



Année Universitaire : 2009-2010

Master Sciences et Techniques : CMBA  
Chimie des Molécules Bio Actives



**MEMOIRE DE FIN D'ETUDES**  
Pour l'Obtention du Diplôme de Master Sciences et Techniques

**Etude de stabilité de l'amoxicilline et l'acide  
clavulanique**

**Présenté par:**

**BENIAICH Ghada**

**Encadré par:**

- Mr H. ALILOU
- Mme H.TOUZANI
- Mr M.ALAMI

**Soutenu le 24 Juin 2010 devant le jury composé de:**

- **Pr H. ALILOU**
- **Pr H.TOUZANI**
- **Pr E. M. EL HADRAMI**
- **Pr J.ASSOUIK**
- **Mr M.ALAMI**

Stage effectué au : **Laboratoire national de contrôle des médicaments (LNCM) RABAT**



Mémoire de fin d'études pour l'obtention du Diplôme de Master Sciences et Techniques

**BENIAICH Ghada**

**Année Universitaire : 2009/2010**

**Titre: Etude de stabilité de l'amoxicilline et l'acide clavulanique**

### **Résumé**

La stabilité est la capacité d'un médicament à demeurer conforme aux critères d'acceptation assurant son identité, son titre, sa qualité et sa pureté durant une période de conservation spécifiée).

L'étude de stabilité des antibiotiques, notamment des bêtalactamines, a une importance capitale suite à l'apparition d'éventuels impuretés toxiques ou un sous- dosage en principe actif qui peut déclencher le phénomène de résistance des bactéries.

Les caractéristiques physico-chimiques d'un médicament sont des indicateurs sensoriels de sa stabilité, des changements par apparition des couleurs, goûts ou odeurs anormales rendent le produit en état de doute .Ces anomalies peuvent être dues à des dégradation au cours de la fabrication, de l'entreposage ou à une mauvaise étanchéité des emballages mettant le médicament en contact direct avec les conditions environnementaux.

D'après notre étude :

\*L'amoxicilline est sensible au bêtalactamases qui l'hydrolyse donc son ajout avec un inhibiteur de bêtalactamases qui la protège et renforce son activité est obligatoires.

\*L'acide clavulanique est très instable à cause de l'oxydation après l'exposition de poudre à l'air atmosphérique.

Il est plus sensible à l'hydrolyse que l'amoxicilline en suspension reconstituée. Cette instabilité est traduite par une baisse de teneur. Aussi il est très instable vis-à-vis l'hydrolyse, notamment basique, qu'à la photodégradation ou la dégradation par température.

L'association de l'amoxicilline et de l'acide clavulanique en poudre doit être conservée dans des emballages étanches et à l'abri de la lumière, en plus l'ajout d'un conservateur est obligatoire. Lorsque le médicament est soumis à la suspension, la conservation à une température de +2°C a +8°C est indispensable.

Mot clés : Antibiotique, Amoxicilline, Acide clavulanique, Stabilité, Poudre, Suspension.



# DEDICACE

*A mes chers parents, à mes frères et soeurs qui m'ont donné un soutien moral.*

*A l'âme de monsieur ELHAWZI qui m'a aidé par ses conseils précieux, et qui restera toujours dans mon cœur.*

*A mes amis (e) et à toutes les personnes qui m'ont prodigué des encouragements et se sont donné la peine de me soutenir durant cette formation.*

*Je dédie ce travail.*



non  
ant

*toute la période de formation.*



*Je présente également mes remerciements particuliers à nos professeurs Mr ALILOU et Mme TOUZANI pour leur bon encadrement, leurs instructions judicieuses et pour leur encouragement et soutien moral. Tous les deux ont apporté des remarques précieuses et constructives sur mon rapport.*

*Je remercie également les membres de jury pour leur travail et leur effort.*

*Je tiens à remercier tous les professeurs de la F.S.T pour leurs efforts et leurs aides durant toute la période des études.*

*Je présente aussi mes remerciements à Mr ALAMI mon encadrant et à tous le personnel du laboratoire national de contrôle de médicaments qui m'a aidée à effectuer mon stage de fin d'études dans les bonnes conditions.*

*Mes sincères remerciements à tous ceux qui ont aidé, de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail*

*Je terminerai en remerciant vivement tous les membres de ma famille.*

# Liste des abréviations



---

<b>AC</b>	: Acide clavulanique
<b>AM</b>	: Amoxicilline
<b>AMM</b>	: Autorisation de mise sur le marché
<b>CDI</b>	: Dénomination commune internationale
<b>CV</b>	: Coefficient de variance.
<b>EDQM</b>	: Direction européenne de la qualité des médicaments
<b>HPLC</b>	: Chromatographie liquide à haute performance.
<b>ICH</b>	: Conférence international d'harmonisation
<b>IMP</b>	: Impureté
<b>LNCM</b>	: Laboratoire national de contrôle des médicaments.
<b>OMCL</b>	: Laboratoires officiels de contrôle des médicaments
<b>OMS</b>	: Organisation mondiale de la santé.
<b>PA</b>	: Principe actif
<b>SCR</b>	: Substance chimique de référence
<b>STD</b>	: Standard
<b>UV</b>	: Ultra violet.
<b>USP</b>	: Pharmacopée américaine



## INTRODUCTION

Les industries pharmaceutiques sont chargées de mettre à la disposition des patients des médicaments sûrs et fiables en terme qualité, sécurité, efficacité. Un élément clef de La qualité du médicament est le profil de stabilité qui constitue une rubrique particulière du dossier d'autorisation de mise sur le Marché (AMM). La stabilité découle de l'ensemble des données physiques et chimiques acquises tout au long du développement du médicament depuis la matière première jusqu'au produit fini.

La stabilité d'une préparation pharmaceutique est sa capacité à demeurer conforme aux critères d'acceptation assurant son identité, son titre, sa qualité et sa pureté durant une période de conservation spécifiée. Elle dépend à la fois des conditions de leur stockage (température, humidité et lumière) et des caractéristiques intrinsèques du produit (substance active, nature des excipients, interaction substance active/Excipients, qualité de la formulation, interaction contenu/Contenant).

L'instabilité d'un produit pharmaceutique peut se traduire soit par la formation d'impuretés pouvant éventuellement présenter une certaine toxicité ou par une diminution de la teneur en principe actif dans le médicament, soit aux aspects liés aux caractéristiques microbiologiques.

Les caractéristiques physico-chimiques d'un médicament sont des indicateurs sensoriels de sa stabilité, des changements par apparition des couleurs, goûts ou odeurs anormales rendent le produit en état de doute. Ces anomalies peuvent être dues à des dégradations au cours de la fabrication, de l'entreposage ou à une mauvaise étanchéité des emballages mettant le médicament en contact direct avec les conditions environnementaux.

Les antibiotiques sont considérés parmi les médicaments les plus importants à étudier leurs stabilités du fait des résistances des bactéries, cette résistance peut être due à une teneur faible en principe actif lors de la diffusion tissulaire du médicament malgré l'administration d'une posologie adéquate de l'antibiotique.

C'est dans ce contexte que se situe le présent travail effectué au laboratoire national de contrôle des médicaments afin de mieux cerner les facteurs influençant l'instabilité de l'antibiotique obtenue par association de deux principes actifs, l'amoxicilline et l'acide clavulanique.

Le rapport sera présenté en deux parties :

La première partie : concerne des généralités sur les différentes classes d'antibiotiques et leurs modes d'actions.

La deuxième partie : concerne l'étude de la stabilité de l'amoxicilline et l'acide clavulanique sous forme de poudre en sachets, et en suspension

### **I- Présentation du laboratoire national de contrôle des médicaments**

Le laboratoire national de contrôle des médicaments (LNCM) a été créé en Octobre 1969 suite au Décret n° 2-72-373 du (24 Avril 1974). Deux ans plus tard, le Décret du 25 Février 1976 l'a placé sous la direction des affaires techniques.

Depuis sa création, ce laboratoire connaît un essor permanent caractérisé par son inscription sur la liste des laboratoires officiels de l'Organisation Mondiale de la santé (OMS) et aussi :

-Laboratoire de référence de la ligue arabe.



- Membre observateur de la Pharmacopée Européenne.
- Membre du réseau des laboratoires nationaux européens de contrôle des médicaments.

Sur 2000 contrôles de médicaments, seuls 5 incidents ont été relevés, ce qui pousse les responsables à affirmer que le taux de satisfaction en ce qui concerne la qualité des médicaments au Maroc est bon.

### **I-1. Activités au LNCM :**

Parmi les activités exercées au laboratoire, on cite le contrôle de médicaments en élaborant des analyses physico-chimiques, la fabrication des objets de pansement et tout autre article utilisé en médecine ainsi que la formation dans le domaine médicaux pharmaceutique.

Les produits analysés au laboratoire peuvent provenir :

- De la commission nationale de débit des spécialités pharmaceutiques sur le marché marocain (produits visa).
- De l'inspection du secteur pharmaceutique (produits finis et matières premières prélevées lors de l'inspection des établissements pharmaceutiques de fabrication ou des unités de distribution).
- Des appels d'offres du Ministère de la Santé (contrôle de livraison).
- Des réclamations suite à un défaut de qualité de production ou de conservation.
- du contrôle continu des médicaments.
- Des enquêtes nationales concernant des spécialités pharmaceutiques renfermant le principe actif objet de l'étude.
- Des homologations des dispositifs médicaux et des articles de puériculture destinés à l'enfant de 1<sup>er</sup> âge.
- Des études collaboratives coordonnées par l'EDQM (Direction Européenne de la Qualité des Médicaments) du fait de l'appartenance du LNCM aux réseaux des OMCL (Laboratoires Officiels de contrôle des Médicaments).
- Des études collaboratives coordonnées par l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé).

