.896	2.854
12	4.747	3.885	3.490	3.259	3.106	2.996	2.913	2.849	2.796	2.753
13	4.667	3.806	3.411	3.179	3.025	2.915	2.832	2.767	2.714	2.671
14	4.600	3.739	3.344	3.112	2.958	2.848	2.764	2.699	2.646	2.602
15	4.543	3.682	3.287	3.056	2.901	2.790	2.707	2.641	2.588	2.544
16	4.494	3.634	3.239	3.007	2.852	2.741	2.657	2.591	2.538	2.494
17	4.451	3.592	3.197	2.965	2.810	2.699	2.614	2.548	2.494	2.450
18	4.414	3.555	3.160	2.928	2.773	2.661	2.577	2.510	2.456	2.412
19	4.381	3.522	3.127	2.895	2.740	2.628	2.544	2.477	2.423	2.378
20	4.351	3.493	3.098	2.866	2.711	2.599	2.514	2.447	2.393	2.348
21	4.325	3.467	3.072	2.840	2.685	2.573	2.488	2.420	2.366	2.321
22	4.301	3.443	3.049	2.817	2.661	2.549	2.464	2.397	2.342	2.297
23	4.279	3.422	3.028	2.796	2.640	2.528	2.442	2.375	2.320	2.275
24	4.260	3.403	3.009	2.776	2.621	2.508	2.423	2.355	2.300	2.255
25	4.242	3.385	2.991	2.759	2.603	2.490	2.405	2.337	2.282	2.236
26	4.225	3.369	2.975	2.743	2.587	2.474	2.388	2.321	2.265	2.220
27	4.210	3.354	2.960	2.728	2.572	2.459	2.373	2.305	2.250	2.204
28	4.196	3.340	2.947	2.714	2.558	2.445	2.359	2.291	2.236	2.190
29	4.183	3.328	2.934	2.701	2.545	2.432	2.346	2.278	2.223	2.177
30	4.171	3.316	2.922	2.690	2.534	2.421	2.334	2.266	2.211	2.165
40	4.085	3.232	2.839	2.606	2.449	2.336	2.249	2.180	2.124	2.077
50	4.034	3.183	2.790	2.557	2.400	2.286	2.199	2.130	2.073	2.026
60	4.001	3.150	2.758	2.525	2.368	2.254	2.167	2.097	2.040	1.993
70	3.978	3.128	2.736	2.503	2.346	2.231	2.143	2.074	2.017	1.969
80	3.960	3.111	2.719	2.486	2.329	2.214	2.126	2.056	1.999	1.951
90	3.947	3.098	2.706	2.473	2.316	2.201	2.113	2.043	1.986	1.938
100	3.936	3.087	2.696	2.463	2.305	2.191	2.103	2.032	1.975	1.927
150	3.904	3.056	2.665	2.432	2.274	2.160	2.071	2.001	1.943	1.894
200	3.888	3.041	2.650	2.417	2.259	2.144	2.056	1.985	1.927	1.878
400	3.865	3.018	2.627	2.394	2.237	2.121	2.032	1.962	1.903	1.854

Nb :

- Quantiles d'ordre 0.95 de la loi de Fisher
- Degrés de liberté du numérateur sur la première ligne
- Degrés de liberté du dénominateur sur la colonne de gauche

ANNEXE XV : Méthodes alternatives à l'expérimentation animale en pharmacotoxicologie.

