

N° d'ordre 04/2010-M/GP

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche
Scientifique
Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene

Faculté de Génie Mécanique & Génie des Procédés



Mémoire
Présenté pour l'obtention du diplôme de Magister

En Génie des Procédés
Option : Technologie Pharmaceutique

Par : Mr BELAISSA Yahia

Sujet De Recherche

**Aspects Galénique, Analytique et Pharmacologique dans
une étude Préliminaire de Bioéquivalence « cas de la
Metformine »**

Soutenu publiquement le : 07/02/2010, devant le jury composé de :

Mr Kamel . DAOUD	Professeur à l' USTHB	Président
Mr Tahar. DOB	Maître de Conférences (ENS)	Directeur de mémoire
Mr J.D. AKRETCHE	Professeur à l' USTHB	Examineur
Mr C. CHELGHOUME	Professeur à l' USTHB	Examineur
Mr M. FERKIOUI	Directeur (CRD-SAIDAL)	Invité

Résumé :

Les études de bioéquivalence sont la dernière étape de développement d'un médicament générique. Ce type d'étude, indépendant du contrôle de qualité classique, vise à débloquent l'équivalence du générique avec le princeps. Ce travail vise à étudier et à optimiser les paramètres galénique, analytique et pharmacologique impliqués dans la démarche de mise en œuvre dans une étude de bioéquivalence concernant la Metformine. Dans ce mémoire, il paraît que :

- La connaissance, l'optimisation et le contrôle des différentes étapes de formulation sont essentiels, ils concernent tous les stades de fabrication, depuis la réception des matières premières pour analyse jusqu'à la phase de conditionnement du produit fini;
- Le choix d'une technique d'analyse très sensible est nécessaire par le niveau toujours faible des concentrations sanguines de la molécule médicamenteuse administrée ;
- Le traitement d'échantillon biologique est un aspect essentiel de la bioanalyse ;
- Le dosage des médicaments in vivo par l'utilisation de méthodes validées est d'une importance capitale pour garantir la sécurité et l'efficacité d'emploi de médicament ;
- Dans la mesure où les conditions sont satisfaisantes sur le plan analytique, les modalités de l'étude pharmacocinétique amènent à choisir un protocole expérimental qui permet la connaissance la plus complète possible du phénomène étudié ; l'absence de certains points expérimentaux peut méconnaître le profil exact de la courbe.

Les études de bioéquivalence sont compliquées, coûteuses, pluridisciplinaires et nécessitent de plus, une étude in vivo chez l'homme créant ainsi une situation de conflit avec l'éthique médical.

Summary:

The studies of bioequivalence are the last stage of a generic drug development. This type of studies, independent of the traditional quality control, aims at resolving the equivalence of the generic from the princeps one. This work aims at studying and optimizing the galenic, analytical and pharmacological parameters implicated in the implementation step in bioequivalence study concerning the Metformine. In this thesis, it appears that:

- The knowledge, the optimization and the control of the different steps of formulation are essential, they concern all of the manufacturing steps from receiving raw materials for analysis to final products conditioning phase;
- the choice of a very sensitive technique of analysis has turned to be highly necessary due to the low level of the blood concentrations of given medicinal molecules;
- Biological sample treatment is an essential aspect of bioanalysis;
- The in vivo drugs measurement with the use of validated methods is of a capital importance so as to guarantee the security and the efficacy of the drug's consumption;
- Insofar as the conditions are satisfactory on the analytical level, modality of the pharmacokinetic study leads to choose an experimental protocol which provides the most complete knowledge of the studied phenomenon; the lack of some experimental points may be able to misrepresent the exact profile of the curve.

The bioequivalence studies are complicated, expensive, and multidisciplinary; in addition, they necessitate an in vivo study within the human being which generates a conflict's case with medical ethics.

Remerciement

Le travail qui fait l'objet de ce mémoire a été réalisé aux laboratoires de chimie analytique, la pharmacie galénique et pharmacotoxicologie de CRD SAIDAL

C'est avec une certaine émotion et beaucoup de sincérité que je voudrai remercier toutes les personnes ayant soutenu mon travail.

En premier lieu, je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à mon promoteur Monsieur D' T. DOB pour avoir dirigé mon travail. Je le remercie chaleureusement pour son encadrement et pour son soutien constant tout au long de mon mémoire.

Mes remerciements vont conjointement à mon co-directeur de thèse Dr M. FERKIOUI Directeur de CRD Saidal pour sa gentillesse et pour l'aide qu'il m'a apporté au cours de ce travail. Son intérêt, sa disponibilité, son suivi quotidien de mes travaux et ses précieux conseils m'ont été d'un grand profit. Je le remercie infiniment.

Je tiens à remercier. Monsieur Pr. K. DAOUD, d'avoir accepté de présider le jury de ma soutenance.

Je souhaite exprimer toute ma gratitude envers les membres du jury qui ont bien voulu consacrer à mon mémoire une partie de leur temps. Monsieur le Pr C. CHELGHOUM et Monsieur le Pr D.J. AKRETCHE qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'être examinateurs de mon travail.

J'exprime une reconnaissance particulière à Mr HADJ SADOUK, docteur en physique pour son aide, son soutien et ses précieux conseils.

Mes plus chaleureux remerciements s'adressent également, à toutes les personnes du laboratoire de (chimie analytique et pharmacie galénique) avec qui j'ai partagées un café, un repas, une discussion ou une console d'ordinateur. Je les remercie tous d'avoir assuré une ambiance particulièrement favorable pour mener à bien mon travail.

Merci

Dédicace

C'est avec la plus grande émotion et la plus grande joie que je dédie ce modeste travail à mes parents, sans qui je ne serai pas où j'en suis aujourd'hui,

- A l'ensemble de mes frères et soeurs,

- A mes nièce et neveux,

- A ma belle -mère

- A mes amis

- A tous ceux et celles que j'aime et qui me sont chères

Il m'est bien évidemment impossible de ne pas citer la femme qui a été la plus grande chance de ma vie.

BELAISSÉ YAHAI .

SOMMAIRE

Liste des tableaux et figures

Introduction générale

Chapitre I : Aspect galénique

Partie I : Synthèse bibliographique.

I Généralités et définitions	05
I-1 Procédés de fabrication des comprimés.....	06
I-2 Influence des propriétés techniques et du procédé de fabrication sur l'homogénéité et la qualité du produit fini.....	09
I-2-1 Propriétés techniques des constituants du mélange.....	09
I-2-2 Paramètres et étapes de fabrication	11

Partie II : Etude Expérimentale

II-1 Étude d'orientation ; caractérisation de la spécialité de référence.....	15
II-1-1 Caractérisation générale.....	15
II-1-2 Caractérisation pharmacotechnique	15
II-1-3 Caractérisation biopharmaceutiques	16
II-2 Etude de pré formulation et formulation.....	17
II-2-1 Caractérisations physicochimiques des matières premières.....	17
II-2-2 Optimisation de la formule quantitative et des paramètres de procédé.....	18
II-2-2-1 Facteurs étudiés.....	18
II-2-2-2 Réalisation des essais	19
II-2-2-3 Détermination et validation de l'optimum.....	20
II-2-3 Contrôle de conformité.....	21

Partie III : Résultats et discussions

III-1 Résultats analytiques	25
III-2 Résultats pharmacotechnique.....	26
III-3 Résultats biopharmaceutique.....	26
Conclusion et nouvelles pistes de recherche	31

Chapitre II : Aspect Pharmacologique et Analytique

Partie I : Synthèse bibliographique

Section I-1 : Aspect Pharmacologique et Réglementaire

I-1-1-1 Cadre juridique d'un médicament générique.....	36
--	----

I-1-2 Devenir du médicament dans l'organisme	37
I-1-2-1 Phase biopharmaceutique	37
I-1-2-2 Phase pharmacocinétique.....	37
I-1-2-3 Définition de quelques paramètres pharmacocinétiques.....	38
I-1-3 Généralités sur le diabète et le mécanisme d'action de la Metformine.....	39
I-1-4 Biodisponibilité et bioéquivalence.....	41
Section I-2 : Aspect Analytique	
I-2-1 Méthodes spectrales.....	46
I-2-2 dosage des médicaments dans le milieu biologique.....	48
I-2-2-1 Problématique et techniques du traitement des échantillons.....	49
I-2-3 Validation.....	54
Partie II : Etude Expérimentale	
II-1 Mise au point et optimisation des conditions chromatographiques	
II-1-1 Réalisation des essais.....	61
II-1-1-1 Choix de l'étalon interne	61
II-1-1-2 Détermination de la longueur d'onde d'absorption maximale.....	61
II-1-1-3 Choix du pH de la phase mobile.....	61
II-1-1-4 Choix de la phase stationnaire et optimisation de la phase mobile.....	61
II-2 Mise au point d'une technique d'extraction	
II-2-1 Réalisation des essais	63
II-2-2 Dérivation	64
II-2-3 Extraction liquide-liquide.....	65
II-2-4 Extraction en phase solide.....	65
II-2-5 Défécation.....	66
II-3 Validation de la méthode bioanalytique.....	67
II-4 Application in vivo de la méthode.....	70
Partie III : Résultats et Discussion	
III-1 Mise au point et optimisation des conditions chromatographiques.....	71
III-2 Mise au point d'une technique d'extraction.....	76
III-3 Validation de la méthode bioanalytique.....	80
III-4 Application in vivo de la méthode.....	97
Conclusion.....	101
Références bibliographiques	
Annexe	

Liste des tableaux

N°	Libellé	Page
01	Classification des propriétés des poudres	10
02	Informations sur la spécialité de référence	15
03	Caractérisation pharmacotechnique de la spécialité de référence	15
04	Formule qualitative du produit générique	17
05	Facteurs et réponses choisis pour la réalisation les essais d'optimisation	18
06	Fourchette tolérée pour la variation de la quantité des excipients	18
07	Etapas de fabrication	19
08	Matrice d'expérience codée en variable centré réduit	20
09	Principaux résultats analytiques	25
10	Résultats des essais de formulation	26
11	Valeurs de F_2 pour chaque milieu	29
12	Comparaison entre un médicament générique et un médicament princeps	36
13	Réactifs employés pour libérer les analytes et éliminer les protéines plasmatiques	51
14	Différentes techniques de traitement des échantillons biologiques	53
15	Tableau récapitulatif de critères de validation	59
16	Essais réalisés pour l'optimisation de la méthode analytique	62
17	Préparation des solutions de contrôle de qualité	63
18	Protocole expérimental de la linéarité et la droite de calibration	67
19	Plages de variation des facteurs en coordonnées centrées réduites	70
20	Ensemble des expériences réalisées pour l'évaluation de la robustesse	70
21	Planification des prélèvements	71
22	Capacité de rétention de le Metformine en fonction de la force ionique.	74
23	Temps rétention de différentes molécules testées pour le choix de l'étalon interne.	74
24	Résultats de l'extraction liquide-liquide	76
25	Résultats de l'extraction en phase solide	78
26	Résultats de l'extraction obtenus par la méthode de dénaturation	79
27	Données brutes obtenues par 03 séries de dosage (linéarité)	80
28	Données brutes obtenues par 03 séries de dosage (droite d'étalonnage)	83

29	Données brutes obtenues par trois niveaux de concentration (évaluation de la fidélité)	86
30	Calcul statistique pour l'évaluation de l'exactitude	91
31	Résultats de l'évaluation de la robustesse	93
32	Résultats de la stabilité obtenus après trois cycles de congélation décongélation	96
33	Résultats obtenus par l'analyse des échantillons sanguines prélevés à partir des rats	98
34	Paramètres pharmacocinétiques de la Metformine (application chez les rats).	99
35	Comparaison du résultat obtenu avec les résultats de la bibliographie	100

Listes des figures et schémas

N°	Libellé	Page
01	Différents procédés de fabrication des comprimés	08
02	Description des principaux rôles d'un lubrifiant	14
03	Description du phénomène de ségrégation	14
04	Etude comparative du profil de dissolution in vitro à pH=1,2	27
05	Etude comparative du profil de dissolution in vitro à pH=4,5	27
06	Etude comparative du profil de dissolution in vitro à pH=6,8	27
07	Différents sites d'action de la Metformine	40
08	Devenir d'un comprimé dans l'organisme	41
09	Différentes phases pharmacocinétiques	41
10	Méthode graphique pour l'évaluation des paramètres pharmacocinétiques	41
11	Signification de coefficient de régression	56
12	Formule chimique développé de la Metformine chlorhydrate	63
13	Mécanisme détaillé de la réaction de dérivation Metformine-p-NBC	64
14	Mécanisme de rétention en chromatographie de phase inverses	71
15	Mécanisme de rétention en chromatographie de paire d'ion	72
16	Chromatogramme obtenu avec la phase stationnaire C ₁₈ en 1 ^{er} cas.	72
17	Chromatogramme obtenu avec la phase stationnaire C ₁₈ en 2 ^{eme} cas.	72
18	Evolution de la capacité de rétention en fonction du % méthanol	73
19	Chromatogramme obtenu avec la phase stationnaire gel de silice	73
20	Evolution de la capacité de rétention en fonction du % méthanol	74

21	Chromatogramme obtenu avec la phase stationnaire phényle	74
22	Interaction de la molécule de Metformine avec les groupements silanol libre de la phase stationnaire phényle	75
23	Interaction de la molécule de Metformine avec les groupements phényle de la phase stationnaire	75
24	Chromatogramme obtenu en utilisant la technique de dérivation	76
25	Mécanisme de dégradation de l'Acébutolol chlorhydrate en milieu acide	77
26	Chromatogramme obtenu par l'extraction liquide – liquide	77
27	Chromatogramme obtenu par l'extraction en phase solide	78
28	Chromatogramme obtenu par la technique de défécation	79
29	Chromatogramme obtenu par l'analyse d'un plasma blanc (spécificité)	80
30	Différents chromatogramme superposés de la linéarité	82
31	Représentation graphique de la linéarité et la droite de calibration	85
32	Fidélité 01 jour 01 (3500ng/ml)	90
33	Fidélité 02 jour 02 (3500ng/ml)	90
34	Evaluation de l'exactitude (test des Résidus)	92
35	Niveau de corrélation entre les facteurs et les réponses	94
36	Influence de variation des conditions chromatographiques sur la surface de pic de la Metformine	95
37	Influence d'une petite variation des conditions chromatographiques sur le temps de rétention de Metformine	95
38	Chromatogramme obtenu par l'analyse du plasma blanc (t=0) avant administration	97
39	Chromatogramme obtenu par l'analyse du plasma après 01h d'une administration orale de Metformine	97
40	Chromatogramme obtenu par l'analyse du plasma après 24h d'une administration orale de Metformine	97
41	Profil de l'évolution de la concentration plasmatique de la Metformine en fonction du temps ; application chez les rats.	98

Introduction Générale

Le diabète est une maladie chronique, caractérisé par des troubles de la glucorégulation. Les complications liées à cette maladie sont multiples à savoir : le dysfonctionnement rénal, la neuropathologie et la cardiopathologie. Plusieurs antidiabétiques oraux sont commercialisés. Parmi ces molécules, la Metformine. L'amélioration du contrôle glycémique de cette dernière réside dans une action anti-hyperglycémiant plus qu'hypoglycémiant.

Durant la phase de conception et de fabrication du médicament, le choix et l'optimisation de la formule qualitative et quantitative en excipients et des divers processus de fabrication doivent être pris en compte. La libération du médicament doit être également contrôlée, pour optimiser son profil thérapeutique.

Le contrôle de qualité d'un médicament ne se limite plus aujourd'hui aux domaines pharmaco technique et analytique, il doit passer impérativement par le dosage dans le milieu biologique. L'étude du devenir des médicaments dans l'organisme est, avant tout un problème analytique englobant l'extraction, la séparation, l'identification et le dosage de ce dernier et/ou de ses métabolites dans les milieux biologiques.

La détermination quantitative de la Metformine dans le milieu biologique est requise pour les études pharmacocinétiques en vue des études de bioéquivalence entre les différentes formulations. De nombreuses méthodes sont mises en œuvre pour le dosage sérique de la Metformine (**Annexe 03**), nous citons principalement les méthodes chromatographiques ; chromatographie en phase gazeuse (dérivation de la Metformine avec le mono chlorodifluoroacétique anhydre) [01], chromatographie en phase liquide où certains auteurs utilisent la chromatographie en phase normale [02], d'autres utilisent la chromatographie en phase inverse [03, 04, 05] et la chromatographie échangeuse de cations [06,07]. Pour la détection, une place importante dans la littérature est réservée à la chromatographie liquide couplée à un détecteur de spectrométrie de masse (LC-MS-MS) [03,05], détecteur de fluorescence (dérivation de la Metformine avec la 9,10- phénantraquinone) [04] et le détecteur UV visible [08, 02, 09].

Pour le traitement d'échantillon, certains auteurs utilisent l'extraction liquide liquide (1-butanol n-Hexane (50/50)) [09], d'autres utilisent la technique de paire d'ion (complexe de Metformine-bleu de bromothymol) [01]. L'ultrafiltration [07,10], la précipitation des protéines par : l'acide trichloracétique, Methanol-sulfate de Zinc- éthylène glycol, Acétonitrile...etc. [06, 11, 02], et l'extraction en phase solide (SPE) [12,04]. La SPE est

probablement la plus attrayante parmi ces techniques, puisque son application est simple, moins coûteuse, très rapide et permet l'analyse de plusieurs échantillons en même temps.

Afin de mettre en examen notre travail et pour exposer les résultats trouvés, notre mémoire sera organisé en deux chapitres.

Chapitre I : Aspect galénique

Dans la première partie de ce chapitre, nous présenterons le cadre théorique de l'étude, où un aperçu est donné sur les différents procédés de fabrication d'un comprimé, l'influence des paramètres techniques et du procédé de fabrication sur l'homogénéité et la qualité finale du produit fini. La seconde partie est consacrée principalement à une étude d'orientation qui est faite à partir d'une caractérisation pharmacotechnique et biopharmaceutique de la spécialité de référence, permettant de faire ressortir les différentes spécifications de ce produit. Une étape de préformulation ayant pour but d'inventorier l'ensemble des facteurs de formulation et de procédé susceptibles d'influencer notre système et une étape de formulation ayant pour but de définir un optimum. Ce chapitre sera achevé par une discussion, une conclusion et perspectives.

Chapitre II : Aspects pharmacologique et analytique

Pour entamer ces aspects, nous avons divisé ce chapitre en trois parties.

Partie I : Synthèse bibliographique, cette partie est divisée en deux sections.

Dans la section 01 on expose l'aspect pharmacologique, où nous allons citer le cadre juridique d'un médicament générique, quelques définitions de différents paramètres pharmacologiques, les critères d'exonération et d'obligation des études de bioéquivalence.

Dans la section 02 nous avons présenté le cadre théorique sur les méthodes d'analyse et principalement la chromatographie liquide, problématiques et techniques du traitement des échantillons biologiques, critères et aspect statistique de la validation.

Partie II : Cette partie est consacrée principalement à une étude de mise au point et optimisation des conditions chromatographiques, une étape de mise au point et optimisation d'une technique d'extraction, une étape de validation pour tester les performances de la méthode bioanalytique, une application in vivo de la méthode développée et la détermination des paramètres pharmacocinétiques de la Metformine chez le Rat.

Partie III : Résultats et discussion

Ce travail sera achevé par une discussion, une conclusion et des perspectives

Importance du sujet

Cette recherche comporte un double intérêt, à savoir :

1. Technique

Il se traduit par le contrôle de la qualité et de la conformité du médicament par rapport aux exigences réglementaires.

Pour répondre à une meilleure qualité du médicament, on doit avoir recours à des moyens multiples et complémentaires de contrôle parmi lesquels :

- Le contrôle physicochimique qui permet de vérifier toutes les spécifications de la pharmacopée, notamment, la qualité de la matière première. A ce là doit-on faire confiance aux certificats d'analyses d'un fournisseur ou au contraire faut-il se méfier ?

- Le contrôle pharmaco-technique et biopharmaceutique en cours et en fin de fabrication. Il est important de rappeler qu'actuellement en Algérie, le contrôle se fait essentiellement pour évaluer ces paramètres et tout produit correspondant à ces spécifications est considéré comme ayant l'effet thérapeutique désiré. Or, des cas d'inéquivalences thérapeutiques ont été observés. Ce défaut d'équivalence a posé à la pharmacothérapie, une réelle inquiétude. D'où la nécessité d'un autre type de contrôle.

- Le contrôle pharmacologique dont le but est de tester la réponse de la matière vivante face à l'entité chimique qu'est le médicament. Ce type de contrôle donne le pouvoir d'évaluer des facteurs indispensables à l'activité pharmacologique qui échappent aux méthodes physicochimiques. Un de ces facteurs est la biodisponibilité.

L'étude chronologique quantitative in vivo des drogues ou de leurs métabolites, est à l'heure actuelle le moyen le plus rationnel d'assurer simultanément l'efficacité et la sécurité d'emploi des médicaments.

2. Economique

Sachant qu'avec la mondialisation des marchés pharmaceutiques et avec les accords commerciaux régulant ces dits marchés, les fabricants régionaux des médicaments sont contraints de respecter certaines exigences, entre autre les études de bioéquivalence ; ce qui va augmenter la mise sur le marché de médicaments génériques équivalents aux médicaments princeps et beaucoup moins chers ce qui va contribuer à la réduction de la facture des médicaments et donc augmenter l'accessibilité des soins, et aussi pour renforcer l'image de marque de la société et de promouvoir la commercialisation et l'exportation de ses médicaments.

CHAPITRE I : Aspect Galénique

PARTIE I : Synthèse Bibliographique

Partie I : Synthèse bibliographique

La pharmacie galénique, appelée également technologie pharmaceutique, est souvent associée à une science empirique basée sur l'expérimentation. En fait, cette science tente à mettre en forme un médicament commercialisable, de biodisponibilité connue.

Conscient de la menace qui planait sur notre système de santé dans lequel l'OMS a tiré la sonnette d'alarme concernant la prolifération du diabète qui touche actuellement environ 370 millions de personnes à travers le monde et sachant que 10 % de la population du Maghreb âgé de plus de 30 ans sont atteints du diabète de type 2 [13], et dans le cadre du traitement de diabète, le CRD « SAIDAL » a initié un projet de développement à travers le laboratoire de pharmacie galénique visant la formulation d'un médicament générique antihyperglycémiant dont la DCI est *la Metformine sous forme de chlorhydrate*.

Notre objectif dans cette partie d'étude est d'optimiser les différents paramètres de formulation et de procédé de fabrication d'un comprimé pelliculé « *Diaguanide[®] 1000 mg* » similaire - sur les plans pharmacotechnique, biopharmaceutique et analytique- à un produit de référence « *Glucophage[®] 1000 mg* ».

I. Généralités et Définitions

« Les comprimés sont des préparations solides contenant une unité de prise d'une ou plusieurs substances actives. Ils sont généralement obtenus en agglomérant par compression un volume constant de particules » [14]. Ils sont constitués par un ou plusieurs principes actifs, additionné ou non de substances auxiliaires appelées « excipients » ou « adjuvants ». Une quantité non optimale d'adjuvants peut être à l'origine d'un défaut de fabrication [15].

Les excipients sont choisis en fonction de leurs propriétés physiques (propriétés d'écoulement, aptitude à la compression, ...etc.) et biopharmaceutiques (libération du principe actif). Ils sont également sélectionnés en fonction de leur inertie et de leur innocuité. Les rôles des principaux adjuvants peuvent être résumés comme suit :

a. Diluants : ils complètent le volume de la matière active généralement insuffisante pour réaliser la forme galénique [16].

b. Agglutinant ou (**liant**) : Il sert essentiellement à unir les particules lorsque celles-ci ne peuvent s'agglomérer sous l'action de la pression. Ils permettent de réduire la force de compression, ils peuvent être utilisés soit à l'état sec, soit le plus souvent mouillée [17].

c. Lubrifiants : Les agents d'écoulement permettent d'améliorer la régularité de la surface des particules, ils permettent de :

- ✓ Réduire la surface des particules en obturant les cavités (figure 1-1), ce qui permet à la particule d'atteindre une forme plus sphérique [18];
- ✓ Former un film à la surface des particules (figure 1-2), ce qui permet de rendre la surface de la particule plus lisse ;
- ✓ Adsorber l'excès d'eau des particules (figure 1-3), ce qui facilite l'écoulement des particules hygroscopiques.

A ces trois rôles importants vient s'ajouter un intérêt supplémentaire des lubrifiants : ils donnent un bel aspect, brillant et non poussiéreux aux comprimés.

d. Délitnant ou Désagrégeant : leur rôle est d'accélérer la désintégration du comprimé donc la dispersion du principe actif dans l'eau ou dans le suc digestif.

e. Agent d'enrobage (pelliculage) : Le pelliculage est un procédé permettant de déposer un film inerte physiologiquement et chimiquement sur un support solide (noyau), qui lui confère des avantages qu'une forme nue ne peut assurer, à savoir : masquer le goût ou l'odeur [15]. La formule d'une solution ou d'une suspension de pelliculage contient généralement un solvant, un polymère filmogène, un plastifiant et une substance de charges ou pigment.

La forme «comprimé» est l'une des plus importantes formes pharmaceutiques, elle représente environ la moitié des médicaments commercialisés. Ses avantages peuvent se résumer comme suit :

- ✓ Les comprimés sont faciles d'emploi;
- ✓ Le dosage est précis par unité de prise ;
- ✓ Un milieu sec et condensé est favorable à une bonne conservation ;
- ✓ La saveur désagréable des principes actifs peut être complètement masquée par enrobage ou pelliculage.

Néanmoins des inconvénients subsistent

- ✓ Le comprimé constitue une forme concentrée, ce qui fait que si le délitement n'est pas rapidement assuré, il peut être nuisible pour la muqueuse du tube digestif ;
- ✓ La mise au point est délicate.

I-1 Procédés de fabrication des comprimés

Les opérations précédant la compression sont différentes par leur principe, leur nombre, l'appareillage qu'elles nécessitent et les procédés de fabrications employés [19]. La granulation est le procédé primordial de ces opérations, ce dernier est utilisé afin de modifier la texture du mélange

pour que celui-ci se prête mieux à la compression. Elle permet de transformer les particules de poudres en agrégats solides plus ou moins résistants et plus ou moins poreux appelés *granulés* ou grains. Les propriétés physiques du grain vont permettre d'assurer au mélange initial de poudre :

- ✓ Une meilleure homogénéité ;
- ✓ Un écoulement optimal ; pour le remplissage unitaire ;
- ✓ Une meilleure cohésion des comprimés.

Selon les caractéristiques du principe actif, nous aurons recours soit à la *granulation par voie humide*, soit à la *granulation par voie sèche* [17].

I-1-1 Procédé de granulation par voie humide

Ce procédé est très utilisé dans l'industrie pharmaceutique, il comporte plusieurs phases [19] :

a. Humidification ou mouillage : La poudre ou le mélange à granuler est additionné d'un liquide de mouillage ;

b. Granulation : Cette opération s'effectue au moyen de « granulateur » dont le rôle est de soumettre la masse humidifiée à une pression mécanique, pour former des particules plus ou moins sphérique ;

c. Séchage: C'est l'opération qui consiste à éliminer partiellement un solvant, généralement l'eau, contenu dans un granulé afin de l'amener à un taux d'humidité résiduelle convenant le mieux à son passage en compression ou en conditionnement primaire. La vitesse de séchage est fonction de différents paramètres intrinsèque et extrinsèque du produit à sécher :

✓ **Paramètres intrinsèques :** Surface à sécher, teneur initiale en solvant, la sensibilité du produit à la chaleur ...etc.

✓ **Paramètres extrinsèques :** Conditions opératoires (température de l'air, humidité et volume de l'air...etc.).

d. Broyage et Tamisage (calibrage) : Pour avoir des grains de dimension bien déterminée, il est nécessaire d'effectuer un tamisage. Cette opération permet en outre de séparer les grains qui se sont collés entre eux. Le tamisage peut éventuellement être précédé d'un léger broyage afin de réduire la taille des particules.

I-1-2 Procédé de granulation par voie sèche

La voie sèche est utilisée lorsque le principe actif ne supporte ni l'humidité, ni le séchage par la chaleur. Pour assurer une cohésion convenable entre les particules, il est nécessaire, comme dans la granulation par voie humide, d'ajouter à la poudre à granuler des liants ou agglutinants sous forme de poudres sèches. Cette voie de granulation comporte deux phases [17]:

- a. Compactage :** il consiste à mettre le mélange de poudres dans l'entrefer de deux cylindres lisses tournant en sens inverse. La poudre est transformée en briquettes [14];
- b. Concassage et calibrage.** La poudre forme alors un ruban ou des plaques compactes qui tombent dans l'entrefer de deux cylindres crantés tournant en sens inverse et placés sous les précédents. La poudre compactée dans un premier lieu est ainsi transformée en grains dans un deuxième temps [14].

I-1-3 Procédé de compression directe

Il consiste à comprimer directement, sous forme de comprimé définitif prêt à être conditionné, un mélange de principe actif et d'adjuvants appropriés [19].

Les différents procédés de fabrication cités précédemment sont regroupés dans le schéma suivant :

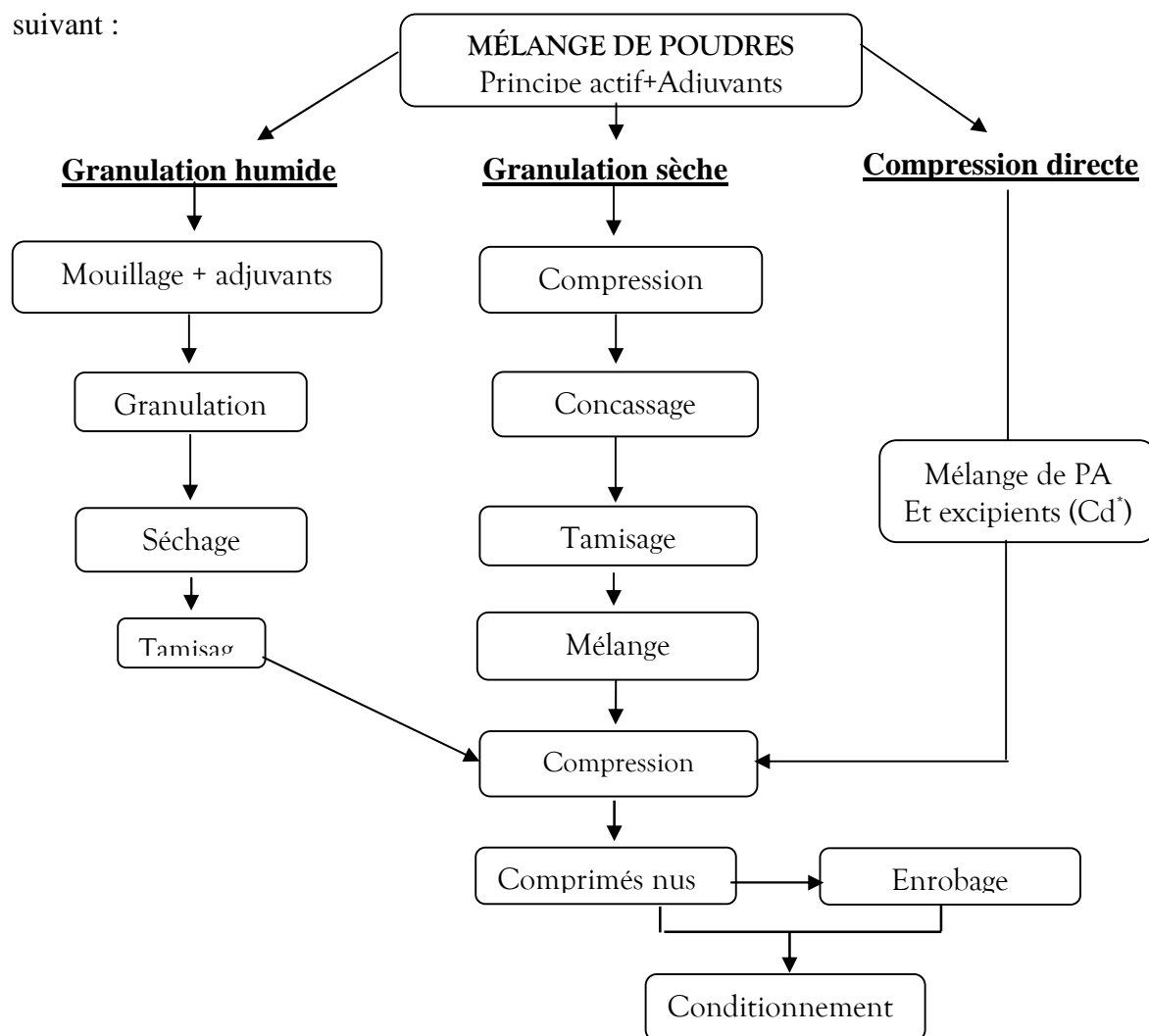


Schéma 01 : Différents procédés de fabrication des comprimés [15]

Cd : excipient pour compression directe.

I-2 Influence des propriétés techniques et du procédé de fabrication sur l'homogénéité et la qualité du produit fini

Dans une formulation le but est d'avoir un comprimé qui doit répondre à la fois à des contraintes techniques (homogénéité, cohésion adaptée, uniformité de poids) et à des contraintes thérapeutiques (délivrance de la dose dans un délai approprié).

L'homogénéité et la qualité d'une formulation sont influencées par un nombre de facteurs incluant les propriétés techniques des différents composants du mélange (l'aspect structural, la distribution granulométrique et les propriétés d'écoulement...etc.), les différents paramètres de fabrication (l'influence du temps de mélange, de l'humidité résiduelle ...etc.), ainsi que les étapes de fabrication (le séchage, l'alimentation mécanique au cours de la compression...etc.).

Le mélange est une opération fondamentale, car il intervient dans la fabrication de toutes les formes pharmaceutiques ; son objectif est de rendre aussi homogène que possible une association de plusieurs produits qui peuvent être solides, pâteux, liquides ou gazeux, et d'assurer l'uniformité de teneur du produit fini [20].

Un *mélange parfait* est un mélange se trouvant dans un état idéal lorsqu'il aboutit à une distribution homogène des particules ; ce type de mélange présenterait une homogénéité absolue invariable en fonction de la taille du mélange de poudres. Ce cas de figure n'existe pas en industrie pharmaceutique ; les formulateurs sont généralement confrontés à des mélanges aléatoires présentant une diminution de l'homogénéité quand la masse de poudre est augmentée. L'obtention de produits finis non conformes en termes d'uniformité de teneur démontre que le procédé du mélange est inadéquat. Il est donc recommandé de bien maîtriser ce procédé.

L'homogénéité de la teneur et la qualité finale de la formulation sont influencées par :

I-2-1 Propriétés techniques des constituants du mélange

Un mélange solide est un milieu hétérogène de plusieurs poudres

✓ C'est un *milieu polyphasiques* où l'on trouve bien entendu des particules solides, mais aussi une phase gazeuse et des phases liquides (solvant résiduel, humidité adsorbée) ; donc il y a l'*existence de toutes les interfaces* : solide/solide, solide/liquide, solide/gaz ;

✓ Chaque particule est de *nature chimique différente* : des groupements fonctionnels différents et donc des propriétés superficielles différentes ;

✓ Chaque particule est de *structure* et de *morphologie différente* : toutes les particules n'ont pas la même taille, la même morphologie, la même porosité et la même rugosité de surface.

L'ensemble des procédés galéniques qui conduisent à des formes solides doivent prendre en considération, non seulement les caractéristiques chimiques, mais également les propriétés de l'état particulaire en terme de taille, de morphologie, qu'il s'agisse de principe actif ou excipients afin de garantir la reproductibilité des procédés de fabrication et des propriétés pharmaceutiques et biopharmaceutiques du médicament. Tous ces éléments justifient la connaissance des matières à l'échelle moléculaire (physicochimique) et au niveau particulaire (texture) qui, ensemble, créent la fonctionnalité des matières à l'échelle de la population de particules.