Au LNCM, on est également chargé d'étudier conformément aux circulaires ministérielles :

- La documentation pharmaceutique, clinique et pharmacotoxicologie.
- Les bulletins d'analyses des produits finis importés.
- Les bulletins d'analyses des matières premières actives.
- Les dossiers des vaccins et sérums en vue de l'octroi d'un certificat de libération de lot.
- Les validations des procédés de fabrication et validations analytiques.

En collaboration avec la Direction de la Normalisation et de la Promotion de la Qualité (Ministère du Commerce et de l'Industrie), on procède, au LNCM, à l'élaboration des normes marocaines relatives aux contrôles des dispositifs médicaux et aux articles de puériculture destinés à l'enfant de 1<sup>er</sup> âge.

### **I-2 Structure du laboratoire :**

Le LNCM comprend les services d'assurance qualité, des essais biologiques, de physico-chimie et de normalisation et de contrôle des dispositifs médicaux ainsi que des unités de coordination et d'assurance qualité (unité de métrologie et unité d'informatique).

La majorité des essais de contrôle se font au service physico-chimie:



**Service de physico-chimie :**

Il a pour rôle de réaliser des contrôles physico-chimiques des médicaments, des dispositifs médicaux et des matières premières. Il vérifie que la dose du principe actif dans la spécialité pharmaceutique est la même que celle indiquée sur le produit fini. Cette étape nécessite l'utilisation, comme outils d'analyses, les méthodes galéniques, spectroscopiques, chromatographiques et chimiques.

Les activités entreprises dans ce service consiste à :

- Exécuter des essais physico-chimiques et des tests galéniques et contrôler par rapport aux normes de qualité avec l'objectif de fournir une base scientifique à toute décision d'ordre technique, administratif ou juridique.
- Formuler les résultats des tests dans des procès verbaux, analyse des anomalies constatées et formulation des recommandations concernant les suites à donner.
- Constituer et gérer une banque de données sur le médicament à l'échelle national et international.

**I-3- Accréditation du laboratoire national de contrôle des médicaments (LNCM) :**

Le contrôle de qualité des médicaments et des produits parapharmaceutiques est le pilier de la veille sanitaire dans le domaine de la pharmacie d'où l'engagement du laboratoire national de contrôle des médicaments (LNCM) dans une démarche assurance qualité en vue d'une accréditation par le réseau Européen des laboratoires nationaux de contrôle des médicaments selon la norme international ISO 17025. L'objectif majeur est de fournir des résultats analytiques fiables, incontestables et de renforcer le contrôle de la qualité des médicaments ce qui ouvre d'avantage la voie aux médicaments marocains sur les marchés européens.

Un plan d'action a été établi et suivi par le comité assurance qualité. Des cercles de qualités sont créés, il s'agit de cellules ou de commissions qui sont chargées d'étudier et de faire le suivi de certaines activités afin d'intégrer tout le personnel.

Le laboratoire a obtenu l'accréditation, par le réseau Européen des laboratoires nationaux de contrôle des médicaments en février 2007, pour l'ensemble des analyses effectuées. L'objectif actuel est de maintenir le niveau de qualification aussi bien du personnel que des tests effectués.

Organigramme de laboratoire national de contrôle des médicaments (Annexes 1)



# Chapitre I :

# Généralités sur les médicaments



## II- LES MEDICAMENTS

### II-1-Définitions

- **Médicament**

Le médicament dérive du mot latin « Medicamentum » qui veut dire « remède ».

Le Dahir portant loi n°1-76-432 de février 1977, B.o n°3369, ainsi que l'article L511 du code de la santé publique définissent le médicament comme suit :

« On entend par médicament, toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales, ainsi que tout produit pouvant être administré à l'homme ou à l'animal en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, corriger ou modifier leurs fonctions organiques ».

- **Médicament générique**

(article 2.6 code du médicament et de la pharmacie Décembre 2006) :

« La spécialité générique d'une spécialité de référence qui est considérée comme une spécialité qui a la même composition qualitative et quantitative en principes actifs et la même forme pharmaceutique que la spécialité de référence, et dont la bioéquivalence avec cette dernière a été démontrée par des études appropriées de biodisponibilité.

Selon l'OMS les médicaments génériques sont « des produits dont l'exploitation ne fait l'objet d'aucun brevet soit qu'ils soient tombés dans le domaine public soit qu'aucun brevet n'a jamais été déposé » [1].

### II-2-Composition d'un médicament

Un médicament est constitué de Principe actif, excipient (additif)

- **Principe actif**

C'est une substance pharmacologiquement active au niveau de l'organisme ; établie à l'origine des indications thérapeutiques. Son dosage est établi en fonction de la puissance du patient (enfant, adulte) la plupart du temps, en très faible proportion dans le médicament par rapport aux excipients.



- **Excipient**

C'est une substance inerte au plan thérapeutique, permettant la préparation du médicament. L'excipient a pour fonction d'améliorer l'aspect ou le goût, d'assurer la conservation, de faciliter la mise en forme et l'administration du Médicament. Il sert aussi à acheminer la substance active vers son site d'action et à contrôler son absorption par l'organisme. L'excipient devrait être bien toléré. Les excipients les plus courants sont l'amidon, le sucre, la gélatine, les graisses, l'eau, l'alcool ...

L'ensemble principe (s) actif (s) et excipients, formulés et préparés à l'avance selon de normes internationales strictes « les bonnes pratiques de fabrication » constituent une spécialité dotée d'une dénomination commerciale appartenant au laboratoire fabricant.

### II-3-Classifications des médicaments :

Les médicaments sont classés selon plusieurs critères : la domination commune internationale, effets thérapeutiques, traitements symptomatiques ....

La classification selon l'effet thérapeutique reste la plus célèbre, dans ce cas on peut citer : les neuroleptiques, les anxiolytiques, les hypnotiques, les anticancéreux, les antibiotiques (10)

### II-4-Formes galéniques :

Les différentes formes du médicament sont :

#### *a- comprimé*

Un comprimé est une forme pharmaceutique solide, destinée à la voie orale, équivalent à une dose (unité de prise) qui peut contenir un ou plusieurs principes actifs. Les comprimés sont obtenus en agglomérant par compression d'un volume de particules (poudre ou granule). Ils sont avalés ou croqués, dissous ou désagrégés dans l'eau. Certains doivent rester dans la bouche pour y libérer le principe actif (comprimé à sucer ou sublingual).

#### *b- gélule*

Une gélule, ou capsule à enveloppe dure, désigne une forme galénique de médicament, solide, que l'on avale c'est l'une des formes pharmaceutiques les plus faciles à réaliser, ce qui explique leur abondance. Elle est constituée d'une enveloppe dure, creuse, le plus souvent en gélatine. L'enveloppe peut aussi contenir d'autres éléments tels les colorants, traitements antibactériens, désagrégants, lubrifiants, traitement de surface, etc. Enfin l'enveloppe peut être imprimée, en général du dosage du médicament. La gélule est constituée de deux parties, la tête (coiffe) et le corps, cylindrique, ouverte à une extrémité et dont le fond est hémisphérique, s'emboîtant l'une dans l'autre. Le contenu est une poudre ou des microgranules.



---

***c--sirops***

Ce sont des préparations aqueuses caractérisées par leur saveur sucrée et leur consistance visqueuse. Ils peuvent contenir du saccharose ou des édulcorants. Ils contiennent généralement des aromatisants ou autre agents.

***d- crèmes***

Ce sont des préparations multiphasées composées d'une phase lipophile et une phase aqueuse.

***e- gels***

Ils sont constitués de liquides gélifiés à l'aide d'agents gélifiants appropriés.

***f-préparation pour perfusion***

Ce sont des solutions aqueuses ou des émulsions en phase externe aqueuse, stériles et normalement isotoniques au sang.

***g- collyres***

Ils sont des solutions ou des suspensions stériles aqueuses ou huileuses, contenant un ou plusieurs principes actifs et destinées à l'installation oculaire.

***h- poudres orales***

Ce sont des préparations constituées de particules solides sèches, libres et plus ou moins fines. Elles contiennent une ou plusieurs substances actives additionnées ou non d'excipients.

Elles sont généralement administrées avec de l'eau sous forme de poudre ou après la mise en suspension.

***i--suppositoires***

Ce sont des préparations unidoses solides. Leur forme, volume et consistance sont adaptées à l'administration par voie rectale.

***j--Solution injectable***

Ce sont des préparations stériles destinées à être injectées. (2)



## II-5- Quelques Terminologies des médicaments :

### ✓ Spécialité Pharmaceutique

Correspond selon le code de la santé publique à un médicament préparé à l'avance, dosé au poids médicinal présenté sous un conditionnement particulier et caractérisé par une dénomination spéciale portant sa composition, le nom et l'adresse du fabricant.

### ✓ Pharmacopée

D'après l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), une pharmacopée est une norme pharmaceutique destinée à assurer dans une entité politique donnée, l'uniformité de la nature, de la qualité, de la composition et de la concentration des médicaments.

Il existe plusieurs pharmacopées : Française, Britannique, américaine (USP), Japonaise, Chinoise et internationale.

Chaque pharmacopée est constituée de plusieurs parties : Les monographies, les prescriptions générales, les réactifs et les méthodes générales d'analyses.