<b>Organe Isolé</b>		
<b>Méthode d'essai classique</b>	<b>Description de la méthode</b>	<b>Critère respecté de la règle des 3R</b>
<b>Absorption Cutanée In Vivo</b>	<p align="center"><b>Modèle d'explant cutané</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- La substance à l'essai est appliquée à la surface d'un échantillon de peau excisée séparant les deux compartiments (un compartiment donneur et un compartiment receveur) d'une cellule à diffusion ;</li> <li>- À divers temps déterminés, le fluide récepteur est analysé et l'absorption de la substance de l'essai ou de ses métabolites est mesurée ;</li> <li>- L'analyse des matières restées à l'intérieur des couches dermiques récupérées par nettoyage de la peau permet d'enrichir l'évaluation des données ;</li> <li>- Les échantillons de peau utilisés peuvent être prélevés sur des humains ou des animaux. Bien qu'il soit préférable d'utiliser des échantillons viables, des échantillons non viables peuvent également être employés.</li> </ul>	<p align="center"><b>Remplacement</b></p> <p>Lors d'une utilisation d'échantillons de peau prélevés sur des humains.</p> <p align="center"><b>Réduction et raffinement</b></p> <p>Lors d'une utilisation d'échantillons de peau prélevés sur des animaux euthanasiés de manière éthiquement acceptable.</p>
<b>Effet irritant ou corrosif aigu sur la peau de Lapin</b>	<p align="center"><b>Essai de résistance électrique transcutanée (RET)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- La surface épidermique de disques de peau, prélevés sur la peau de jeunes rats humainement euthanasiés, est exposée à la substance de l'essai pour une durée n'excédant pas 24 heures ;</li> <li>- Les disques sont ensuite lavés et la résistance électrique transcutanée (RET) est mesurée ;</li> </ul>	<p align="center"><b>Réduction</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Les disques cutanés prélevés chez un même rat permettent d'étudier jusqu'à cinq substances.</li> <li>- Les substances identifiées comme non corrosives doivent être soumises à des essais chez l'animal.</li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Les substances corrosives sont identifiées par leur capacité à provoquer la perte de l'intégrité du stratum corneum normal et de la fonction de barrière, cette perte étant mesurée comme une diminution de la RET en dessous d'une valeur seuil de 5Kw ;</li> <li>- Lorsque des mesures de RET <math>\leq 5kW</math> sont obtenues, une étape de fixation est ajoutée à la procédure pour confirmer les résultats afin de s'assurer que la diminution de la résistance électrique est imputable à la destruction physique du stratum cornéum et non à d'autres facteurs.</li> </ul>	<p style="text-align: center;"><b>Raffinement</b></p> <p>Utilisation d'animaux morts plutôt que vivants.</p>
<p style="text-align: center;"><b>Effet irritant ou corrosif aigu sur les yeux (épreuve de Draize sur l'œil du lapin)</b></p>	<p style="text-align: center;"><b>Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Méthode d'essai d'opacité et de perméabilité sur la cornée bovine ;</li> <li>- Des cornées, découpées des yeux de bovins (provenant d'abattoirs), sont exposées à la substance de l'essai ;</li> <li>- La quantité de fluorescéine passant à travers la cornée permet de mesurer la perméabilité et la modification du passage de la lumière à travers la cornée (opacité cornéenne) permet de déterminer la capacité d'une substance à provoquer un effet irritant ou corrosif.</li> </ul>	<p style="text-align: center;"><b>Réduction</b></p> <p>Les substances identifiées comme irritantes lors d'essais n'avanceront pas à l'étape des essais chez les animaux.</p>
	<p style="text-align: center;"><b>Isolated Chicken Eye (ICE) Test Method</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Méthode d'essai sur l'œil de poulet isolé ;</li> <li>- Des yeux, prélevés sur des poulets (provenant d'abattoirs) sont isolés afin d'être exposés à la substance de l'essai ;</li> <li>- Cette procédure permet de mesurer l'œdème et l'opacité de la cornée ; de plus, le taux de rétention de la fluorescéine permet de déterminer la capacité d'une substance à provoquer un effet irritant ou corrosif.</li> </ul>	<p style="text-align: center;"><b>Réduction</b></p> <p>Les substances identifiées comme irritantes lors d'essais n'avanceront pas à l'étape des essais chez les animaux.</p>

	<p style="text-align: center;"><b>Isolated Rabbit Eye (IRE) Test Method</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Méthode d'essai sur l'œil de lapin isolé ;</li> <li>- Des yeux de lapin, prélevés sur des animaux ayant été euthanasiés à des fins commerciales ou de recherche, sont exposés à la substance à l'essai ;</li> <li>- Cette méthode permet de mesurer l'œdème, l'opacité de la cornée et le taux de rétention de la fluorescéine ainsi que d'évaluer les effets de la procédure sur l'épithélium cornéen.</li> </ul>	<p style="text-align: center;"><b>Réduction</b></p> <p>Les substances identifiées comme irritantes lors d'essais n'avanceront pas à l'étape des essais chez les animaux</p>
--	---	---

<b>Culture Cellulaire</b>		
<b>Méthode d'essai classique</b>	<b>Description de la méthode</b>	<b>Critère respecté de la règle des 3R</b>
<b>Effet irritant ou corrosif aigu sur les yeux (épreuve de Draize sur l'œil du lapin)</b>	<p style="text-align: center;"><b>Essai de fuite de la fluorescéine</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Essai in vitro de cytotoxicité effectué sur une monocouche confluente de cellules épithéliales des tubules MDCK CB997 qui sontensemencées sur des inserts semi-perméables comme modélisation de l'état de non-prolifération de l'épithélium cornéen in vivo.</li> </ul>	<b>Réduction</b>

<p><b>Effet irritant ou corrosif aigu sur la peau de lapin</b></p>	<p><b>Essai sur modèle de peau humaine (EPISKIN™, EpiDerm™ et SkinEthic™)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- La substance de l'essai est appliquée sur un modèle tridimensionnel de peau humaine comprenant au moins un épiderme reconstitué avec un stratum corneum fonctionnel ;</li> <li>- Une substance est considérée comme corrosive si la viabilité cellulaire, déterminée par un essai de fixation (MTT), est réduite en dessous des valeurs seuils définies pour des périodes d'exposition déterminées.</li> </ul>	<p><b>Remplacement</b></p> <p><b>ou</b></p> <p><b>Réduction</b></p>
<p><b>Essai de phototoxicité in vivo chez les mammifères</b></p>	<p><b>Essai de phototoxicité In Vitro 3T3 Neural Red Uptake (NRU)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- La viabilité des fibroblastes de souris Balb/c 3T3 est mesurée après leur exposition à une substance à l'essai avec et sans la présence d'une dose de lumière solaire simulée ;</li> <li>- La cytotoxicité est exprimée par la diminution de l'absorption et de la fixation du rouge neutre.</li> </ul>	<p><b>Remplacement</b></p>