Le tableau suivant résume quelques propriétés à contrôler et à optimiser lors d'une formulation d'un comprimé.

Tableau 01 : Classification des propriétés des poudres

Propriétés primaires (physicochimique)	Propriétés secondaires (texture)	Propriétés fonctionnelles
Solubilité	Morphologie	Aptitude à l'écoulement
Teneur en eau (HR)	Distribution granulométrique	Aptitude au tassement

I-2-1-1 Caractérisation physico-chimique des matières

a. Solubilité : un des critères de classification et de sélection des excipients et de procédé de fabrication.

b. Teneur en eau d'un mélange de poudre : Elle est déterminée par l'environnement de fabrication, de manipulation et de stockage des poudres (humidité relative de l'air) et la nature de chacun des composants du mélange (hygroscopicité).

- Si l'humidité est trop faible (grain sec), les comprimés vont manquer de cohésion et la friabilité sera importante ;
- si l'humidité est importante, il y aura un collage du grain sur les poinçons.

I-2-1-2 Caractérisation texturale des particules ou agglomérats

a. Morphologie

L'évaluation de la morphologie requiert l'observation directe des particules à l'aide d'un microscope. Cette information est un complément important de la granulométrie car elle permet de contrôler la sphéricité des particules.

b. Distribution granulométriques

Une répartition granulométrique étroite des différents constituants du mélange est recherchée afin d'améliorer l'efficacité du mélange. En effet, il est préférable d'avoir une poudre homogène, c'est-à-dire mono distribuée. Pour obtenir un bon mélange, la granulométrie d'un principe actif et des excipients doit être la plus rapprochée possible.

I-2-1-3 Caractérisation du comportement globale.

a. Ecoulement

L'augmentation de la capacité d'écoulement d'un mélange de poudre est recherchée, ceci est faisable par la modification de certains paramètres tels que la forme, l'état de surface des grains ou par l'adjonction d'un agent d'écoulement dans la formulation.

La capacité d'une poudre à s'écouler plus ou moins facilement dépend de :

- la forme des particules;
- la présence des cavités;
- la différence de densité de chaque constituant du mélange de poudre.

b. Aptitude au tassement

Le but de la granulation est surtout de modifier la texture du mélange pour augmenter sa densité, ceci afin qu'il s'écoule bien et qu'il y ait le moins d'air possible entre les particules. La présence d'air en proportion importante gênerait la compression.

I-2-2 Paramètres et les étapes de fabrication

I-2-2-1 Temps du mélange [21]

Le développement du procédé de mélange requiert une détermination exacte et précise du temps optimal de mélange, pour une homogénéité constante de la qualité du granulé.

I-2-2-2 Vitesse de mélangeur [22]

Une vitesse suffisante et juste est requise pour atteindre l'homogénéité du mélange en un temps acceptable :

- ✓ Une vitesse trop lente obligera à prolonger le temps de mélange ;
- ✓ Une vitesse trop élevée génère un soulèvement de poussière.

NB : Il existe un volume optimal de remplissage pour l'obtention rapide et efficace d'un mélange homogène. Pour atteindre les meilleures performances, le mélangeur doit être rempli d'un volume de 50 à 80 % de son volume nominal.

I-2-2-3 Compression

Le but de ce procédé est d'obtenir un compact de poudre homogène, sans défaut, de masse uniforme et de cohésion adaptée [17].

L'uniformité de teneur des échantillons d'un mélange de poudre destiné à la compression n'est pas un bon indicateur de celle du produit fini.

La stabilité d'un mélange ordonné est réversible et peut conduire à un démélange par le phénomène de ségrégation : lorsque le mélange glisse sur un plan incliné au moment où le manipulateur vide le mélangeur ou sous l'effet de secousse de vibration (survenant au cours du tamisage, au cours du chargement de la poudre dans la trémie d'alimentation de la machine à compression...), il se forme des espaces libres dans lesquels se glissent plus facilement les particules les plus denses, et qui finalement peuvent se retrouver toutes réunies au fond du récipient (figure 3) [23]. La ségrégation survient par manque d'interaction, par différence de taille, mais aussi par différence de densité, le mécanisme le plus similaire à la ségrégation est la percolation ; le principe actif le plus fin tend à traverser et s'encaster à travers les espaces entre les particules d'excipients de grossière granulométrie, entraînant une séparation des deux composants.

NB : Les vibrations peuvent dans certains cas poursuivre l'opération de mélange

Il existe deux types de machine à compression ; des machines alternatives et des machines rotatives. Quelque soit le type de la machine utilisée, la compression suit toujours quatre étapes successives.

- ✓ L'alimentation ou le remplissage de la chambre de compression : se fait par simple écoulement du grain; le poinçon supérieur est relevé, le poinçon inférieur est en position basse qui est réglée avec précision pour avoir un volume bien déterminé;
- ✓ Arasage : le sabot se déplace horizontalement (pour reprendre sa position initiale) en éliminant l'excès de grain au niveau supérieur de la matrice ;

✓ La compression proprement dite : le poinçon supérieur descend brutalement et comprime avec force le grain ;

✓ Ejection : remontée du poinçon inférieur qui amène le comprimé au bord supérieur de la matrice.

Les éléments clé de ces quatre temps de la compression sont :

- L'importance du volume de poudre à comprimer.
- La régularité du remplissage de la chambre de compression.
- Les caractéristiques de la poudre (grain).

Le réglage de la masse et de la dureté des comprimés se fait de la façon suivante :

Masse : le volume de la chambre de compression est ajusté en réglant par tâtonnement la position du poinçon inférieur.

Dureté : elle est ajustée par le réglage de la course du poinçon supérieur, plus celui-ci descendre, plus le comprimé sera dur.

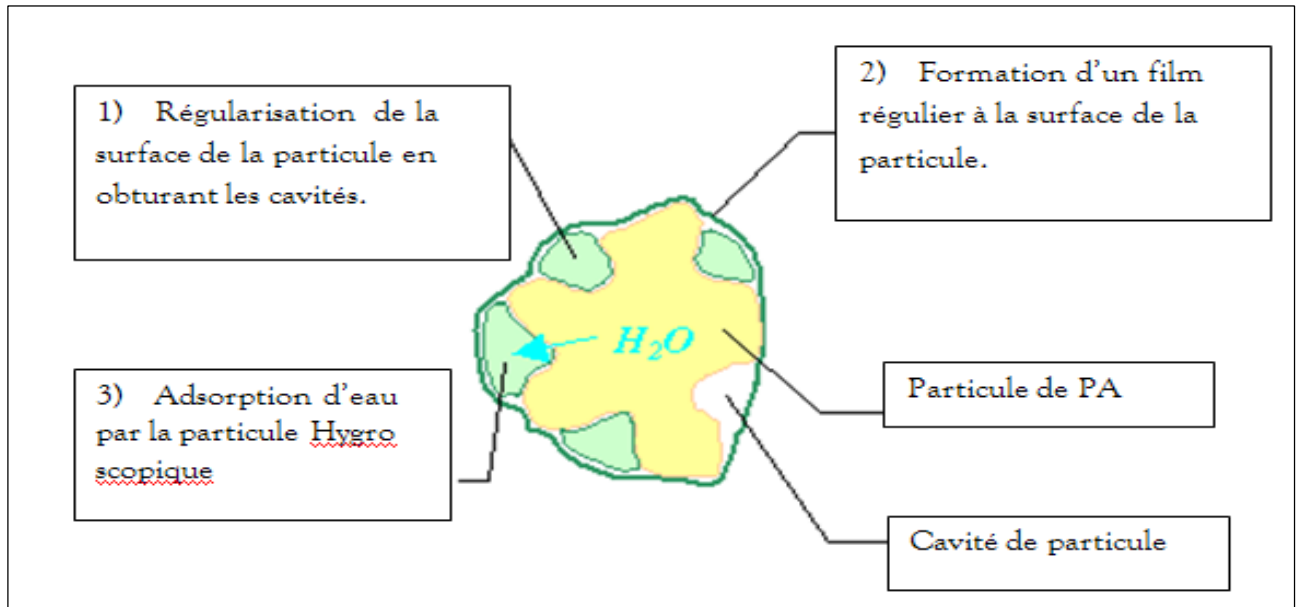


Figure 02 : Description des principaux rôles d'un lubrifiant

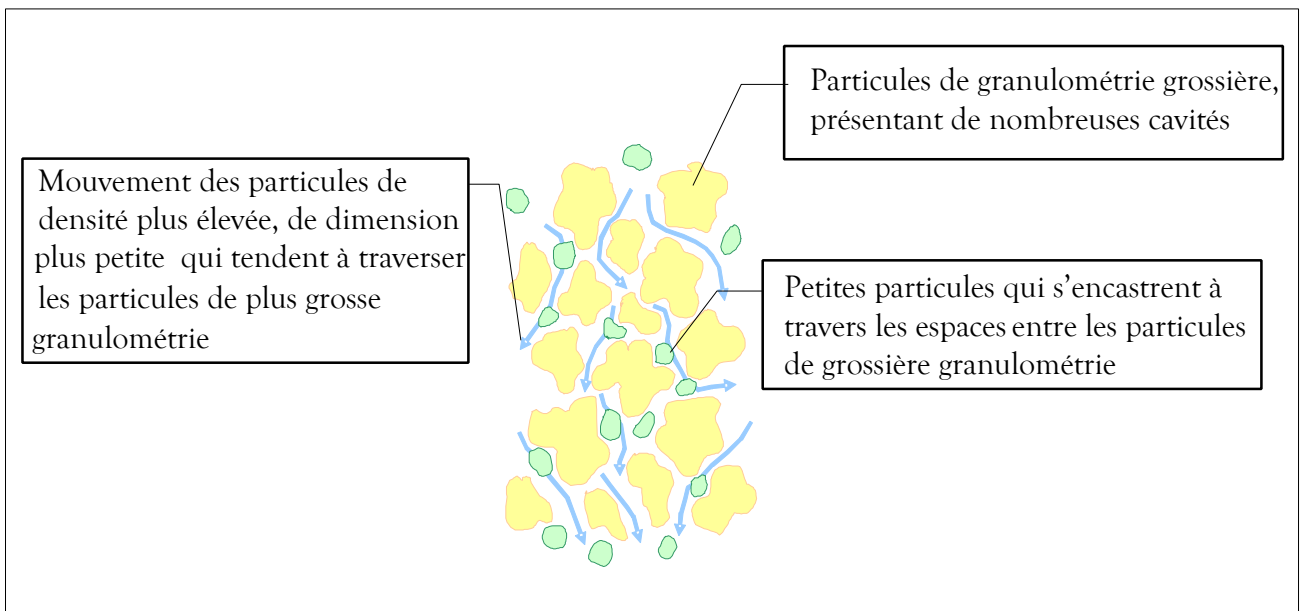


Figure 03 : Description du phénomène de ségrégation

PARTIE II : Partie Expérimentale

Matériels utilisés : Annexe (02)

La liste du matériels et réactifs est donnée ci-après

- Balance analytique
- Balance dessiccateur infrarouge
- Mélangeur granulateur
- Etuve pour séchage OLSA
- Plateaux en inox
- Comprimeuse KILIAN RTS32
- Calibrateur FREWITT avec grille de 1,6mm d'ouverture de la maille
- Turbine de pelliculage
- Blistereuse
- Dissolutest «pharmatest » contient huit réacteurs de 1000 ml de capacité, plateau mobile portant 08 tiges d'agitation.
- Spectrophotomètre «JASCO V530 »
- Pompe
- Agitateur magnétique
- pH mètre.

Réactifs :

- Dihydrogenophosphate de potassium
- Acétate de sodium
- Acide chlorhydrique
- Soude.

Matière première :

- Metformine chlorhydrate
- Povidone K30
- Stéarate de magnésium
- Propylène glycol
- Dioxyde de titane
- Hydroxypropylméthylcellulose

Partie II : Etude Expérimentale

Dans le cadre de cette étude expérimentale, notre démarche empirique empruntée pour aboutir à l'objectif fixé est constituée de trois étapes principales :

1-*Une étude d'orientation* faite à partir d'une caractérisation de la spécialité de référence « *Glucophage[®] 1000mg* » sur les plans pharmacotechniques et biopharmaceutiques, permettant ainsi de faire ressortir les différentes spécifications de ce produit, et en s'inspirant aussi du dossier de formulation de « *Diaguanide[®] 850mg* » qui est fabriqué par le Groupe SAIDAL. Au terme de cette étude d'orientation, nous avons fait ressortir les réponses caractéristiques qui serviront dans la phase de formulation

2-*Une étude de préformulation* qui permet d'inventorier l'ensemble des facteurs de formulation et de procédé susceptibles d'influencer notre système.

3-*Une étude de formulation* qui a pour but de réaliser des essais en vue de définir l'optimum. Cette étape est finalisée par la validation de ce dernier.

II-1 Étude d'orientation : Caractérisation de la spécialité de référence

II-1-1 Caractérisation générale : Ces caractéristiques sont regroupées dans le tableau suivant :

Tableau 02 : Informations sur la spécialité de référence.

D.C.I	Metformine chlorhydrate
Forme	Comprimé pelliculé sécable
Fabriquant	MERCK santé France
Nom commercial	GLUCOPHAGE [®] 1000 mg

II-1-2 Caractérisation pharmacotechnique

Les caractérisations pharmacotechnique du produit de référence sont regroupées dans le tableau suivant :

Tableau 03 : Caractérisation pharmacotechnique de la spécialité de référence

Test	Moyenne	CV	
Poids	1053,6 mg	0,002	3,07
Dureté	18,76 K _p	0,027	0,52
Friabilité	0,26 %	/	/
Temps de délitement	9,2 min	/	/

II-1-3 Caractérisation biopharmaceutique

A côté des essais in vivo nécessaires pour connaître la biodisponibilité des produits, ainsi que l'activité qui en découle, des tests in vitro sont indispensables pour connaître la cinétique de libération du principe actif à partir de la forme médicamenteuse dans laquelle elle est incluse [27]. Les caractérisations biopharmaceutiques de la spécialité de référence sont réalisées en effectuant le test de dissolution (page 27). D'après le profil de dissolution de la spécialité de référence, on peut dire qu'il s'agit d'une forme à libération immédiate.

II-1-4 Formule qualitative

Les différents constituants rentrant dans notre formulation, ainsi que leurs rôles, sont résumés dans le tableau (04).

a. Liant : Le liant que nous avons utilisé dans notre formulation est le Povidone K₃₀ ([C₆H₉NO] n).

b. Lubrifiant [17] : le stéarate de magnésium [CH₃ (CH₂)₁₆COO]₂ Mg, est l'additif le plus utilisé pour augmenter les propriétés d'écoulement d'un mélange de poudre.

Les caractéristiques et les avantages du stéarate de magnésium sont :

1) Il possède une chaîne hydrocarbonée suffisamment longue pour séparer physiquement les fines particules.

2) Il forme un film hydrophobe continu entourant chaque particule prise individuellement : l'écoulement de la poudre est alors amélioré.

Afin de masquer le goût amer prononcé de la Metformine, nous avons procédé au pelliculage

c. Solution de pelliculage : Le réseau du vernis est constitué d'un agent filmogène associé à un agent plastifiant et à un opacifiant.

➤ **HPMC :** est un polymère à base de cellulose, c'est une matière de choix pour les caractéristiques suivantes :

- Solubilité dans le milieu gastro-intestinal.
- Absence de goût et d'odeur
- Stabilité à la chaleur, la lumière, l'air et l'humidité

- **Propylène glycol C₃H₈O₂ (plastifiant) [24]** : il est capable de modifier les propriétés physiques du polymère pour le rendre plus flexible et donc plus apte à la filmification
- **Dioxyde de titane TiO₂(pigment) [24]** : C'est un puissant agent de blanchissement, il renforce la protection des principes actifs photosensibles.

Pour la formule qualitative et quantitative de la solution de pelliculage, on a rien modifié par rapport au « **Diaguanide® 850 mg** ».

Tableau 04 : Formule qualitative du produit générique.

	Constituants	Rôle
Phase interne	Metformine chlorhydrate	Principe actif
	Povidone K ₃₀	Liant
Phase externe	Stéarate de magnésium	Lubrifiant
Pelliculage	Propylène glycol, dioxyde de titane	Solution A de pelliculage
	Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC)	Solution B de pelliculage

II-2 Etude de préformulation et formulation

II-2-1 Caractérisations physicochimiques des matières premières.

II-2-1-1 Caractérisation du principe actif.

La caractérisation physico-chimique de la Metformine chlorhydrate est réalisée selon la pharmacopée américaine (USP 30) et les tests réalisés sont :

- a) **Test d'identification** : il comporte essentiellement les tests suivant : Infrarouge, test des chlorures, perte à la dessiccation, résidu à la calcination et les métaux lourds.
- b) **Substances apparentées**
- c) **Dosage de la matière première**

Ces trois tests ont fait l'objet d'un mémoire de fin d'études en vue de l'obtention d'un diplôme ingénieur d'états en génie des procédés, option génie pharmaceutique à l'université de Ahmed BOUGUERA (UNH) Boumerdes «Octobre 2009 ». Les résultats sont tous conformes.

II-2-1-2 Caractérisation des excipients

Les caractérisations des différents excipients rentrant dans notre formule sont réalisées au niveau de la filiale PHARMAL. Et les résultats sont tous conformes.

II-2-2 Optimisation de la formule quantitative et des paramètres de procédé

Dans cette partie d'étude, nous nous intéressons à l'optimisation des paramètres de procédé, principalement les facteurs d'homogénéité et les facteurs de formulation (formule quantitative). Pour ce la nous avons varié la composition quantitative de divers excipients, les étapes et les paramètres de fabrication de telle sorte à obtenir un produit possédant les meilleures caractéristiques et similaire à la spécialité de référence.

Pour le mode de granulations nous avons opté pour la granulation par voie humide, Pour ce faire, nous devons suivre les étapes énoncées dans la partie synthèse bibliographique (07).

II-2-2-1 Facteurs étudiés

A l'issue de l'étude d'orientation et de pré formulation, nous avons choisi cinq facteurs. Ces facteurs s'avèrent parmi les plus importants et les plus sollicités lors d'une formulation d'un comprimé à base de Metformine. Le tableau suivant résume les facteurs susceptibles d'influencer sur la qualité de notre formulation et les réponses choisies (à optimiser).

Tableau 05 : Facteurs et réponses choisis pour la réalisation des essais d'optimisation.

Facteurs		Réponses	
Formule quantitative	Procédé de fabrication	pharmacotechnique	biopharmaceutique
- Quantité du liant	-Durée de granulation	-Dureté	-Test de dissolution
- Quantité du lubrifiant	-Durée de séchage des comprimés	-Friabilité	(taux de libération de PA en fonction du temps)
	-Humidité résiduelle HR	-Temps de délitement	
		-Ecoulement	
		-Homogénéité	

Dans la limite de variation des facteurs de la formulation nous devons prendre en considération les contraintes exigées par le Hand Book of Pharmaceutical Excipients (tableau 06), et les contraintes techniques et économiques

Tableau 06 : Fourchette tolérée pour la variation de la quantité des excipients [24]

Facteurs	Intervalles de variation
Povidon K ₃₀	[0,5-5] % (m/m)
Stéarate de magnésium	[0,25-5] % (m/m)

II-2-2-2 Réalisation des essais

Pour la réalisation des essais nous avons établi un prototype de mode opératoire (tableau 07), dans chacun des essais, nous modifions seulement les valeurs de (X_i) et sur chaque étape nous effectuons des contrôles de conformité.

Tableau 07 : Etapes de fabrication (essai sur un kilogramme)

Etape	Chronologie des opérations	Contrôle in process
Préparation de la solution Liante	Dans un Becher, chauffer 60 ml d'eau purifiée à 60°C. Introduire progressivement (X_1) de Povidon K ₃₀ et mélanger.	Aspect
Mélange des poudres	Dans le mélangeur granulateur, introduire (950g) de Metformine chlorhydrate préalablement tamisé, émotter pendant 05 min	Vitesse, durée
Granulation	Enclencher le granulateur tout en incorporant la solution liante. Pendant une durée de (X_2)	Vitesse, durée
Séchage du grain	Répartir le grain sur des plateaux et le mettre dans l'étuve à une température comprise entre 20 à 25°C. jusqu'à (HR) soit égale à (X_3).	Durée, humidité résiduelle
Calibration	Le calibrage du grain se fait sur un calibre oscillant muni d'une grille d'ouverture de maille 1,6 mm.	Aspect granulométrique
Lubrification	Dans le mélangeur granulateur ajouter au grain calibré (X_4) de stéarate de magnésium agiter pendant (X_5) min	Durée, vitesse, titre tassement
Compression	Le grain est comprimé sur une machine rotative, le diamètre du poinçon est de 16 mm et le poids moyen des comprimés est 1,05 g	Contrôle pharmaco-technique
Séchage des comprimés	Les comprimés sont recueillis dans des plateaux puis placés dans l'étuve pour le séchage à une température comprise entre 20 et 25°C pendant une durée de (X_5).	Durée, dureté
Préparation de la solution de pelliculage	<u>Préparation de la solution aqueuse (A)</u> Dans un Becher, introduire 100 ml d'eau, ajouter sous agitation une quantité (X_6) propylène glycol et (X_7) oxyde de titane. <u>Préparation de la solution (B)</u> . Dans un Becher chauffer à 85°C 600 ml d'eau, disperser sous agitation (X_8) de HPMC. Mélanger les deux 02 solutions (A) et (B),	Aspect
Pelliculage	Température 80 à 82°C, rotation de la turbine 1,3 à 2 t/mi Vitesse de pulvérisation : 2 à 5%	Aspect, poids moyen des comprimés
Conditionnement	<ul style="list-style-type: none"> → Primaire se fait dans des plaquettes de PVC/ALU → Secondaire se fait dans des étuis en carton 	/

Les essais réalisés sont classés dans le tableau suivant :

Tableau 08 : Matrice d'expérience codée.

N° d'essais	X ₁ (Qté de liant)	X ₂ (duré de granulation)	X ₃ (H _R)	X ₄ (Qté de lubrifiant)	X ₅ (durée de séchage)
001	-0,11	07	5,53	-0,052	0
002	-0,11	07	4,74	-0,052	0
003	-0,11	07	3,90	-0,052	0
004	-0,11	10	3,37	-0,052	0
005	-0,11	12	3,48	-0,052	0
006	-0,11	13	4,12	-0,052	0
007	-0,11	15	3,65	-0,052	0
008	-1	15	3,51	0,79	0
009	0,88	15	3,92	-1	0
010	0,11	15	3,63	-0,263	0
011	0,33	15	3,45	-0,473	0
012	0,33	15	3,28	-0,473	6
013	0,33	15	3,53	-0,473	12
014	0,33	15	3,71	-0,473	16

NB : Les valeurs de X₁ et X₄ sont en coordonnées centrées réduites

Une fois, la matrice d'expérience est définie, nous passons à la réalisation des essais de formulation. Ces derniers sont réalisés selon un procédé de fabrication bien défini. Sur chacun des essais, des contrôles en cours et en fin de fabrication sont effectués conformément aux spécifications et exigences pharmaceutiques (pharmacopées)

II-2-2-3 Détermination et validation de l'optimum.

Pour la validation de l'optimum, nous avons suivi les mêmes étapes de fabrication que ceux utilisés lors de l'essai 14 et en vérifiant la répétabilité des résultats.

II-2-3 Contrôle de conformité

Pour le contrôle de conformité, nous avons réalisé deux types de contrôles

II-2-3-1 Contrôle en cours de fabrication (in process) [25].

a- Tassement

L'essai de tassement est réalisé afin d'évaluer la plus ou moins grande aptitude d'un grain à se tasser, en déterminant les volumes apparents avant et après tassement.

Dans une éprouvette sèche de 250 ml graduée, on introduit sans tasser 100 g du grain, et on lit le volume apparent (V_0) [on doit prendre une moyenne, car le niveau de grain dans l'éprouvette n'est pas uniforme], puis on fait subir à l'éprouvette 10 puis 490 coups, et on note les volumes apparents correspondants $V_{10 \text{ moy}}$ et $V_{500 \text{ moy}}$.

L'aptitude au tassement est calculée par la relation suivante :

Norme : le volume doit être inférieur à 20ml

$$V = V_{10 \text{ moy}} - V_{500 \text{ moy}} \dots (1)$$

b- Ecoulement

On fait écouler une masse de 100 g du grain dans un entonnoir normalisé, et on note le temps exact, on répète l'opération trois fois, puis on calcule la moyenne.

Norme : Un bon écoulement est représenté par un temps d'écoulement inférieur à 10 secondes.

c- Analyse granulométrique (tamisage)

Son principe de base consiste à répartir un matériau pulvérulent en faisant passer une masse connue à travers une phase stationnaire de tamis soumis à des vibrations. Chaque fraction est ensuite pesée pour déterminer la distribution granulométrique.

d- Mesure de l'humidité résiduelle

Le taux d'humidité est mesuré à la fin de l'opération de séchage de grain (HR). Pour le mesurer nous avons utilisé un dessiccateur infrarouge.

e- Dosage analytique du grain [26].

e-1. Préparation des solutions.

Ce contrôle consiste à doser le principe actif à trois niveaux du mélange final, afin de vérifier son homogénéité. Pour cela, trois échantillons sont prélevés sur ce dernier puis

analysés séparément par spectrophotométrie UV. Le protocole opératoire effectué sur chaque échantillon prélevé est le suivant :

e-1-a Solution standard : Préparer une solution étalon de (10 µg/ml) de Metformine chlorhydrate (Substance Chimique de Référence) dans l'eau distillée.

e-1-b Solution échantillon : Peser l'équivalent de 20 comprimés (en grain). Transférer une quantité équivalente à 100 mg de Metformine chlorhydrate dans une fiole de 100 ml. Ajouter 70 ml d'eau, mélanger pendant 15 minutes, compléter au volume avec l'eau et filtrer.

Solution (A) : diluer 10 ml de filtrat dans 100 ml d'eau

Solution (B) : diluer 10 ml de la Solution (A) dans 100 ml d'eau.

e-2 Lecture : déterminer l'absorbance de la solution standard et la solution (B) en utilisant l'eau comme blanc (0) à une longueur d'onde de 232 nm.

e-3 Calcul. La quantité en mg de Metformine chlorhydrate contenu dans 100 mg du grain est calculée par l'équation (02)

$$Q \text{ (mg)} = 10 * C * (A_w / A_s) \quad \dots (2)$$

Où **C** : concentration de la solution standard en (µg /ml)

A_w et **A_s** sont respectivement les absorbances de la solution essai (solution B) et la solution standard respectivement.

II-2-3-2 Contrôles pharmacotechniques, biopharmaceutiques et analytiques réalisés sur le produit fini. [25].

Ces contrôles sont des tests que nous devons effectuer afin d'assurer que notre produit répond aux normes. Il comprend généralement les tests suivants :

a- Temps de délitement

Cet essai est destiné pour la détermination de l'aptitude des comprimés à se désagréger dans un milieu liquide pendant un temps prescrit.

b- Uniformité de masse

Elle consiste à vérifier le poids moyen d'un échantillon de vingt comprimés (20). Les poids individuels doivent se trouver dans des limites bien précises.

c- Friabilité

Cet essai est destiné à déterminer la quantité perdue en poids lorsque la surface des comprimés est endommagée ou présente des signes d'abrasion ou de rupture sous l'effet de chocs mécaniques [17]. Elle est calculée par la relation (03) :

P_0 : poids de comprimés mesurés avant le test (mg)

P_1 : poids de comprimés mesuré après le test (mg)

$$\text{Friabilité} = \left[\frac{(P_0 - P_1)}{P_0} \right] \times 100 \quad \dots(03)$$

d- Dureté

Le but de ce test est de déterminer, dans des conditions définies la résistance à la rupture des comprimés, mesurée par la force nécessaire pour provoquer leur rupture par écrasement.

e- Dosage des comprimés

Il sert à contrôler des paramètres critiques, notamment l'homogénéité des mélanges, ainsi que le dosage du principe actif dans le produit fini (cp).

Le dosage unitaire est calculé par la formule suivante :

$$T_{PF} (mg / cp) = \frac{DO_{ech}}{DO_{eta}} \times \frac{P_{eta}}{P_{ech}} \times \text{Titre} \times PM \quad \dots (4)$$

f- Dissolution

Les tests de dissolution in vitro ont été proposés pour prévoir le comportement in vivo de la formule. Ils sont un facteur clé dans le développement des formes pharmaceutiques solides. Ce paramètre a une importance capitale car la biodisponibilité d'un médicament dépend en grande partie de la dissolution de son principe actif.

Les principaux bénéfices des études de dissolution in vitro [27] :

- Réduction du temps et du coût de développement.
- Diminution des essais in vivo.
- Amélioration de la qualité biopharmaceutique des produits au profit de l'efficacité clinique et de la sécurité

Une méthode interne « CRD SAIDAL » a permis de valider un protocole appliqué à la Metformine dans le cadre des études de bioéquivalence in vitro.

L'étude de la dissolution in vitro est réalisée à l'aide d'un **Dissolutest** à paniers tournants, constitué de 8 récipients cylindriques à fond hémisphérique, d'une capacité de 01litre chacun. Ces récipients sont plongés dans un bain d'eau thermostaté qui permet de maintenir la température du milieu qu'ils contiennent à $37 \pm 0,5$ °C. Chaque récipient est muni d'un couvercle qui permet de limiter l'évaporation du milieu. Les couvercles comportent un orifice central par lequel est introduit verticalement un thermomètre, un dispositif de prélèvement du milieu ainsi qu'une tige en acier inoxydable munie d'un panier perforé.

Le contrôle se fait sur 6 comprimés prélevés au hasard sur un même essai. Chaque comprimé est placé dans un panier qui est plongé dans son récipient au moment de la mise en marche de l'appareil. L'agitateur fait subir aux 6 paniers placés à l'extrémité de chaque tige, une rotation constante pendant un temps déterminé durant lequel le principe actif diffuse dans le milieu de dissolution. La composition du milieu de dissolution dépend des caractéristiques du principe actif, notamment sa solubilité et son site d'absorption.

Remarque : deux récipients sur huit ne reçoivent pas de comprimés pour les raisons suivantes :

- L'un contient le milieu de dissolution vierge (blanc), c'est à dire à 0% de principe actif, pour que l'absorbance relative au milieu soit soustraite.
- L'autre contient le milieu de dissolution étalon, dont la concentration en principe actif correspond à la quantité maximale que peut libérer un comprimé. Le logiciel informatique prend l'absorbance de cette solution comme référence pour ses calculs.

Les conditions opératoires (voir annexe 01)

Partie III - Résultats et Discussions

Les résultats issus de l'étude expérimentale réalisée sur les différents essais seront discutés ci-après :

III-1 Résultats analytiques (dosage)

Les résultats du dosage analytique sont regroupés dans le tableau suivant :

Tableaux 09 : Principaux résultats analytiques

Essais	Echantillon	Résultats		Normes
001	Mélange final	Haut Milieu Bas	104,92% 88,46% 92,34%	[88,37-97,67%]
	Produit fini	984,27 mg/Cp		[950-1050 mg/Cp]
004	Mélange final	Haut Milieu Bas	87,27% 91,99% 93%	[88,37-97,67%]
	Produit fini	972,15 mg/Cp		[950-1050 mg/Cp]
005	Mélange final	Haut Milieu Bas	100,42% 98,87% 94,72%	[88,37-97,67%]
	Produit fini	1117,1 mg/Cp		[950-1050 mg/Cp]
006	Mélange final	Haut Milieu Bas	96,81% 90,80% 87,21%	[88,37-97,67%]
	Produit fini	1049,14 mg/Cp		[950-1050 mg/Cp]
007	Mélange final	Haut Milieu Bas	91,22% 95,69% 97,17%	[88,37-97,67%]
	Produit fini	968,1 mg/Cp		[950-1050 mg/Cp]
012	Mélange final	Haut Milieu Bas	94,75% 93,85% 95,09%	[88,37-97,67%]
	Produit fini	980,10 mg/Cp		[950-1050 mg/Cp]
013	Mélange final	Haut Milieu Bas	93,94% 94,77% 96,22%	[88,37-97,67%]
	Produit fini	980,13 mg/Cp		[950-1050 mg/Cp]
014	Mélange final	Haut Milieu Bas	96,32% 91,54 93,25	[88,37-97,67%]
	Produit fini	975,72 mg/Cp		[950-1050 mg/Cp]

III-2 Résultats pharmacotechniques

Les principaux résultats des tests pharmacotechniques sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau 10 : Résultats des essais de formulation (pharmacotechnie)

N° d'essai	HR	Écoulement (S)	Tassement (ml)	Dureté (Kp)	Friabilité (%)	Temps de délitement (mn)	Taux de fine (%)
1	5,53	9,70	13,30	4,53	1,15	3,11	16,2
2	4,74	7,90	17,20	4,85	3,254	3,26	18,3
3	3,90	8,50	15,20	6,38	1,022	4,01	15,1
4	3,37	7,70	09,10	10,34	0,451	5,19	17,9
5	3,48	8,00	12,12	9,89	0,541	8,74	23,1
6	4,12	7,50	14,20	9,45	0,621	7,58	18,5
7	3,65	6,90	13,21	10,98	0,451	8,54	14,3
8	3,51	5,80	12,36	8,20	0,642	6,25	16,6
9	3,92	8,90	12,50	11,03	0,487	7,23	21,0
10	3,63	7,50	11,10	09,10	0,596	6,81	14,5
11	3,45	7,20	11,30	10,46	0,472	7,52	17,8
12	3,28	7,10	10,80	13,62	0,249	9,28	16,5
13	3,53	6,30	11,60	15,74	0,289	9,37	14,5
14*	3,71	6,80	12,50	17,54	0,258	9,44	15,4

(*) L'optimum trouvé

III-3 Résultats biopharmaceutiques

Le test de dissolution consiste à suivre l'évolution de la quantité de principe actif libérée à chaque temps, L'essai de dissolution réalisé sur les deux produits dans les conditions opératoires citées ci-dessus, permet d'obtenir des profils de dissolution traduisant la quantité (le pourcentage cumulé) de principe actif dissout en fonction du temps (page 27), les valeurs trouvées sont regroupées dans les tableaux (Annexe 01).

Pour le générique nous avons utilisé les comprimés issus de l'essai 14.