### ✓ Les impuretés

Les impuretés apparaissent pendant la synthèse du principe actif. Elles peuvent comprendre les produits de dégradation, de synthèse, stéréochimique, des produits de réactions secondaires, etc. Elles devraient être identifiées, qualifiées et étudiées sur le plan toxicologique.

### ✓ Les substances chimiques de référence SCR

La substance chimique de référence est définie comme un matériau prévu pour être utilisé dans des essais chimiques et physiques spécifiques, dans lesquels ces propriétés sont comparées aux propriétés des échantillons à examiner. Le degré de pureté d'une telle substance dépend du but de son utilisation.



---

# **Chapitre II :**

## **Classification et mode d'action des antibiotiques**



### III-Les antibiotiques

#### III-1 -Définition

Pendant longtemps on a appelé antibiotique toute substance chimique pouvant inhiber la croissance ou détruire les bactéries et d'autres micro-organismes. Cette définition est aujourd'hui trop restrictive et doit être abandonnée car les molécules obtenues par synthèse ou par modification chimique d'une molécule naturelle peuvent être douées des mêmes propriétés. Un antibiotique est actuellement défini comme toute substance d'origine biologique ou synthétique agissant spécifiquement sur une étape essentielle du métabolisme des bactéries (Agent antibactérien) ou des champignons, et pouvant être administré à l'organisme (3).

Quelle que soit l'origine de l'antibiotique, il doit avoir les propriétés suivantes :

- Une action antibactérienne
- Une toxicité sélective
- Une activité en milieu organique
- Une possibilité d'absorption et de diffusion dans l'organisme.

#### III-2-Historique

Les premières recherches orientées vers la découverte des médicaments antibactériens ont été menées dans deux directions : la voie chimique et la voie biologique. La voie chimique qui a consisté à trouver par voie de synthèse chimique des antiseptiques à toxicité sélective n'a pas connu de grands succès. La voie biologique a été pratiquement le point de départ de l'ère des antibiotiques. Elle a consisté à découvrir des produits utilisables parmi les substances antimicrobiennes produites par les micro-organismes. Pasteur et Joubert constatèrent en 1887 un antagonisme entre le bacille du charbon et d'autres bactéries. Pasteur émit l'idée qu'il serait possible d'obtenir des médicaments antimicrobiens à partir de cet antagonisme. Ils furent suivis par d'autres tels que Dachynes qui aboutit aux mêmes conclusions la même année.

Mais l'ère véritable des antibiotiques ne s'ouvrit qu'avec la découverte de la pénicilline par Alexandre FLEMING en 1929.

C'est en 1940 qu'une équipe de chercheurs d'Oxford Foley, Chain et Meatley réussit à obtenir une pénicilline concentrée, partiellement purifiée et stable. Elle fut employée pour traiter des septicémies à staphylocoques et la méningite intrarachidienne. Après le succès de la pénicilline plusieurs antibiotiques furent successivement découverts.

C'est ainsi qu'en 1939, Dubos extrait la tyrothricine à partir du *Bacillus* sp, mais elle était trop toxique pour être utilisée par voie générale. En 1944, Selman Abraham Waksman découvrit avec Schartz et Bugie la streptomycine à partir d'un *Streptomyces*. Ils l'utilisèrent contre la tuberculose. En 1947 les polymyxines ou aerosporines furent isolées d'une bactérie du genre *Bacillus* sp par deux groupes de chercheur.

En 1948, deux antibiotiques importants à spectre large furent isolés du genre *Streptomyces*. Le chloramphénicol par Ehrlich était le premier antibiotique actif contre la fièvre typhoïde et la chlortétracycline ou aureomycine par Duggar



qui fut suivie en 1949 de l'oxytétracycline. En 1950, la colistine fut isolée L'érythromycine et la vancomycine furent découvertes en 1956, la kanamycine en 1957. La gentamycine fut isolée en 1963 à partir d'un champignon du genre *Microsporum* la lincomycine en 1967 fut également extraite du genre *Streptomyces* (3).

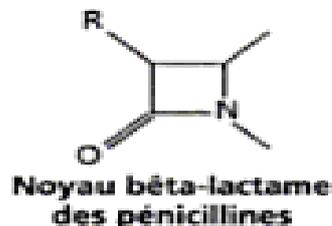
### III-3 -Classification

Les antibiotiques sont classés selon leur structure de base, leur mécanisme d'action, leur spectre d'activité et leurs propriétés pharmacologiques. Les antibiotiques ayant une structure chimique identique, leur conférant un même mécanisme d'action antibactérienne se classent dans la même famille. Il existe plusieurs familles d'antibiotiques auxquelles, il faut ajouter diverses molécules isolées à activités antibactériennes. Plusieurs familles d'antibiotiques peuvent avoir un même mode d'action. C'est ainsi que certains agissent par inhibition de la synthèse du peptidoglycane de la paroi bactérienne. D'autres altèrent la membrane cytoplasmique provoquant des troubles létaux de perméabilité. Beaucoup inhibent la synthèse protéique au niveau des ribosomes.

D'autres encore inhibent la synthèse des acides nucléiques, Les antibiotiques d'une même famille peuvent se différencier par leur spectre d'activité. On les réunit alors dans des groupes quelque fois subdivisés en sous-groupes. Les antibiotiques d'un même groupe ou d'un même sous-groupe diffèrent uniquement par leurs propriétés pharmacologiques. Leur activité *in vitro* est identique. Cette classification constitue un guide pratique des antibiotiques dont la connaissance est indispensable pour leur utilisation correcte.

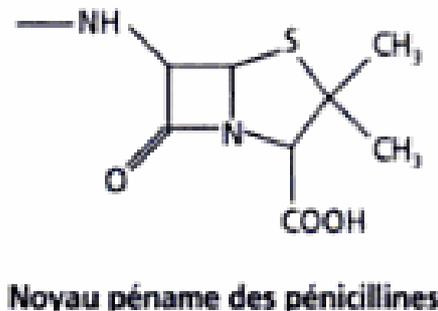
On peut classer les antibiotiques selon leurs structures chimiques (1,3).

#### III-3-1- Les bêtalactames



Le noyau de base est le cycle  $\beta$  lactame. Il s'agit d'une amine interne cyclisée, Les antibiotiques de cette famille sont bactéricides. En générale les bêtalactamines agissent sur la paroi bactérienne et se répartissent à divers groupes :

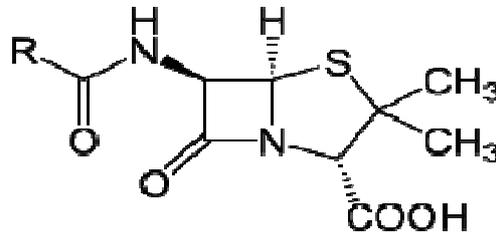
##### III-3-1- 1- Les pénams (pénicillines)





L'adjonction d'un cycle thiazolidine et d'une fonction amine conduit à l'acide 6-amino-pénicillanique, c'est-à-dire au noyau péname, squelette des pénicillines.

III-3-1- 1-1- Pénicillines :  
Structure générale :



Les pénicillines peuvent être classées selon le radical R :

**\*Groupe G : la pénicilline G (benzylpénicilline)**

C'est une pénicilline extractive, injectable parce qu'il ne résiste pas à l'acidité gastrique. Son spectre d'action est étroit (activité presque limitée aux germes gram+). Elle est très sensible à toutes les pénicillinases et comporte :

- Benzylpénicilline
- Benzathine benzylpénicilline

**\*Groupe V :(phénoxy méthylpénicilline)**

Aussi comporte le cycle  $\beta$  lactame et un cycle thiazoline .Elles sont des pénicillines naturelles extractives, utilisées par voie orale (résistantes à l'acidité gastrique) .Leur spectre est étroit et sont très sensibles à toutes les pénicillinases.

**\*Groupe M : des pénicillines antistaphylococques :**

Ils comportent le cycle  $\beta$  lactame et un cycle thiazoline (pénicillines M et pénicillines V). Les pénicillines M sont hémi synthétiques, utilisées par voie orale, leur spectre est étroit. Ces pénicillines sont résistantes aux pénicillinases du staphylocoque (inactives sur la plupart des grams-)

**\*Groupe A : de l' amino-benzylpénicilline :**



Ils comportent un cycle lactame et un cycle dihydrothiazine. Les pénicillines A sont des pénicillines semi synthétiques, dont le spectre d'action par rapport à la pénicilline G est très élargi vers les germes gram- et inclut notamment de nombreuses entérobactéries. Elles sont inactivées par les pénicillinases.

***Dans ce groupe on peut citer :***

- Ampicilline
- Amoxicilline
- Bacampicilline
- Métampicilline
- Pivampicilline

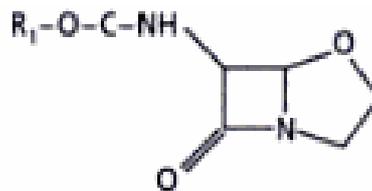
**\*Groupe des Pénams, inhibiteurs des bêtalactamases :**

Le but de ces substances est de renforcer l'efficacité des pénicillines contre des germes devenus de fort<<secréteurs>>de bêta lactamases. Ils ont une activité antibactérienne faible.

Les sous groupes :

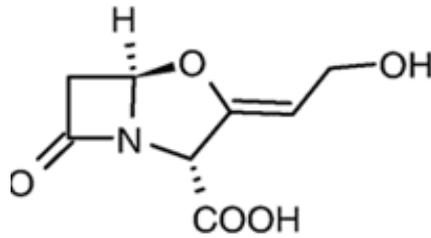
**\*Oxapénam :**

- Le noyau oxapéname est formé par le remplacement de l'atome du soufre par un atome d'oxygène dans le cycle thiazolidine.