<p><b>Test de provocation létale pour le titrage de l'activité du vaccin antidiphtérique</b></p>	<p><b>Dosage des AC sur lignées cellulaires Véro</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Titrage des AC anti diphtérique dans le sérum de cobaye immunisé par vaccination</li> <li>- Cellule Vero (de rein de singe vert) en présence de la toxine donne un ECP =&gt; Lyse</li> <li>- Révélation soit par l'inhibition métabolique, soit sur la cytotoxicité comme point limite (MTT)</li> </ul>	<p><b>Réduction Raffinement</b></p>
<p><b>Mutagenèse</b></p>	<p><b>Essai d'aberration chromosomique in vitro chez les mammifères</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Exposer des cultures cellulaires, pendant un cycle et demi, à la substance d'essai,</li> <li>- Les cellules sont traitées avec une substance bloquant la métaphase (exemples : colchicine-colcémide)</li> <li>- Récoltées et teintées, les cellules métaphasiques sont analysées par microscopie pour déceler les aberrations chromosomiques.</li> </ul>	<p><b>Réduction</b></p>

## Méthodes polymériques

<b>Effet irritant ou corrosif sur peau de lapin</b>	<p style="text-align: center;"><b><u>Corrositex®</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>- Membrane cellulaire synthétique « bio-barrière » + Système de détection chimique (SDC).</li><li>- Une Substance corrosive provoque une nécrose irréversible.</li><li>- Mesure du temps nécessaire à la pénétration de la bio-barrière =&gt; changement de coloration de la solution indicatrice du SDC.</li></ul>	<p style="text-align: center;"><b>Remplacement</b></p> <p>Pour l'étude des acides et des bases.</p> <p style="text-align: center;">OU</p> <p style="text-align: center;"><b>Réduction</b></p> <p>Les substances, autres que des acides et des bases, qui sont identifiées comme corrosives n'avanceront pas à l'étape des essais chez les animaux.</p>
---	--	--

## Méthodes immunochimiques

<b>Test de provocation létale ou paralytique pour le titrage de l'activité du vaccin tétanique (anatoxine tétanique)</b>	<p style="text-align: center;"><b>Immuno- enzymatique ELISA</b></p> <p>Titration des AC antitétanique par ELISA dans le sérum de cobaye 28 jrs après immunisation par le vaccin</p>	<p style="text-align: center;"><b>Réduction</b></p> <p>Analyse à l'aide d'une seule dilution plutôt qu'une analyse à dilutions multiples.</p> <p style="text-align: center;"><b>Raffinement</b></p> <p>La mort ne constitue pas un point limite.</p>
--	---	--

## **Résumé**

Le médicament n'est pas un produit anodin, il met en jeux la santé et la vie du patient. Il est donc soumis à des exigences strictes en termes d'efficacité et de sécurité.

Pour notre étude nous avons choisi un princeps et un générique d'un anesthésique local très largement utilisé, de l'odontologie à l'anesthésiologie en passant par la médecine générale et de nombreuses spécialités médicales et chirurgicales : la Lidocaïne.

Pour évaluer la sécurité de nos médicaments, nous avons réalisé l'essai de la toxicité anormale qui a confirmé l'absence d'une toxicité surajoutée à la dose maximale efficace non toxique utilisée chez l'homme et le test de recherche des endotoxines bactériennes (le LAL test) qui a démontré que nos produits sont dépourvus d'endotoxines bactériennes.

Quant à l'évaluation de l'efficacité, nous avons réalisé le test du rayon chauffant sur la queue de la souris et le réflexe cornéen chez le lapin qui nous ont permis de mettre en évidence l'action anesthésique de la Lidocaïne princeps et générique. Cette action s'est manifestée par une analgésie avec diminution de la sensibilité à la chaleur (test de la queue de souris), ainsi qu'une abolition du réflexe cornéen chez le lapin, avec l'absence d'une différence significative entre les deux produits testés.

**Mots clés :** anesthésique local, Lidocaïne, toxicité, endotoxines, analgésie.

## **Abstract**

Medications are not innocuous products; they put the patient's health and life at stake. They are therefore subject to strict requirements in terms of efficiency and safety.

For our study we chose an original and a generic of a local anesthetic widely used, from odontology to anesthesiology, in general medicine and many medical and surgical specialties: Lidocaïne.

To assess the safety of our drugs, we performed the Abnormal Toxicity Test, which confirmed the absence of added toxicity to the maximum effective non-toxic dose used on humans, and the bacterial endotoxin test (the LAL test) which showed that our products are bacterial-endotoxin free.

As for the evaluation of the efficacy, we carried out the test of the heating ray on the mouse's tail and the corneal reflex on the rabbit, which allowed us to highlight the anesthetic action of the generic and original Lidocaïne. This action manifested itself through analgesia with decreased sensitivity to heat (test of the mouse's tail), as well as an abolition of the corneal reflex in the rabbit, with the absence of a significant difference between the two products tested.

**Keywords:** local anesthetic, Lidocaïne, toxicity, endotoxins, analgesia.