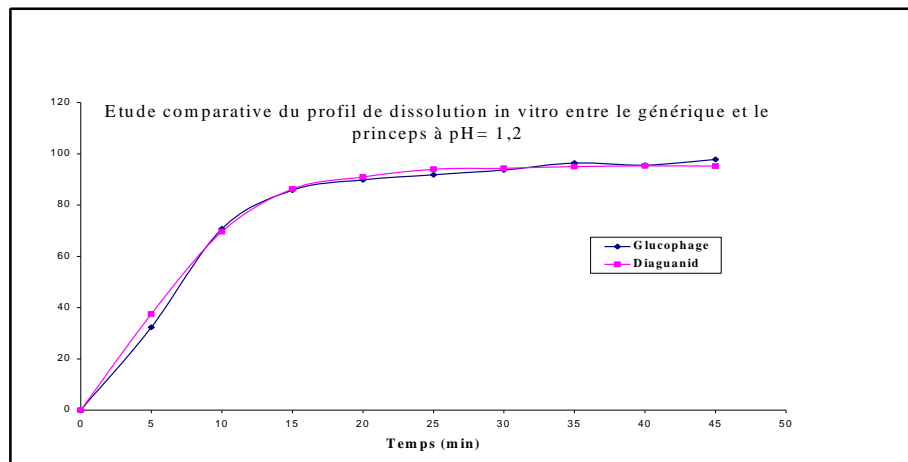


Figure 04 : Etude comparative du profil de dissolution in vitro à pH=1,2

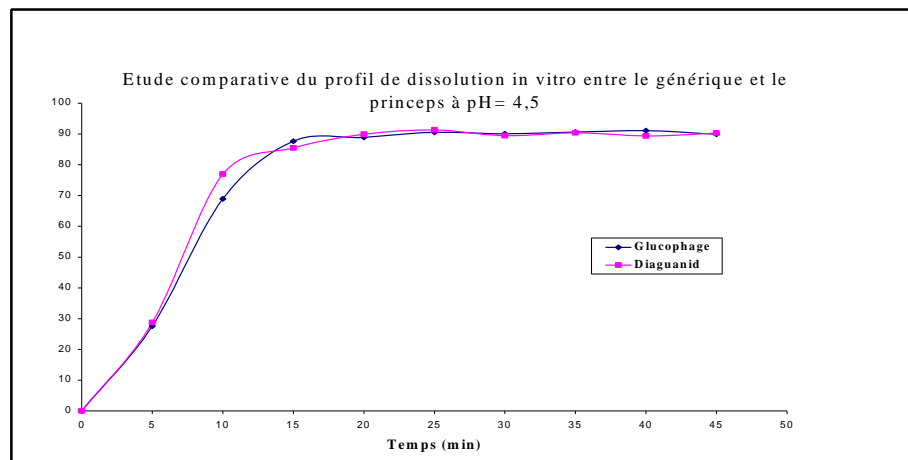


Figure 05 : Etude comparative du profile de dissolution in vitro à pH=4,5

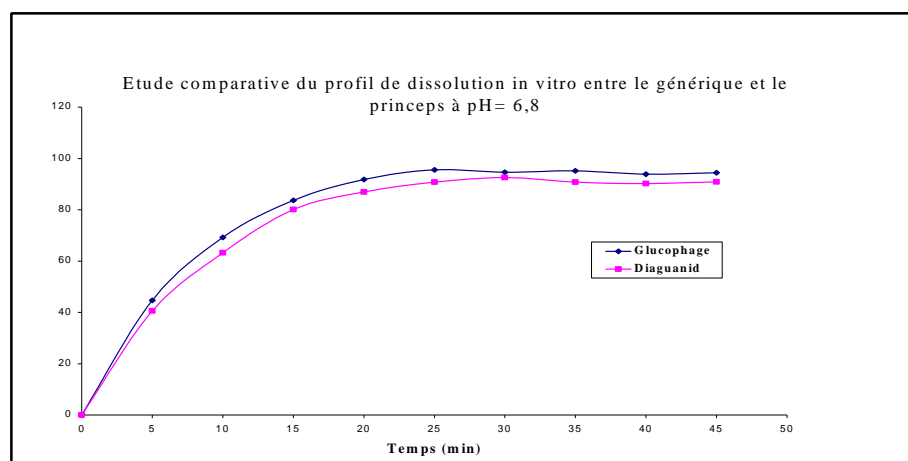


Figure 06 : Etude comparative du profil de dissolution in vitro à pH=6,8

III-4 Discussion des résultats

1- Etude paramétrique

- L'augmentation de l'humidité résiduelle (essai 01,02 et 03) a un effet néfaste sur l'écoulement du grain, ceci peut s'expliquer par l'agglomération due à l'élévation de la cohésion des particules.
- L'augmentation de la durée de granulation (essai 04, 05, 06 et 07) a donné un effet positif sur l'amélioration de la distribution des particules de principe actif.
- Le stéarate de Magnésium influe positivement sur l'écoulement du granulé jusqu'à atteindre une valeur de 5,8 secondes correspondant à une concentration maximale du stéarate dans la formule (essai 08, 09, 10 et 11), ceci peut être expliqué par le fait que le stéarate de magnésium en qualité de lubrifiant, permet d'augmenter la surface de contact entre les particules ce qui confie au mélange une bonne coulabilité.
- L'augmentation de la quantité de Povidone K₃₀ (essai 08, 09, 10 et 11) dans la formule pour un intervalle de [0,5–5%] augmente de façon significative la dureté. Celle-ci peut être traduite par le rôle du Povidone qui renforce les liaisons entre les particules et favorise l'agglomération et la cohésion des particules, et par conséquent, la dureté augmente.

Malgré la quantité importante du liant utilisée la dureté reste faible et insuffisante.

- Le séchage des comprimés (essai 12,13 et 14) conduit à une augmentation remarquable de la dureté ce qui est plausible car la diminution de l'humidité entraîne une augmentation de la dureté.

2- Etude de formulation

- a) Concernant les résultats analytiques du grain, une meilleure uniformité de teneur est observée pour l'essai 07 après 15 minutes de granulation
- b) Concernant les résultats pharmacotechniques du grain :
- L'écoulement des grains issus des différents essais est bon étant donné qu'ils s'écoulent tous en moins de 10 secondes.
 - Quant à leur aptitude au tassement, pour tous les essais, ils sont conformes et les valeurs trouvées ne dépassent pas 20 ml.
 - Au regard, des résultats granulométriques des différents essais, il est possible de faire le commentaire suivant : Le taux de fine de la majorité des grains a des valeurs voisines de 20 %. Ce taux représente le pourcentage de particules, dans le grain, ayant un diamètre inférieur à 180 μm . Plus le pourcentage de fines particules est inférieur à 20% plus le grain a des chances d'avoir des propriétés de fluidité intéressantes et facilite la compression du grain. Ce paramètre est indicatif de l'homogénéité granulométrique du grain
- c) Concernant les résultats pharmacotechniques du produit fini, les commentaires suivants sont faits (tableau 10) :
- Les 14 essais présentent des comprimés relativement peu friables à l'exception de trois (03) d'entre eux qui ont une friabilité dépassant 1%, cette anomalie est expliquée par une faible valeur de dureté (< 5 Kp).
 - Quant aux autres essais, les comprimés ont une dureté entre 8,2 et 17,54 Kp, ce qui reflète une cohésion satisfaisante des grains.
 - Concernant le temps de délitement, il est pour tous les essais qui sont conformes du point de vue friabilité et dureté au voisinage de 09 minutes qui est le temps pour lequel le produit de référence se délite.
- d) Concernant les résultats biopharmaceutiques

L'examen visuel des trois graphiques (page 27), correspondant à l'étude de la dissolution du principe actif en milieu gastrique artificiel, montre que le but recherché au niveau de la formulation galénique est pratiquement atteint.

- Allures similaires des courbes de dissolution des produits référence et test dans les trois milieux.
- Dans les trois milieux la libération maximale du PA au bout de 15 minutes et au-delà de ce temps un plateau graphique est atteint.

Nous sommes en présence d'une cinétique de dissolution rapide qui nous permet de classer notre produit dans la classe des produits à libération rapide ce qui coïncide avec la classification BSC (Biopharmaceutical Classification System).

Pour l'évaluation de la similarité entre les deux produits nous devons calculer le facteur F_2 .

$$F_2 = 50 \times \log \left(\left[1 + \left(\frac{1}{n} \right) \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2 \right]^{-0.5} \times 100 \right) \dots (6)$$

n : le nombre de prélèvement par comprimé.

R_t : la valeur de % dissout de référence pour chaque temps t .

T_t : la valeur de % dissout de test pour chaque temps t .

Après le calcul de F_2 en utilisant l'équation 06, Nous avons trouvé les valeurs suivantes

Tableau 11 : Valeurs de F_2 pour chaque milieu.

pH du milieu	La valeur de F_2 en %
1,2	81
4,5	75
6,8	68

Norme : Si F_2 est compris entre 50 et 100 les deux produits sont équivalents

D'après les valeurs de F_2 , nous pouvons dire que les deux produits (générique et princeps) sont similaires et il y a une forte probabilité que les deux formulations soient bioéquivalentes.

PARTIE III : Résultats Et Discussions

Conclusion

1- Conclusion

Le concept de qualité du mélange et de mise en forme d'un comprimé est difficile à atteindre puisqu'ils impliquent les paramètres physico-chimiques des composants de la formule galénique (taille, morphologie, distribution granulométrique, écoulement), et également les différentes paramètres et étapes de fabrication (le temps de mélange, le séchage...etc.)

C'est dans cette optique que ce travail vise à optimiser les différents paramètres de formulation afin de réduire et/ou minimiser tous les facteurs de variabilité entre les deux produits (générique et princeps) au point de vue bio pharmaceutique et pharmaco technique. A cet effet, une démarche méthodologique est adoptée, faisant appel à trois étapes : Etude d'orientation, étude de pré formulation et étude de formulation.

- Il ressort de l'étude d'orientation les différentes propriétés pharmacotechniques et biopharmaceutiques du produit de référence.
- Une étude de préformulation est entamée pour faire ressortir l'ensemble des facteurs de formulation et du procédé de fabrication ayant une influence sur notre système, le nombre de ces facteurs est égal à cinq.
- L'étape de réalisation des essais nous a permis de définir un optimum. Les grains et les comprimés issus de ce dernier ont présenté des meilleures réponses en termes d'homogénéité et des caractéristiques pharmacotéchniques principalement l'écoulement, la friabilité et la dureté.
- Les résultats biopharmaceutiques présentés sous forme de profil de dissolution in vitro donnent a première vue une allure similaire entre les deux produits, cette similarité a été confirmée par le calcul du F_2 . Les valeurs de ce dernier dans les trois milieux dépassent leS 68 %.

Les résultats obtenus, montrent une grande similarité entres les deux produits, donc il y a une forte probabilité que les deux formulations soient bioéquivalentes.

Pour pouvoir se prononcer sur l'interchangeabilité (princeps/générique) nous devons passer par une étude comparative in vivo pour les deux formulations.

2- Nouvelles pistes de recherche.

Partant des résultats de cette étude, des études peuvent se pencher sur plusieurs pistes et débouchés de recherche, nous proposons quelques problématiques :

Il serait utile d'entreprendre une autre investigation, dans une perspective de redévelopper une nouvelle formule, afin de minimiser ou d'éviter la durée de séchage des comprimés.

L'un des inconvénients techniques de la Metformine chlorhydrate, pour la préparation de comprimés, est la faible compressibilité de ce principe actif, associé à un faible pouvoir liant.

Afin de pallier à cet inconvénient, il a été proposé de fabriquer des comprimés par un procédé incluant une étape de granulation sèche ou par un procédé de compression directe. (Brevets Américains n° US 2003/0021841 et n° US 2003/0104049).

Les différents comprimés commercialisés de Metformine ayant une dureté initiale après fabrication, de l'ordre de 20 Kp, la dureté pouvait aller jusqu'à 40 Kp après quelques mois de stockage, Ce qui obligeait le patient à piler le comprimé pour obtenir une poudre grossière du médicament pour qu'il puisse être ingéré par voie orale [28]. En effet, l'accroissement au cours du temps de la dureté des comprimés entraîne simultanément une dégradation importante des caractéristiques de désintégration de ces comprimés. Ce phénomène mérite une étude approfondie sur le plan structural de principe actif du moment qu'il est majoritaire dans le comprimé.

Afin de surmonter les problèmes liés à la forme comprimés à base de Metformine décrits ci-dessus, nous proposons de remplacer la forme pharmaceutique comprimé par des préparations pharmaceutiques sous forme liquide "suspension buvable", ou bien l'incorporation d'un désintégrant dans la formule.

Afin de compléter l'effet hypoglycémiant de la Metformine, pour le traitement du patient, nous proposons aussi une association de la Metformine avec un second principe actif hypoglycémiant qui est actif à faible dose, à l'exemple de glibenclamide...etc.

CHAPITRE II : Aspect Pharmacologique et Analytique

Introduction

Pendant longtemps, les médecins et les pharmaciens ont prescrit et délivré des médicaments en s'appuyant sur le principe de l'équivalence, qui veut que la dose de principe actif reçue par l'organisme est celle qui est indiquée sur l'étiquette de la forme pharmaceutique.

En 1920, HANCE, est le premier qui a affirmé qu'un comprimé pouvait contenir une même quantité de principe actif mais cependant produire des effets pharmacologiques différents. Il faut ensuite attendre OSER, 1945 Pour remettre en cause le postulat selon laquelle le postulat « dose administrée égale dose absorbée » soit remis en cause. Jusqu'en 1954, on a observé des cas d'inéquivalences thérapeutique sans savoir s'ils incombaient à une insuffisance ou à une augmentation de leur biodisponibilité. D'où l'introduction d'un nouveau concept, celui de la bioéquivalence, fondé sur l'égalité d'un paramètre pharmaceutique de la forme galénique, la biodisponibilité, ou disponibilité physiologique [29].

L'étude de la biodisponibilité – cette nouvelle exigence– en matière de contrôle de qualité a récemment complété les études en vue de l'enregistrement des nouveaux médicaments. L'évaluation de ce paramètre est tout particulièrement indispensable lorsqu'on veut établir une étude de bioéquivalence entre deux médicaments. Dans ce contexte, deux problèmes d'ordre pratique surgissent d'emblée :

- En premier lieu de nombreux problèmes surgissent dès le moment où l'homme est impliqué dans l'expérimentation ; l'administration du médicament en vue de l'expérimentation va soulever des problèmes d'ordre éthique, soit parce qu'un médicament inconnu du genre humain va être utilisé pour la première fois chez l'homme, soit parce qu'un médicament connu est administré chez un volontaire sain. Cette situation est en contradiction avec le principe en vertu duquel le médicament sert à guérir et que l'humain sain n'a pas besoin de risquer des méfaits. Dans une étude pharmacologique on a recours à deux modes d'évaluation, soit l'effet ou bien la concentration sanguine, compte tenu de la grande de la fréquence difficulté d'appréciation d'un effet, le suivi des taux du principe actif au sein des milieux biologiques sélectionnés est le plus pratique. Cette méthode repose sur une hypothèse fondamentale qui est la corrélation entre l'effet et la présence en fonction de temps de la molécule active au niveau des sites récepteur. Ces sites étant le plus souvent inaccessibles, une autre hypothèse est qu'une corrélation existe entre le site d'évaluation de principe actif et son site d'action.

- Ensuite, la mise au point du dosage de l'analyte nécessite un discernement judicieux dans le choix de la méthode d'analyse; le faible volume des prélèvements sanguins, ainsi que la quantité de plus en plus infime en médicament dans l'échantillon et le faible rendement d'extraction, exigent des techniques très sensibles pour isoler, déceler, identifier et doser le médicament et/ou de ses métabolites dans des liquides biologiques.

La préparation des échantillons biologiques, préalablement à leur analyse chromatographique est un des aspects essentiels de la bioanalyse. Les interférences doivent être éliminées pour assurer à la technique d'analyse une sélectivité et une sensibilité adéquates. Il s'agit, à la fois d'améliorer l'efficacité du dosage par l'élimination des protéines et des composés endogènes susceptibles d'interférer au niveau du chromatogramme et de concentrer les analytes pour atteindre le domaine de sensibilité compatible avec les niveaux attendus du détecteur.

Il est important d'utiliser une méthode analytique validée pour obtenir des résultats fiables qui pourront être ainsi interprétés de façon satisfaisante.

Notre objectif dans cette partie d'étude consiste en la mise au point et validation d'une méthode de dosage de la Metformine dans le plasma et l'optimisation d'un protocole expérimental en vue de l'appliquer à des études in vivo ultérieures.

PARTIE I : Synthèse Bibliographique

SECTION I-1 : Aspect pharmacologique

I-1-1 Définition juridique d'un médicament générique

On entend par médicament

« Toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales, et tous produits pouvant être administrés à l'homme ou à l'animal en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, corriger et modifier ses fonctions organiques » [30]

« Tout générique qui a la même composition qualitative et quantitative en principe(s) actif(s), la même forme pharmaceutique sans indications nouvelles et qui est *interchangeable* avec le produit de référence du fait de sa *bioéquivalence* démontrée par des études appropriées de *biodisponibilité* » [30] .

Un médicament est soit un princeps (spécialité de référence) soit un générique, ces deux catégories partagent entre eux certaines similitudes et renferment quelques différences.

Tableau 12 : Comparaison entre un médicament générique et un médicament princeps

Identique	Semblable	Différent
- Principe actif - Dose unitaire - Voie d'administration - Schéma posologique - Indication thérapeutique	- Forme Pharmaceutique - Stabilité - Biodisponibilité	- AMM* - Nom commercial - Prix et Emballage - Composition qualitative et quantitative en excipients

AMM : Autorisation de la Mise sur le Marché

I-1-2 Devenir du médicament dans l'organisme

Traiter une maladie par voie interne revient à réaliser au site d'action une concentration optimale en principe actif. Entre le moment de l'administration du médicament et celui de l'obtention de l'effet, ce dernier doit franchir plusieurs barrières, il doit se déliter, le principe actif doit se dissoudre et parcourir un cheminement relativement long, plein d'obstacles avant d'atteindre les cellules cibles. En outre, il rencontrera sur son passage un bon nombre de membrane à franchir, et souvent un métabolisme gastro-intestinale ou hépatique.

Toutes ces étapes peuvent être groupées en trois phases appelées phases bio pharmaceutique, pharmacocinétique et pharmacodynamique. Dans une étude de bioéquivalence nous nous intéressons plus à la pharmacocinétique, car elle englobe un ensemble de paramètres qui nous permettent de mieux suivre le parcours et le devenir du médicament dans l'organisme.

I-1-2-1 Phase biopharmaceutique [31]

Cette phase comporte les étapes de la mise à disposition :

a. Libération

Elle se fait généralement par désintégration de la forme solide suivie d'une désagrégation en particules de petite taille pour faciliter la dissolution, qui est l'étape suivante de la mise à disposition.

b. Dissolution

Pour traverser les membranes biologiques, le principe actif doit être dispersé à l'état moléculaire. La vitesse de dissolution du principe actif dépend de ses caractéristiques physicochimiques.

I-1-2-2 Phase pharmacocinétique [32]

Nous pouvons considérer la pharmacocinétique comme l'étude du devenir du médicament dans l'organisme ou encore comme l'étude de l'influence de l'organisme sur le médicament. L'organisme peut réagir vis-à-vis de la molécule qui lui a été administrée en limitant son absorption, en l'inactivant et en l'éliminant par les différentes voies (rénale, digestif et pulmonaire).

La pharmacocinétique englobe l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'élimination.

a. Absorption [32]

C'est le processus par lequel le principe actif passe de son site d'administration à la circulation générale. L'absorption d'un médicament par le système gastro-intestinale constitue un processus complexe, elle est conditionnée par l'aptitude du principe actif à franchir les barrières biologiques et peut être influencée par de nombreux facteurs tels que : le métabolisme de premier passage intestinal ou hépatique, les facteurs physiologiques tels que la vidange gastrique et les interactions médicamenteuses au niveau du tube digestif.

b. Distribution [31]

Après leur absorption, le principe actif va être distribué aux différents tissus par la circulation sanguine.

c. Elimination [31]

Elle correspond à l'ensemble des processus par lesquels le principe actif disparaît de l'organisme. Elle se fait sous deux modalités : la biotransformation et l'excrétion.

c-1 Biotransformation

C'est la transformation du principe actif en métabolites possédant ou non une activité biologique. Elle est surtout réalisée au niveau du foie.

c-2 Excrétion

C'est l'évacuation irréversible du principe actif vers l'extérieur, Le rein est le principal organe d'excrétion, d'autres organes peuvent intervenir à l'exemple des poumons.

Une figure récapitulative du devenir d'un comprimé dans l'organisme est donnée dans la Figure (08), et la figure (09) montre les différentes phases pharmacocinétique (page 41).

I-1-2-3 Définition de quelques paramètres pharmacocinétiques [31]

- **Demi-vie** : Est le temps nécessaire pour que la quantité de médicament présent dans l'organisme ait diminué de moitié. il permet d'apprécier la durée de séjour du médicament dans l'organisme, d'adapter la posologie et la durée d'intervalle (washout) entre les deux périodes d'un essai en chassé croisé et la modalité de prélèvement de l'échantillon biologique.

- **Clairance** : Est le volume de plasma entièrement épuré du principe actif par unité de temps.

- **Volume de distribution** : Est une valeur théorique correspondant au volume qu'occuperait le principe actif s'il était dans tous les tissus où il se distribue à la même concentration que dans le plasma.

$$V_d = Q/C_p \quad \dots (5)$$

Où Q : quantité de principe actif présente dans l'organisme,

C_p : concentration plasmatique mesurée au même instant que le (V_d) .

- **C_{max}** : Concentration plasmatique maximale obtenue après une dose unique
- **T_{max}** : Temps de l'obtention du pic de la concentration plasmatique.
- **Surface Sous la Courbe SSC** : Est la surface délimitée par les axes de coordonnées et la courbe de concentration plasmatique entre le temps initial et le temps à l'infini. Cette surface caractérise la quantité du principe actif qui est absorbée et la vitesse de son élimination. Elle correspond à l'intégrale de la concentration plasmatique sur un intervalle de temps défini.

La détermination graphique de ces paramètres est représentée dans la figure (10).

I-1-3 Généralité sur le diabète et le mécanisme d'action de la Metformine

a. Diabète [33]

« Le diabète est une maladie chronique qui apparaît quand le pancréas ne sécrète pas assez d'insuline ou quand l'organisme utilise mal l'insuline qu'il produit ».

Le mot diabète remonte à la civilisation grecque, particulièrement à Aretaeus. Il signifie "passer à travers". Les médecins de cette époque pensaient qu'il existait un conduit entre le tube digestif et la vessie, ce qui pouvait expliquer pourquoi les diabétiques buvaient et urinaient tant. À la fin du 19^{ème} siècle, les chercheurs se sont aperçus que c'était la glande appelée pancréas qui était responsable du contrôle du sucre. Au début des années 20, il y a eu l'apparition de médicaments antidiabétiques issus de différentes structures à savoir les biguanides. Le retrait du marché de la phenformine (phényléthylbiguanide) en 1977 dans beaucoup de pays du taux a été la raison du taux élevé d'acidose lactique associée, le représentant actuel de cette classe de médicament est le diméthylbiguanide ou la Metformine [34].

b. Metformine

b-1 Mécanisme d'action de la Metformine [35]

L'amélioration du contrôle glycémique réside dans une action anti-hyperglycémiant plus qu'hypoglycémiant. Elle peut agir par l'intermédiaire de quatre mécanismes :

Au niveau du foie

- En réduisant la production hépatique du glucose;
 - En inhibant la néoglucogenèse et la glycogénolyse;
- } ... (1)

Au niveau musculaire

- En augmentant la sensibilité à l'insuline, en favorisant la captation et l'utilisation périphérique du glucose ... (2)

Au niveau intestinal

- En retardant l'absorption intestinale du glucose... (3)

Ces trois mécanismes sont représentés dans la figure (07)

b-2 Paramètres pharmacocinétiques spécifiques de la Metformine [36]

- Absorption et biodisponibilité : l'absorption de la Metformine est saturable et incomplète, il semble qu'elle soit non linéaire, elle se fait principalement au niveau de l'intestin grêle. Sa biodisponibilité absolue est de l'ordre de 40 à 60%. Les concentrations plasmatiques maximales sont atteintes en une à deux heures avec des valeurs de 1 à 3 $\mu\text{g/ml}$ après une prise de 500 à 1000 mg et sa demi-vie plasmatique est comprise entre 4 et 8,7 heures.

- Distribution et taux de liaison aux protéines plasmatiques : La liaison aux protéines plasmatiques est négligeable. Le volume de distribution moyen (Vd) est compris entre 63 et 276 litres.

- Excrétion : Après une administration intraveineuse de Metformine à une personne saine, presque 80% de la dose a été trouvée sous forme inchangée dans les urines et aucune trace n'a été détectée dans les selles. Donc le rein est le principal organe d'élimination

- Biotransformation (métabolisme) : quand le médicament est administré à l'homme aucun métabolite n'est détecté dans les urines.

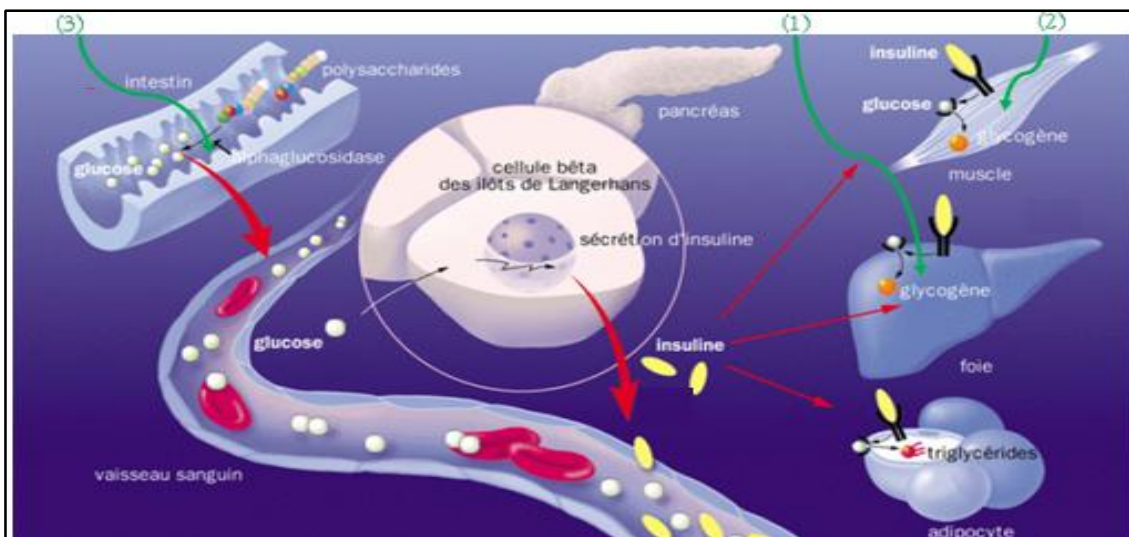


Figure 07 : Différents sites d'action de la Metformine.

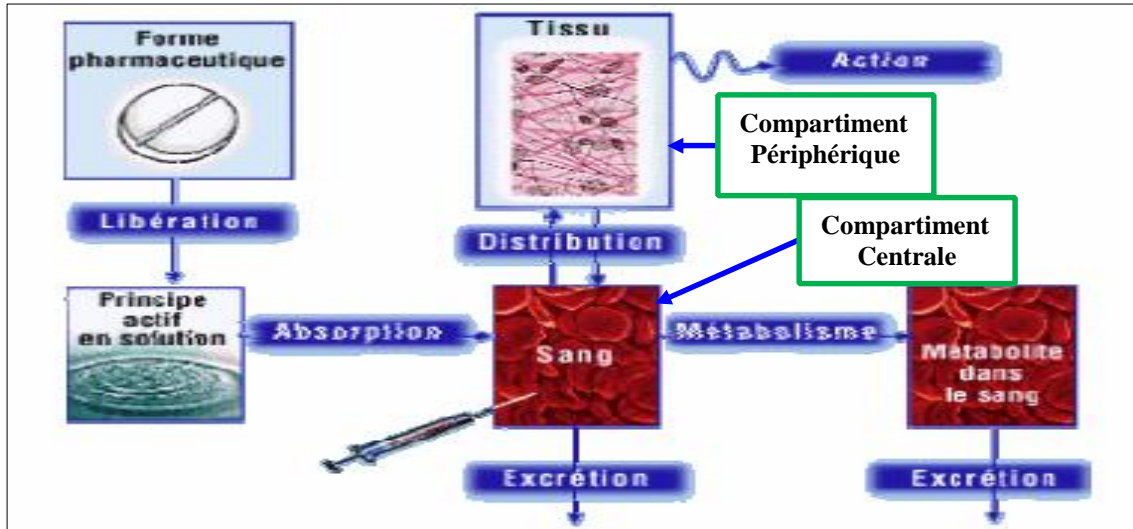


Figure 08 : Devenir d'un comprimé dans l'organisme

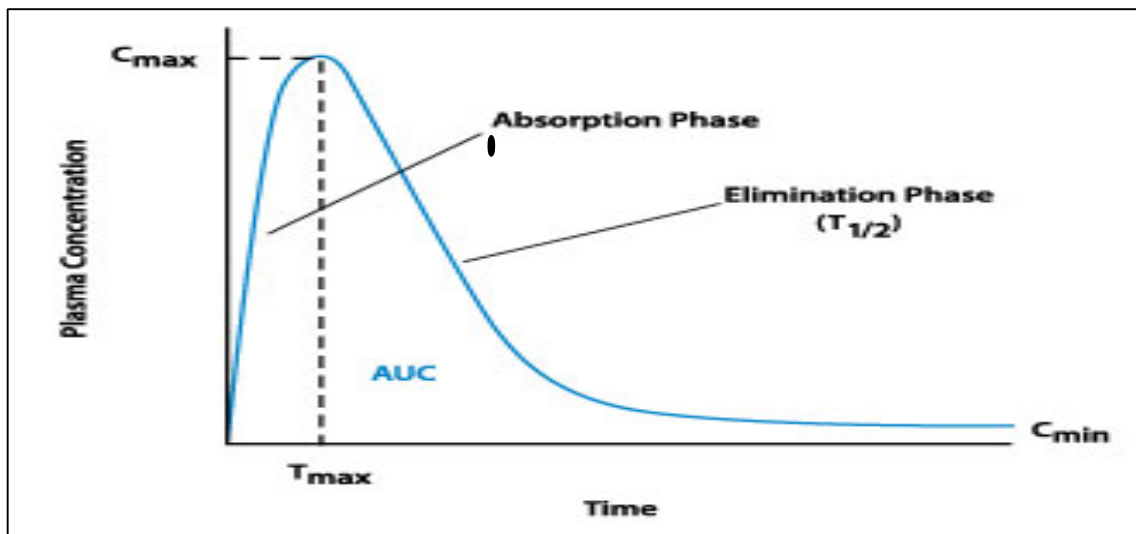


Figure 09 : Différentes phases pharmacocinétiques.

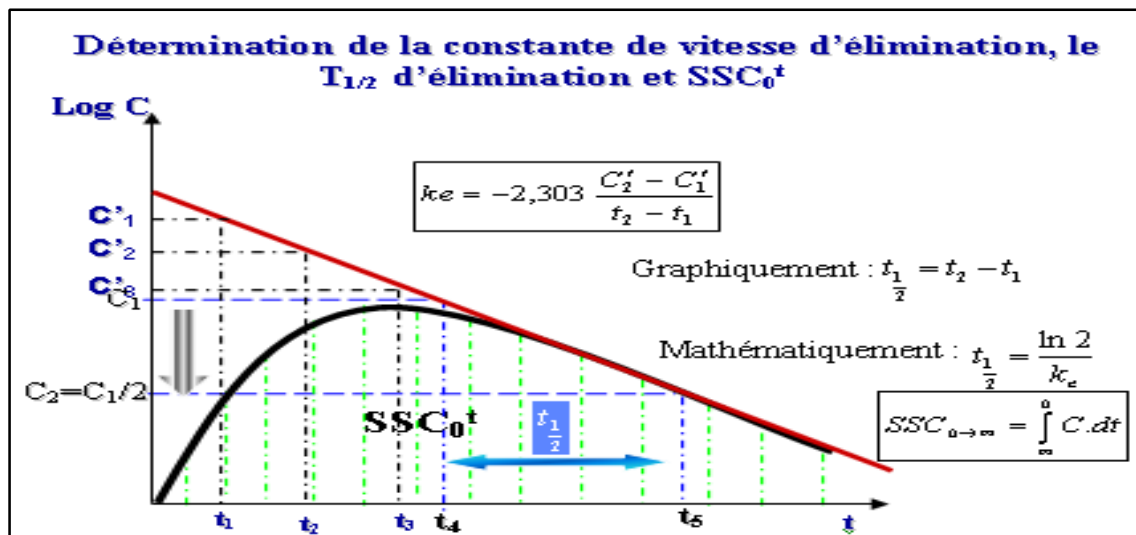


Figure 10 : Méthodes graphique pour évaluer les paramètres pharmacocinétique (approche monocompartimental avec une administration par voie orale)

I-1-4 Biodisponibilité et bioéquivalence

I-1-4-1 biodisponibilité [37]

N. Wagner a défini la biodisponibilité comme étant un paramètre pharmaceutique spécifique d'une forme pharmaceutique, elle est caractérisée par les deux paramètres suivant :

1) la quantité relative de principe actif absorbée à partir d'une forme pharmaceutique qui atteint la circulation systémique.

2) la vitesse à laquelle se produit ce phénomène.

Cette définition, fait la synthèse de toutes celles qui l'ont précédée. Bien qu'elles introduisent toutes, les deux paramètres à savoir la quantité et la vitesse, elles diffèrent par certains termes. Ainsi, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) parle de la quantité de principe actif « absorbable » à partir d'un médicament, c'est-à-dire de la quantité de principe actif libéré, dissous, transformé et susceptible d'être absorbé par l'organisme (potentialité d'absorption).

The Food and Drug Administration se réfère à la quantité de principe actif disponible pour le site d'activité. Certes, on ne connaît pas exactement le site d'activité de tous les principes actifs, mais cela implique cependant que la notion de biodisponibilité doit être rattachée à l'effet thérapeutique ou pharmacologique du principe actif.

Enfin, l'**American Pharmaceutical Association** ajoute dans sa définition que c'est la quantité de principe actif inchangée qui doit être évaluée dans une étude de biodisponibilité. Cette notion est importante et implique à la fois un dosage spécifique du principe actif inchangé et une connaissance parfaite de son métabolisme.

Cependant, une étude de biodisponibilité peut reposer uniquement sur l'évaluation du ou des principaux métabolites, à condition d'être sûre qu'ils sont responsables de l'effet pharmacologique. C'est le cas des prodrogues.

La biodisponibilité est généralement déterminée en évaluant les concentrations du principe actif dans l'échantillon biologique. On obtiendra une courbe de concentration de principe actif en fonction du temps dont les caractéristiques serviront à la détermination de la biodisponibilité par exemple : C max T max et SSC.

▪ Raison justifiant une étude de biodisponibilité [37]

Les raisons peuvent être nombreuses et elles obligent à chaque fois à élaborer un protocole adapté au but poursuivi.

- 1- formulation d'un nouveau principe actif ;
- 2- modification de la quantité de principe actif dans le médicament ;
- 3- changement de la voie d'administration ;
- 4- modification de la formule de médicament ;
- 5- évaluation de la bioéquivalence de deux formes pharmaceutique.

Selon la préparation de référence utilisée pour la comparaison, la biodisponibilité est dite absolue ou relative.

a. Biodisponibilité absolue [32]

Elle correspond au rendement absolu du passage dans la circulation générale. La voie intraveineuse est prise comme référence car elle entraîne une absorption de 100%. Ce type d'étude permet d'évaluer :

- 1) La vitesse et l'importance de la libération du principe actif, de la forme galénique et de l'absorption qui suit la dissolution.
- 2) L'effet du premier passage hépatique (métabolisation).

Biodisponibilité absolue = SSC (administration orale) / SSC (administration intra veineuse).

b. Biodisponibilité relative [32]

On détermine quantitativement l'importance relative de la vitesse de passage dans la circulation générale, sans connaître la quantité absolue absorbée et sans étudier l'effet du premier passage hépatique. Ces études peuvent permettre d'apprécier la bioéquivalence de deux formes pharmaceutiques. Cependant, contrairement à la détermination de la biodisponibilité absolue, l'évaluation de la biodisponibilité relative repose sur la comparaison non seulement des SSC, mais aussi de la vitesse d'absorption. La méthodologie de telles études de biodisponibilité comparées vise à réduire tous les facteurs extérieurs à celui que l'on veut mesurer, c'est à dire les facteurs qui peuvent modifier la pharmacocinétique tels que:

- ✓ Choix des sujets

En vue des études de bioéquivalence, le choix de l'être humain se porte sur des sujets sains. Parmi les critères, une place prépondérante est réservée aux examens de biologie clinique.