Parmi ces espèces on trouve :

Acide clavulanique :

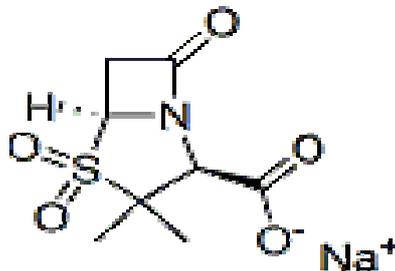


On peut l'associer avec l'amoxicilline ou avec la ticarcilline.

**\*Pénicilline-sulfones :**

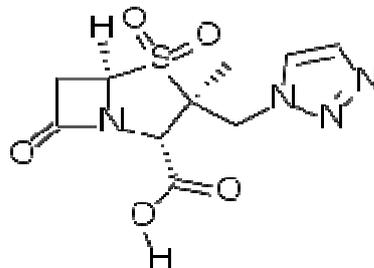
On peut citer le sulbactam et le Tazobactam.

Sulbactam



On peut l'associer avec l'ampicilline.

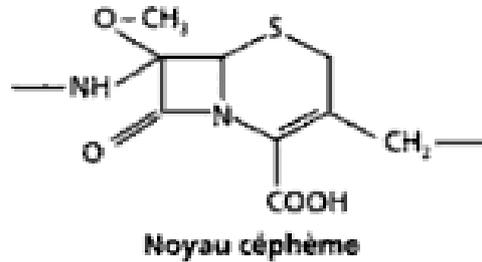
Tazobactam





On peut l'associer avec la pipéracilline.

### III-3-1- 2-Les céphems (Céphalosporines)



Le remplacement du cycle pentagonal thiazolidine par un cycle hexagonal, porteur d'une double liaison (ou cycle dihydrothiadiazine) conduit à l'acide 7-amino-céphalosporinique, c'est-à-dire au noyau squelette des céphalosporines. Elles sont actives sur des gram+ et gram-.

Les céphalosporines sont classées en quatre catégories selon le spectre d'action (quatre "générations").

#### \*Céphalosporines de 1ere génération :

*Actives surtout sur les germes gram +, mais aussi sur quelques germes gram-.*

**Spectre :** relativement résistantes aux pénicillinases ; détruites par les céphalosporines.

#### \* Céphalosporines de 2eme génération :

*Actives sur un plus grand nombre des germes gram -, mais notablement moins actives sur les germes gram+.*

Cette génération est relativement résistante à certaines céphalosporines.

#### \* Céphalosporines de 3eme génération :

*Encore plus active contre les germes gram - d'origine intestinale présentant des résistances multiples. (Céphems, Oxacéphems).*

#### \*Céphalosporines de 4eme génération :

*Est à l'étude : elle serait très active à la fois contre les bactéries gram- et gram +.*

*A l'intérieur de ces groupes les diverses céphalosporines ne se distinguent que par :*

- *Leur mode d'administration (orale...)*



- *Des particularités pharmacocinétiques : (la demi-vie, la fixation aux protéines plasmatiques, concentration sanguine...).*

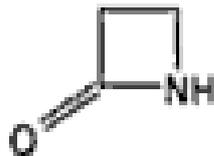
### III-3-1- 3- Les pénems : carbapénems

La structure générale :



Par analogie avec les céphèmes, on fait apparaître une double liaison dans le noyau pénames pour obtenir les pénèmes.

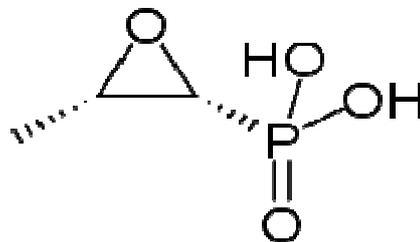
### III-3-1- 4- Monobactams



On supprime le second cycle et on obtient les monolactames.

Ce groupe contient des antibiotiques qui sont à la fois résistants aux bêtalactames et un inactivateur des céphalosporines. Tous les germes gram+ et les anaérobies sont résistants à ces antibiotiques. Leur Spectre est actif uniquement sur les bacilles à Gram négatif.

### III-3-2- Fosfomycines



Sa structure chimique est très simple : il s'agit de l'acide L -cis 1-2 époxy propyl-phosphonique.



La fosfomycine a été extraite de certaines souches de streptomyces, c'est un antibiotique bactéricide à spectre large. Elle est toujours utilisée en association pour éviter l'apparition de mutants.

### III-3-3 Glycopeptides

Les glycopeptides constituent le groupe des antistaphylococciques héroïques, leur Spectre est étroit.

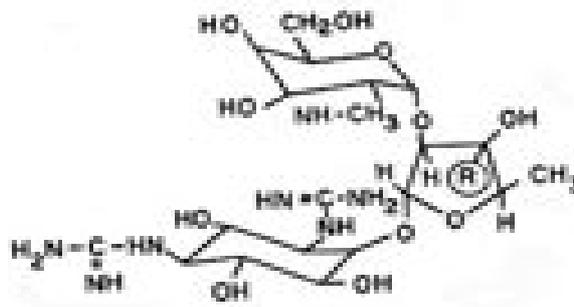
### III-3-4-Groupe des surfactifs : (polypeptides cycliques)

Ce groupe d'antibiotiques, de nature polypeptidique cyclique, isolés de bacilles du sol. Leur spectre d'action est limité strictement à des germes gram-.

Ces antibiotiques de nature polypeptidique, sont constitués d'enchaînements d'acides aminés. Ils sont produits par des bactéries du genre bacilles ou streptomyces.

Leur spectre d'action est limité strictement à des germes gram- .

### III-3-5-Aminosides

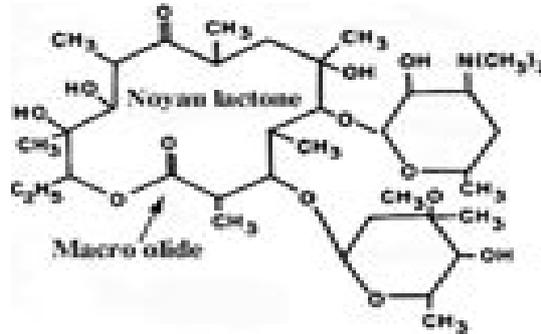


Ce sont des hétérosides naturels formés par un ou plusieurs glycosides liés à un aminocyclitol. Cette structure comporte toujours un ou plusieurs fragments de dérivés aminés des sucres. Leur spectre est large englobant des germes gram- et gram+. Elles sont naturelles et aussi hémi synthétiques.

Les plus connues sont :

- Streptomycine
- Kanamycine
- Tobramycine
- Amikacine

### III-3-6 Groupe des macrolides



Ces antibiotiques sont ainsi nommés en raison de leur structure chimique comportant un gros noyau à plusieurs ponts lactoniques, auxquels sont fixés un ou plusieurs oses.

Les principales molécules de ce groupe sont : Spiromycine, Erythromycine, Clarithromycine et Azithromycine.

### III-3-7-Phénicolés

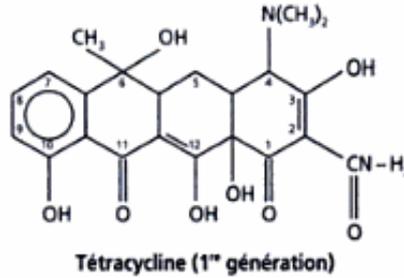
Leur structure de base :



Ce sont des molécules très simples, extraites par streptomycetes *venezuelae* synthétisées maintenant par les chimistes organiciens. Ils ont un spectre d'action très large (Chloramphénicol, Thiamphénicol).



### III-3-8 Tétracyclines



Leur structure chimique comporte une structure commune à quatre cycles. Il s'agit d'un groupe d'antibiotiques extraits de champignons streptomyces, exerçant une action bactériostatique, sur les gram- et gram+ mais dont le spectre se rétrécit petit à petit, avec l'extension du nombre des souches résistantes.

Les molécules les plus intéressantes sont :

- Tétracycline
- Doxycycline
- Minocycline

### III-3-9-Groupes des fusidamines

L'acide fusidique est un antibiotique de structure chimique stéroïdique, particulièrement actif contre des staphylocoques. Leur spectre est limité.

### III-3-10-Rifamycines

Les rifamycines sont des antibiotiques isolés de streptomyces méditerranéen et modifiés par hémisynthèse.

Leur structure chimique est complexe (noyau dihydro-naphto-furane). Ils sont bactéricides sur les germes en phase de multiplication. Leur spectre d'action est large.

Les antibiotiques les plus intéressants sont : Rifamycine et Rifampicine

Ce genre d'antibiotiques bloque l'ARN polymérase.

### III-3-11-Quinolones :

Les quinolones ont une structure générale dérivant de l'acidedihydro 1,4 oxo 4 quinoléine carboxylique.



Leur structure chimique :



a- Quinolones de première génération

Il s'agit d'un groupe de substance d'origine synthétique, exerçant une action antibactérienne efficace sur les bactéries gram-.

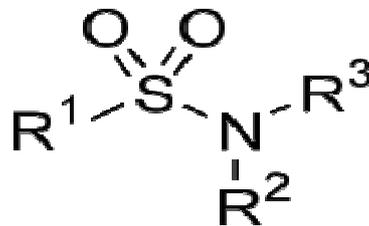
- Acide nalidixique
- Acide oxolinique
- Acide pipémidique

b - Quinolones de deuxième génération (FLUOROQUINOLONES)

Leur Spectre est élargi aux bactéries à Gram positif.