- ✓ Régimes alimentaires

Au cours d'un essai d'évaluation de la biodisponibilité les repas doivent être standardisés rigoureusement pour que d'éventuelle influence sur l'activité médicamenteuse se rapproche d'une constante. (Effet du calcium sur les concentrations sériques d'une tétracycline par formation d'un complexe mal absorbé) [38].

I-1-4-2 Bioéquivalence

1. Définition

Deux médicaments contenant le même principe actif, administrés dans les mêmes conditions au même individu, ne sont équivalents sur le plan thérapeutique que si un minimum de conditions est rempli.

Il faut que les deux formulations soient chimiquement équivalentes, c'est-à-dire qu'elles contiennent la même quantité de principe actif sous la même forme chimique. De plus, il faut que les deux médicaments soient des équivalents pharmaceutiques ce qui implique l'identité de la forme des excipients et de la forme médicamenteuse. Si tous ces critères sont réunis, il existe de forte probabilité pour que ces deux médicaments soient d'une part bioéquivalents, c'est-à-dire présentant une biodisponibilité comparable, et d'autre part des équivalents thérapeutiques, c'est-à-dire présentant une efficacité et une sécurité thérapeutique comparable [32].

D'un point de vue pratique ; deux formulations du même principe actif sont bioéquivalent lorsque, leurs profils de concentrations biologiques (sériques) en fonction du temps obtenus après administration de la même dose molaire sont similaires qu'il est impossible de donner des différences significatives d'ordre clinique (efficacité et/ou sécurité).

« La bioéquivalence est définie par l'absence d'une différence significative dans l'étendue (taux) et la vitesse avec laquelle un principe actif devient disponible au niveau des sites d'action lorsqu'ils sont administrés à la même dose molaire sous les mêmes conditions et selon un design approprié » [39].

Doit-on prouver la bioéquivalence pour tous les médicaments génériques ?

L'étude de bioéquivalence ne concerne pas tous les produits pharmaceutiques.

2. Critères d'exonération et d'obligation des études de bioéquivalence [40]

Les différentes réglementations concernant le médicament générique admettent dans certains cas la possibilité d'exonération des études de biodisponibilité.

L'approche des critères de sélection est cependant différente. Deux types de concepts ont été inventoriés : des concepts généralistes pour lesquels l'exonération est basée principalement sur la forme pharmaceutique, et des concepts plus spécifiques pour lesquels les possibilités d'exonération se basent sur les principes actifs.

2-1 Réglementations de l'OMS [40]

➤ **Selon la forme galénique.** Ces concepts raisonnent sur les risques de bioéquivalence en fonction des formes galéniques.

✓ Critères de dispense

Ils concernent essentiellement les médicaments destinés à être administrés par voie parentérale, les médicaments en solution pour administration par voie orale, les médicaments en poudre destinés à être reconstitués en solution, les gaz médicaux ainsi que les médicaments à usage ophtalmique, auriculaire, topique, et les produits pour inhalation et pulvérisation.

✓ Critères d'obligation

Sauf dans les cas précédemment décrits, il est recommandé aux autorités d'homologation d'exiger une preuve d'équivalence, consistant à comparer le produit générique au médicament princeps. Cette recommandation concerne plus particulièrement :

Les produits à libération immédiate administrés par voie orale dotés d'une action systémique, lorsque un ou plusieurs des critères suivant s'applique :

- Plage thérapeutique étroite
- Pharmacocinétique compliquée
- Une élimination ou un métabolisme élevé lors de premier passage (hépatique...etc.)
- Proportion élevée des excipients par rapport au principe actif

➤ Selon le risque

La dispense des études de bioéquivalence dans ce cas prend en compte le risque pour le patient. A l'exemple des médicaments anticancéreux et des stupéfiants.

SECTION I-2 Aspect Analytique

La chimie analytique est une science qui étudie l'élaboration et la théorie des méthodes d'analyse à l'aide desquelles on met en évidence la composition chimique de substances ou de leurs mélanges [41]. L'analyse qualitative révèle la nature chimique des substances présentes et l'analyse quantitative se propose pour déterminer la quantité de diverses substances qui constituent l'échantillon.

Il existe plusieurs techniques d'analyses qui diffèrent par leurs principes. Nous citerons principalement les méthodes alliées aux méthodes spectrales.

I-2-1 Méthodes spectrales [42]

L'identification d'un composé complètement inconnu peut s'effectuer à l'aide d'un spectre d'absorption infra rouge, d'absorption ultraviolette, de résonance magnétique nucléaire ou de masse. Les données ainsi accumulées étendent considérablement le champ d'investigation et peuvent fournir des renseignements importants en matière d'identification.

I-2-2 Méthodes chromatographiques

Nous nous intéresserons plus dans cette partie aux techniques chromatographiques et principalement la Chromatographie Liquide à Haute Performance, car elle représente une technique de choix pour l'identification et la quantification des médicaments dans le milieu biologique. En effet, outre le fait qu'elle allie à la fois la rapidité, l'efficacité et la sensibilité, elle permet également la séparation de diverses substances.

I-2-1-1 Principe de la CLHP [43]

- Un liquide appelé phase mobile parcourt un tube appelé colonne. Cette colonne contient un support solide ou liquide appelé phase stationnaire;
- Si la phase stationnaire a été bien choisie, les constituants du mélange, appelés solutés, sont inégalement retenus lors de la traversée de la phase stationnaire, ce phénomène appelé rétention, il résulte que les constituants du mélange injecté se déplacent tous moins vite que la phase mobile et que leurs vitesses de déplacement sont différentes. Ils sont ainsi élués de la phase stationnaire les uns après les autres ;
- Un détecteur placé à la sortie de la colonne couplé à un enregistreur permet d'obtenir un tracé appelé chromatogramme.

Il existe plusieurs modes en CLHP, chacun correspond à un type précis d'interaction.

a. Chromatographie d'adsorption : la phase stationnaire est un solide adsorbant ; la rétention est due à une suite de processus d'adsorption / désorption

b. Chromatographie de partage : la phase stationnaire est un liquide déposé ou greffé sur un support solide ; la rétention est basée sur le partage du soluté entre les deux phases.

I-2-1-2 Paramètres d'un chromatogramme [44]

➤ Le temps de rétention d'un composé représente le temps que mis le composé pour traverser la colonne chromatographique.

➤ La séparation entre deux pics adjacents est caractérisée par le facteur de résolution (R_s) ; la séparation est d'autant meilleure que R_s est plus grand ; lorsque R_s est supérieur à 1, la séparation est complète, et pour R_s inférieur à 0,8, la séparation est insuffisante.

➤ Nombre de plateaux théoriques (N) : Ce paramètre caractérise l'efficacité de la colonne.

➤ Pour pouvoir comparer entre des colonnes de différentes longueurs, on définit la hauteur équivalente à un plateau théorique (HEPT) :

$$\text{HEPT} = L/N \quad (L \text{ est la longueur de la colonne})$$

I-2-1-3 Analyse qualitative et quantitative

- Dans des conditions chromatographiques données, le "temps de rétention" caractérise qualitativement une substance ;
- L'amplitude de chaque pic, ou l'aire limitée par le pic et la ligne de base permet de mesurer la quantité de chaque soluté dans le mélange injecté ;
- Méthode du standard interne : cette méthode utilise une molécule de propriété physicochimique spécifique, introduite à une concentration connue dans l'échantillon à analyser. Cette molécule est appelée étalon interne.

L'étalon interne doit être :

- Inerte chimiquement vis-à-vis du soluté ;
- Séparé des autres analytes ;
- Comportement physico-chimique proche du soluté ;
- De concentration du même ordre de grandeur que l'analyte.

Son emploi est particulièrement avantageux, d'une part dans le dosage des substances à faibles concentrations puisque l'analyse est affranchie du volume injecté et d'autre part, il permet d'apprécier l'efficacité de l'extraction.

I-2-2 Dosage des médicaments dans le milieu biologique

Lors d'une administration systématique à l'homme ou à l'animal, toute substance médicamenteuse gagne, via le système circulatoire, ses récepteurs cellulaires. Ce transfert est fonction des caractéristiques physicochimiques de l'agent pharmacologique d'une part et d'autre part les paramètres morphologiques et physiologiques liés à l'espèce. Le médicament est ensuite métabolisé et enfin éliminé, le plus souvent par voie urinaire. Sa métabolisation peut, selon le cas, donner naissance à des dérivés de structure voisine ou mener à une transformation complète de la molécule.

Pour le suivi du médicament et de ses métabolites dans l'organisme, il est indispensable de développer des méthodes analytiques et de les valider. Or, les substances médicamenteuses, dont les concentrations sont parfois très faibles, ne peuvent être dosées le plus souvent qu'après leur libération des fluides ou tissus et leur séparation des constituants endogènes de la matrice biologique (extraction).

L'étude du devenir du médicament dans l'organisme est, avant tout, un problème analytique englobant l'extraction, la séparation, l'identification et le dosage du médicament et/ou de ses métabolites dans les milieux biologiques. L'analyse des médicaments dans les milieux biologiques est devenue une source d'information indispensable dans de nombreux domaines. Parmi ceux-ci, citons :

- ✓ Le contrôle de la prise de médicaments en médecine sportive (dopage, stupéfiant);
- ✓ Le contrôle de l'intoxication;
- ✓ La détermination des paramètres pharmacocinétiques lors du développement de nouvelles substances médicamenteuses;
- ✓ L'étude de la biodisponibilité d'une préparation pharmaceutique;
- ✓ L'étude de bioéquivalence entre formulations ayant la même visée thérapeutique;
- ✓ Le suivi thérapeutique dans le milieu hospitalier.

I-2-3 Matrice biologique

N'importe quel échantillon biologique, peut servir de support au dosage de médicament, les matrices biologiques les plus fréquemment analysées sont le plasma, le sérum et l'urine, toutefois, compte tenu de la distribution de certains médicaments dans l'organisme, l'analyse de la salive, de la bile ou de liquide céphalorachidien peut parfois s'avérer fort utile.

Le sang est le liquide biologique qui présente le plus d'intérêt analytique, d'une part il est le plus important vecteur de médicament dans le corps humain, et d'autre part, l'activité thérapeutique du médicament est étroitement liée à sa concentration sanguine [45]. Le sérum et surtout le plasma sont préférés au sang complet pour le dosage des médicaments, une étape de purification est alors nécessaire afin d'éliminer les cellules sanguines [46].

La coagulation naturelle du sang complet conduit à la formation d'une phase liquide, le sérum, et d'un caillot composé de fibrine et des éléments figurés du sang [46].

Le plasma produit par centrifugation du sang anti-coagulé, est le milieu le plus utilisé, ce d'autant plus qu'il est obtenu en quantité plus importante que le sérum à partir d'un même volume de sang [46]. C'est la partie liquide du sang (80% d'eau), il est de composition complexe, il comprend essentiellement des protéines de poids moléculaire élevé telles les albumines et les globulines (7,5%) et une quantité de glycoprotéines, il renferme également des glucides, des lipides (0,5%), des hormones, des enzymes, des éléments minéraux ainsi que des composés de petits poids moléculaires (urée, créatinine, créatine, etc.) [45].

I-2-3-1 Problématique et techniques du traitement des échantillons biologiques

Le problème majeur, lors du développement d'une méthode CLHP en bioanalyse, réside dans la présence de protéines dans les échantillons. Celles-ci, peuvent entraîner une rapide perte de l'efficacité de la colonne analytique. Les phénomènes susceptibles de se produire au sein du système chromatographique après l'injection directe de la matrice biologique sont :

- Adsorption des protéines plasmatiques sur le support chromatographique; qui conduit à une perturbation de la distribution des solutés à doser entre la phase mobile et stationnaire;
- Dénaturation des protéines induite par la présence d'un ou plusieurs solvants (méthanol, acétonitrile); ceux-ci sont fréquemment présents dans les phases mobiles et en concentration élevée ;
- Colmatage rapide du fritté de faible porosité employé en sommet de la colonne, par les lipides qui ne peuvent pas être éliminés par centrifugation;

Après un nombre restreint d'injection, ces phénomènes entraînent une modification du temps de rétention des analytes, une augmentation de la pression, un élargissement des pics et un aboutissement rapide à l'obturation de la colonne chromatographique [47]. Nous pouvons souligner, dès à présent, que les performances des différents procédés de préparation des

échantillons biologiques dépendront principalement du degré d'élimination des protéines et de l'innocuité de ces procédés pour l'analyte.

Néanmoins, l'analyse directe des échantillons biologiques est parfois réalisée. Certaines solutions alternatives peuvent être utilisées.

a. Analyse directe des échantillons biologiques

Cline Love et al [48] : proposent de neutraliser l'effet indésirable des protéines par complexation micellaire avec un agent tensioactif. La solubilisation des protéines dans les micelles permet d'éviter leur précipitation sur le support chromatographique et de favoriser le déplacement des molécules thérapeutiques de leur liaison protéique. Lorsque le médicament est fortement lié aux protéines plasmatiques, il n'est pas toujours libéré de façon complète. Les formes libres et liées peuvent alors interagir différemment avec la phase stationnaire de la CLHP et donner naissance à deux pics plus ou moins séparés.

L'injection directe de liquides biologiques n'est bien possible que dans des circonstances limitées. Le traitement préliminaire des échantillons reste donc le plus souvent indispensable à une application réussie de la CLHP à l'analyse des médicaments dans les milieux biologiques.

b. Méthode de traitement des échantillons biologiques [45]

Les différentes techniques de préparation des échantillons biologiques peuvent être classées en deux modes de traitement.

- Le traitement non sélectif qui a pour objectif d'éliminer les protéines et des particules de matières biologiques ainsi que la concentration de l'échantillon ;
- Le traitement sélectif qui est, utilisé pour isoler les analytes de la matrice et concentrer l'échantillon en analyte.

b-1 Traitement non sélectif

▪ Dénaturation (Défécation) [49]

L'addition au plasma des réactifs modifiant les caractéristiques physicochimiques des protéines, est une technique fréquemment employée pour libérer les analytes et éliminer les protéines plasmatiques. Après centrifugation de l'échantillon, la phase liquide surnageante est introduite, directement ou après concentration, dans le système chromatographique. Les méthodes de déprotéinisation suivantes sont couramment utilisées.

- La modification du pH plasmatique : en milieu acide, les protéines sont chargées positivement (forme cationique); par conséquent, l'addition d'un acide fort ou d'un réactif cationique, tel le Cu^{2+} ou le Zn^{2+} en solution alcaline, induit la précipitation des protéines[49] ;
- L'augmentation de la force ionique de l'échantillon : l'adjonction au plasma d'un sel neutre (sulfate d'ammonium) réduit le degré d'hydratation des molécules protéiques, ce qui entraîne leur relargage par diminution de la solubilité [46];
- La modification de la constante diélectrique par addition d'un solvant organique miscible à l'eau induit la diminution de la solubilité des protéines entraînant leur précipitation [46];
- le chauffage de l'échantillon plasmatique à une température supérieure à 50-60°C ou le refroidissement à une température de -20°C provoque la dénaturation de la plupart des protéines [46].

Tableau 13 : Réactifs employés pour libérer les analytes et éliminer les protéines [45]

Réactifs	Volume (ml)*
1 .Acides	
- Acide métaphosphorique (5%, m/v)	0,8
- Acide perchlorique (6%, m/v)	0,8
- Acide trichloracétique (10%, m/v)	0,4
2 .Sels minéraux	
- Sulfate de cuivre dans du tungstate sodique	2,0
- Sulfate d'ammonium (solution saturée)	4,0
3 .Solvants organiques	
- Acétone	2,0
- Acétonitrile	2,0

* volume de réactifs induisant la précipitation des protéines dans 01 ml de plasma.

Hormis sa simplicité et sa rapidité, ce mode de préparation des échantillons biologiques présente de nombreux inconvénients dont les principaux sont :

- La dilution de l'échantillon : en effet comme le montre le **tableau (13)**. 2 à 3 ml de solvant sont nécessaires pour traiter 1ml de plasma, l'utilisation d'un acide fort permet de réduire ce volume, mais la rectification subséquente du pH entraîne un défaut de stabilité de l'analyte ;
- L'élimination incomplète des protéines (95%) [45].

b-2 Traitement sélectif

Certains constituants peuvent être extraits de leur mélange à l'aide d'un solvant. L'opération, appelée absorption lorsque le mélange est gazeux, reçoit le nom d'extraction liquide-liquide lorsque la matière à traiter est un liquide, et d'extraction solide-liquide lorsque cette matière contient un solide [50]

▪ **Extraction liquide - liquide [50]**

Son principe est basé sur la modification du coefficient de partage de l'analyte entre deux phases l'une aqueuse et l'autre organique. Pour qu'une extraction soit possible, le solvant ajouté à la matière à traiter doit provoquer l'apparition d'une nouvelle phase. Le passage du soluté d'une première phase vers une seconde phase de masse volumique différente, constitue un transfert de matière, il suffit ensuite de séparer mécaniquement les deux phases.

L'efficacité de l'extraction dépend principalement de la nature du solvant et du pH du milieu : l'éventail des solvants à utiliser est très large mais la prédiction du solvant idéal pour une molécule donnée est parfois difficile.

Un ensemble de facteurs influence le choix du solvant. Les plus importants sont [51] :

- ✓ La lipophilicité ou l'hydrophobicité de l'analyte ;
- ✓ L'analyte doit être soluble dans le solvant d'extraction ;
- ✓ Le solvant doit avoir une faible température de vaporisation pour faciliter son élimination ;
- ✓ Une faible viscosité pour faciliter son mélange avec la matrice ;
- ✓ Non miscible avec l'eau et faiblement toxique.

Généralement la sélection se fait en choisissant le solvant le moins polaire où l'analyte est soluble. Dans des cas particuliers, on peut utiliser un mélange de solvant ; Un mélange de (50/50) de Tetrahydrofurane et de Chlorure de méthylène est un puissant solvant pour extraire les molécules polaires à partir du plasma.

Avantages de cette technique

- ✓ Réalisation simultanée de la dénaturation des protéines, de la purification de l'échantillon et la concentration de l'analyte ;
- ✓ Bonne sélectivité.

Inconvénient

- ✓ Formation fréquente d'émulsions

▪ **Extraction en phase solide [46]**

L'extraction en phase solide (SPE), consiste en la mise en contact d'un liquide renfermant la substance à extraire avec une phase solide sur laquelle sera sélectivement adsorbée et, après élimination d'éventuelles interférences, sélectivement éluée. Les principaux mécanismes de séparation et d'isolation utilisés en SPE sont semblables à ceux utilisés en CLHP. Par ailleurs les mécanismes de séparation dans les deux techniques sont les mêmes, par contre la dynamique de chaque technique est différente. En HPLC les composés sont séparés continuellement en suivant la phase mobile alors qu'en SPE, la séparation est une série d'étapes discontinues.

La SPE est typiquement mise en exécution suivant quatre étapes : conditionnement et équilibrage, chargement, rinçage et élution

Le tableau suivant regroupe les différentes techniques du traitement des échantillons biologiques.

Tableau 14 : Différentes techniques de traitement des échantillons biologiques

1. Libération des médicaments glucorono ou sulfoconjugués	
- Hydrolyse	- Acide - Basique
2. Elimination des protéines et autres constituants endogènes	
Traitements non sélectifs	Traitements sélectifs
- Dénaturation - Dialyse - Ultrafiltration	- Extraction liquide-liquide - Extraction en phase solide
3. Procédés complémentaires de traitement	
- Congélation - Dilution - Centrifugation	- Filtration - Evaporation

I-2-4 Validation

Toute valeur expérimentale est entachée d'une incertitude de mesure qui limite l'applicabilité de la méthode utilisée. L'interprétation des données issues des études de biodisponibilité, de pharmacocinétique, de toxicocinétique, ne serait pas fiable sans l'utilisation de méthodes analytiques validées. Or, l'analyse dans les milieux biologiques présente certaines particularités par rapport à l'analyse chimique classique et implique quelques spécifications dans la démarche de validation.

I-2-4-1 Objectif de la validation

L'objectif de la validation est de donner des *garanties* suffisantes que chacune de ces mesures qui seront réalisées en routine avec cette méthode seront *suffisamment proches* de la vraie valeur [52]. La validation est une exigence réglementaire, qui assure la conformité des méthodes d'analyse avec les normes nationales et internationales. Elle repose sur l'étude de plusieurs paramètres.

I-2-4-2 Critères de validation en CLHP

a- Spécificité [53]

Une méthode est spécifique lorsqu'elle permet de garantir que le signal mesuré provient seulement de la substance à analyser (l'analyte d'intérêt).

En pratique.

- Injecter un plasma blanc
- Injecter les deux solutions d'intérêt (molécule à analyser et son étalon interne)

Vérifier qu'il n'y a pas de pic aux temps de rétention des substances à doser

b- Sélectivité

C'est la capacité d'une méthode à détecter et à quantifier l'analyte cible en présence d'interférent dans l'échantillon [53], elle mesure le degré d'interférences entre un principe actif et d'autres composants présents dans l'échantillon. Pour démontrer la sélectivité d'une méthode bioanalytique, il faut provoquer le maximum d'interférences, d'une part il faut analyser plusieurs sources de plasma blanc. En vue de prévoir toutes les interférences possibles qui peuvent se produire lors de la mise en application de la méthode. D. Dadgar [53] a proposé 10 à 20 sources de matrice ce qui paraît raisonnable à cause de l'importance de la sélectivité dans la bioanalyse. Et d'autre part, par le chargement de la matrice avec d'autres

composés qui sont souvent présents dans l'échantillon biologique. À l'exemple des médicaments, des métabolites et des xanthines...etc. [54].

Valentina porta [55] préconise l'analyse de six matrices dont quatre de différentes sources, une lipimique et l'autre hémolysée.

La sélectivité est évaluée par un examen visuel, qui se traduit par l'absence de tout chevauchement dû aux composés endogènes de la matrice biologique avec l'analyte à doser.

c- Rendement d'extraction [56]

Le rendement d'extraction absolu peut être défini comme étant le rapport des signaux mesurés, d'une part après traitement de l'échantillon chargé avec une quantité connue, et d'autre part après l'injection directe dans le système analytique d'une gamme non biologique de référence contenant une concentration équivalente de substance à examiner.

Le rendement d'extraction absolu doit être préféré au rendement d'extraction relatif, où la gamme non biologique de référence subit le même traitement que l'échantillon, mais il n'est pas toujours possible de l'obtenir, c'est notamment le cas lorsqu'une étape de dérivation est introduite dans le processus de préparation de l'échantillon biologique. Dans cette condition seul le rendement relatif peut être évalué.

Le rendement d'extraction absolu est un critère important pour les procédures nécessitant une extraction préalable de l'analyte. Si le rendement d'extraction est faible, il conviendra donc de poursuivre le développement de la méthode d'extraction.

d -Limite de détection et limite de quantification [56]

La limite de détection est la plus petite concentration d'analyte qui peut être détectée, mais non quantifiée et la limite de quantification est la plus petite concentration d'analyte qui peut être quantifiée dans un échantillon.

e-Linéarité et droite de calibration

- La linéarité d'une procédure d'analyse est sa capacité à l'intérieur d'un certain intervalle de dosage d'obtenir des réponses directement proportionnelles à la concentration de la substance étudiée dans l'échantillon [56].

- La relation entre la concentration de l'analyte dans l'échantillon et sa correspondance en réponse (dans les méthodes bioanalytiques surtout le rapport de réponse de l'analyte et la

réponse de l'étalon interne) doit être examinée. Le model mathématique qui traduit cette relation est généralement un model linéaire d'ordre 1.

La détermination de la droite de calibration se fait à partir d'une matrice chargée, dont les concentrations doivent couvrir tout le domaine d'étude, partons de la limite inférieure de quantification jusqu' à la concentration maximale [57]. En pratique, la plupart des référentiels exigent un minimum de cinq à huit niveaux de concentrations et certains précisent qu'il faut deux à six injections par niveau.

L'étude de la linéarité et de la droite de calibration est faite simultanément :

- sur le principe actif seul (linéarité)
- sur le plasma chargé ; un plasma blanc et on ajoute la substance à analyser en quantité variable (droite de calibration).

Les quantités de substances à tester doivent être pesées individuellement. Il est possible d'introduire dans le mélange la substance à tester sous forme d'une fraction d'une solution mère.

NB : l'évaluation de la linéarité selon ICH (International Conférence of Harmonisation) se fait par un examen visuel du graphe réponse en fonction de concentration

NB : Insuffisance de R^2 [56]

Le coefficient de détermination R^2 n'est pas en soit un bon estimateur de la qualité de la régression. C'est-à-dire une indication que la régression linéaire appropriée pour rendre compte des observations. Ce coefficient indique que les observations sont suffisamment modélisées par une régression linéaire, mais il ne permet pas d'affirmer que le modèle linéaire est adéquat

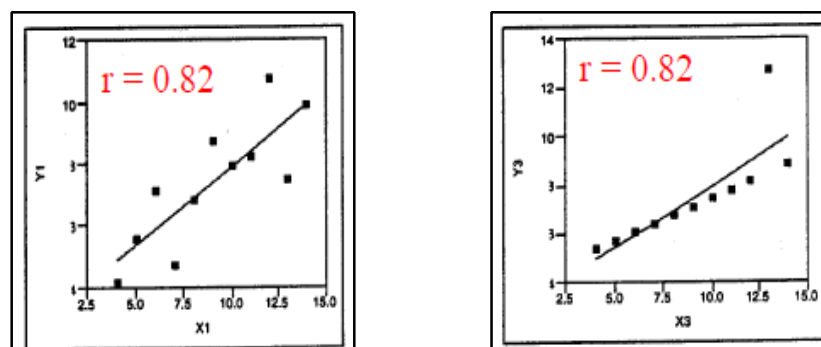


Figure 11 : Signification du coefficient de régression.

Tests statistiques pour l'évaluation de la linéarité et la droite de calibration [56]

- Détermination de l'équation de la droite de régression ;
- Détermination de la pente ;
- Détermination de l'ordonnée à l'origine ;
- Détermination du coefficient de régression (R^2) ;
- Comparaison de l'ordonnée à l'origine avec zéro (0) « test de Student » ;
- Homogénéité des variances « test de Cochran » ;
- Existence d'une pente significative «test de Fisher 1» ;
- Validité de la droite de régression «test de Fisher 2».

f-Fidélité [56]

C'est l'ensemble des caractéristiques de dispersion, Elle représente un terme global qui varie entre deux valeurs extrêmes; l'une minimale appelée répétabilité (minimum de variabilité) et l'autre maximale appelée reproductibilité (maximum de variabilité), elle représente les deux mesures extrêmes de la variabilité.

f-a Répétabilité [56]

Elle définit la variabilité entre des essais réalisés sur des échantillons identiques dans le même laboratoire, avec la même méthode, le même opérateur utilisant le même équipement et pendant un court intervalle de temps, elle permet de caractériser la variabilité de la méthode au cours de la journée.

f-b-Fidélité intermédiaire

Elle correspond aux variations survenant dans un même laboratoire d'essai identique, avec la même méthode, dans différents jours.

NB : la reproductibilité est utilisée dans le cas d'une méthode analytique destiné à être standardisée (pharmacopée) [56].

A fin de vérifier la fidélité de la méthode on réalise les tests statistiques suivants :

- Homogénéité des variances de recouvrement « test de Cochran »
- Détermination des coefficients de variation de la répétabilité

g-Exactitude [53]

L'exactitude exprime l'étroitesse de l'accord entre la valeur de la méthode obtenue et la valeur de référence acceptée. Elle est vérifiée sur le principe actif à différentes concentrations en se basant sur les résultats de la linéarité. L'étude statistique de l'exactitude comporte deux tests :

- Homogénéité des variances « test de Cochran »

- L'analyse des résidus

h- Stabilité des échantillons [58]

Compte tenu du grand nombre des échantillons à analyser et pour assurer une garantie supplémentaire à la validité des résultats, on doit connaître la stabilité des échantillons dans des conditions extrêmes de températures. La stabilité est définie comme l'absence de variation significative de la réponse de l'analyte en fonction du temps, elle doit être évaluée aussi bien pendant la période de stockage que durant l'analyse.

h-1. Stabilité en solution : elle concerne surtout les solutions étalons.

h-2. Stabilité dans le milieu biologique

La stabilité de l'analyte doit être déterminée après trois cycles de congélation et de décongélation. Trois niveaux de concentration faible, moyen et élevé sont stockés à une température de congélation durant 24 heures puis on les met à une température ambiante pour la décongélation. Le cycle de congélation et de décongélation doit être répété deux fois

j- Robustesse

j-1 plan d'expérience

Cette méthode est utilisée pour obtenir le maximum d'information par l'utilisation d'un nombre minime d'expériences. Les plans d'expériences sont classés en trois catégories. Les deux premières catégories couvrent les facteurs indépendants, et la troisième catégorie est réservée aux facteurs dépendants.

- Les facteurs indépendants sont des facteurs où on peut choisir les niveaux comme on le désire. Le choix du niveau de facteur n'entraîne aucune contrainte sur le choix des niveaux des autres facteurs.
- Les facteurs dépendants sont des facteurs où les niveaux sont liés entre eux par une relation. Par exemple les proportions d'un mélange font toujours cent pour cent, si on modifie le pourcentage d'un constituant, le pourcentage d'au moins un autre constituant est également modifié.

j-2 Définition de la robustesse :

La robustesse est définie par « la capacité d'une méthode analytique à maintenir ses performances lorsqu'elle est soumise à de petites variations fortuites des conditions expérimentales, telles que celles susceptibles de se produire lors de sa mise en oeuvre par un autre opérateur, sur un autre matériel ou dans un autre laboratoire [59]. L'objectif de l'étude est d'examiner l'incidence de faibles variations fortuites des facteurs autour de leurs valeurs de consigne sur les performances de la méthode.

Les paramètres à varier pour ce type d'étude sont (pour CLHP) :

- ✓ Type de phase stationnaire (fabricant, longueur de la colonne)
- ✓ Température
- ✓ pH de la phase mobile
- ✓ Débit de la phase mobile
- ✓ Concentration du tampon (force ionique)
- ✓ Composition de la phase mobile

j-3 Choix du plan d'expériences utilisé dans une étude d'évaluation de la robustesse.

Il paraît important de noter que la détermination de la robustesse est intimement liée à la recherche de l'optimum. C'est là où les faibles changements ont le moindre influence sur la réponse, $dy/dx = 0$. Parmi les plans permettant l'utilisation d'un modèle polynomial de degré 2, nous avons choisi un plan composite centré. Le plan composite centré est en fait un plan factoriel de type 2^k (éventuellement factoriel fractionnaire 2^{k-p} où K désigne le nombre total de facteurs étudiés, P désigne le nombre de facteurs étudiés sur une interaction et 2 signifie que chaque facteur est étudié à deux niveaux) auquel on a ajouté des points dits en étoile et des points au centre. La distance des points axiaux est déterminée en fonction du critère d'isovariance par rotation. Si l'on veut que le plan composite satisfasse les critères d'isovariance par rotation, il faut placer les points en étoiles à une distance (), égale à la racine quatrième du nombre de points du plan factoriel [60]. La méthode sera d'autant plus robuste que l'écart relatif sera plus faible par rapport au point de fonctionnement.

Les critères de validation sont regroupés dans le tableau suivant :

Tableau 15 : Tableau récapitulatif de critères de validation

Critère	Type d'analyse			
	Impureté		Dosage	Quantification bioanalyse
	Identification	Essai limite		
Spécificité / sélectivité	+	+	+	+
Rendement	-	-	+/-	+
Linéarité	-	-	+	+
Fidélité	-	-	+	+
LLOQ	-	+	-	+
Exactitude	-	+	+	+
Robustesse	-	-	-	+

+ : test obligatoire

PARTIE II : Etude Expérimentale

Matériels et réactifs.

La liste du matériels et réactifs est donnée ci-après

- Balance analytique (SARTORIUS)
- pH mètre (HANNA)
- Agitateur magnétique (VELP scientifica)
- Ultra son (ANNEMASSE France)
- Dispositif de filtration (MILLIPORE)
- Filtre en membrane en nylon 0,45 μ m
- Micropipette de : 100-1000 μ l / 20-200 μ l et 5-50 μ l (SOCOREX)
- Embouts
- Portoir
- Sonde gastrique pour gavage
- Fioles de 50 et 100ml
- Tubes EDTA
- Tubes à essai
- Becher
- Cristallisoir
- Centrifugeuse
- Evaporateur sous flux gazeux thermostaté (LABORTECHNIK liebiceh®)

L'appareil CLHP utilisée dans ce travail se compose de :

- Pompe modèle 600 Pump WATERS
- Contrôleur de la Pompe 600 WATERS
- Injecteur Rhéodyne 7725 muni d'une boucle de 20 μ l ;
- Dégazeur Waters IN-LINE ;
- Système de filtration millipore ;
- Détecteur (UV/VIS) 2487 Waters couplé à un system informatique (PC) muni d'un logiciel EMPOWER.
- Vac-Elut Varian Sample Preparation Product pour l'extraction en phase solide
- Colonne SUPELCO Discovery ® C₁₈ (25cm× 4,6mm. 5 μ m)
- Colonne phényle MACHEREY-NAGEL. NUCLEOSIL (15cm× 4,6mm. 5 μ m)
- Colonne gel de silice Waters spherisorb (25cm× 4,6mm. 5 μ m)
- Précolonne silice Waters spherisorb (1cm× 4,6mm. 5 μ m)
- Précolonne phényle : MACHEREY-NAGEL. NUCLEOSIL (1cm× 4,6mm. 5 μ m)

- Plasma : fourni gracieusement par le centre hospitalo-universitaire de BAB EL OUED Centre d'Hématologie et Transfusion sanguine.
- Rats : de race albinos de souche WISTAR âgés approximativement de six semaines, leurs poids est de 200 ± 20 g.

Réactifs :

- Méthanol pour HPLC Sigma Aldriche
- Acétonitrile pour HPLC Sigma Aldriche
- Acide chlorhydrique 0,1M
- Dihydrogénophosphate de potassium
- Chlorure de méthylène
- Hydroxyde de Potassium
- Hydroxyde de Sodium
- Chlorure de para-nitrobenzoyl (p-NBC)
- Acide octane sulfonique
- Sodium dodecyle sulfate
- Triéthyleamine
- Eau ultra pure
- Metformine chlorhydrate matière première titrée (lot N° MTB078851107, T=99,70%)
- Acébutolol chlorhydrate matière première titrée (lot N° 067010, T=99,18%)
- Azote

Partie II : Etude Expérimentale

Notre but dans ce chapitre consiste en la mise au point et validation d'une méthode de dosage de la Metformine dans le plasma et l'appliquer à une étude in vivo.

Dans le cadre de cette étude expérimentale, la démarche empruntée pour aboutir à notre objectif est constituée de quatre étapes principales.

- ◆ Mise au point et optimisation des conditions chromatographiques ;
- ◆ Mise au point et optimisation de la technique d'extraction ;
- ◆ Validation de la méthode bioanalytique ;
- ◆ Application in vivo de la méthode.

II-1 Mise au point et optimisation des conditions chromatographiques

Pour mener à bien une élution en chromatographie liquide, il faut sélectionner et optimiser plusieurs paramètres, dont les plus importants sont :

- Le choix de la phase stationnaire;
- Le choix et l'optimisation de la composition de la phase mobile.

Dans tous les cas, il s'agit de déterminer les conditions optimales d'analyse permettant :

- ✓ D'atteindre le seuil limite de détection le plus bas en travaillant avec une sensibilité maximale ;
- ✓ D'améliorer la sélectivité de la phase stationnaire vis-à-vis du produit à analyser ;
- ✓ D'obtenir une résolution convenable entre les molécules à analyser ;
- ✓ De réduire le temps d'analyse.