On peut citer : Fluméquine, Péfloxacin et Ofloxacin.

*III-3-12-Sulfamides :*



Ils se constituent d'un noyau sulfonamide avec des radicaux R. Ils ont un spectre d'activité large mais actuellement réduit (résistance).



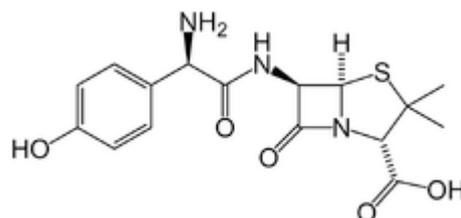
## Chapitre III :

# L'amoxicilline et l'acide clavulanique

### IV- Propriétés chimiques et pharmacologiques de l'amoxicilline et de l'acide clavulanique :

#### IV-1-L'amoxicilline:

- Structure:



es - Fès  
r - FES



,3H<sub>2</sub>O

Formule brute: C<sub>16</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>S, 3H<sub>2</sub>O

Nomenclature: acide (2S, 5R, 6R)-6-[[[(2R)-2-amino-2-(4-hydroxyphényl)-acetyl] amino-3, 3-diméthyl-7-oxo-4-thia-1-azabicyclo[3.2.0]heptane-2-carboxylique trihydretée.

- **Caractère :**

Son caractère est une poudre cristalline, blanche ou sensiblement blanche.

- **Solubilité :**

Peu soluble dans l'eau, très peu soluble dans l'éthanol à 96%, pratiquement insoluble dans les huiles grasses. L'amoxicilline trihydratée se dissout dans les acides dilués et dans les solutions diluées d'hydroxydes alcalins. (2)

- **pharmacologie :**

L'amoxicilline, dérivé de la pénicilline semi synthétique, est un antibiotique bêtalactamine bactéricide de la famille des aminopénicillines indiqué dans le traitement des infections bactériennes à germes sensibles, son spectre élargi vers les bacilles *gram* (-) et certains bacilles *gram* (+). C'est un analogue de l'ampicilline (dérivé 4-hydroxy de l'ampicilline). L'amoxicilline résiste à l'inactivation par l'acidité gastrique. Elle est rapidement et complètement absorbée et cela mieux que l'ampicilline. De plus la présence d'aliments dans l'estomac n'influence pas son absorption (4, 5, 6).

L'amoxicilline présente un intérêt thérapeutique tout particulier dans les indications suivantes: otites moyennes aiguës de l'adulte, sinusites maxillaires aiguës et autres formes de sinusites, surinfections de bronchites aiguës du patient à risque, notamment éthylique chronique, tabagique...

Comme pour toutes les pénicillines elle ne doit pas être administrée aux gens hypersensibles à la pénicilline.

#### **IV-1-1-Mode d'action :**

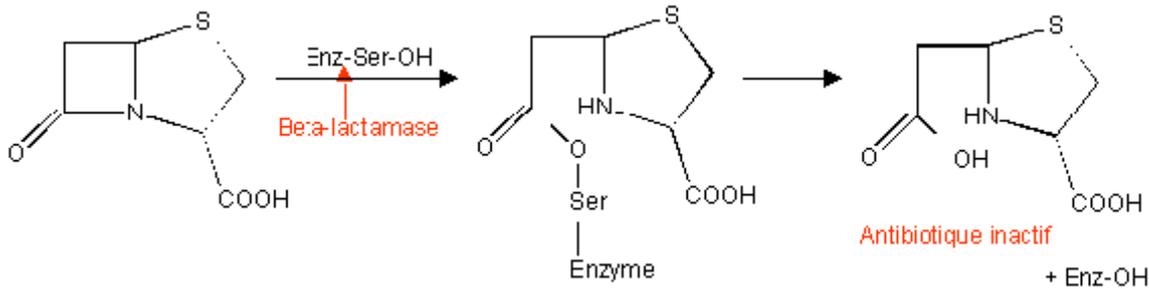
Les bêtalactamines inhibent la synthèse de la paroi bactérienne en se fixant sur les protéines liant les pénicillines. Ces protéines sont des carboxypeptidases et des transpeptidases nécessaires à la liaison entre les chaînes latérales des peptidoglycanes. L'inhibition d'une ou plusieurs de ces enzymes fait accumuler des précurseurs de peptidoglycanes qui activent le système autolytique de la bactérie et entraînent sa lyse. (9)

De nombreuses bactéries ont développées un système de résistance contre les bêtalactamines.

#### **IV-1-2- Résistance au bêtalactamines :**

Il existe plusieurs types de résistances parmi les quelles, l'inactivation enzymatique par production des bêtalactamases.

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes bactériennes qui hydrolysent la liaison amide du cycle  $\beta$ -lactame des  $\beta$ -lactamines pour donner un acyl-enzyme qui sera ensuite dégradé en acide inactif (figure 2). L'hydrolyse irréversible du noyau  $\beta$ -lactame entraîne alors l'inactivation de l'antibiotique et la perte totale de son activité antibactérienne. Chez les bactéries à Gram positif les  $\beta$ -lactamases sont sécrétées dans le milieu de culture tandis que chez les bactéries à Gram négatif ces enzymes se retrouvent dans l'espace périplasmique. (13,14)

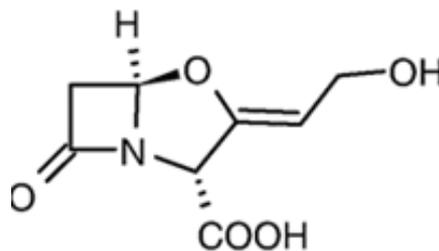


**Figure 1 : inactivation enzymatique par bêtalactamases**

L'inefficacité de l'amoxicilline vis-à-vis des bactéries productrices de bêtalactamases, de même que sur des germes anaérobies à gram négatives, nécessite l'association de l'amoxicilline avec un inhibiteur de bêtalactamases pour résoudre un peu le problème (7).

#### IV-2- L'acide clavulanique :

- **Structure :**



L'atome de soufre caractéristique des pénicillines est substitué par un atome d'oxygène.

Formule brute :  $C_8H_8KNO_5$

Nomenclature : (2R,3Z,5Z)-3-(2-hydroxyéthylidène)-7-oxo-4-oxa-1-azabicyclo[3.2.0]heptane-2-carboxylate de potassium

- **Caractères :**



Aspect : poudre cristalline blanche à sensiblement blanche, hygroscopique.

- **Solubilité :**

Facilement soluble dans l'eau, peu soluble dans l'alcool, très peu soluble dans l'acétone.

**IV-2-1-Biosynthèse de l'acide clavulanique :**

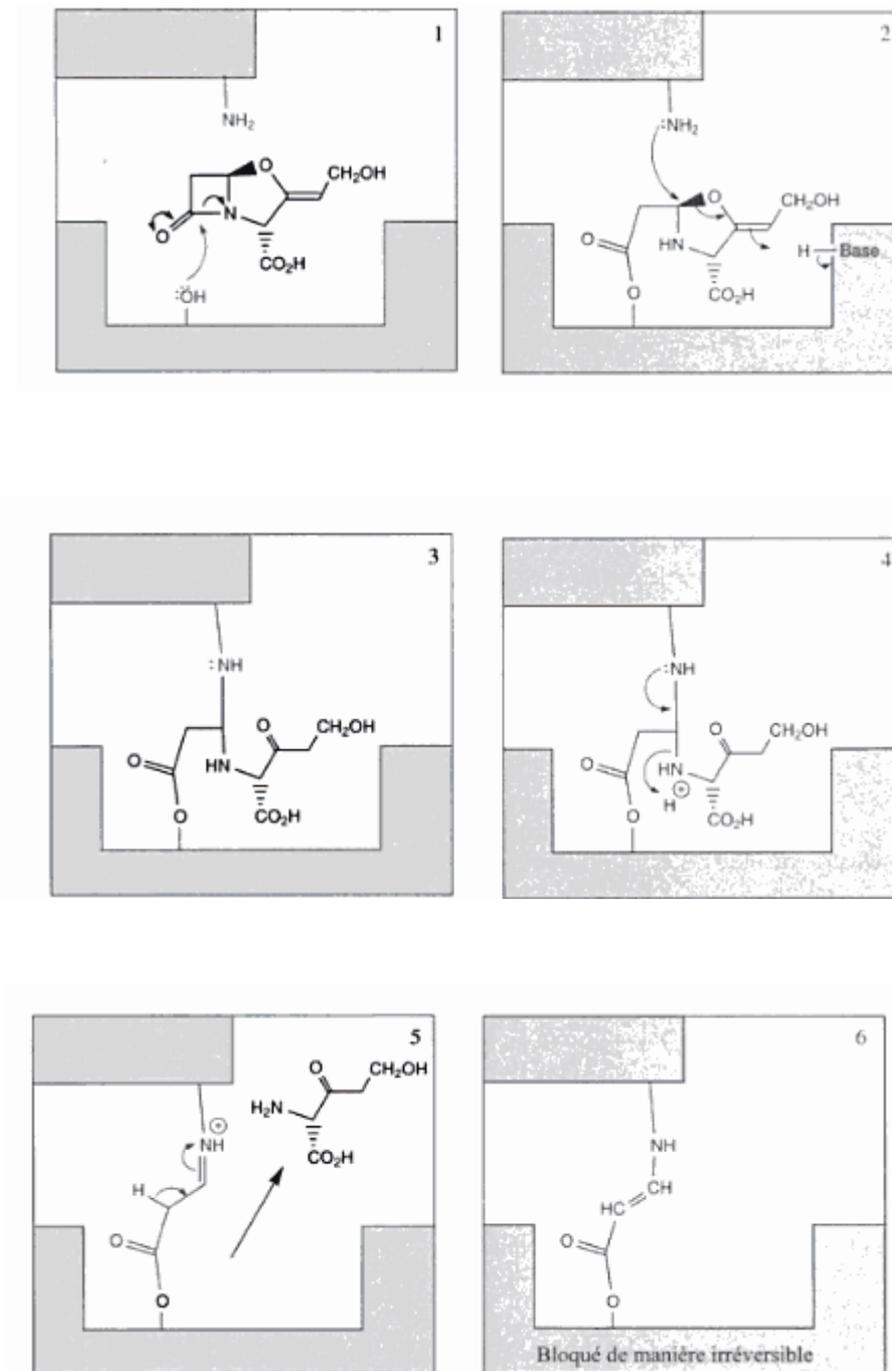
L'acide clavulanique est un sel potassique d'une substance élaborée par la croissance de certaines souches de streptomycetes clavuligerus ou obtenue par tout autre moyen. (2,15)

**IV-2-2-Mode d'action de l'acide clavulanique**

L'acide clavulanique en fait un inhibiteur irréversible des bêta lactamases, dotées d'une très faible activité d'antibiotique et appartenant à la catégorie des substances suicidaires. Ce médicament vient s'emboîter dans le site actif du bêta lactamases, puis le cycle de bêta lactame est amené à s'ouvrir sous l'action d'un résidu sérine, de la même manière que la pénicilline.

Mais ici, l'enzyme acylée formée transitoirement réagit dans un deuxième temps avec un autre groupe nucléophile appartenant à l'enzyme (probablement  $\text{NH}_2$ ) ce qui a pour résultat de lier le médicament irréversiblement à l'enzyme (en formant un complexe stable, molécule-enzyme). Ce mécanisme implique la perte ou la fixation d'un proton à divers moments, de sorte qu'un acide aminé de type histidine est sûrement présent dans le site actif pour jouer le rôle d'un donneur /accepteur de proton (figure 4).

Il en résulte que l'acide clavulanique est détruit et protège ainsi les pénicillines (l'amoxicilline) d'une inactivation par ces enzymes. (9, 10,15)



**Figure 2 : Mécanisme d'action de l'acide clavulanique**

#### **IV-3-Association amoxicilline et acide clavulanique :**

L'acide clavulanique s'associe généralement avec les pénicillines, notamment l'amoxicilline pour redonner à l'amoxicilline son activité sur les souches ayant acquises une résistance et élargit son spectre d'activité. Cette association se fait par une formulation de l'amoxicilline (sous forme



trihydratée) et de l'acide clavulanique (sous forme de clavulanate de potassium) avec un rapport variable.

Pour la forme orale le rapport était de 4/1, ensuite de nouvelles posologies sont apparues avec un rapport de 8/1 qui réclament une efficacité identique associée à plus de sécurité et de tolérance. Cependant, pas tous les pays ne commercialisent des génériques avec un rapport du 8/1. Récemment, une AMM a été accordé à une association amoxicilline acide clavulanique avec un rapport 16/1 dans les pneumonies chez l'adulte à risque. (11)

Donc tous ces changements jouent un rôle primordial dans la santé des patients.

## Chapitre IV :



# Rappel bibliographique sur la stabilité du médicament

## V-stabilité des médicaments :

### V-1-Définitions

Selon les ICH (International Standard of Harmonisation = Conférence Internationale d'harmonisation) on entend par stabilité:

« Aptitude d'un médicament à conserver ses propriétés chimiques, physiques, microbiologiques et biopharmaceutiques dans des limites spécifiées pendant toute sa durée de validité ».

La pharmacopée américaine (USP) a classé la stabilité en cinq modalités:

- **Stabilité chimique** : chaque principe actif conserve son intégrité chimique et sa teneur déclarée.
- **Stabilité physique**: maintien des propriétés physiques initiales, telle que l'aspect, goût, uniformité, dissolution et pouvoir de remise en suspension.
- **Stabilité microbiologique**: la stérilité ou la résistance au développement microbien est maintenue et les agents antimicrobiens éventuellement présents conservent leur efficacité dans les limites prescrites
- **Stabilité Thérapeutique**: efficacité thérapeutique demeure inchangé
- **Stabilité toxicologique**: aucune hausse notable de la toxicité n'est tolérée. (8)

### V-2- Principaux processus de dégradation d'un médicament

Les facteurs influençant la dégradation des médicaments sont :

- L'hydrolyse : dégradation par l'eau ou par humidité
- L'oxydation : dégradation par l'oxygène ou par un agent d'oxydation
- La photodégradation : dégradation par la lumière
- Contamination microbienne



- Température : une augmentation de la température accélère l'hydrolyse, oxydation et la prolifération bactérienne.

Pour augmenter la durée de vie ou la date de péremption d'un médicament, les industriels sont sensés d'inhiber ces facteurs.

### a- ralentir l'oxydation :

L'utilisation d'un agent antioxydant et conditionnement approprié et sous azote est la façon la plus sécurisée pour conserver un médicament sensible à l'oxydation.

### b- ralentir l'hydrolyse :

Pour minimiser l'effet de l'hydrolyse d'un médicament il faut :

- Conserver certains médicaments sous forme de poudre lyophilisée à reconstituer au moment de l'emploi.
- Ajouter un produit de dessiccation dans l'emballage du médicament.
- Emballage approprié et bien étanche.

-En faisant figurer «conserver à l'abri de la lumière» sur l'emballage.

### c- ralentir la photodégradation :

En utilisant des flacons opaques et colorés et des blisters en aluminium ainsi en faisant figurer« conserver à l'abri de la lumière» sur l'emballage.

### c- éviter la contamination microbienne :

Pour éviter la prolifération microbienne il faut ajouter des adjuvants antimicrobiens réfrigérer le flacon lorsque c'est possible pour limiter la prolifération.

### d- éviter les écarts de température :

- Respecter rigoureusement la chaîne du froid
- Utiliser correctement les frigos et les contrôler régulièrement
- Faire figurer sur l'emballage « conserver à température ambiante» ou « conserver au réfrigérateur» entre 2 et 8°C pour les médicaments sensibles à la température.

En plus des facteurs extrinsèques de la stabilité d'un médicament (humidité, température, lumière) il existe d'autres facteurs intrinsèques :

- Substance active
- La nature des excipients
- L'interaction Substance active/excipients
- La qualité de la formulation
- L'interaction contenu/contenant

L'instabilité d'un médicament peut être évalué suivant un contrôle physico-chimie par :

- une baisse de 5 % de la teneur en principe actif par rapport la valeur initiale

(Sous dosage et problème de résistance en cas des antibiotiques).

- Présence des produits de dégradations en dehors des spécifications : risque de toxicité
- pH en dehors des limites spécifiés



- Spécifications relatives à l'apparence et aux propriétés physiques non respectées  
(exemple changement de couleur)(12)

### V-3-Objectifs des études de stabilité

Il existe deux types d'études de stabilité :

#### a-Etudes de stabilité en temps réel

Étude expérimentale des caractéristiques Physiques, chimiques, biologiques et microbiologiques d'un médicament pendant sa durée de validité et d'utilisation prévue et au-delà, dans des conditions de stockage prévues pour le marché auquel il est destiné.

Les conditions de longue durée permettent de définir la date de péremption du produit, intervalle de temps où le produit reste conforme à ses spécifications.

L'étude de stabilité peut être influencée par le climat de la région, l'OMS a défini quatre grandes zones climatiques, les fabricants doivent adapter leurs études au marché visé. Ces régions sont :

Zone I : climat tempéré

Zone II : climat subtropical avec possibilité de forte humidité

Zone III : climat chaud et sec

Zone IV : climat chaud et humide

Les conditions climatiques moyennes rencontrées dans ces zones ainsi que les conditions de stockage dérivées pour les études de stabilité en temps réel sont présentées dans le tableau (1).

**Tableau 1 : Conditions de stabilité selon les zones climatiques.**

Zone climatique	Mesures à l'air libre		Mesures en entrepôt		Conditions dérivées	
	°C	% HR	°C	% HR	°C	% HR
I	10,9	75	18,7	45	21	45
II	17,0	70	21,1	52	25	60
III	24,4	39	26,0	54	30	35
IV	26,5	77	28,4	70	30	70

La zone I ne comporte que quelques pays, il est donc conseillé aux fabricants désirant commercialiser un produit sous les climats tempérés de concevoir leurs études de stabilité en fonction des conditions dérivées de la zone climatique II, qui correspondent également aux températures et humidités spécifiées dans les recommandations ICH (International Conférence of Harmonisation).



Cependant, pour les fabricants visant un marché mondial, il est recommandé de mettre en oeuvre des études de stabilité utilisant les paramètres de la zone IV.

Les essais en conditions d'humidité relative élevée sont très intéressants pour les emballages semi-perméables car le risque de dégradation est beaucoup plus élevé.

*b -les études de dégradation accélérées*

Ces études sont destinées à augmenter la vitesse de dégradation chimique ou physique d'un médicament en le soumettant à des conditions de stockage extrêmes dans le cas du programme officiel des études de stabilité.