II-1-1 Réalisation des Essais

L'objectif est d'avoir une méthode qui satisfait aux contraintes techniques de l'analyse, Il faut à ce stade vérifier que tout les paramètres sont adéquats ; séparation satisfaisante des différents composés, temps d'analyse acceptable par rapport au nombre important des manipulations à réaliser.

II-1-1-1 Choix de l'étalon interne

Les propriétés de l'étalon interne doivent se rapprocher de celles de la molécule à doser. C'est-à-dire une ressemblance dans la structure chimique, pour avoir le même comportement physico-chimique vis-à-vis les différents réactifs utilisés dans l'étape d'extraction. Généralement on choisi une molécule qui appartient à la même classe chimique. Pour notre cas, la Metformine appartient à la famille des biguanides, la Phenphormine et la Buformine peuvent être utilisées, mais ces deux molécules ne sont pas disponibles sur le marché, pour cela, nous avons testé d'autres molécules à savoir : Dexchlorpheniramine, Aciclovir, Aténolol, Metoclopramide, Acébutolol et la phénytoin.

II-1-1-3 Détermination de la longueur d'onde d'absorption maximale

Pour augmenter la sensibilité de la méthode de dosage, nous devons déterminer une longueur d'onde où l'analyte engendre une réponse maximale en termes d'absorption, pour cela, nous avons fait un balayage en spectrophotométrie UV-visible entre 200 et 400 nm.

II-1-1-4 Choix du pH de la phase mobile

Dans un milieu acide, la Metformin existe sous deux formes tautomériques [61], et à pH inférieur à 05 la Metformine n'est pas retenue en phase stationnaire (polaire) et à pH supérieur à 07 la capacité de rétention augmente mais la durée de vie de la phase stationnaire est considérablement réduite. Le meilleur compromis est d'ajuster le pH de la phase mobile à pH neutre neutre [55].

II-1-1-5 Choix de la phase stationnaire et optimisation de la phase mobile

La séparation chromatographique dépend de la différence de solubilité des solutés dans la phase mobile et de différentes interactions des solutés avec les groupements organiques greffés sur la phase stationnaire.

Pour ce la, nous avons utilisé un mélange binaire de solvant ; un modificateur de polarité de la phase mobile et un tampon phosphate pour maintenir le pH constant

Des tests préliminaires nous ont permis de fixer les paramètres expérimentaux notamment la longueur d'onde à 232nm, la température de la phase stationnaire à 25°C, le débit de la phase mobile à 0,9 ml/min et le volume injecté est de 20µl. Les différentes expériences réalisées sont regroupées dans le tableau suivant.

Tableau 16 : Essais réalisés pour l'optimisation de la méthode analytique

Phase stationnaire	Phase mobile
Gel de silice	Méthanol / tampon phosphate (KH ₂ PO ₄ 0.05M) X ₁ /X ₂ (V/V), pH =7 avec KOH 02M
	40/60
	45/55
	50/50
	55/45
	60/40
	65/35
	70/30
C₁₈	-1 ^{ère} cas : Acétonitrile, Sodium dihydrogène phosphate 0,01M (40/60).
	-2 ^{ème} cas : Acétonitrile, Sodium dihydrogène phosphate 0,01M.20mM (AOS) (40/60).
Phényle	-1. Tampon acétate de sodium / Acétonitrile pH 5,5 70/30(V/V) [08]
	-2. Tampon phosphate (KH ₂ PO ₄ 10mM) / Méthanol 65 /35
	-3. Tampon phosphate (KH ₂ PO ₄ 05mM) / Méthanol 65 /35
	-4. Méthanol / Tampon phosphate (KH ₂ PO ₄ 0,05M) X ₁ /X ₂ (V/V), pH=7
	-4. 1. 50/50
	-4. 2. 60/40
	-4. 3. 65/35
	-4. 4. 70/30
	-4. 5. 75/25
	-4. 6. 77/23
-4. 7. 80/20	

(AOS) Acide Octane Sulfonique

II-2. Mise au point de la technique d'extraction

Cette étape est essentielle, car elle conditionne la mise en œuvre de la bonne méthode de quantification et par conséquent la qualité du résultat pharmacocinétique. Pour cela nous avons utilisé plusieurs techniques d'extraction en vue de choisir la meilleure.

Les caractéristiques physico-chimiques de la Metformine chlorhydrate sont [01] :

a- Formule chimique : $C_4 H_{12} N_5 Cl$

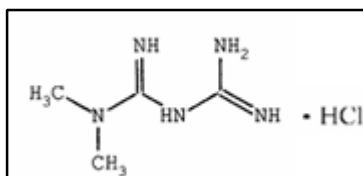


Figure 12 : Formule chimique développée de la Metformine chlorhydrate

b- Solubilité et polarité

La Metformine chlorhydrate est très soluble dans l'eau, peu soluble dans l'alcool, pratiquement insoluble dans le chloroforme, l'acétone, le chlorure de méthylène et l'éther.

La Metformine est une molécule très polaire, elle est caractérisée par un coefficient de partage (octane/eau) égale 0,01, elle est caractérisée par un pKa de 12,4.

II-2-1 Réalisation des essais

Le choix d'une technique d'extraction est basé principalement sur les propriétés physico-chimiques de l'analyte.

II-2-1-1 Préparation des solutions de contrôle de qualité

Les solutions de contrôle de qualité (solutions de plasma à trois niveaux de concentration faible, moyen et élevé) vont servir à l'évaluation du rendement d'extraction, la fidélité et la stabilité des échantillons dans le milieu biologique, la méthode de préparation est indiquée dans le tableau suivant.

Tableau 17 : Préparation des solutions de contrôle de qualité

Concentration En ng/ml	Solution d'Acébutolol (10µg/ml)	Solution de Metformine (1µg/ml)	Solution de Metformine (10µg/ml)
90	50µl	45µl	/
1500	50µl	/	75µl
3500	50µl	/	175µl

Exemple : pour préparer une solution de 90ng/ml, il faut prendre 45µl à partir de la solution de Metformin (1µg/l).

Pour le système chromatographique nous avons utilisé la méthode développée dans la partie mise au point et optimisation des conditions chromatographiques.

Comme nous l'avons déjà mentionné, la Metformine est un produit très polaire, ce qui rend son extraction par solvant très difficile, certaines solutions peuvent être utilisées.

1- Changement du pH du milieu : l'extraction liquide-liquide permet l'utilisation de toute l'échelle de (pH) ; afin de déplacer le partage de la substance à analyser vers le solvant organique, le caractère hydrophobe de cette substance peut être augmenté par suppression de l'ionisation, Dans le cas où le pH dépasse les 07 la Metformine risque de se dégrader [01].

2-Réactions de dérivation: les composés ionisables peuvent être extraits par un solvant organique sous forme de paires d'ions globalement neutres, en présence d'un agent d'appariement approprié (tetrabutylammonium, alcane sulfonate) ou bien par une réaction chimique.

II-2-2 Dérivation

II-2-2-1 Principe

La réaction de dérivation est effectuée dans un milieu biphasique, l'une aqueuse contient la Metformine dans le plasma et l'autre organique contient une solution de p-NBC dans le Chlorure de méthylène :

- ✓ Formation d'un complexe (triazinique) hydrophobe ;
- ✓ Extraction du complexe formé par un solvant organique (Chlorure de méthylène) ;
- ✓ Concentration de l'analyte par évaporation du solvant ;
- ✓ L'analyse directe dans le système chromatographique après reconstitution ;

II-2-2-2 Mécanisme réactionnel

Etape (01) : Transformation de Metformine de la forme diguanide vers la forme - diiminique en utilisant une solution de NaOH pour modifier le pH du milieu.

Etape (02) : Réaction équimolaire entre la forme - diiminique de la Metformine et le p-NBC.

Etape (03) : L'excès de p-NBC non réagit est éliminé de la phase organique par formation d'un sel hydrosoluble (réaction 03).

NB : les réactions (2) et (03) sont compétitives, donc pour favoriser la réaction (2) on doit ajouter le p-NBC en excès

Le mécanisme réactionnel est détaillé dans la figure suivante :

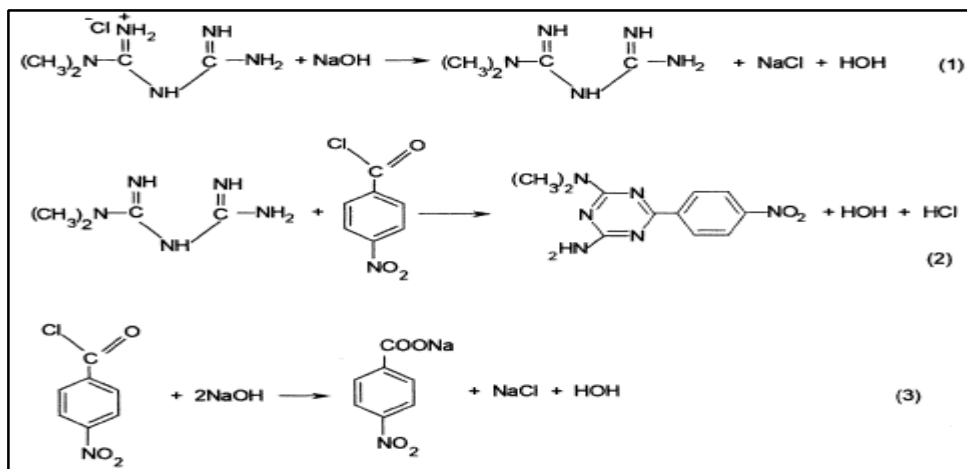


Figure 13 : Mécanisme détaillé de la réaction de dérivation Metformine- p-NBC :

II-2-2-3 Protocole expérimental [62]

- Préparation de la solution de p-NBC dans le dichlorométhane;
- A 0,5ml de plasma ajouter 0,25ml d'une solution à 20% (NaOH) et 2ml solution de p-NBC;
- 60 minutes d'agitation en utilisant un vortex ;
- 08 minutes de centrifugation ;
- Séparation de la phase organique ;
- Evaporation sous flux d'azote à T= 40°C ;
- Reconstitution du résidu par 01ml de (CH₃OH/H₂O/ (C₂H₅)₃N) (30/20/1) ;
- Injection de 20μl de cette solution dans le système chromatographique.

II-2-3 Extraction liquide-liquide [02]

II-2-3-1 Protocole expérimental

- A 0,5ml de plasma ajouter 50μl de l'étalon interne et 50 μl d'acide chlorhydrique 0,1M
- Agiter au vortex pendant 05min, puis 1,5ml d'acétonitrile et centrifuger à 2000 tours/minutes durant 10minutes ;
- Filtrer sur un filtre millipores 0,45μm transférer le contenu dans un autre tube puis ajouter 02 ml de Chlorure de méthylène, l'homogénéité est assurée par une agitation rapide (30 secondes) à l'aide d'un agitateur vibrax ;
- Centrifuger à 2000 tours/minutes durant 10 minutes, transférer la phase aqueuse à l'aide d'une micropipette ;
- Evaporer à siccité sous flux d'azote à une température de 40 °C.
- Reconstituer le résidu par 300μl de la phase mobile.
- Injecte la solution dans le système chromatographique.

II-2-4 Extraction en phase solide

II-2-4-1 Principe

- Conditionnement du support d'extraction ; il se produit en deux étapes :
 1. Le support d'extraction est conditionné en l'inondant avec un solvant organique, cette opération à deux objectifs
 - a. Assure la solvatisation des chaînes d'hydrocarbures sèches, les jointure et les fixer au support de silice.
 - b. Elimination des impuretés provenant de la synthèse et du conditionnement de la phase solide. Ces impuretés peuvent provoquer des interférences lors de l'analyse chromatographique
 2. La phase solide doit suivre un équilibrage avec les solvants utilisés pour solubiliser les analytes (eau, solution tampon avec pH approprié,...) pour éliminer l'excès de solvatisation due au solvant de dilution.
- Chargement des échantillons plasmatiques :

Cette étape se caractérise par l'adsorption complète de l'analyte à la phase solide et l'élimination des macromolécules
- Rinçage du support d'extraction :

Le support doit être rincé avec un solvant approprié de manière à éliminer le maximum d'interactions dues aux composants de la matrice biologique
- Éluion de l'analyte :

S'effectue avec un solvant ou un mélange de solvant pour assurer le maximum de désorption de l'analyte afin d'obtenir un taux de récupération élevé

L'échantillon est dilué de moitié (v/v) avec de l'eau avant le chargement. Cette étape réduit la viscosité de l'échantillon et prévient donc un éventuel blocage de l'adsorbant.

II-2-4-2 Protocole expérimental [04]

- Echantillon : A 0,5 ml de plasma ajouter 50µl de l'étalon interne, 0,5 ml d'eau et 50µl d'une solution d'acide chlorhydrique 0,1M.
- Conditionnement 1(cartouche) : 1 ml de méthanol suivi par 01 ml d'eau distillée ;
- Conditionnement 2 : 1ml d'une solution aqueuse de 02 mM sodium dodecyl sulphat ;
- Chargement : 1,1 ml d'échantillon;
- Rinçage : 1 ml d'une solution de 30% méthanol ;
- Elution : 1ml méthanol ;

- Evaporation : la partie éluée est évaporée à siccité sous flux d'azote à une température de 40 °C. Puis la reconstitution du résidu par 300 µl de phase mobile.
- injection de la solution obtenue dans le système chromatographique.

II-2-5 Défécation

II-2-5-1 Protocole expérimental [55]

- A 0,5 ml de plasma ajouter 50µl de l'étalon interne et 50 µl d'acide chlorhydrique 0,1M .vortex pendant 05min
- Ajouter 02ml d'acétonitrile et centrifuger à 2000 tours /minutes durant 10minutes,
- Transférer le contenu dans un autre tube et filtrer sur un filtre millipores 0,45µm,
- Evaporer à siccité sous flux d'azote à une température de 40 °C.
- Reconstituer le résidu par 300 µl de phase mobile et injecte la solution dans le système chromatographique

II-3 Validation de la méthode bioanalytique

II-3-1 Spécificité et sélectivité

Pour l'évaluation de ces deux paramètres nous avons analysé quatre plasmas de différentes sources, et aussi nous avons chargé un plasma blanc par la caféine et le diclofenac.

II-3-2 Limite de quantification

Pour la détermination de la limite inférieure de quantification, nous avons utilisé la méthode de dilution, elle consiste à préparer une solution mère puis on fait des dilutions successives et on fait l'analyse chromatographique pour chaque dilution, jusqu'à ce qu'on arrive à cerner la valeur limite.

II-3-3 Linéarité et Droite de calibration

L'intervalle de mesure découle des études de linéarité, il dépend du type d'application prévue par la méthode.

Nous avons déterminé la borne inférieure en se basant sur la valeur de la limite inférieure de quantification, par contre la limite supérieure de quantification est fixée à partir de références bibliographiques et principalement sur le fait que « La concentration plasmatique maximale de la Metformine n'a jamais dépassé 04µg/ml malgré une augmentation de la dose administré » [61].

Tableau 18 : Protocole expérimental de la linéarité et la droite de calibration

Concentration ng/ml	Plasma blanc [*] (ml)	Solution EI (10µg/ml)	Solution mère 1 (1µg/ml)	Solution mère 2 (10µg/ml)
30	0,5	50µl	15µl	/
100	0,5	50µl	50µl	/
250	0,5	50µl	125µl	/
500	0,5	50µl	250µl	/
1000	0,5	50µl	/	50µl
2000	0,5	50µl	/	100µl
4000	0,5	50µl	/	200µl

(*) Pour la droite de calibration

Dans un tube sec ajouter 50µl d'étalon interne et l'une des solutions mère (1) ou (2).

- Evaporer à siccité sous flux gazeux d'azote à 40°C
- Ajouter 0,5 ml du plasma
- 50µl d'acide chlorhydrique 0,1M.
- Ajouter 02 ml d'acétonitrile
- Centrifuger à 2000tr/min pendant 10mn
- Filtrer sur filtre de porosité 0,45µm
- Evaporer à siccité sous flux d'azote à 40°C
- Ajouter 300µl de la phase mobile

II-3-4 Fidélité

II-3-4-1 Répétabilité : Les solutions de contrôle de qualité sont analysées avec 05 répétitions par niveau, les injections sont faites dans le désordre.

II-3-4-2 Fidélité intermédiaire : Les solutions de contrôle de qualité sont analysées avec 05 répétitions par niveau, sur deux jours différents, les injections sont faites aléatoirement.

II-3-5 Robustesse

II-3-5-1 Facteurs contrôlés du modèle

Les expériences préliminaires ainsi que les connaissances déjà acquises sur la méthode nous ont conduit à choisir cinq facteurs. Ces facteurs sont ceux qui a priori sont les plus à même d'agir de manière significative sur les aires et les temps de rétention des pics et donc sur les titres et les qualités. Ce sont :

- ✓ Pour la phase mobile : le débit, la concentration en ions phosphate, le pH et le pourcentage volumique de méthanol
- ✓ Pour la phase stationnaire : la température du four

Si l'on voulait faire toutes les combinaisons d'un plan complet de 2^5 il faudra réaliser 64 essais.

Le plan que nous avons décidé de retenir pour notre étude comporte 29 essais répartis de la manière suivante : 16 (2^{5-1}) pour le plan factoriel fractionnaire, 10 pour les points axiaux et 3 points au centre qui vont permettre d'estimer la répétabilité de la méthode.

Le plan fractionnaire utilisé a été construit en choisissant d'aliaser le cinquième facteur sur l'interaction des quatre autres, ce qui en notation de Box s'écrit $5 = 1234$.

Le choix de la gamme de variations de chacun des facteurs est, dans l'optique d'une étude de robustesse, un problème délicat. En effet la plage de variation doit satisfaire deux critères qui peuvent se révéler contradictoires. D'une part la plage de variations des facteurs doit être suffisamment large pour que l'on puisse observer des variations significatives de la réponse et d'autre part elle doit être suffisamment restreinte pour pouvoir simuler les variations susceptibles de se produire de manière non contrôlée lors de la mise en oeuvre de la méthode.

Pour un plan composite centré à 5 facteurs, le critère d'isovariance par rotation est vérifié lorsque la distance des points axiaux au centre du domaine est égale à ± 2 [60]. L'ensemble de ces considérations nous a conduits à fixer les niveaux des facteurs comme il est indiqué dans le tableau (20).

Les niveaux des facteurs sont exprimés en valeurs centrées réduites : 0 représente le niveau au point de fonctionnement (centre du domaine), -1 et +1 respectivement les niveaux bas et haut pour le plans factoriels, -2 et +2 respectivement les niveaux bas et haut pour le plan axial.

Tableau 19 : Plages de variation des facteurs

Facteurs	Niveau bas		Point central	Niveau haut	
	Axial	Factoriel		Factoriel	Axial
	(-2)	(-1)	0	(1)	(2)
Débit (ml/min) (F1)	0,86	0,88	0,9	0,92	0,94
Phosphate (g/l) (F2)	5,24	5,34	5,44	5,54	5,64
pH (F3)	6,8	6,9	7,00	7,1	7,2
Température (°C) (F4)	23	24	25	26	27
Méthanol (%v) (F5)	78	79	80	81	82

Tableau 20 : Ensemble des expériences réalisées pour l'évaluation de la robustesse.

Expérience n°	Température	pH	Phosphate	Débit	Méthanol
1	-1	-1	-1	-1	1
2	-1	-1	-1	1	-1
3	-1	-1	1	-1	-1
4	-1	-1	1	1	1
5	-1	1	-1	-1	-1
6	-1	1	-1	1	1
7	-1	1	1	-1	1
8	-1	1	1	1	-1
9	1	-1	-1	-1	-1
10	1	-1	-1	1	1
11	1	-1	1	-1	1
12	1	-1	1	1	-1
13	1	1	-1	-1	1
14	1	1	-1	1	-1
15	1	1	1	-1	-1
16	1	1	1	1	1
17*	0	0	0	0	0
18*	0	0	0	0	0
19*	0	0	0	0	0
20	-2	0	0	0	0
21	2	0	0	0	0
22	0	-2	0	0	0
23	0	2	0	0	0
24	0	0	-2	0	0
25	0	0	2	0	0
26	0	0	0	-2	0
27	0	0	0	2	0
28	0	0	0	0	-2
29	0	0	0	0	2

(*) Point de fonctionnement

II-4 Application in vivo de la méthode

Dans le but d'avoir accès aux paramètres pharmacocinétiques définis dans la partie théorique, et pour vérifier la fiabilité de la méthode de dosage de la Metformine dans le plasma, nous avons réalisé des expériences sur les animaux de laboratoire. Les animaux d'expérience retenus sont des rats, Dont le poids moyen est de 216,11 grammes.

Ces rats sont répartis en 04 groupes et chaque groupe contient 03 sujets. Nous avons laissé le 04^{ème} groupe comme réserve en cas d'une mortalité. Ces animaux sont mis à jeun la veille de l'expérience, le lendemain et (t = 0) un comprimé de 3,6 mg de Metformine chlorhydrate est administré en une seule prise à l'aide d'une sonde gastrique de gavage suivi de 02 ml d'eau.

En se basant sur les propriétés pharmacocinétiques de la Metformine, nous avons programmé les prélèvements aux temps suivants : 0,5 .1. 1,5. 2. 2,5. 3. 3,5. 4,5 .6, 5 .16 .24 h après la prise du médicament.

L'utilisation éventuelle de la méthode analytique, au cours d'une étude pharmacocinétique, doit être assortie de certaines réserves concernant le respect du protocole expérimental très précis de ce type d'étude. En effet, il est nécessaire de suivre le principe actif dans le site d'évaluation choisi, d'une façon rigoureuse sur le plan chronologique, ce qui conduit à multiplier les prélèvements dans le temps, ceci est irréalisable sur de petits animaux de laboratoire. Pour cette raison nous avons, planifié les prélèvements de telle sorte à avoir trois mesures pour chaque temps.

Tableau 21 : Planification des prélèvements

N ° lot	Lot 001	Lot 002	Lot 003	Lot 004
Temps de prélèvement en (heures)	0,5	1	1,5	/
	2	2,5	3,5	/
	4,5	6,5	16	/
	24	24	24	/

Nous avons prélevé le sang à partir du sinus rétroorbitaire grâce à un tube capillaire, le sang est récolté dans des tubes contenant de l'EDTA. Les prélèvements sont centrifugés à 4000 tr/min durant 10min. et 500µl du surnageant récupéré sont aussitôt congelés à -70°C.

PARTIE III : Résultats et Discussion

Partie III : Résultats et Discussions

III-1 Mise au point et optimisation des conditions chromatographiques

III-1-1 Détermination de la Longueur d'onde d'absorption maximale

Un maximum d'absorption est observé à $\lambda = 232$ nm pour la Metformine, et à $\lambda = 231$ nm pour l'Acébutolol. (Figure annexe 04)

III-1-2 choix de la phase stationnaire

III-1-2-1 Phase stationnaire C₁₈

Pour le premier cas, nous avons obtenu un résultat non satisfaisant, un temps de rétention très court (ils sont faiblement retenus par la phase stationnaire), un chevauchement des pics et une mauvaise résolution entre les deux analytes (Figure 16). Ce résultat est explicable par la grande polarité des analytes, ce qui fait qu'il n'y a pas d'interaction avec la phase stationnaire apolaire de C₁₈. (Figure 14). Ces résultats sont en accord avec la référence [08]. « L'utilisation de différentes concentrations d'Acétonitrile ou bien du Méthanol avec différents pH de tampon, ont donné des résultats non satisfaisants qui se traduisent par une faible rétention de la Metformine dans la chromatographie liquide en phase inverse ».

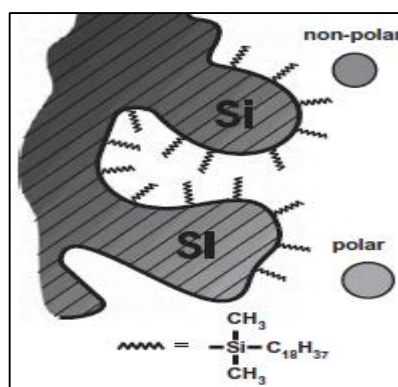
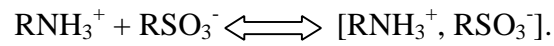


Figure 14 : Mécanisme de rétention en chromatographie en phase inverse

Pour le deuxième cas (figure 17), l'ajout de l'acide octane sulfonique dans la phase mobile accroît de façon proportionnelle le temps de rétention des deux molécules. Le facteur de résolution reste inférieur à 1,0 ce qui traduit une mauvaise séparation et donc une erreur dans l'estimation des surfaces des pics.

« La capacité de rétention d'une molécule polaire dans une phase stationnaire apolaire est déterminée principalement par le réactif d'ion paire » [43]. Le Mécanisme de rétention et la formation de paires d'ions se fait selon la réaction suivante



Les contre-ions hydrophobes se fixent sur les chaînes alkyl de la phase stationnaire et la transforment en une phase échangeuse d'ions (**figure 15**).

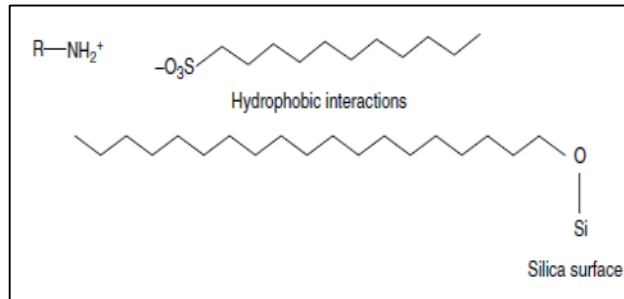


Figure 15 : Mécanisme de rétention en chromatographie de paire d'ion

Les chromatogrammes obtenus pour les deux cas sont :

Tr = 0,912 Metformine

Tr = 2,516 Acébutolol

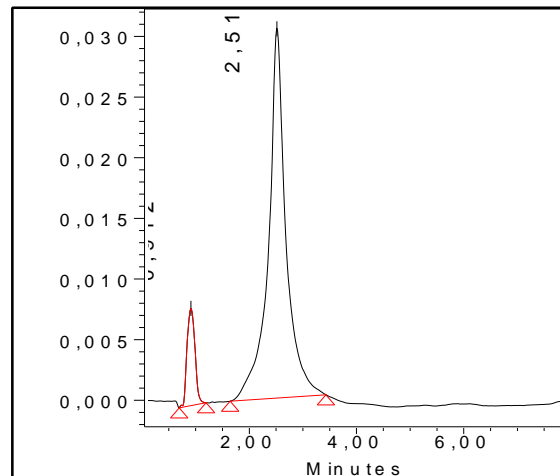


Figure 16 : Chromatogramme obtenu avec la phase stationnaire C₁₈ 1^{er} cas.

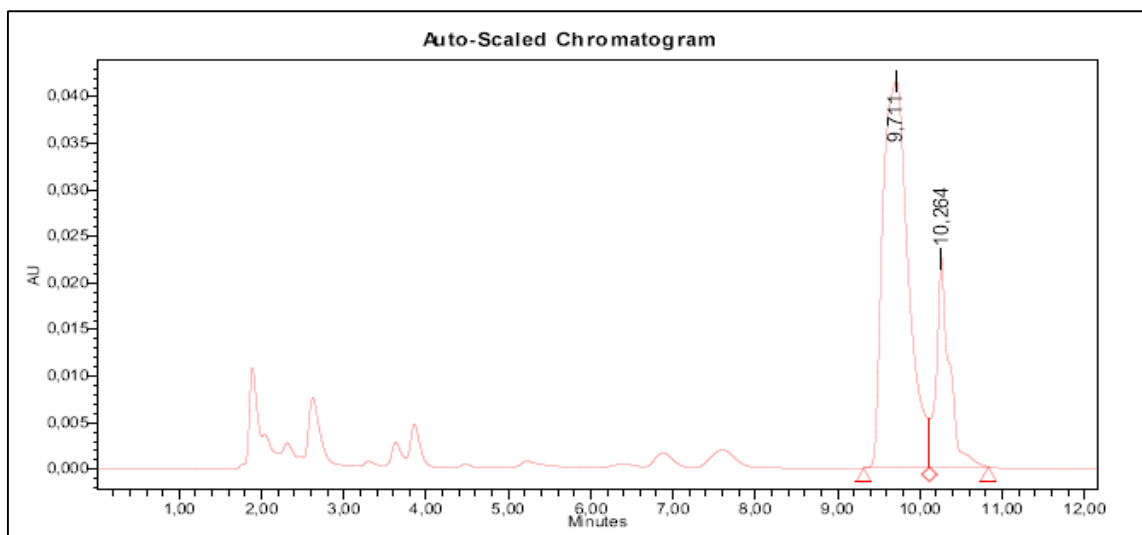


Figure 17 : Chromatogramme obtenu avec la phase stationnaire C₁₈ 2^{eme} cas.

III-1-2-2 Phase stationnaire gel de silice

Avec la phase stationnaire silice, nous avons remarqué une augmentation proportionnelle de la capacité de rétention des deux analytes en fonction de la composition en méthanol dans la phase mobile (figure 18) et les valeurs sont regroupées dans le tableau (annexe 05). Les résultats obtenus sont très satisfaisants en termes de séparation, résolution et symétrie des pics, mais l'inconvénient majeur de cette phase réside dans la non répétabilité des résultats

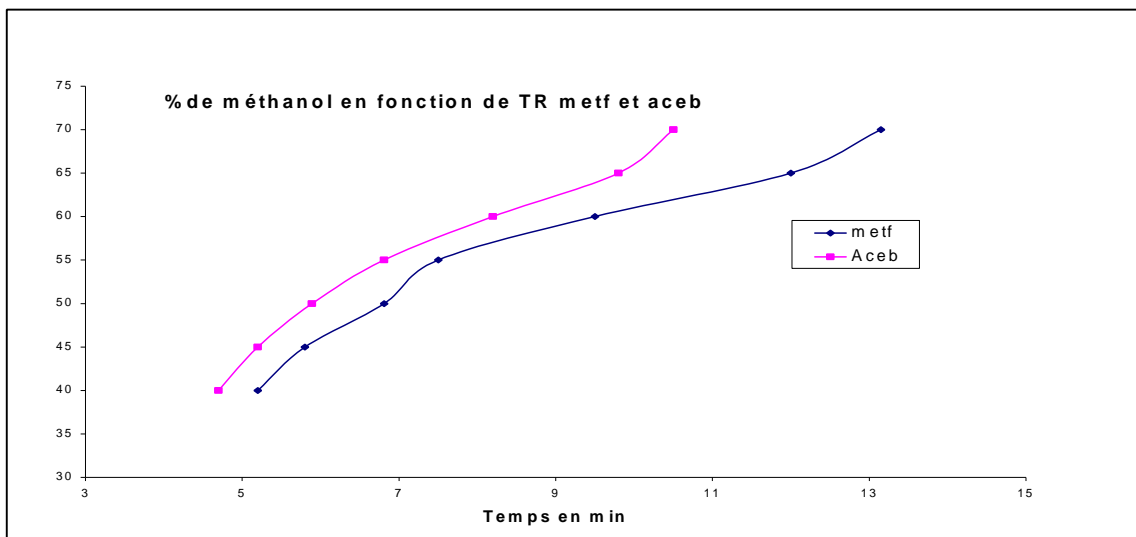


Figure 18 : Evolution de la capacité de rétention en fonction du % méthanol.

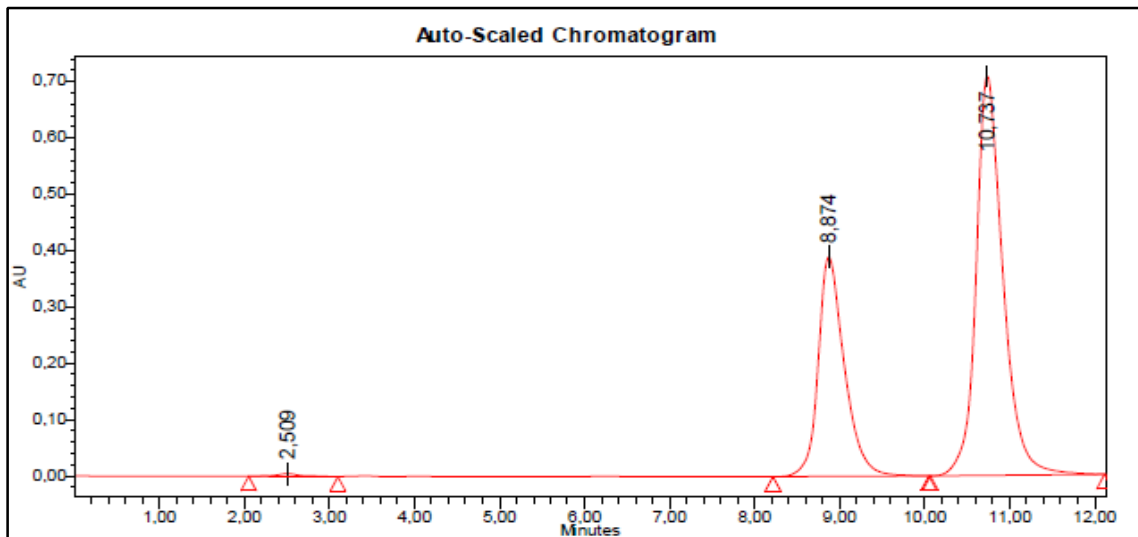


Figure 19 : Chromatogramme obtenu avec la phase stationnaire gel de silice (60% en méthanol)

Acébutolol Tr = 8,874

Metformine Tr= 10,737

III-1-2-3 Phase stationnaire phényle

a- Optimisation de la phase mobile

D'après les expériences 2, 3 et 4-3 (**tableau 22**), nous avons remarqué que l'augmentation de la force ionique engendre une diminution de la capacité de rétention des analytes, cette variation du temps de rétention est probablement liée à la diminution de la solubilité des analytes dans la phase stationnaire.

Tableau 22 : Capacité de rétention de le Metformine en fonction de la force ionique.

Expérience	2	3	4-3
Tr min	1,12	2,32	3,67

D'après la figure (20) nous avons remarqué une croissance de la capacité de rétention des deux analytes en fonction de l'augmentation de la composition en Méthanol dans la phase mobile. Cette variation peut être attribuée à une augmentation du coefficient de partage des analytes, cette constatation est déjà été fait par Z. Chen et al [63] « Avec la phase stationnaire phényle et quand on utilise une phase mobile composé de méthanol- eau le mécanisme de rétention est principalement basé sur le phénomène de partage par contre si on utilise une phase mobile Acetonitrile-eau on est en présence d'un phénomène d'adsorption ».