Les études de stabilité en temps réel et accéléré sont réalisées dans des conditions de température et humidité (tableau 2)

**Tableau 2 : stabilité des médicaments en temps réel et accéléré**

Étude	Conditions d'entreposage	Période minimale pour laquelle des données sont disponibles au moment de la présentation
Longue durée	$25\text{ °C} \pm 2\text{ °C} / 60\% \text{ HR} \pm 5\%$	6 > mois
Dégradation accélérée	$40\text{ °C} \pm 2\text{ °C} / 75\% \text{ HR} \pm 5\%$	6 mois



Les études de stabilité sont donc un paramètre capital à prendre en compte lors des approvisionnements en médicaments et cela pour trois raisons principales :

1. Les conditions climatiques des pays en développement sont très différentes de celles des pays européens qui servent généralement de base pour les référentiels d'études.
2. Les conséquences d'une mauvaise stabilité sont graves en termes d'inactivité ou de toxicité.
3. La stabilité ne peut pas être évaluée par un contrôle qualité du produit fini à la réception.

Les études de stabilité ont pour but de fournir des données probantes sur la façon dont la qualité d'un principe actif ou d'un produit médicamenteux varie en fonction du temps sous l'effet de divers facteurs environnementaux, comme la température, l'humidité et la lumière, permettant ainsi de définir les conditions de conservation et de déterminer la durée de validité des produits.

Dans les laboratoires de recherches on parle souvent de la dégradation forcée dans des conditions plus agressives :

- Température : peut être supérieure 40°C
- Hydrolyse : HCl 0.1 N ou NaOH 0.1 N
- Oxydation : H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- Photolyse : UV (8)



---

# Chapitre IV :

## Etude expérimentale de la stabilité de l'amoxicilline et de l'acide clavulanique



**Partie A :**

**Stabilité de l'amoxicilline et de l'acide  
clavulanique sous forme de poudre en sachets et  
en suspension reconstituée**

**I-Objectif :**

Suite à une constatation du changement de couleur de médicament sous forme de poudre en sachet ,aussi en suspension reconstituée dans des flacons ,contenant de l'amoxicilline et l'acide



clavulanique ,on a effectué des études de stabilité du produit par dosage des principes actifs et recherche des impuretés par la méthode de chromatographie liquide HPLC .

## II- Matériel et méthodes :

- Le dosage des principes actifs et des impuretés dans la forme solide en sachet, et en suspension reconstituée ont été réalisés selon les conditions chromatographiques suivantes :
- Chaîne de chromatographie liquide HPLC qualifiée avec des performances suivantes :
  - Pompe quaternaire
  - Injecteur automatique
  - Détecteur UV, DAD (barrette de diode)
  - Logiciel Empower.

### Les conditions chromatographiques :

- ❖ **Colonne : zorbax** C18 en acier inoxydable, de dimension 25cm×4,6mm, : 5 µm
- ❖ **Débit** : 1 mL/min.
- ❖ **Température** : 25°C
- ❖ **Longueur d'onde** : 230 nm.
- ❖ **Volume d'injection** : 20 µL
- ❖ **Diluant** : Phase A
- ❖ **Mode de séparation** : gradient
- ❖ **Phase mobile** :
  - phase mobile A : on prépare une solution de phosphate monosodique  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  à 7,8g/l, et on ajuste à pH=4 par l'acide phosphorique  $\text{H}_3\text{PO}_4$ .
  - Phase mobile B : on mélange un volume égaux de phase mobile A et de méthanol.

Temps (min)	$\dot{O}A(\% v/v)$	$\dot{O}B(\%v/v)$
0 - 4	100	0
4 - 15	100 - 50	0 - 50
15 - 18	50	50
18 - 24	50 - 100	50 - 0
24 - 39	100	0

- Solvants utilisés : eau est distillée et filtrée au laboratoire.

Le méthanol est de grade HPLC (Merck).



- Réactifs : acide phosphorique utilisé à une pureté de 85% et le phosphate monosodique à une qualité de réactif pour analyse.
- Substances chimiques de référence (standard) :
  - Amoxicilline trihydratée étalon de travail de source interne de laboratoire (titre : 98,5%, teneur en eau : 13,1%)
  - Clavulanate de potassium : titre : 41,1% (acide clavulanique), teneur en eau : 0%)
  - Verrerie de préparation est de classe A (Fioles, pipettes ...)
    - Balance de précision (0,1 mg)
    - Bain ultrason.
    - Réfrigérateur

### III- Stabilité de l'amoxicilline et de l'acide clavulanique dans un médicament sous forme de poudre

#### - Présentation des échantillons :

Le médicament à analyser contenant 3g d'amoxicilline et 375mg d'acide clavulanique sous forme de poudre en sachet, de masse moyenne 5,228g. La recherche d'éventuelles impuretés concerne à la fois l'état normal du produit ainsi que l'analyse après une exposition de quatre heures à l'air atmosphérique.

#### III-1-Dosage des principes actifs dans l'état normal de la poudre :

##### -Solution standard :

On dissout une quantité de 114,6mg d'amoxicilline trihydratée de référence et 30,6 mg de clavulanate de potassium dans 200 ml d'eau.

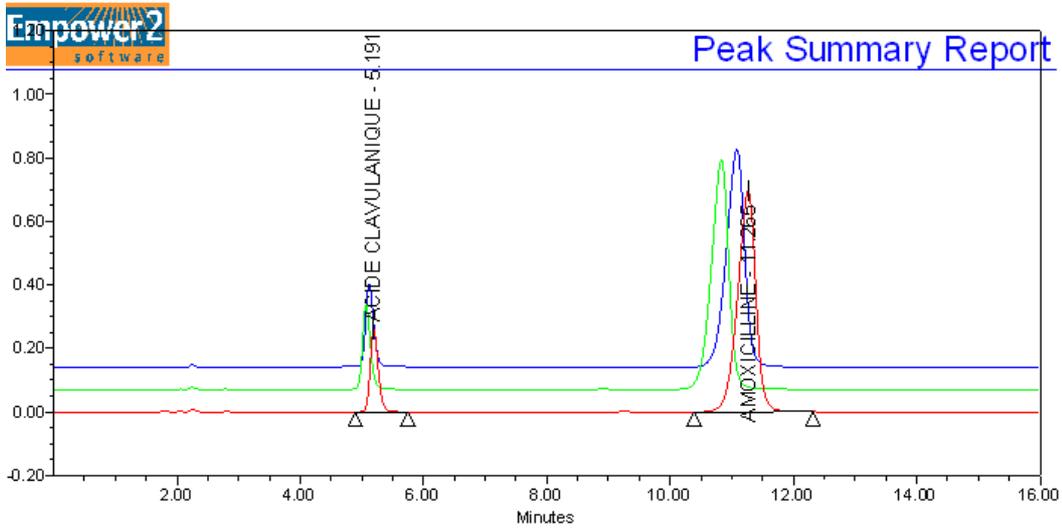
##### - Préparation d'échantillon :

On dissout à peu près 174 mg de poudre (sur trois essais) dans 200 ml d'eau, après l'agitation, on filtre la solution et le filtrat obtenu est utilisé dans le dosage avant une heure après la préparation.



III-1-1-Résultat et discussion :

Après traitement des données, on obtient les chromatogrammes suivants :



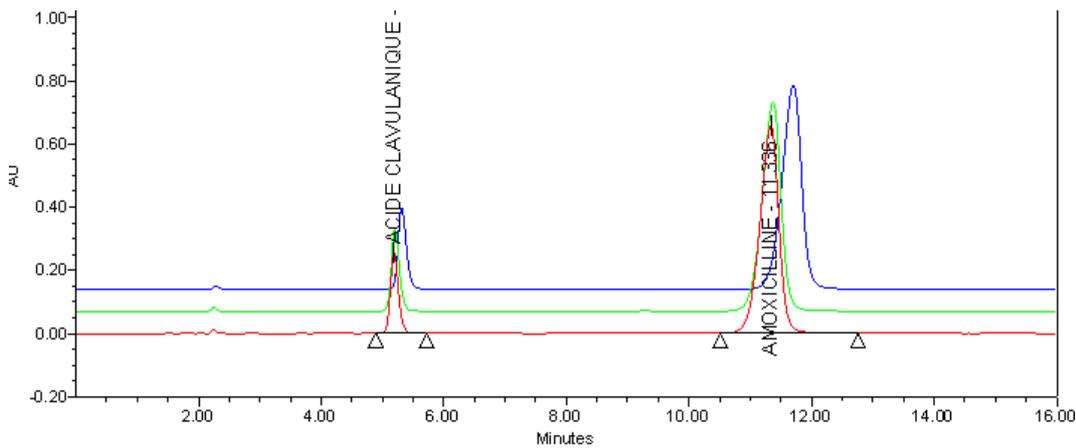
Name : ACIDE CLAVULANIQUE

	Sample Name	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height
1	STD	2	1	ACIDE CLAVULANIQUE	5.191	2408432	14.28	260231
2	STD	2	1	ACIDE CLAVULANIQUE	5.066	2395815	14.27	266674
3	STD	2	1	ACIDE CLAVULANIQUE	5.117	2395972	14.28	261967

Name : AMOXICILLINE

	Sample Name	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height
1	STD	2	1	AMOXICILLINE	10.830	14390398	85.73	722154
2	STD	2	1	AMOXICILLINE	11.082	14380964	85.72	686018
3	STD	2	1	AMOXICILLINE	11.265	14459002	85.72	695828