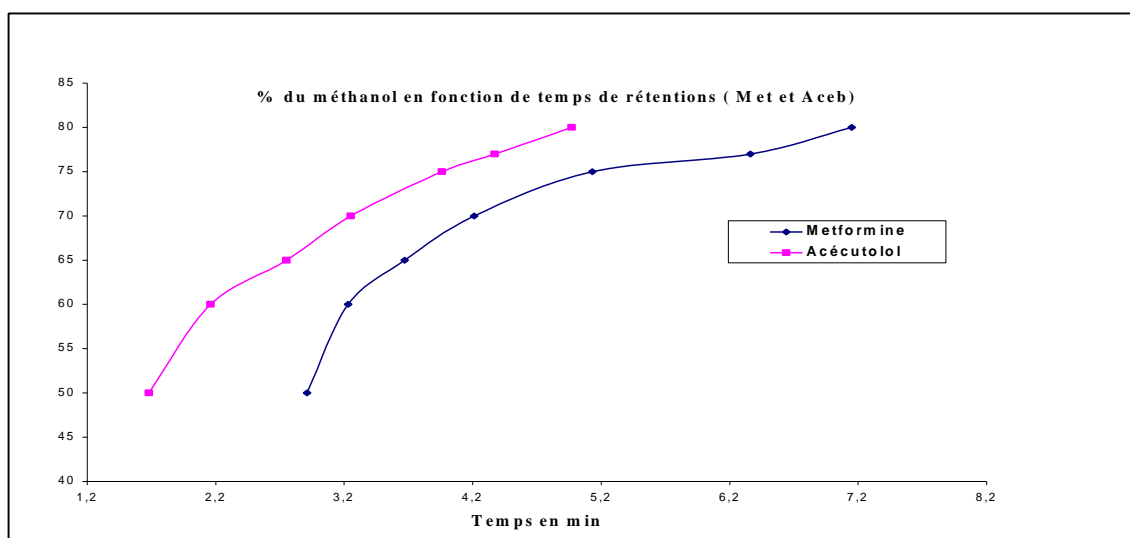


Figure 20 : Evolution de la capacité de rétention en fonction du % méthanol.

b- Choix de l'étalon interne. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau 23.

Tableau 23 : Temps rétention de différentes molécules testées pour le choix de l'étalon interne.

(D'après l'expérience 4.7)

molécule	Metformine	Dexchlorpheneramine	Aciclovir	Aténolol	Metoclopramide	Acébutolol
Tr min	7,15	3,5	3,8	2,14	25	4,92

La molécule la plus adéquate pour notre cas est l'Acébutolol, car elle donne une bonne résolution et un temps de rétention convenable. Le chromatogramme suivant illustre les deux analytes (Acébutolol Tr = 4,78 et Metformine Tr = 7,08)

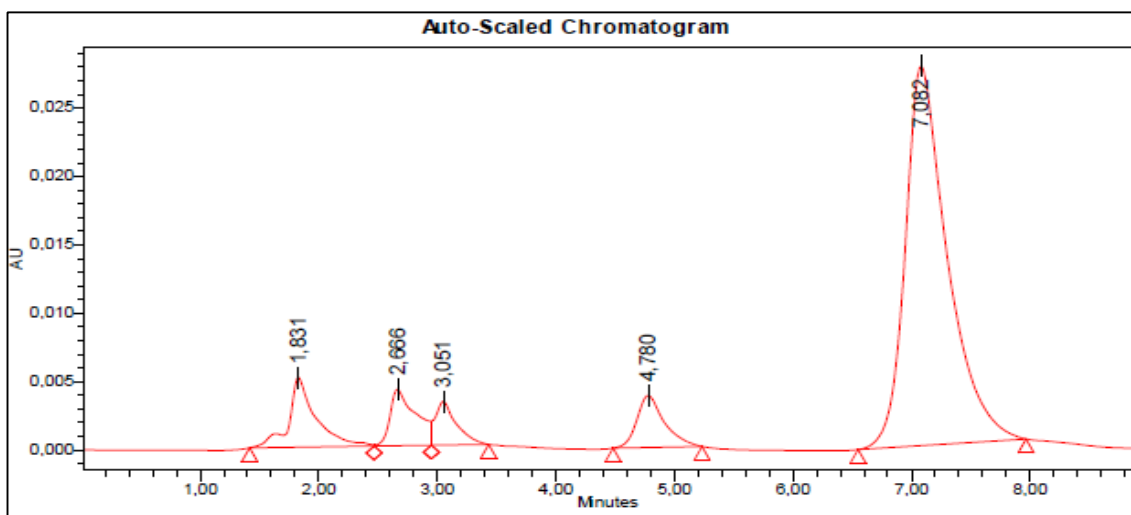


Figure 21 : Chromatogramme obtenu avec la phase stationnaire phényle

D'après les deux figures (18 et 20), nous avons constaté que les deux analytes ont le même comportement vis-à-vis de la variation du pourcentage en méthanol dans la phase mobile pour les deux cas, donc peut être qu'ils subissent les mêmes interactions dans les deux phases.

« À pH=07 la Metformine est chargée positivement, la rétention de la Metformine ne se base pas sur l'interaction de la phase inverse, mais sur l'interaction avec les groupements silanols libres qui sont plus disponibles dans la phase stationnaire phényle que dans la phase stationnaire octadécylsilylé » [55]. Ces interactions sont représentées dans la figure 22.

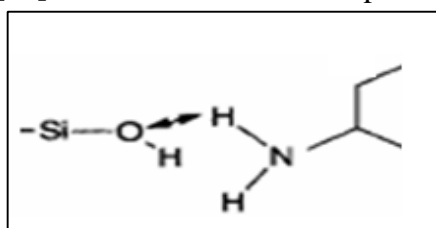


Figure 22 : Interaction de la molécule de Metformine avec les groupements silanol libre de la phase stationnaire phényle

Une autre approche est basée sur des interactions → (figure 23) qui surviennent entre l'analyte (très polaire) et les groupements phényle (polaires) de la phase greffée. [08]

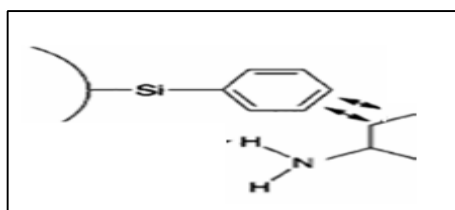


Figure 23 : Interaction de la molécule de Metformine avec les groupements phényle de la phase stationnaire

III-2 Mise au point et optimisation d'une technique d'extraction.

Différents essais effectués au laboratoire ont permis de vérifier le rendement d'extraction de la Metformine et l'Acebutolol.

III-2-1 Dérivation

La technique de dérivation nous a permis de réaliser l'extraction sans passer par une étape de traitement d'échantillon. Mais son inconvénient est le temps consommé ; plus d'une heure d'agitation, ce type d'extraction, n'est pas pratique dans une étude de bioéquivalence, où le nombre d'échantillons est très important. De plus nous avons obtenu une mauvaise séparation entre le complexe p-NBC-Metformine ($T_r = 1,37$ min) et les composés du plasma (figure 24).

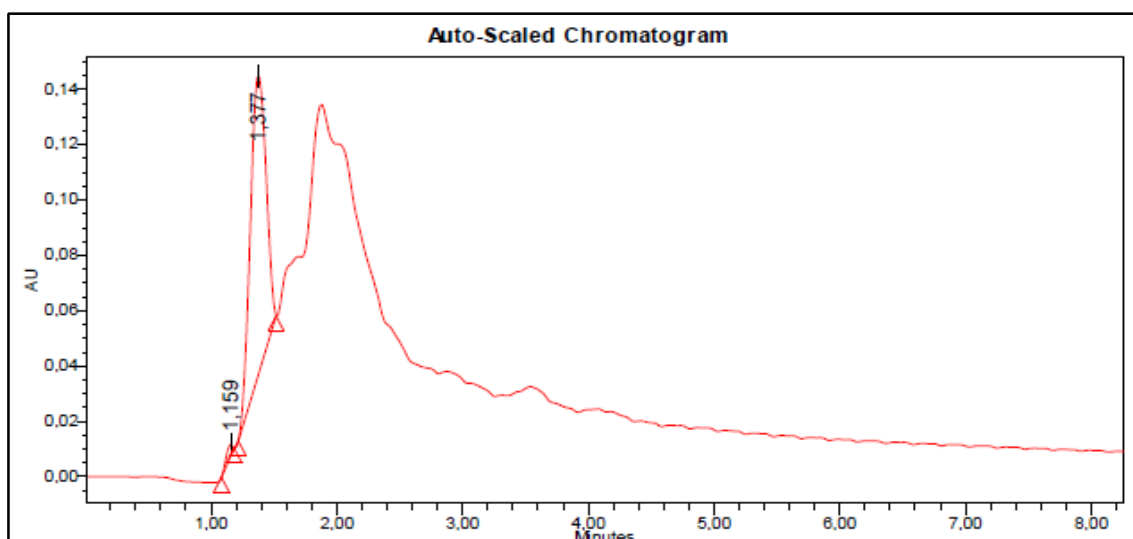


Figure 24 : Chromatogramme obtenu en utilisant la technique de dérivation

III-2-2 Extractions liquide-liquide

La Metformine est pratiquement insoluble dans tous les solvants organiques, ce qui rend son extraction par solvant à partir du plasma très délicat.

Les résultats de l'extraction obtenus sont regroupés dans le tableau suivant

Tableau 24 : Résultats de l'extraction liquide-liquide

[C] ng/ml	Etalon Injection directe		Etalon Après traitement		Echantillon		Rendement absolu		Rendement relatif	
	S Me	S Ac	S Me	S Ac	S Me	S Ac	S Me	S Ac	S Me	S Ac
90	17120	157801	12406	52294	12839	7050	74,99	4,46	103,49	13,4
1500	263921	147132	221094	58105	180090	5570	68,23	3,78	81,45	9,58
3500	602480	148482	586702	61069	430813	2186	71,50	1,47	73,42	3,57

S Me : Surface de pic de la Metformine et S Ac : Surface de pic de l'Acebutolol

Le rendement d'extraction est acceptable pour la Metformine mais pour l'Acébutolol il est très faible, une augmentation de la quantité de Chlorure de Méthylène jusqu'au 05 ml (il est ajouté afin d'éliminer tous les interférents présent dans l'échantillon à condition qu'ils soient solubles dans ce solvant) a donné une bonne séparation entre la phase organique et la phase aqueuse. L'ajout d'une quantité d'eau distillée (0,2 ml) a provoqué une augmentation du rendement d'extraction (80% pour la Metformine et 15% pour l'Acébutolo) Ce phénomène explique la solubilité préférentielle des deux analytes. Malgré l'augmentation remarquable du rendement d'extraction de la Metformine, celui de l'Acébutolol reste encore faible. Le phénomène est expliqué par la dégradation de l'Acébutolol en milieu acide, Alaa El-Gindy [64] a évoqué cette idée (**figure 25**), par contre une autre étude menée par Jan Krzek [65] a mentionné que l'Acébutolol chlorhydrate dans un milieu acide (0,1M) durant 04 heures d'incubation à une température de 40°C, reste stable à 98,68%.

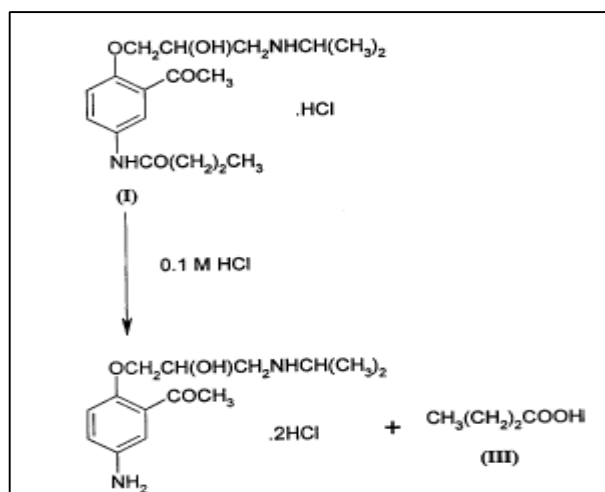


Figure 25 : Mécanisme de dégradation de l'Acébutolol chlorhydrate en milieu acide [65]

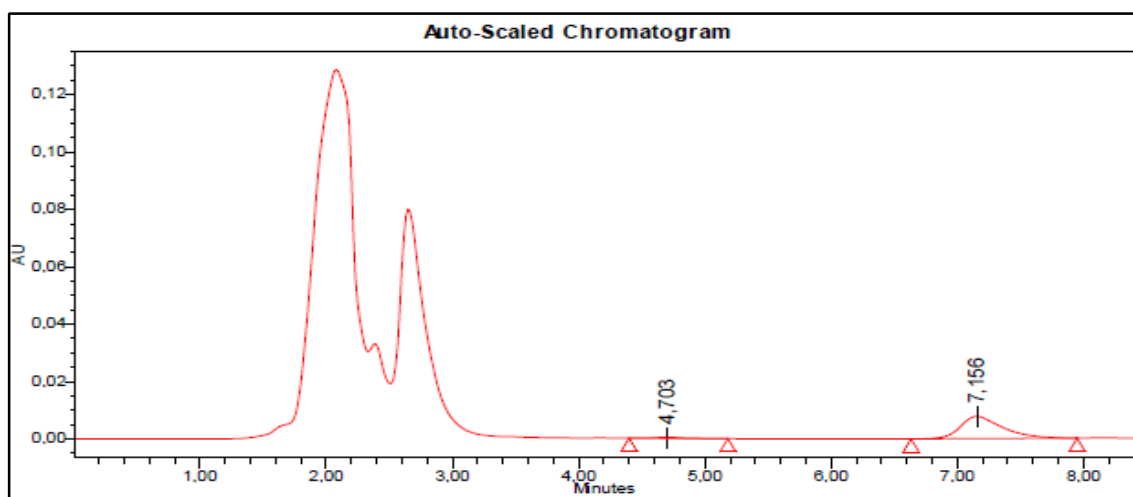


Figure 26 : Chromatogramme obtenu par l'extraction liquide – liquide

III-2-3 Extraction en phase solide

Les résultats de l'extraction sont regroupés dans le tableau (25).

L'extraction en phase solide est une alternative avantageuse lors de la détermination des analytes dans le plasma, elle met en œuvre la microextraction de plusieurs échantillons simultanément, Cette technique est très rapide, simple et sélective, mais le rendement d'extraction obtenu est très faible, et ne dépasse pas 15% pour la Metformine et 40% pour l'Acébutolol.

Une augmentation de la concentration de Dodecyle Sulfate de Sodium jusqu'à 20mM conduit à une augmentation du rendement d'extraction absolu de la Metformine et de l'Acébutolol jusqu'à 20% et 60% respectivement, Mais au delà de cette concentration nous avons observé un rendement constant. Nous pensons que le mécanisme d'extraction est basé sur la formation d'un complexe d'ion paire (même phénomène que la phase stationnaire octadécylsilylé). Malgré l'ajout du réactif d'ion paire, le rendement d'extraction reste insuffisant, nous pouvons conclure de façon nette que ce résultat est lié au faible volume d'absorbant de la cartouche utilisée.

Donc pour améliorer le rendement d'extraction nous devons changer la capacité de la cartouche.

Tableau 25 : Résultats de l'extraction en phase solide

[C] ng/ml	Etalon Injection directe		Etalon Après traitement		Echantillon		Rendement absolu		Rendement relatif	
	S Met	S Ace	S Met	S Ace	S Met	S Ace	Met	Ace	Met	Ace
90	17120	157801	6345	2460	2460	30700	14,36	19,45	38,77	51,1
	17653	155645	6319	2273	2273	30365	12,87	19,50	35,97	50,0
1500	263921	147132	5294	9881	9881	26670	3,74	18,12	186,64	47,7
	270225	151232	5465	8406	8406	27404	3,11	18,12	153,81	18,1
3500	602480	148482	10815	11388	11388	50388	1,89	33,93	105,29	61,2
	610771	157828	11810	12859	12859	58937	2,10	37,34	108,88	73,6

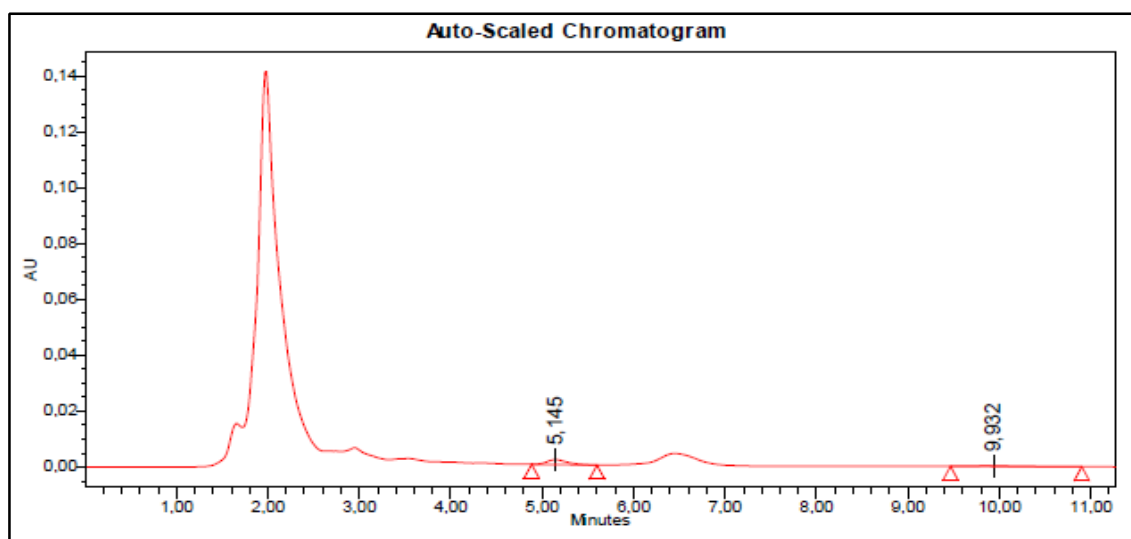


Figure 27. Chromatogramme obtenu par l'extraction en phase solide

III-2-4 Dégélation (dénaturation)

D'après le **tableau (26)** nous remarquons que le rendement d'extraction des deux analytes à partir de plasma est supérieur à 70%. Ce pourcentage est dans les normes selon [57].

La récupération incomplète des deux analytes découle de la co-précipitation de ces derniers ou de son emprisonnement dans le floculat protéique.

Ce protocole est relativement simple et permet de traiter plusieurs échantillons sériques dans un intervalle de temps réduit. Au cours de l'analyse, nous avons remarqué une augmentation du temps de rétention de la Metformine et un élargissement des pics.

Les résultats de l'extraction sont regroupés dans le tableau suivant

Tableau 26 : Résultats de l'extraction obtenus par la méthode de dénaturation

[C] ng/ml	Etalon Injection directe		Etalon Après traitement		Echantillon		Rendement absolu		Rendement relatif	
	S Metf	S Aceb	S Metf	S Aceb	S Metf	S Aceb	Metf	Aceb	Metf	Aceb
90	17120	157801	15811	150903	14838	101580	86,67	64,37	93,84	67,31
	17653	155645	15263	150828	15144	102347	85,78	65,75	99,22	67,85
	17758	153562	16052	149684	15219	103643	85,70	67,49	94,81	67,49
1500	263921	147132	246305	143856	252985	106183	95,85	72,16	102,71	73,81
	270225	151232	250054	143855	256462	107644	94,90	71,17	102,56	74,82
	265845	156428	257183	149394	262489	110530	98,73	70,65	102,06	73,98
3500	602480	148482	609746	157779	516145	104022	85,67	70,05	84,64	65,92
	610771	157828	616853	160624	539972	107671	88,40	68,2	87,53	67,03
	605235	142562	593171	156213	533778	105745	88,19	74,17	89,98	67,69

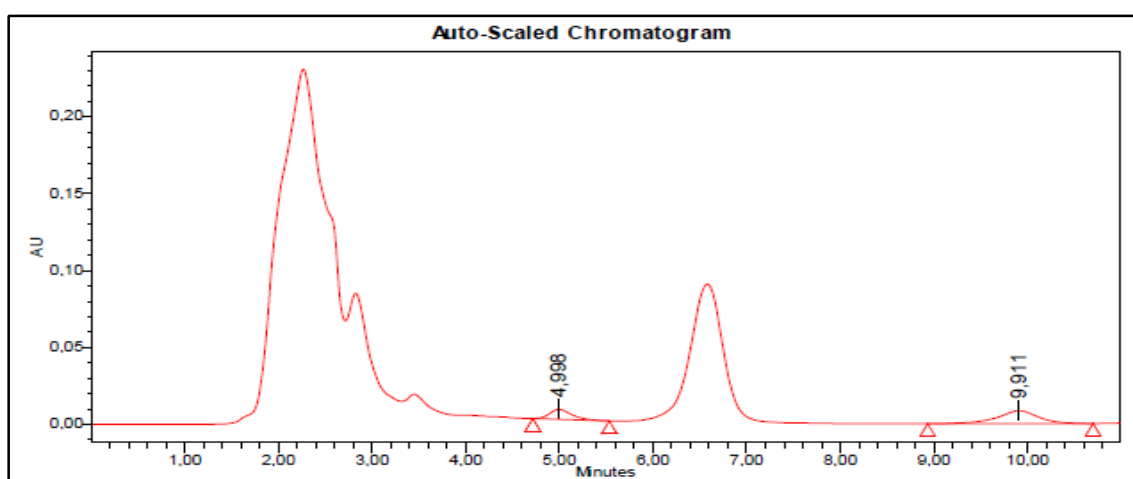


Figure 28 : Chromatogramme obtenu par la technique de dévégation.

III-3 Validation de la méthode bioanalytique

Pour le traitement statistique des différents paramètres de validation, nous avons utilisé le logiciel AVA V 3.1 (WIN).

III-3 -1 Sélectivité / spécificité

Les chromatogrammes (Annexe06) ne présentent aucun pic au temps de rétention correspondant à l'analyte et à étalon interne, et aucune interférence avec les molécules ajoutées à la matrice.

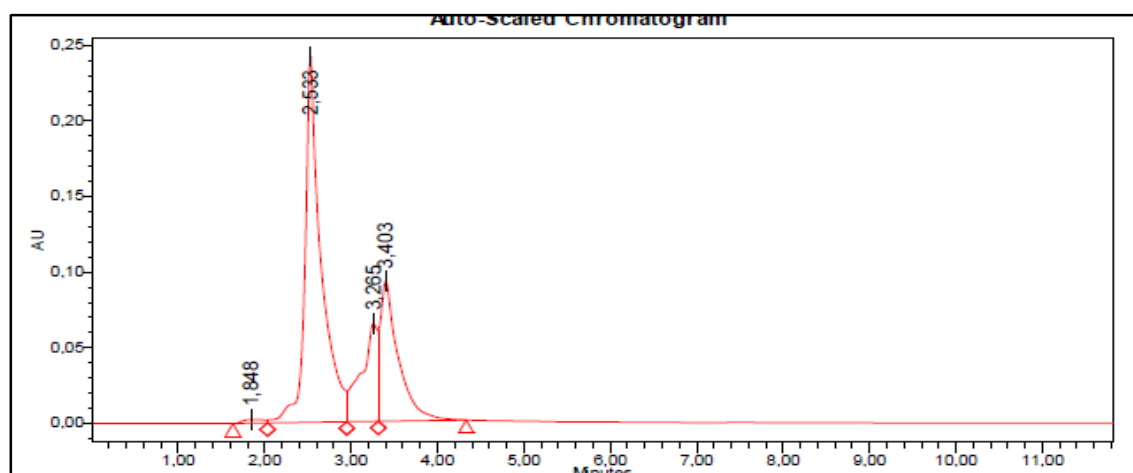


Figure 29 : Chromatogramme obtenu par l'analyse d'un plasma blanc (spécificité)

III-3 -2 limites de détection et de quantification : La plus petite valeur de concentration de l'analyte que nous avons pu quantifier est de 30 ng/ml, cette valeur est testée statiquement en calculant le coefficient de variation, ce dernier est de 1,34%.

III-3-3 Linéarité : La linéarité de la méthode de dosage est étudiée par une régression linéaire.

Tableau 27 : Données brutes (rapports de surfaces metformine /acebutolol) obtenues par 03 séries de dosage (linéarité).

Concentration en (ng/ml)	Jour 01	Jour 02	Jour 03	Moyenne
30	0,067	0,041	0,051	0,053
100	0,127	0,123	0,122	0,124
250	0,322	0,313	0,328	0,321
500	0,572	0,571	0,587	0,577
1000	1,207	1,292	1,293	1,264
2000	2,647	2,706	2,964	2,773
4000	5,385	5,388	5,430	5,401

(1) Droite de régression linéaire :

$y = a * x + b$	
Pente (a)	0,001
Ordonnée à l'origine (b)	-0,031
Coefficient de corrélation (r)	0,9954
Coefficient de régression (r^2)	0,9991

L'équation de la droite de régression : $Y = 0,001 X - 0,031$

2) Comparaison de l'ordonnée à l'origine avec 0 :

Ordonnée à l'origine (b)	-0,031
Ecart type de l'ordonnée à l'origine	0,02
$t_{\text{calculé}}$	1,365

L'ordonnée à l'origine de la droite de régression n'est pas significativement différente de zéro au risque de 5%.

$$t_{\text{calculé}}=0,365 < t_{\text{théorique}5\%}=2,093$$

(3) Test d'homogénéité des variances :

S²max	0,028
Somme des variances	0,031
C calculé	0,392
K (nb essais)	7
n (nb répétition par essai)	3

L'analyse de l'homogénéité des variances à chaque concentration démontre que l'ensemble des variances des différents groupes est considéré comme homogène au risque 1%.

$$C_{\text{calculé}}=0,39240 < C_{\text{théorique}1\%}=0,6644$$

(4) Test d'existence d'une pente significative :

	DDL	Somme des carrés	Variance	$F_{1\text{calculé}}$
Variation totale	20	69,424094	/	10963,76
Variation due à la régression	1	69,303991	69,303991	
Variation résiduelle	19	0,120103	0,006321	

La variabilité due à la régression est plus importante que la variabilité résiduelle

$$F_{1\text{calculé}}= 10963,76 > F_{\text{théorique}1\%}=8,189$$

(5) Test de validité de la droite de régression :

Source de variation	DDL	Somme des carrés	Variance	$F_{2\text{calculé}}$
Erreur expérimentale	5	0,056	0,011	2,471
Erreur de la régression	14	0,063	0,004	

La variabilité expérimentale est plus importante que la variabilité d'ajustement donc L'ajustement est considérée comme valide au seuil de probabilité $p=95\%$

$$F_{2\text{calculé}}= 2,471637 < F_{\text{théorique}5\%}= 2,958249$$

Tableau récapitulatif de la linéarité

Comparaison de l'ordonnée à l'origine avec 0

$t_{\text{calculé}}$	$T_{\text{théorique 5\%}}$	$T_{\text{théorique 1\%}}$	Condition	Conclusion
1,365	2,093	/	$t < t_{\text{th}}$	Valide au risque 5%

Homogénéité des variances

$C_{\text{calculé}}$	$C_{\text{théorique 5\%}}$	$C_{\text{théorique 1\%}}$	Condition	Conclusion
0,392	0,5612	0,6644	$C < C_{\text{th}}$	Valide au risque 1%

Existence d'une pente significative

$F_{1\text{calculé}}$	$F_{\text{théorique 05\%}}$	$F_{\text{théorique 1\%}}$	Condition	Conclusion
10963,766	8,184	15,08	$F_1 > F_{\text{th}}$	Valide au risque 1%

Validité de la droite de régression

$F_{2\text{calculé}}$	$F_{\text{théorique 5\%}}$	$F_{\text{théorique 1\%}}$	Condition	Conclusion
2,471	2,958	/	$F_2 < F_{\text{th}}$	Valide au risque 5%

Les chromatogrammes obtenus de la linéarité sont représentés dans la figure suivante

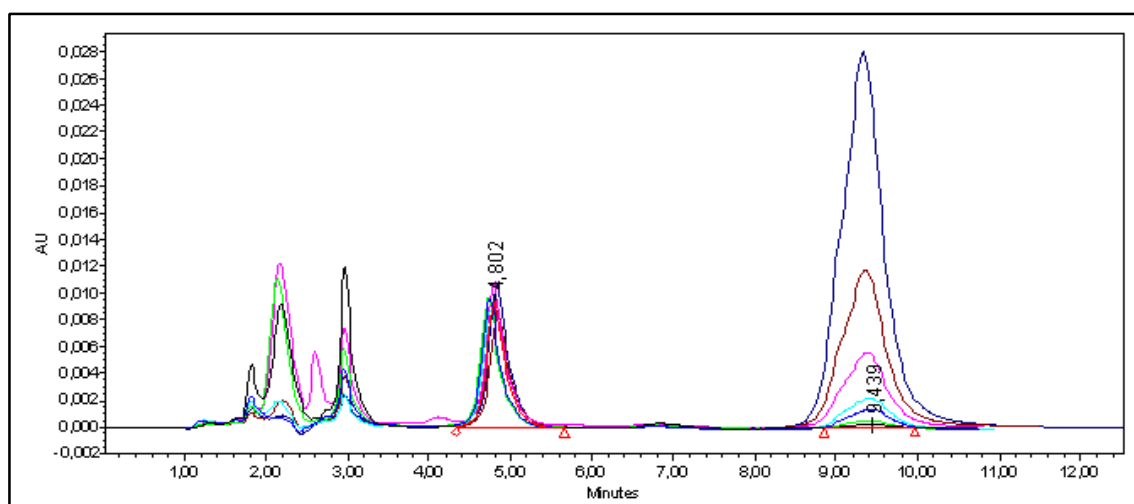


Figure 30 : Différents chromatogrammes superposés de la linéarité

III-3 -4 Droite de calibration

La détermination d'un modèle de calibration approprié est nécessaire pour une bonne quantification, les résultats de la détermination de ce dernier sont regroupés dans le tableau suivant :

Tableau 28 : Données brutes obtenues par 03 séries de dosage (droite d'étalonnage)

Concentration	Jour 01	Jour 02	Jour 03	Moyenne
30	0,048	0,049	0,049	0,049
100	0,166	0,163	0,157	0,162
250	0,448	0,463	0,464	0,458
500	0,777	0,762	0,747	0,762
1000	1,503	1,442	1,529	1,492
2000	2,565	2,697	2,669	2,64
4000	5,001	5,020	5,131	5,051

1) Droite de régression :

y = a * x + b	
Pente (a)	0,001
Ordonnée à l'origine (b)	0,112
Coefficient de corrélation (r)	0,9993
Coefficient de régression (r²)	0,9

L'équation de la droite de régression : $Y = 0,001 X + 0,112$

2) Comparaison de l'ordonnée à l'origine avec 0 :

Ordonnée à l'origine (b)	0,112
Ecart type de l'ordonnée à l'origine	0,02
t_{calculé}	4,552

L'ordonnée à l'origine de la droite de régression est significativement différente de zéro

$$t_{\text{calculé}}=4,55213 > t_{\text{théorique}5\%}=2,093$$

$$t_{\text{calculé}} \text{ égale } t_b = \left| \frac{b - 0}{\sigma_b} \right|$$

On compare le $t_{\text{calculé}}$ avec la valeur de $t^\circ [, n-2]$. (Table de STUDENT).

: le risque et $(n-2)$ nombre de degré de liberté.

Si t_b est inférieur à $t_{\text{théorique}}$ la méthode est spécifique. Or pour que b soit statistiquement considéré comme non différent de zéro il faut que la valeur de b (écart type) soit importante.

Donc plus la dispersion des points est importante plus il est facile de prouver que b est statistiquement différent de zéro !.

(3) Test d'homogénéité des variances

S2max	0,0049
Somme des variances	0,012
C calculé	0,41
K (nb essais)	7
n (nb répétition par essai)	3

L'analyse de l'homogénéité des variances à chaque concentration démontre que l'ensemble des variances des différents groupes peut être considéré comme homogène au risque 5%.

$$C_{\text{calculé}}=0,410029 < C_{\text{théorique}5\%}=0,5612$$

(4) Test d'existence d'une pente significative

	DDL	Somme des carrés	Variance	F_{1calculé}
Variation totale	20	58,34	/	7824,923
Variation due à la régression	1	58,20	58,20	
Variation résiduelle	19	0,141	0,007	

$F_{1\text{ calculé}}$ étant significatif, on conclut à l'existence d'une pente, donc à une dépendance linéaire au seuil de probabilité $p=99\%$. Et que la variabilité due à la régression est plus importante que la variabilité résiduelle

$$F_{1\text{calculé}}= 7824,9239 > F_{\text{théorique}1\%}=8,184947$$

(5) Test de validité de la droite de régression

Source de variation	DDL	Somme des carrés	Variance	F_{2calculé}
Erreur expérimentale	5	0,117	0,023	3,548
Erreur de la régression	14	0,024	0,001	

La variabilité expérimentale est plus importante que la variabilité d'ajustement donc l'ajustement est considéré comme valide au seuil de probabilité $p=95\%$

$$F_{2\text{calculé}}= 3,54 < F_{\text{théorique}1\%}=4,69$$

Tableau récapitulatif de la droite de calibration

Pente	0,001
Ordonnée à l'origine (a)	0,112
Coefficient de régression (r²)	0,998

Comparaison de l'ordonnée à l'origine avec 0

t_{calculé}	t_{théorique 5%}	t_{théorique 1%}	Condition	Conclusion
4,55	2,093	/	t _{calculé} < t _{th}	Non valide

Homogénéité des variances

C_{calculé}	C_{théorique 5%}	C_{théorique 1%}	Condition	Conclusion
0,410	0,561	/	C _{calculé} < C _{th}	Valide au risque 5%

Existence d'une pente significative

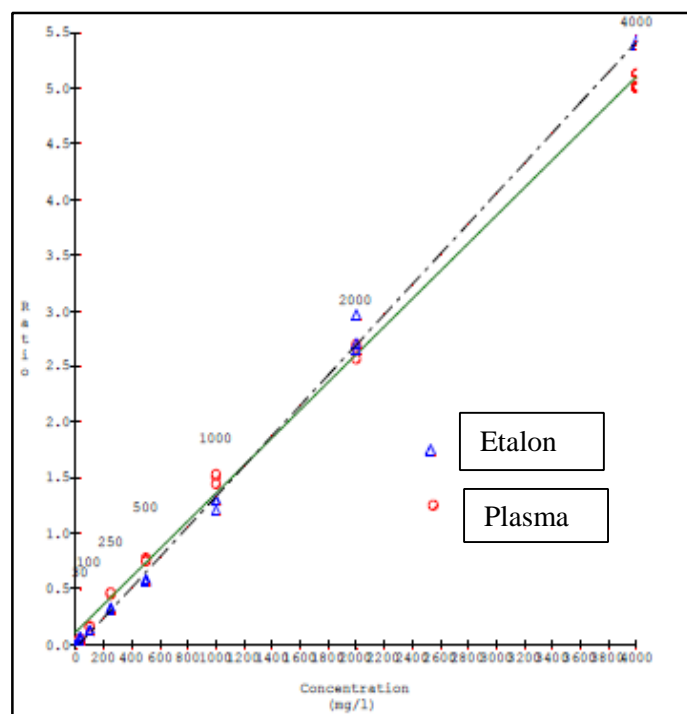
F_{1calculé}	F_{théorique 5%}	F_{théorique 1%}	Condition	Conclusion
7824,92	/	8,184	F _{1calculé} > F _{th}	Valide au risque 1%

Validité de la droite de régression

F_{2calculé}	F_{théorique 5%}	F_{théorique 1%}	Condition	Conclusion
3,54	2,95	4,69	F _{2calculé} < F _{th}	Valide au risque 1%

Après le tracé du rapport de surface de la Metformine et l'Acébutolol en fonction de la concentration de la Metformine dans les deux cas (la linéarité et la droite de calibration) nous avons obtenu la figure suivante :

Figure 31 : Représentation graphique de la linéarité et la droite de calibration.



III-3 -5 Fidélité

Les données de l'évaluation de la fidélité de la méthode sont regroupées dans le tableau 29.

Tableau 29 : Données brutes obtenues par trois niveaux de concentration (évaluation de la fidélité)

	Jour 01	Jour 02
[C] (ng/ml)	Rapport des surfaces	
90	0,154	0,157
	0,156	0,157
	0,152	0,141
	0,148	0,153
	0,154	0,152
1500	1,984	1,868
	2,189	1,908
	2,252	2,063
	1,878	2,137
	1,862	2,10
3500	4,877	4,702
	4,390	4,999
	5,124	4,941
	4,613	5,350
	4,984	5,198

III-3 -5-1 Fidélité 90 ng/ml

L'évaluation de la fidélité est réalisée par les tests statistiques suivant.

(1) Homogénéité des variances

S_{2max}	35,10
Somme des variances	42,563
C_{calculé}	0,824
k (nb essais)	2
n (nb répétitions par essai)	5
C_{théorique 5%}	0,905
Conclusion	Valide au risque 5%

C_{calculé} est inférieur à la valeur critique de la table au seuil 5% ; le test de Cochran n'est pas significatif ; l'ensemble des variances peut être considéré comme homogène.

(2) Calcul des variances

Variance intergroupe	2,107
Variance fidélité intermédiaire	21,281
Moyenne générale	34,443
CV répétabilité	13,394%
CV fidélité intermédiaire	13,394%

III-3 -5-2 Fidélité 1500 ng/ml

L'évaluation de la fidélité est réalisée par les tests statistiques suivant.

(1) Homogénéité des variances

S²max	94,029
Somme des variances	135,365
C_{calculé}	0,694
k (nb essais)	2
n (nb répétitions par essai)	5
C_{théorique 5%}	0,905
Conclusion	Valide au risque 5%

C_{calculé} est inférieur à la valeur critique de la table au seuil 5% ; le test de Cochran n'est pas significatif ; l'ensemble des variances peut être considéré comme homogène.

(2) Calcul des variances

Variance intergroupe	11,652
Variance fidélité intermédiaire	67,682
Moyenne générale	102,867
CV répétabilité	7,997%
CV fidélité intermédiaire	7,997%

III-3 -5-3 Fidélité 3500 ng/ml

L'évaluation de la fidélité est réalisée par les tests statistiques suivant.

(1) Homogénéité des variances

S²max	46,848
Somme des variances	79,393
Ccalculé	0,590
k (nb essais)	2
n (nb répétitions par essai)	5
Cthéorique 5%	0,905
Conclusion	Valide au risque 5%

$C_{calculé}$ est inférieur à la valeur critique de la table au seuil 5% ; le test de Cochran n'est pas significatif ; l'ensemble des variances peut être considéré comme homogène.

(2) Calcul des variances

Variance intergroupe	1,583
Variance fidélité intermédiaire	41,280
Moyenne générale	110,871
CV répétabilité	5,682%
CV fidélité intermédiaire	5,794%

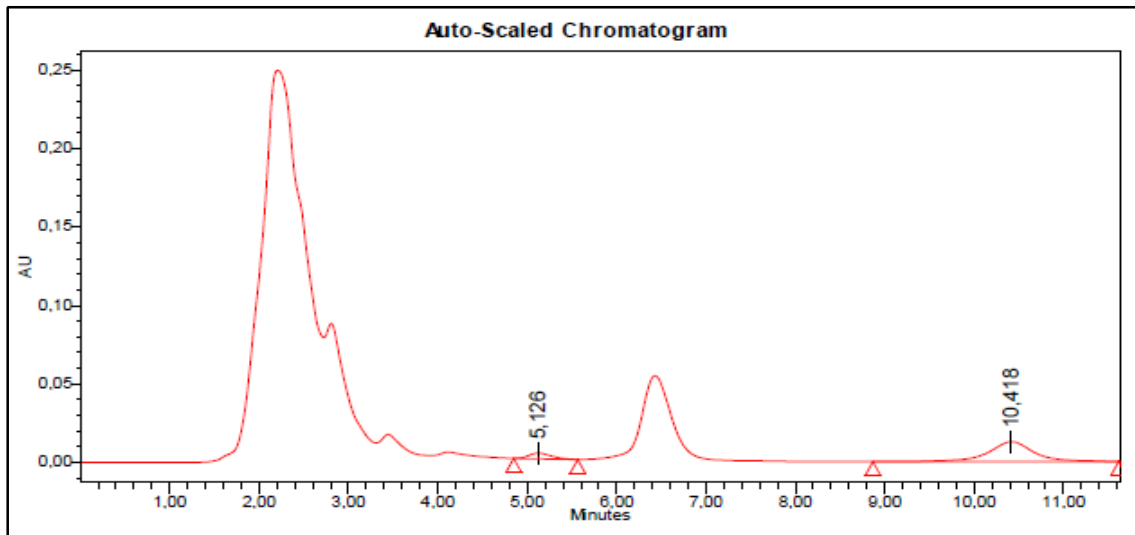


Figure 32 : Fidélité 01 jour 01 (3500ng/ml)

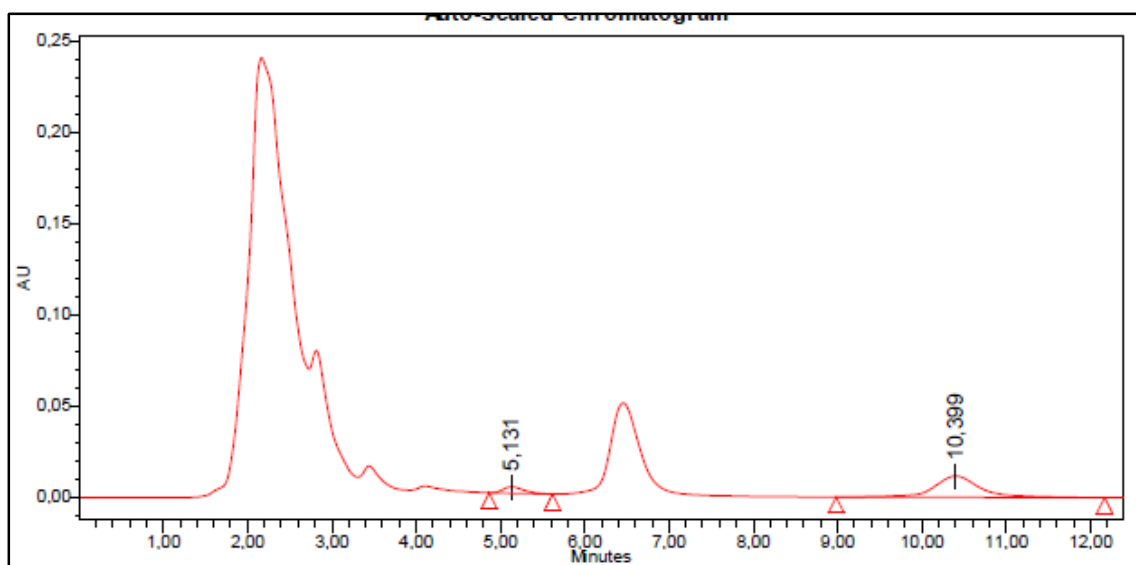


Figure 33 : Fidélité 02 jour 02 (3500ng/ml)

III-3 -6 Exactitude

Nous rappelons que l'évaluation de l'exactitude se fait par des tests statistiques des données de la linéarité (droite de calibration en bioanalyse), ces tests sont regroupés dans le tableau 30.

Tableau 30 : Tests statistiques pour l'évaluation de l'exactitude

Concentration (ng/ml)	Rapport de surfaces	x*	(xi*/xi)	100×(xi*/xi) Recouvrement	écart type	variance
30	0,048	20,620	0,687	68,735	3,841	14,757
30	0,049	22,913	0,763	76,378		
30	0,049	21,564	0,718	71,882		
100	0,166	43,376	0,433	43,376	3,758	14,126
100	0,163	40,916	0,409	40,916		
100	0,157	35,995	0,359	35,995		
250	0,448	267,985	1,071	107,194	2,904	8,433
250	0,463	280,110	1,120	112,044		
250	0,464	280,966	1,123	112,386		
500	0,777	530,404	1,060	106,080	2,408	5,799
500	0,762	518,139	1,036	103,627		
500	0,747	506,323	1,012	101,264		
1000	1,503	1108,636	1,108	110,863	3,551	12,613
1000	1,442	1060,607	1,060	106,060		
1000	1,529	1129,941	1,129	112,994		
2000	2,565	1955,318	0,977	97,765	2,766	7,653
2000	2,697	2060,2332	1,030	103,011		
2000	2,669	2038,253	1,019	101,912		
4000	5,001	3896,479	0,974	97,411	1,403	1,969
4000	5,020	3911,487	0,977	97,787		
4000	5,131	4000,347	1	100,0085		

x* : la valeur trouvée par le modèle

Homogénéité des variances

S²max	14,757
Somme des variances	65,354
C_{calculé}	0,225
C_{théorique 1%}	0,664
Conclusion	Valide au risque 1%

L'analyse de l'homogénéité des variances à chaque concentration démontre que l'ensemble des variances des différents groupes est considéré comme homogène au risque 1%.

La représentation graphique des résidus est donnée dans la figure 37.

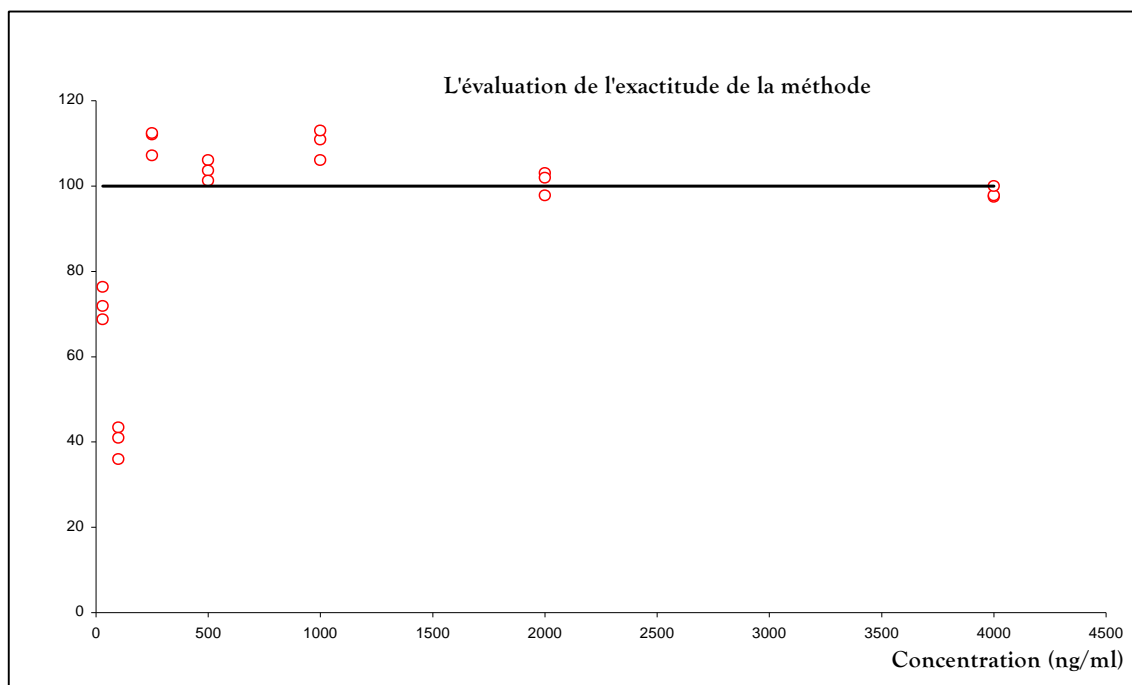


Figure 34 : Evaluation de l'exactitude (test des Résidus)

L'analyse visuelle des résidus permet de conclure que notre méthode est exacte sachant que le recouvrement moyen est de 90,84%.

III-3 -7 Robustesse

Sélection des réponses d'intérêt

Dans le cas de l'analyse quantitative, ce sont les titres des différents composés du mélange qui présentent le plus d'intérêt. Etant donné que les titres sont calculés directement à partir des aires des pics, ensuite interviennent, au niveau de la reconnaissance des composés, les temps de rétention, puis de manière beaucoup plus secondaire des paramètres chromatographiques classiques tels que la résolution, l'efficacité de la colonne ou la symétrie des pics.

Les résultats obtenus (tableau 31) sont exprimés en écart absolu entre la valeur mesurée et la valeur moyenne des trois réponses obtenues par les essais de répétabilité (essai 17,18 et 19).

$$y_i^* = y_i - \bar{y}(17,18,19)$$

Tableau 31 : Résultats de l'évaluation de la robustesse

Expérience N°	Surfaces		Temps de rétention	
	Metformine (R ₁)	Acebutolol (R ₂)	Metformine (R ₃)	Acebutolol (R ₄)
1	-0,0090150	-0,0045176	0,0153251	-0,0242470
2	0,0899806	-0,0430706	-0,0844916	-0,0767191
3	0,0194866	-0,0008796	0,0296388	0,0837280
4	0,0575191	-0,0057139	-0,0174731	-0,0053040
5	0,0213284	0,0251241	0,0134293	-0,0090926
6	0,0188160	-0,0385041	-0,0659122	-0,0729305
7	0,0185763	-0,0199213	0,0197804	0,0714150
8	0,0190739	0,0252780	-0,0709363	-0,0484940
9	-0,0091394	0,0145086	0,00992196	-0,0335291
10	0,0877200	0,0707637	-0,081553	-0,1246450
11	-0,0090302	0,0158958	0,0629111	0,0445160
12	0,0918953	0,0616170	-0,0620257	-0,0342868
13	-4,24809e-005	0,0141914	-0,0117856	0,0647850
14	0,0152415	-0,0260719	-0,0316921	-0,0231104
15	0,0493142	0,0553601	0,0412984	0,0573972
16	0,0194927	0,0405184	-0,0187055	0,0647850
17	-0,0246055	-0,0261874	0,0854718	0,0157227
18	0,0051128	-0,0143310	-0,0667654	-0,0805077
19	-0,0243324	-0,0729294	-0,0212649	-0,0253836
20	0,0090453	-0,0826488	-0,0374744	-0,0123129
21	0,0051462	0,0070785	-0,0197482	-0,0583444
22	-0,0091516	-0,0107961	0,0096375	-0,0071983
23	0,0300127	3,79771e-005	-0,0060980	-0,1129000
24	0,0324615	0,0029786	0,0014854	-0,0109869
25	0,0272727	0,0180512	-0,0908427	-0,0348551
26	0,0354776	0,0278060	0,1008280	0,0289828
27	0,0241989	0,0116034	0,0020541	-0,0318242
28	0,0489865	0,0180250	0,0003478	-0,0301193
29	0,0574615	0,0296151	-0,0001260	-0,0253836

Pour l'exploitation de la robustesse nous avons utilisé le logiciel MODDE© 6.0.

Avant d'examiner les résultats expérimentaux réponse par réponse il est judicieux d'effectuer une étude de corrélation entre les diverses réponses. En effet, si deux ou plusieurs de celles-ci sont fortement corrélées cela signifie que leurs comportements vis-à-vis des facteurs envisagés dans le plan sont similaires et peuvent facilement se déduire les uns des autres. Il apparaît donc inutile de multiplier des exploitations qui n'apporteront au fait aucune information supplémentaire.

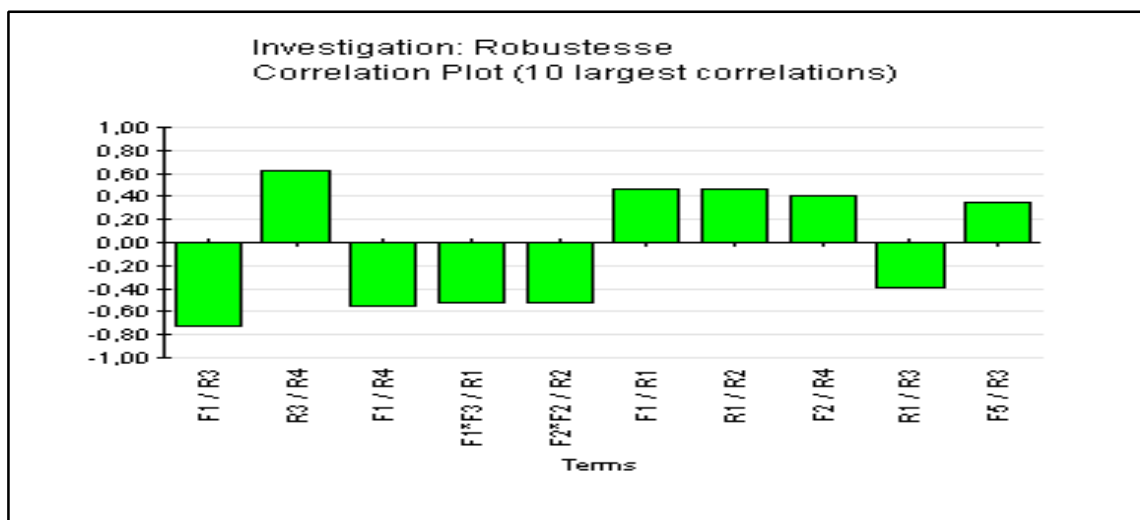


Figure 35 : Niveau de corrélation entre les facteurs et les réponses

D'après la figure 35 nous pouvons dire qu'il existe une forte corrélation entre les réponses R_3 et R_4 , et une corrélation acceptable entre la réponse R_1 et la réponse R_2 .

Les autres réponses peuvent être considérées comme indépendantes et feront l'objet d'une exploitation séparée. Donc nous avons choisi seulement les deux réponses R_1 et R_3 .

Ces constatations ont été confirmées par l'analyse des variances.

$$t_{\text{calculé}} \text{ égale } t = \left| \frac{1 - R^2}{\sigma} \right|$$

On compare le $t_{\text{calculé}}$ avec la valeur de t° [, n-2].

: le risque et (n-2) nombre de degré de liberté.

Et les valeurs trouvées sont :

$$t_1 = \left(\frac{1 - 0,63}{\sigma} \right) \quad t_2 = \left(\frac{1 - 0,45}{\sigma} \right)$$

$$t_{\text{théorique}} = 0,036$$

$$t_1 = 3,9015$$

$$t_2 = 7,072$$

t_1 et t_2 sont supérieurs à la valeur critique au risque de 1%, donc le test est considéré comme valide

L'équation du modèle qui traduit l'effet des facteurs sur la surface de pic de la Metformine est :

$$Y_{\text{Smet}} = 0,028 + 0,014 x_1 + 0,0042 x_2 - 0,0071 x_3 + 0,00030 x_4 - 0,0037 x_5 - 0,0052 x_1^2 - 0,0044 x_2^2 - 0,0034 x_3^2 + 0,0045 x_4^2 + 0,0044 x_5^2$$

L'équation du modèle qui traduit l'effet des facteurs sur le temps de rétention de la Metformine est :

$$Y_{\text{Tr met}} = -0,0035 - 0,035 x_1 + 0,0071 x_2 + 0,0022 x_3 + 0,0029 x_4 + 0,017 x_5 + 0,0019 x_1^2 - 0,0072 x_2^2 - 0,0016 x_3^2 - 0,00079 x_4^2 + 0,00077 x_5^2$$

Les modèles obtenus présentent un coefficient de régression de l'ordre de 0,85

Les effets de différents facteurs sur les réponses sélectionnées sont représentés dans les deux figures suivantes 36 et 37.

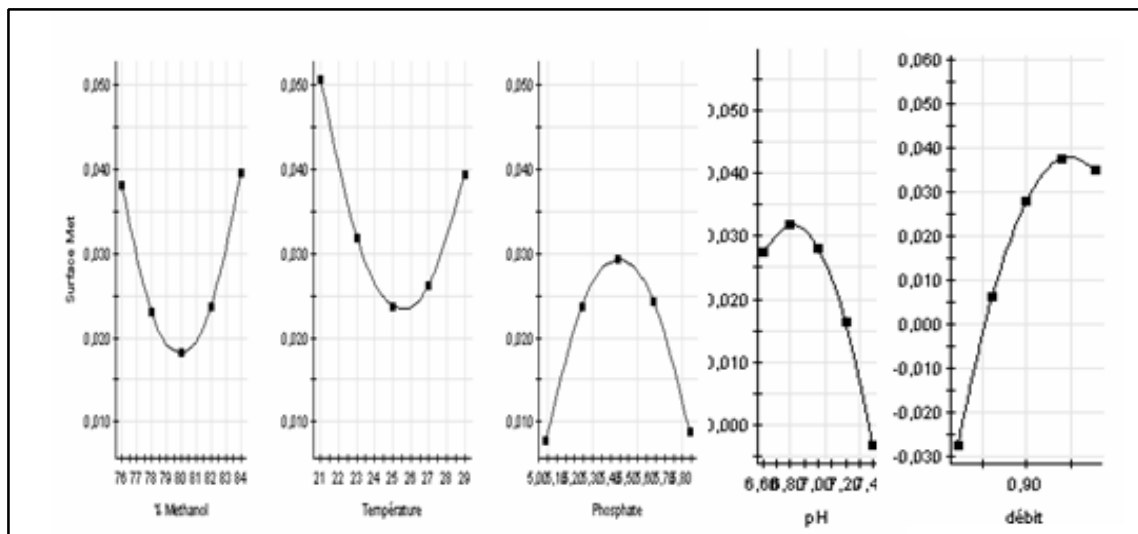


Figure 36 : Influence de variation des conditions chromatographiques sur la surface de pic de la Metformine

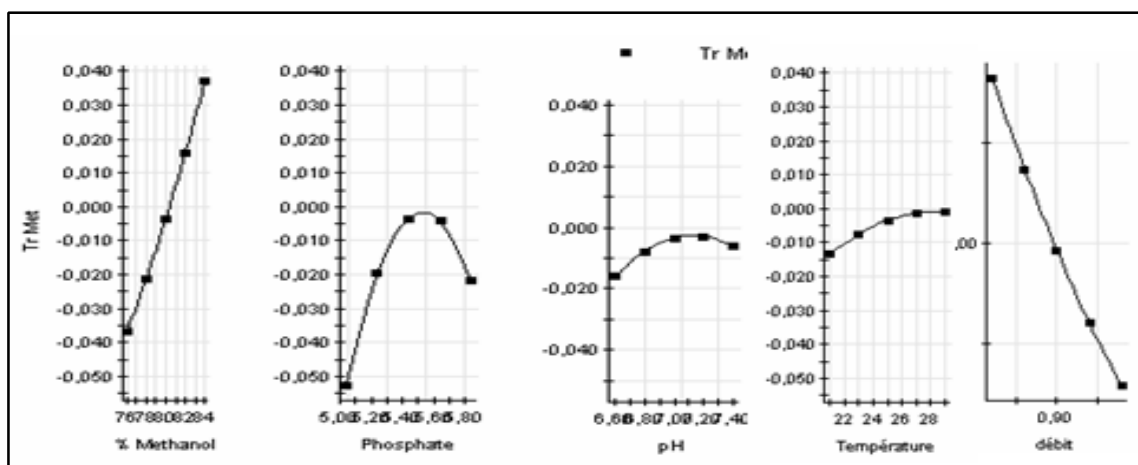


Figure 37 : Influence d'une petite variation des conditions chromatographiques sur le temps de rétention de Metformine

Si on fait l'hypothèse que l'erreur acceptable de l'écart absolu des réponses doit être inférieure à 5%. Nous pouvons conclure que notre méthode analytique est globalement robuste sous réserve d'éviter de se retrouver dans des conditions à température faible puisque celle-ci conduit à une modification de la valeur de la surface de pic de la Metformine.

D'après la deuxième figure, nous remarquons que les facteurs qui requièrent une grande vigilance sont : le pourcentage élevé du méthanol et le faible débit de la phase mobile dans une analyse qualitative de la Metformine

NB : les interprétions des résultats de la Metformine sont valables pour l'Acébutolol.

III-3 -8 La stabilité

III-3 -8-1 Stabilité en solution

- a. Des solutions de Metformine de concentration de 0,1mg/ml sont préparées dans différents milieux de pH allant de 2,5 à 8,5 et à la température ambiante sont restées stables durant 06 jours. Mais à pH égal à 10, la solution est dégradée presque entièrement (95%). [01].
- b. Des solutions de Metformine de concentration de 10 et 1µg/ml sont préparées dans le méthanol et ils sont maintenus à une température de 04 °C, sont restées stables durant 02 mois.

III-3 -8-2 Cycle de congélation –décongélation.

Tableau 32 : Résultats de la stabilité obtenus après trois cycles de congélation décongélation

Concentration (ng/ml)	Au temps initial		Après 03 cycles de congélation décongélation		Pourcentage restant	
	S Metf	S Aceb	S Metf	S Aceb	Metformine	Acebutolol
90	15219	103643	14589	98580	95,860	95,114
1500	262489	110530	256514	99216	97,723	89,763
3500	533778	105745	542514	99642	101,636	94,228

Les deux analytes sont restés stable pendant trois cycles de congélation – décongélation.

III-4 Application in vivo de la méthode

En appliquant le protocole expérimental décrit dans la partie expérimentale, nous avons obtenus les résultats regroupés dans le tableau 33. Et pour les chromatogrammes nous présentons les trois chromatogrammes suivants :

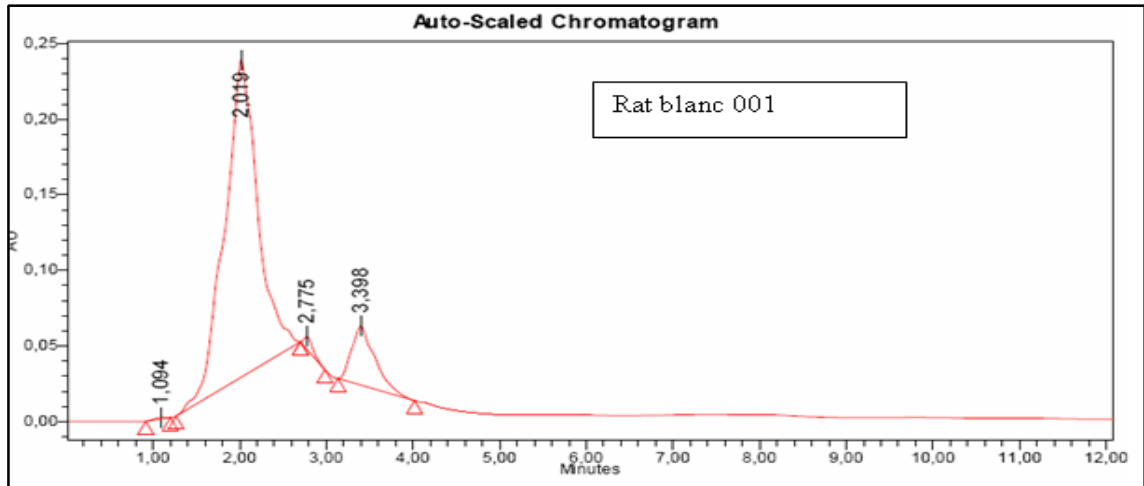


Figure 38 : Chromatogramme obtenu par l'analyse du plasma blanc (t=0) avant administration

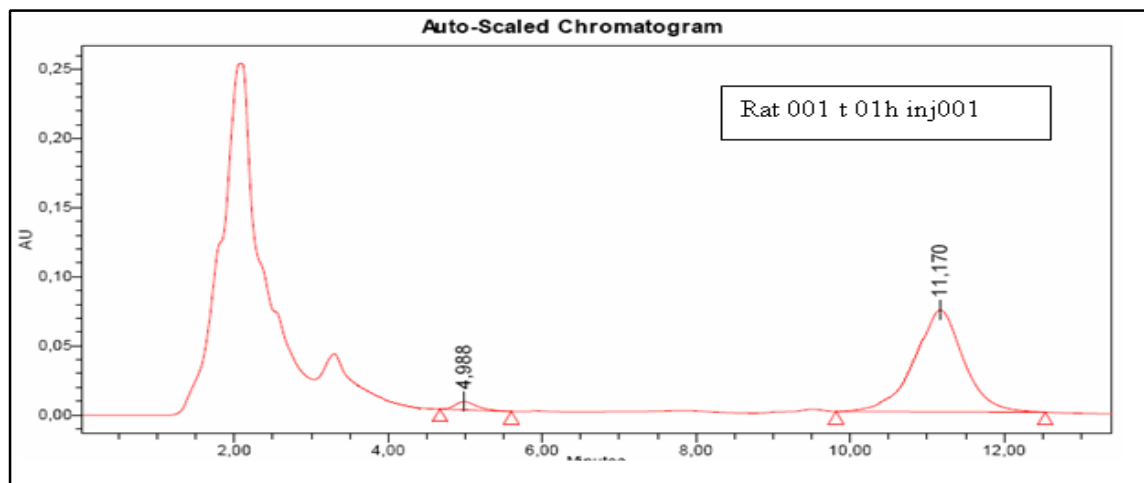


Figure 39 : Chromatogramme obtenu par l'analyse du plasma après 01h d'une administration orale de Metformine

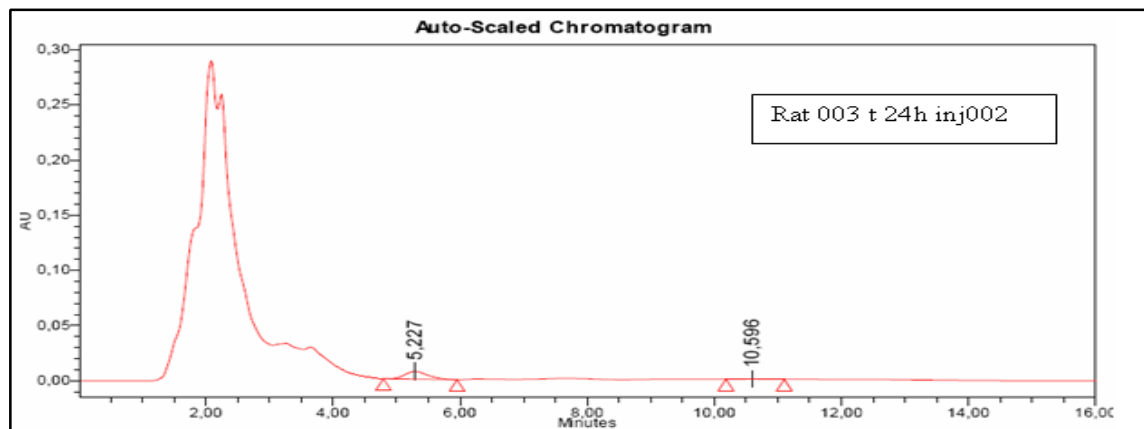


Figure 40 : Chromatogramme obtenu par l'analyse du plasma après 24h d'une administration orale de Metformine

Tableau 33 : Résultats obtenus par l'analyse chromatographique des échantillons prélevés à partir des rats

Groupe	T (h) Surface	0,5	1	1,5	2	2,5	3,5	4,5	6,5	16	24
		1	Metformin	83816	121971	139423	173088	217784	152180	92043	106602
Acebutolol	95658		105648	93589	91254	93659	91548	82568	90548	89584	69584
Metformin	74112		123835	135644	171485	216339	156814	92154	113957	33895	4350
Acebutolol	94856		95648	89548	79586	89548	89564	75648	93586	88594	68594
2	Metformin	64264	107978	116886	182856	250620	213324	144093	131692	36984	3501
	Acebutolol	86594	87548	84587	91254	91548	82458	96512	95487	91584	65841
	Metformin	67756	95712	116230	188781	240863	196967	145550	135876	36598	/
	Acebutolol	68954	78954	69854	98546	97845	95648	86231	87546	90658	69854
3	Metformin	64857	85334	75164	156841	219949	169189	113465	123872	62546	3102
	Acebutolol	69532	78546	69548	92458	105691	79856	78596	66592	95478	66598
	Metformin	79591	83509	74751	163904	232231	167129	110251	122517	65481	5052
	Acebutolol	78521	95486	76594	93265	92458	69542	68542	66984	96582	64859

À l'aide de l'équation de droite de calibration « $Y = 0,001248 x + 0,112106$ ». Nous avons transformé le rapport de surface des pics (S_{met}/S_{ach}) en concentration plasmatique de Metformine. Et après le tracé de la courbe traduisant l'évolution de la concentration plasmatique de la Metformine en fonction de temps, nous avons obtenu le profil pharmacocinétique moyen suivant

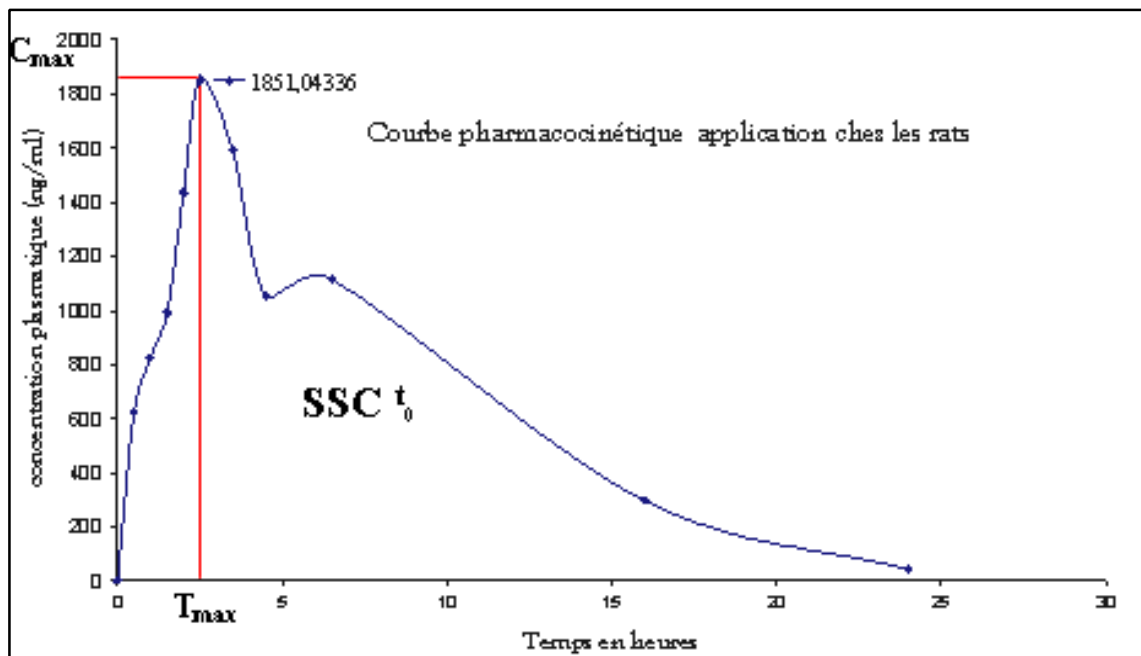


Figure 41 : Profil de l'évolution de la concentration plasmatique de la Metformine en fonction du temps ; application chez les rats.

Les valeurs de concentrations plasmatiques maximales (C_{max}), le temps nécessaire à l'obtention de la concentration plasmatique maximales (T_{max}) et l'aire sous la courbe (SSC) ont été calculés à partir du profil pharmacocinétique moyen à l'aide d'un logiciel spécial « Kinetica 4.4[®] ». Les résultats obtenus sont classés dans le tableau (33).

Tableau 34 : Paramètres pharmacocinétiques de la Metformine (application chez les rats).

Paramètre	C_{max} ($\mu\text{g/mL}$)	$T_{1/2}$ (heure)	T_{max} (heur)	$SSC_{0 \rightarrow 24}$ ($\mu\text{g/mL} \cdot \text{h}$)	$SSC_{24 \rightarrow}$ ($\mu\text{g/mL} \cdot \text{h}$)	$SSC_{0 \rightarrow}$ ($\mu\text{g/mL} \cdot \text{h}$)
Valeur	1,851	4,68	2,5	14,818	0,434	15,22

D'après l'allure de la courbe il s'agit d'une administration par voie orale, ce qui corrobore les résultats puisque nous avons obtenu une phase ascendante (qui correspond à la phase d'absorption et une phase de distribution) et une phase descendante correspondant grossièrement à l'élimination. Durant la phase croissante, l'absorption est prédominante, mais elle est accompagnée de phénomène d'élimination, tandis que, durant la phase décroissante, les phénomènes d'élimination sont prédominants. La courbe a une allure caractéristique avec une cassure dans la phase décroissante. En fait, il existe deux pentes au niveau de la phase d'élimination ; l'une correspondante à la distribution et à l'élimination et l'autre à l'élimination proprement dite. La distribution ici, concerne particulièrement le compartiment des globules rouges puisqu'il y'a séquestration dans ce milieu, ce qui fait qu'après, il y a une élimination plutôt lente (pente plus inclinée par rapport à la première pente) due au relargage à partir des hématies.

Pour les paramètres pharmacocinétiques trouvés nous pouvons dire que les valeurs se rapprochent de celles de la bibliographie [66] mais, la $SSC_{0 \rightarrow}$ est nettement plus importante que notre résultat, cette différence est explicable par la quantité importante de la dose administrée qui est de l'ordre de 10 fois supérieure.

Tableau 35 : Comparaison du résultat obtenu avec les résultats de la bibliographie

Paramètre Référence	C_{max} ($\mu\text{g/mL}$)	$T_{1/2}$ (heur)	T_{max} (heur)	K_e (1/h)	$SSC_{0 \rightarrow t}$	$SSC_{0 \rightarrow}$ ($\mu\text{g/mL} \cdot \text{h}$)
Résultats obtenus	1,85	4,68	2,5	0,16	14,818	15,22
K.H. Yuen et al	7,20	2,30	2,5	0,3	/	46,52

Nous pouvons dire que la cinétique chez les rats présente des ressemblances avec celle de l'homme puisqu'on a toujours deux compartiments ce qui est retrouvé dans la littérature [05] et le Vidal 2008 « Le chlorhydrate de Metformine diffuse dans les érythrocytes. Les érythrocytes représentent très probablement un compartiment secondaire de distribution ».

Bien qu'un compartiment profond ait été suspecté de longue date pour la Metformine, un seul travail a étudié directement la distribution tissulaire en dosant la concentration de Metformine dans les érythrocytes chez des sujets diabétiques en traitement chronique.

Nous avons constaté que l'une des difficultés de ce protocole réside dans l'insuffisance des points expérimentaux constituant la courbe finale, d'une part, l'interprétation statistique est évidemment d'autant plus précise que la multiplication des points expérimentaux. D'autre part, l'absence de certains points expérimentaux peut faire méconnaître le profil exact de la courbe réelle et donc entraîner d'importantes erreurs.

En perspective, et à la lumière des résultats encourageants trouvés dans le but de faire une étude proprement dite de la bioéquivalence et pour une meilleure estimation de SSC et le $T_{1/2}$ d'élimination, nous préconisons une légère modification des conditions opératoires, telle que la durée des prélèvements sanguins dans la phase d'élimination

L'allure de la courbe pharmacocinétique démontre que la Metformine disparaît rapidement dans le plasma mais lentement dans les érythrocytes. Le dosage érythrocytaire de la Metformine peut aider à ajuster la posologie de la Metformine

Conclusion

Conclusion

Notre objectif dans cette partie d'étude consiste à la mise au point et validation d'une méthode de dosage de la Metformine dans le plasma et l'optimisation d'un protocole expérimental en vue de l'appliquer à des études in vivo ultérieures.

La mise au point d'une procédure de dosage peut être décomposé en quatre phases successives : développement, pré validation, validation et application en routine. Le choix de la CLHP comme technique d'analyse répond aux critères d'une méthode sensible, spécifique, sélective et précise.

Sur la base du travail effectué :

- Une optimisation des conditions d'analyse chromatographiques pour le dosage sérique de la Metformine a été réalisée en premier lieu le test de plusieurs phases stationnaires usuelles dont les résultats ont été discutés et mis en valeur dont la partie précédente, un même travail a été réalisé lors de l'optimisation de la phase mobile. Notre choix s'est porté sur les conditions suivantes : une phase stationnaire phényle et une phase mobile constituée du mélange : méthanol / Tampon phosphate (KH_2PO_4 0,05M) 80/20 (V/V), pH=7. Ces conditions nous ont permis d'obtenir une bonne séparation entre les deux analytes et les composés endogènes de la matrice biologique, une sensibilité acceptable (30 ng/ml) par rapport au niveau très faible de concentration plasmatique et un temps d'élution ne dépassant pas 10 minutes.
- Une optimisation d'une technique d'extraction : l'élaboration des différentes techniques d'extraction nous a permis de sélectionner la meilleure technique en se basant sur le rendement d'extraction. La technique de défécation a donné des résultats satisfaisants en termes de taux de récupération obtenu, sachant qu'il dépasse les 86% pour la Metformine et les 70% pour l'étalon interne. Cette technique nous a permis de réaliser plus de 300 analyses sans aucune variabilité mis à part la petite variation de temps de rétention des deux analytes.
- Une validation de la méthode: elle répond à toutes les exigences de validation d'une méthode bioanalytique, ces performances sont démontrées par des études statistiques appropriées à savoir : la spécificité et sélectivité et nous pouvons avancer sur sa fiabilité au vu du coefficient de corrélation 0,9991 obtenu pour la linéarité et 0,998 pour la droite de calibration sur un intervalle de 30 – 4000 ng/ml , les coefficients de

variation et l'erreur relative aussi bien lors de l'étude de la répétabilité que la fidélité intermédiaire montrent une grande précision de la méthode proposée.

- La méthode des plans d'expériences paraît bien adaptée à l'étude de la robustesse d'une analyse par CLHP, la principale difficulté réside dans le choix du type de plan, et dans la construction de réponses les mieux adaptées. L'introduction d'une fonction de robustesse permet de caractériser globalement la capacité de la méthode à résister aux variations des conditions expérimentales, et d'identifier les facteurs qui requièrent la plus grande vigilance.
- Une application in vivo de la méthode : cette étude nous a permis d'ajuster le protocole expérimental et de vérifier la fiabilité de la méthode proposée.

Références Bibliographiques

La bibliographie

- [01]. Analytical profiles of drugs substances and excipients volume 25. (1998) 250.
- [02]. Ching-Ling Cheng , Chen-Hsi Chou, Journal of Chromatography B,762 (2001) 51–58
- [03]. Marlice A. Sipoli Marques, Alcenir de Souza Soares, Olivia Woyames Pinto Journal of Chromatography B, 852 (2007) 308–316
- [04]. S. AbuRuz « The development and validation of liquid chromatography method for the simultaneous determination of metformin and glipizide, gliclazide, glibenclamide or limperide in plasma » Journal of Chromatography B, 817 (2005) 277–286
- [05]. Robert et al « Cinétique de la Metformine dans le plasma et les érythrocytes après Administration chez le sujet sain » Diabètes Metab : 2003
- [06]. B.G. Charles, N.W. Jacobsen, P.J. Ravenscroft, Clin. Chimie. 27 (1981) 434.
- [07]. Ole Vesterqvist, Fizal Nabbie, Brian Swanson, Journal of Chromatography B, 716 (1998) 299–304
- [08]. Ceren Yardimci et al « Simultaneous determination of rosiglitazone and metformin in Plasma by gradient liquid chromatography with UV detection » Talanta (2007) 1416–1422
- [09]. Paris G. Hossein A, Abolhassan ahmadiani. Journal of chromatography B, 824(2005) 319-322
- [10]. Q. Vesterqvist, F. Nabbie, B. Swanson, Journal of Chromatography. B 716 (1998) 299.
- [11]. A.R. Bonfigli, S. Manfrini, F. Gregorio, R. Testa, Drug Monitor. (1999) 330.
- [12]. R.Huupponen, P.Ojala-Karlsson, J. Rouru, M. Koulu, Journal of Chromatography. (1992) 583
- [13]. J. Fatima Merouane « séminaire de la Fédération maghrébine d'endocrinologie et de diabétologie ». Le Courrier d'Algérie- 25.05.09
- [14]. P.WEHRLE « pharmacie galénique, formulation et technologie pharmaceutique ». MALOINE (2004). 52
- [15]. LE HIR « Pharmacie galénique » 7^{ème} édition Masson 1997
- [16]. Rossetto Yves .Pharmacotechnie industrielle Q41. (1998) 183
- [17]. Bulletin terminologique de l'industrie pharmaceutique Volume 17, n° 2, (2006)
- [18]. Jones T.M. « Mechanism of flow improvement by the addition of fine particles to bulk solids » Journal of pharmaceutical sciences, (1968)2015-2016

- [19]. A. Denoel ; Fr. Jaminet « Pharmacie galénique » (tome III) Les presses universitaires de Liège 1971.
- [20]. Hersey J.A. « Ordered mixing : a new concept in powder mixing practice » Powder technology, (1975).41-44
- [21]. Staniforth J.N. Rees J.E., Kayes J.B. « Relation between mixing time and segregation of ordered mixes » Journal of pharmacy and pharmacology, (1981).175-176
- [22]. Schweiger A., Sindel U., Zimmermann I. « Determination of the optimum mixing time for a mixture of lactose and corn starch, a general approach » Pharmaceutical industrie, (1997).985-988
- [23]. Vachon M.G., Chulia D. « The use of particle characteristics to elucidate mix homogeneity in binary powder blends » Drug development and industrial pharmacy, (1998); 61-971
- [24]. Hand book of Pharmaceutical Excipients 5^{ème} édition. (2006)
- [25]. Pharmacopée européenne 3^{ème} édition 2000
- [26]. Pharmacopée américaine 30^{ème} édition
- [27]. P.GORIS et A.LIOT Pharmacie galénique Tome 1. Édition (1939).
- [28]. [Http://www.wipo.int/pctdb/en/wo.jsp](http://www.wipo.int/pctdb/en/wo.jsp)
- [29]. Mohamed DAOUD- BRIKCI. « Le contrôle pharmacologique- intérêt des études de bioéquivalence »
- [30]. Journal Officiel de La République Algérienne Démocratique et Populaire° 44 « loi n° 08-13 du 17 Rajab 1429 correspondant au 20 juillet 2008 modifiant et complétant la loi n° 85-05 du 16 février 1985 relative à la protection et à la promotion de la santé. Aouel Chaâbane 1429. Août (2008) 3-4.
- [31]. Leblanc Pierre-Paul « Traiter de biopharmacie et pharmacocinétique » 2^{ème} édition (1990).23-30.
- [32]. Mohamed DAOUD- BRIKCI« la biodisponibilité : concepts, évaluation, Applications». Université d'Alger institut de pharmacie 1983
- [33]. [Http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/fr/index.html](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/fr/index.html)
- [34]. Orbana, et al. « Acidose lactique et Metformine » Annales Françaises d'Anesthésie et de réanimation 25 (2006) 1046–1052 Journal of Chromatography.
- [35]. Vidal 2008
- [36]. Sanofi-aventis Canada Monographie de produit Glucophage®. 28 avril 2009.
- [37]. J.M.Aiache et al. Traité de biopharmacie et pharmacocinétique 3^{ème} édition (1997)128-132.

- [38]. « Interaction with the absorption of tétracycline »; Drugs II, US, 1976.
- [39]. FDA (Food and Drugs Administration) 2003.
- [40]. K. BELREKA Etude de bioéquivalence de deux formulations d'amoxiciline gélule
- [41]. V Alexiev analyse qualitative Edition Mir U.R.S.S (1970) p. 09
- [42]. Skoog, Holler, Nieman ; « Principe d'analyses instrumentale » ; traduction et révision scientifique de la 5^{ème} Edition Américaine
- [43]. R. Mallett David. Handbook of Bioanalysis and Drug Metabolism « High-performance liquid chromatography in pharmaceutical bioanalysis » (2004), 16
- [44]. David Harvey Depauw « Modern Analytical Chemistry Chromatographic Resolution» (2000) 549-555
- [45]. H.LINGEMAN et al. Trends anale de Chimie. (1991) 10-48
- [46]. Ph. HYBERT et al Préparation des échantillons d'origine biologiques préalable à leur analyse SFST Pharma pratiques. (1999) 160-180
- [47]. B.r.Manno et al. Journal .Anal of toxicology (1979) 88.
- [48]. L.J.Cline Love et al anal of chimie (1985) 1564.
- [49]. C.K.Lim Trends anal of Chimie(1988) 340.
- [50]. Emilian Koller Aide Mémoire Génie Chimique, (2001) 433.
- [51]. Richard F.Venn Pfizer Principles And Practice of Bioanalysis Central Research, Sandwich, UK (2005) 14-22
- [52]. Cours de validation Duboste (2008).
- [53]. D. Dadgar, P.E. Burnett, « issues in evaluation of bioanalytical methode selectivity and drug stability». Jornal of Pharma. Biomidical. (1995) 23-31.
- [54]. F.t. petrers, H.H. Maurer, « bioanalytical method validation and method validation and its implications for forsenic and clinical toxicology» (2002) 441-449
- [55]. Valentina Porta et al Metformin 850mg « Determination of metformin in humain plasma for application in pharmacokinetics and bioequivalence studies » Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 46 (2008) 143–1.
- [56]. SFST Pharma pratique (1997)169-194
- [57]. Frank T .Peters et al « validation of new methods» Forensic Science International 165(2007) 216- 224.
- [58]. Guidance for Industry Bioanalytical method validation U.s. Department of Health And Drug Administration FDA administration may 2001

- [59]. J. Vial et A. Jardy « Utilisation des plans d'expériences pour évaluer la robustesse d'une méthode d'analyse quantitative par Chromatographie en Phase Liquide », Sciences, Wiley -VCH Analysis (1998), 15-24
- [60]. Jaques Goupy « plan d'expérience pour surface de réponse » série génie industriel. 256.
- [61]. Ali M. Qaisi et al, « determination of metformin in human plasma using normal phase HPLC » Saudi Pharmaceutical Journal, Vol. 14, No. 2 April (2006)
- [62]. Florentin Tache « HPLC-DAD determination Of Metformin in human plasma using derivatization with *p*-nitrobenzoyl chloride in biphasic system » Microchemical Journal 68 (2001) 13-19
- [63]. J.Z. Song, H.F. Chen, S Tian, Z.P. Sun, Journal of Chromatography. B708 (1998) 277.
- [64]. Alaa El-Gindy et al «First derivative spectrophotometric, TLC-densitometric, and HPLC determination of Acebutolol HCL in presence of its acid-induced degradation Product » Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 24 (2001) 527–534
- [65]. Jan Krzek et al «Stability of Atenolol, Acebutolol and Propranolol in Acidic Environment Depending on its Diversified Polarity » Pharmaceutical Development and Technology. 2006 409–416.
- [66]. «Rapid and simple RPHPLC method for the estimation of metformin in Rat plasma » indian journal of pharmaceutical sciences; avrile 2008.
- [67]. K.H. Yuen, K.K. Peh, Journal of Chromatography. B 710 (1998) 243.

Annexe

Annexe 1 :

1. Conditions opératoires

Milieu de dissolution pH : 1,2 4,5 et 6,8. Le volume totale est de 900ml sous agitation à une vitesse de 75 tours/ min avec une température à 37°C pendant 50min.

2. Préparation des milieux de dissolution

pH 1,2 : dissoudre 2,00g de chlorure de sodium dans 500ml d'eau distillée, ajuster le pH à 1.2 avec l'acide chlorhydrique puis compléter le volume jusqu'à 1litre

pH 4,5 : dissoudre 2,99g d'acétate sodium tri hydraté dans 500ml d'eau distillée, ajuster le pH à 4,5 avec l'acide acétique glacial puis compléter le volume jusqu'à 1litre

pH 6,8 : dissoudre 2,72g de dihydrogénophosphate de potassium dans 500ml d'eau distillée, ajuster le pH à 6,8 avec la soude (10%) puis compléter le volume jusqu'à 1litre.

3. Préparation de la solution étalon : Préparer une solution étalon de (10 µg/ml) de Metformine chlorhydrate dans l'eau.

4. Préparation des échantillons : on a fait une dilution de 1ml dans 100 ml, et l'absorbance est lue à 232nm

Après avoir effectué les lectures des densités optiques à l'aide du détecteur UV-Visible, Nous avons utilisé la formule suivante pour calculer le pourcentage dissout à chaque temps.

$$\%Dissout = (DO_{éch}/DO_{éta}) * (C_{éta}/C_{éch}) * (Cd_{éta}/Cd_{éch}) * (P_{moy}/P_{thé}) * 100 \dots (5)$$

DO_{éch} : densité optique de l'échantillon.

C_{éta} : concentration de l'étalon.

P_{moy} : poids moyen des six comprimés

DO_{éta} : densité optique de l'étalon

C_{éch} : concentration de l'échantillon

Cd_{éta} : coefficient de dilution de l'étalon

P_{thé} : poids théorique (la dose en Principe actif).

Cd_{éch} : coefficient de dilution de l'échantillon

Les résultats de test de dissolution sont résumés dans les tableaux suivants

Tableau (1) : Glucophage® milieu HCL (pH= 1,2)

	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45
Cp 1	0	29,56	69,28	83,8	84,36	85,34	87,45	90,15	88,65	98,15
Cp 2	0	30,52	68,58	84,12	89,6	89,92	94,12	99,6	99,87	99,19
Cp 3	0	33,15	69,58	83,16	91,85	93,63	95,21	95,46	98,93	97,69
Cp 4	0	33,76	73,89	86,18	89,54	93,24	94,17	99,98	99,61	99,02
Cp 5	0	32,89	74,97	88,75	92,14	95,62	95,86	96,52	88,42	93,2
Cp 6	0	34,17	67,89	88,93	91,64	93,38	95,13	93,79	94,85	99,6
moyenne	0	32,34	70,69	85,82	89,85	91,85	93,65	96,41	95,55	97,80

Cp: comprimé

Tableau (2) : Diaganide® milieu HCL (pH= 1,2)

	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45
Cp 1	0	32,15	50,1	73,9	90,50	95,34	95,66	94,07	97,90	94,78
Cp 2	0	40,68	72,9	87,7	88,06	89,44	93,89	92,76	92,76	93,41
Cp 3	0	33,95	63,7	85	90,74	92,23	94,21	97,96	97,96	91,94
Cp 4	0	43,78	86	92,5	92,25	94,07	92,72	96,06	91,91	94,83
Cp 5	0	38,52	71,9	89,8	91,64	97,81	96,56	94,39	92,81	98,66
Cp 6	0	35,72	72,9	88,7	92,58	94,73	92,83	94,95	98,46	97,26
moyenne	0	37,46	69,58	86,26	90,96	93,93	94,31	95,03	95,3	95,14

Tableau (3) : Glucophage® Tampon acétate (pH= 4,5)

	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45
Cp 1	0	31,35	58,16	84,00	87,22	91,54	92,95	91,47	93,12	91,12
Cp 2	0	28,46	62,96	86,25	91,25	92,65	89,22	91,84	91,89	87,61
Cp 3	0	26,67	77,54	87,13	90,21	90,98	91,58	90,30	91,23	90,93
Cp 4	0	27,83	74,65	89,87	92,58	88,85	88,25	89,90	88,89	90,93
Cp 5	0	27,20	71,25	88,68	83,56	89,87	90,19	91,45	92,19	90,39
Cp 6	0	23,70	69,21	90,00	88,57	89,45	88,49	88,96	89,10	88,77
moyenne	0	27,54	68,96	87,66	88,90	90,56	90,11	90,65	91,07	89,96

Tableau (4) : Diaganide® Tampon acétate pH= 4,5)

	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45
Cp1	0	30,08	69,08	85,57	88,62	91,48	90,46	90,56	90,13	88,51
Cp 2	0	35,49	73,93	86,07	92,14	93,29	90,65	90,49	89,93	91,46
Cp3	0	29,72	86,14	85,00	91,39	92,06	91,25	89,43	90,19	88,66
Cp4	0	27,9	77,51	89,71	90,50	91,38	87,50	91,27	88,58	90,05
Cp5	0	23,28	78,00	75,45	85,51	88,45	89,33	91,01	89,15	93,69
Cp6	0	25,66	77,05	91,05	91,49	91,55	87,66	89,46	88,53	89,38
moyenne	0	28,69	76,95	85,48	89,94	91,37	89,48	90,37	89,42	90,29

Tableau (5) : Glucophage® Tampon phosphate (pH=6,8)

glucophage	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45
Cp 1	0	44,56	68,86	86,05	96,36	94,45	96,54	97,1	91,49	96,56
Cp 2	0	43,07	68,62	76,58	93,35	94,91	94,4	97,46	91,66	93,05
Cp 3	0	46,66	68,55	87,17	90,97	99,27	94,92	94,26	94,7	94,97
Cp 4	0	49,29	75,65	84,27	90,1	97,48	92,98	95,38	94,16	92,03
Cp 5	0	40,06	66,3	81,87	89,57	95,29	95,61	94,49	95,85	95,38
Cp 6	0	44,43	67,31	85,73	90,57	92,04	93,15	92,14	95,06	94,49
moyenne	0	44,68	69,22	83,61	91,82	95,57	94,6	95,13	93,82	94,41

Tableau (6) : Diaganide® Tampon phosphate (pH=6,8)

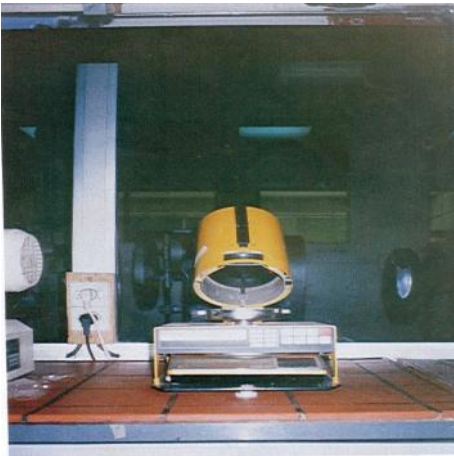
Diaganide	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45
Cp 1	0	40,82	60,6	79,11	87,67	94,5	96,92	95,01	93,42	92,05
Cp 2	0	39,35	59,44	79,43	85,21	87,87	87,89	89,5	87,23	89,54
Cp 3	0	39,98	64,18	82,59	85,77	89,82	87,98	94,62	89,06	92,4
Cp 4	0	49,37	74,23	86,05	87,39	92,48	94,84	88,08	87,78	91,94
Cp 5	0	34,14	59,56	75	86,63	92,14	96,08	89,16	93,17	91,48
Cp 6	0	39,99	61,4	78,2	88,79	88,04	91,36	88,22	90,36	88,04
moyenne	0	40,6	63,23	80,07	86,91	90,8	92,51	90,76	90,17	90,9



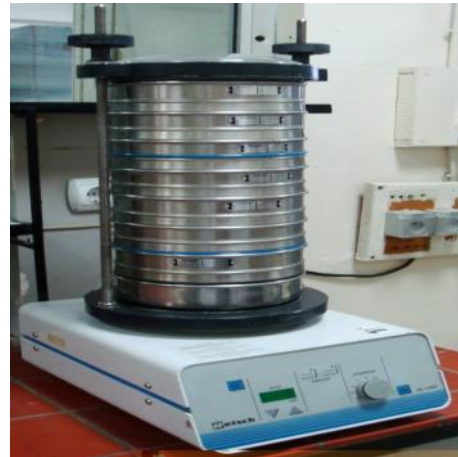
Comprimeuse



Duromètre



Hygromètre infra rouge



Série tamis



Friabilimètre



Montage de tassement



Appareil de délitement



Test de l'aptitude à l'écoulement



Dissolutest couplé avec un détecteur UV-vis



Turbine d'enrobage



Mélangeur



Calibrateur



Annexe 3 :

Les travaux antérieurs :

La recherche bibliographique relative à l'analyse de la Metformine nous a montré que divers procédés ont été mise en œuvre, ces procédés reposent sur des techniques chromatographiques et principalement sur CLHP

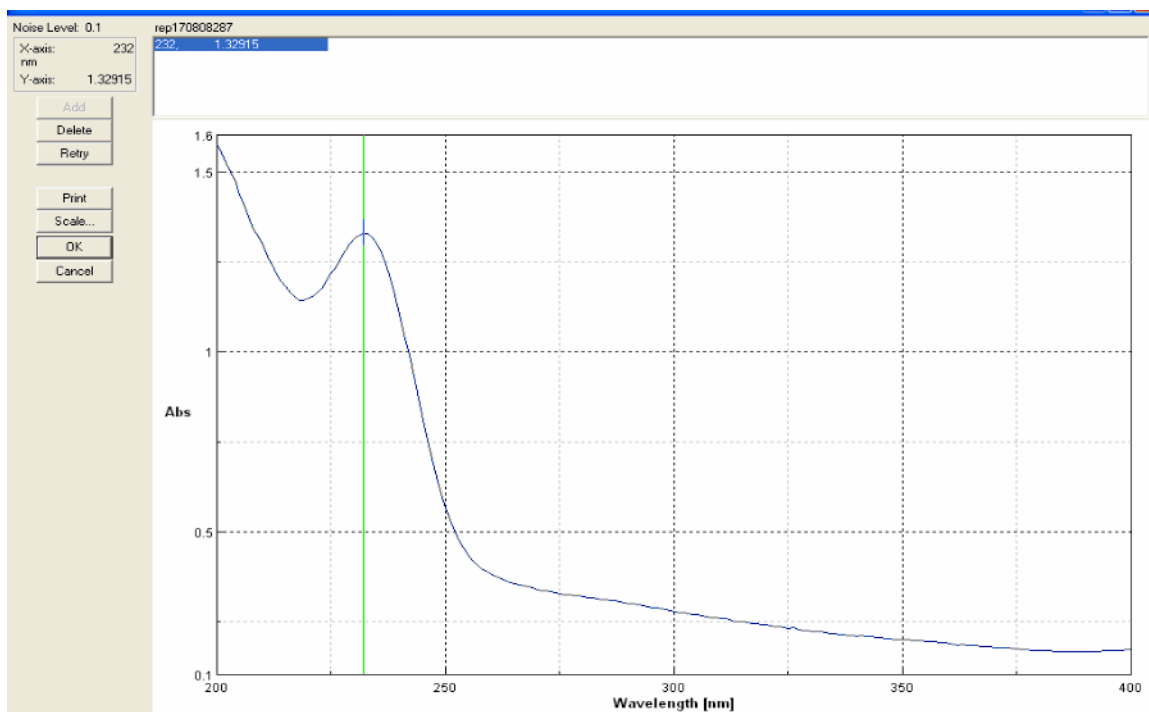
Le tableau suivant regroupe les diverses conditions analytiques rencontrées dans la littérature

Réf	Colonne	Phase mobile	EI	Extraction	LOQ
[02]	Silice	30 mM (NH ₄) ₂ HPO ₄ (pH 7) /CH CN. 75/25	Atenolol	Acétonitrile	10
[11]	CX	50 mM KH ₂ PO ₄ –CH CN 76:24 (pH 5,3)	Buformin	CH ₃ OH– ZnSO –EG*	20
[10]	CX	0.4 M (NH ₄) ₂ HPO ₄	/	Ultrafiltration	100
[67]	Cyano	10 mM KH ₂ PO ₄ (pH 3,5)–CH ₃ CN (60:40)	/	PCA*	60
[63]	Silice	0.1 M Phosphate (pH 2,5)	Phenformin	IPE*	250
[12]	phenyl	10 mM KH ₂ PO ₄ (pH 7)– CH ₃ CN (60:40) (+diethylamine)	Phenformin	SPE* (C ₈)	50
[06]	CX	30 mM (NH ₄) ₂ HPO ₄ (pH 2,4)	Propylbigua nide	TCA*	200
[08]	Phenyl	acetonitrile : 5mM acetate buffer pH 5,5 (75 :25, v/v) gradient	Verapamil	Acétonitrile	250
[05]	C ₈	Acetonitrile/eau/acide formique ((70/30/1)	Diphenylhydr amin	Acetonitrile / APCI LC-MS-MS	02
[04]	C ₁₈	0.02M (SDS/acétonitrile) / (0.0125M KH ₂ PO ₄) ; (37,5/62,5) pH=5,3	Phenformin	IPSPE*	30
[03]	C ₁₈	Acetonitrile/eau/acide formique (45/55/0,048)	Metoprolol	ESI ⁺ LC-MS-MS	20
[07]	CX	systeme switching 0,05 mol/ l ammo- nium phosphate 0,4 mol/ l ammonium phosphate	Sans	Ultrafiltration CX	50

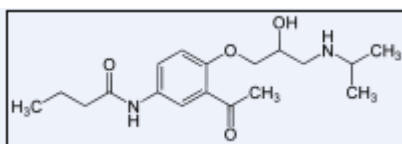
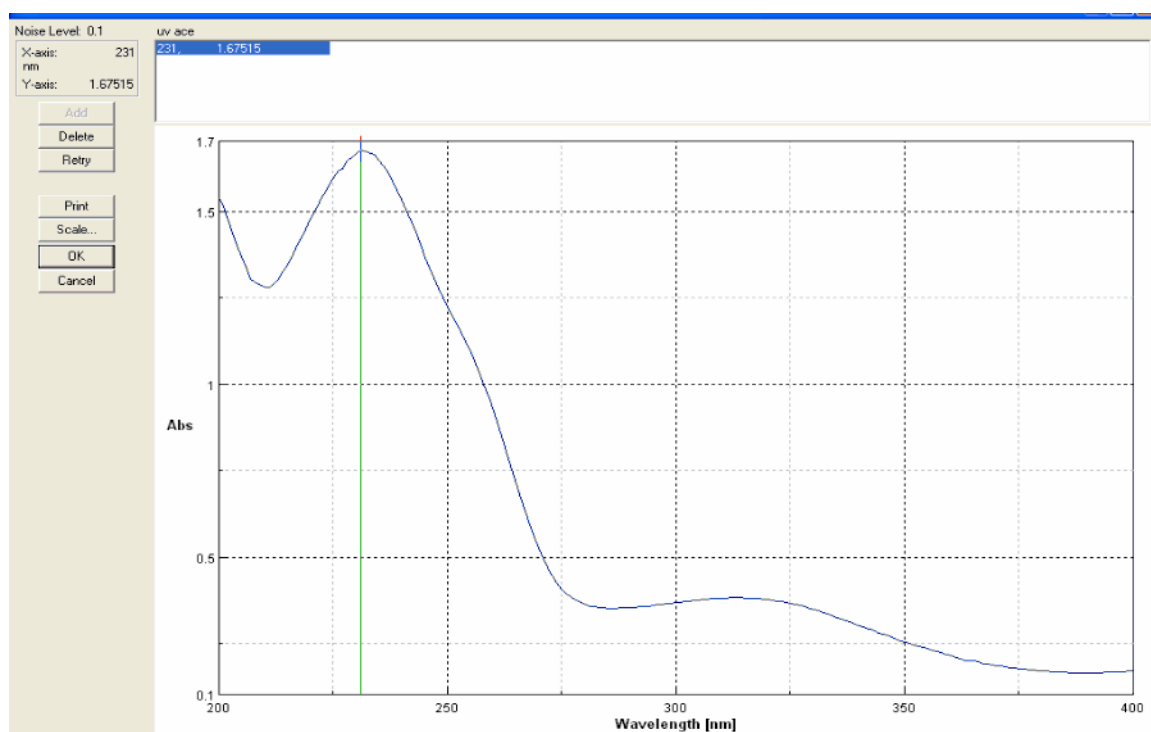
CX: échange de cation, EG:éthylène glycol, IPE:ion-pair extraction, PCA: acide perchlorique, SPE: Extraction en phase solide, TCA: acide trichloracétique, IPSPE : Ion Pair Extraction en phase solide, APCI : ESI Electrospray Ionisation

Annexe 4 :

Spectre uv-vis od'une solution de 0,1mg/ml de metformin chlorhydrate



Spectre uv-vis d'une solution de 0,1mg/ml d'Acebutolol chlorhydrate



Formule chimique de l'Acebutolol

Annexe 5 :

Les résultats de l'étude expérimentale « mise au point et optimisation des conditions chromatographiques »

1- phase stationnaire gel de silice

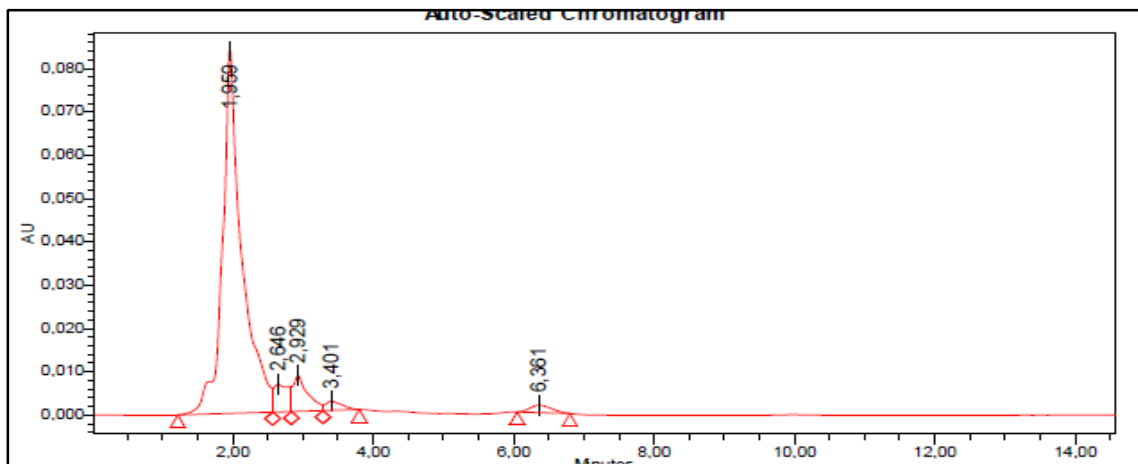
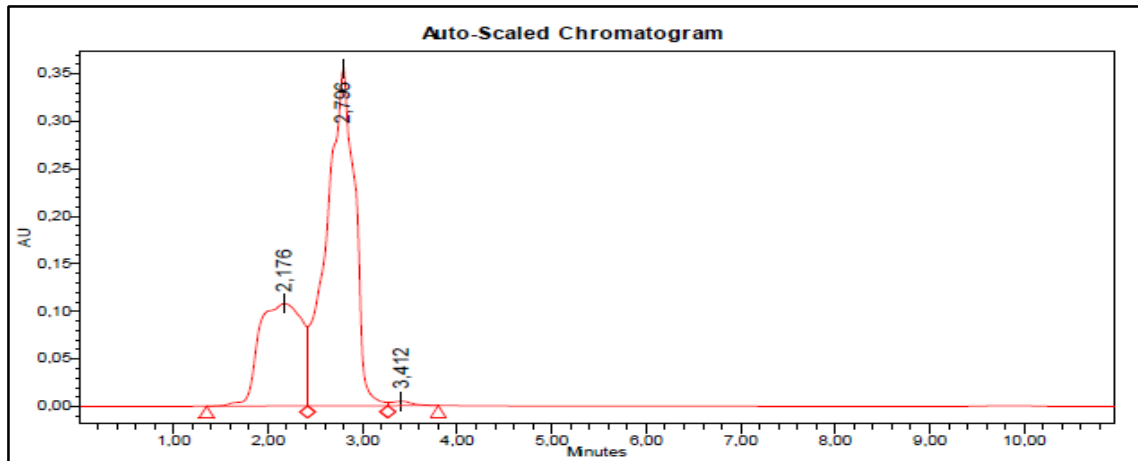
Expérience	Tr Metformine	Tr Acebutolol
40/60	5,2	4,7
45/55	5,8	5,2
50/50	6,81	5,89
55/45	7,5	6,81
60/40	10,7	8,8
65/35	12	9,8
70/30	13,15	10,5

2- phase stationnaire phényle

Expérience	Tr Metformine	Tr Acebutolol
-4. 1. 50/50	2,91	1,68
-4. 2. 60/40	3,23	2,16
-4. 3. 65/35	3,67	2,75
-4. 4. 70/30	4,21	3,25
-4. 5. 75/25	5,13	3,96
-4. 6. 77/23	6,36	4,37
-4. 7. 80/20	7,15	4,97

Annexe 6

L'évaluation de la spécificité de la méthode bioanalytique



Plasma traité (dérivation)