*Figure 3 : chromatogramme type de standard*



**Name: ACIDE CLAVULANIQUE**

	Sample Name	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height
1	ESS1/73	6	2	ACIDE CLAVULANIQUE	5.187	2396227	14.38	257671
2	ESS2/73	7	1	ACIDE CLAVULANIQUE	5.202	2434536	14.46	260926
3	ESS3/73	8	1	ACIDE CLAVULANIQUE	5.314	2445411	14.36	256662

**Name: AMOXICILLINE**

	Sample Name	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height
1	ESS1/73	6	2	AMOXICILLINE	11.336	14271260	85.62	656423
2	ESS2/73	7	1	AMOXICILLINE	11.372	14396560	85.54	663024
3	ESS3/73	8	1	AMOXICILLINE	11.702	14579490	85.64	646508

**Figure 4: chromatogramme type de l'essai**

Pour calculer la teneur (T en % et en mg/unité) de l'amoxicilline et de l'acide clavulanique dans le produit, on utilise les formules suivantes :

$$T \text{ (mg/unité)} = \frac{\text{Aire essai}}{\text{Aire std} \times m \text{ std} / V \text{ std} \times V_e / m_e \times PM \times T \text{ std} (\%)/100} \times (100 - T_{\text{eau}}) / 100$$

$$T (\%) = T \text{ (mg/unité)} \times 100 / VT$$

mstd : masse de la substance de référence (mg)      me :masse d'essai (mg)

Tstd : Titre de la substance de référence (%)

Vstd : volume de dilution de standard (ml)      T eau: teneur en eau du std (%)

Ve : volume de dilution d'essai (ml)

PM : Poids moyen (mg)

VT : valeur théorique déclarée dans la Spécialité pharmaceutique (3000mg pour l'amoxicilline et 375mg pour l'acide clavulanique).



**Tableau3 : Résultat de calcul de l'acide clavulanique :**

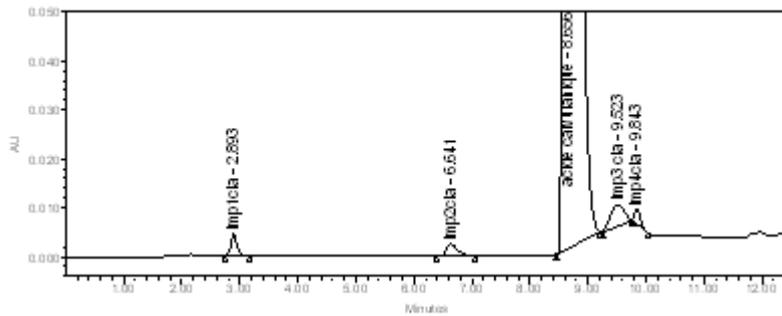
Spécialité						
DCI	Acide Clavulanique					
N° d'enregistrement						
N° du lot						
Titre STD (%)	41,4					
T en eau STD (%)	0					
V de dilution STD (ml)	200					
V de dilution essai (ml)	200					
Poids moyen (mg)	5228,03					
Facteur de conversion	1					
Fabricant						
Date de PER						
	<b>Masse (g)</b>	<b>Aire</b>	<b>F.R.</b>	<b>T (mg/unité)</b>	<b>T (%)</b>	<b>F.R. %</b>
Etalon 1	0,0306	2395815,00	78294608			
Essai 1	0,1741	2394763,50		<b>380,25</b>	<b>101,40</b>	
Etalon 1	0,0306	2408432,00	78706928			99,5%
Essai 2	0,1752	2453162,50		<b>385,05</b>	<b>102,68</b>	
Etalon 1	0,0306	2395972,00	78299739			100,5%
Essai 3	0,1742	2442123,50		<b>387,52</b>	<b>103,34</b>	
				<b>Ecartype</b>	<b>0,99</b>	
				<b>C.V. trouvé (%)</b>	0,96	
				<b>C.V. limite DT (%)</b>	2,50	

Théorie (mg/unité) =	375,00		
Erreur maximum tolérée =	5,0	%	
Limite inférieure =	356,25	95	
Limite supérieure =	393,75	105	
Teneur (mg/unité)	384,27		
<b>Intervalle de confiance</b>	<b>380,01</b>	<b>389</b>	

**Tableau 4 : Résultat de calcul de l'amoxicilline:**

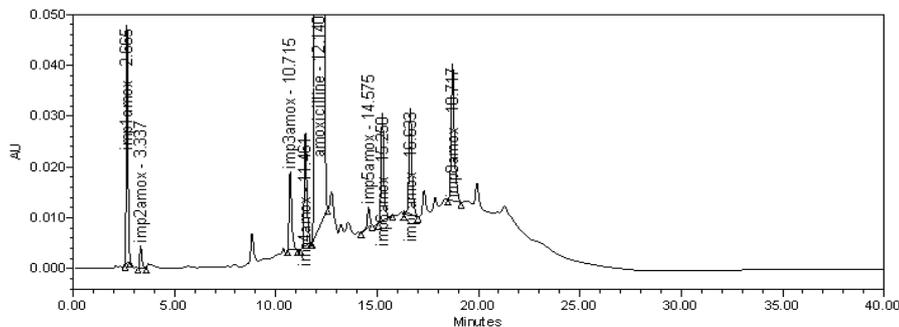
Spécialité			
DCI	Amoxicilline		
N° d'enregistrement			
N° du lot			
Titre STD (%)	98,5		
T en eau STD (%)	13,1		
V de dilution STD (ml)	200		
V de dilution essai (ml)	200		
Poids moyen (mg)	5228,03		
Facteur de conversion	1		
Fabricant			
Date de PER			





Peak Name	RT	Area	% Area	Height
1 imp1cib	2.893	31718	0.43	4429
2 imp2cib	6.641	32310	0.44	2425
3 active calcium trihydrate	8.656	723111	97.88	507088
4 imp3cib	9.523	7277.3	0.98	4417
5 imp4cib	9.843	19917	0.27	2947

**Figure 5 : Chromatogramme type de témoin a**

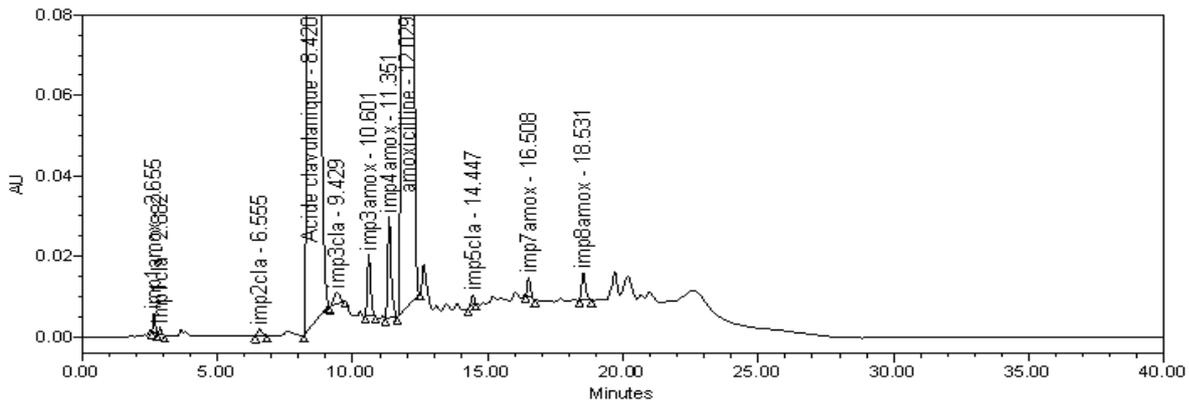


Peak Name	RT	Area	% Area	Height
1 imp1amox	2.665	272868	0.52	46644
2 imp2amox	3.337	30625	0.06	4333
3 imp3amox	10.715	136230	0.26	15345
4 imp4amox	11.461	195896	0.37	22219
5 amoxicilline	12.140	51145675	97.38	3440951
6 imp5amox	14.575	34452	0.07	3857
7 imp6amox	15.250	194148	0.37	21155
8 imp7amox	16.633	213718	0.41	20879
9 imp8amox	18.717	299854	0.57	26758

**Figure 6 : Chromatogramme type de témoin b**

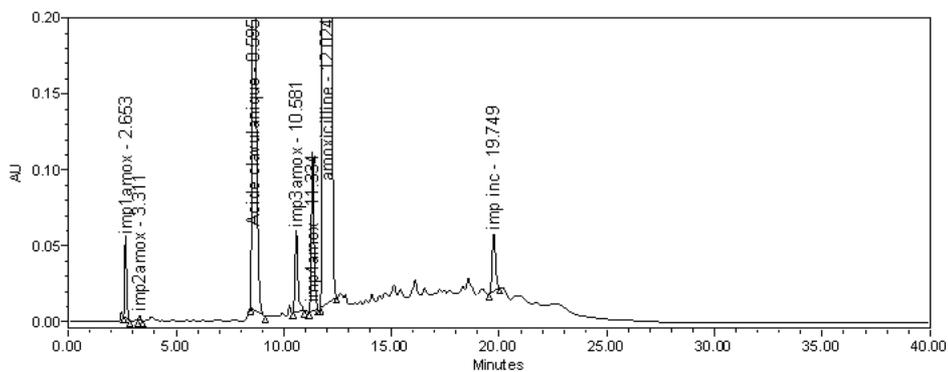
-quantification des impuretés dans les essais :

Pour identifier les impuretés dans les essais ,On se réfert à deux solutions témoins a et b



	Peak Name	RT	Area	% Area	Height
1	imp1 amox	2.655	24723	0.04	4624
2	imp1 cla	2.882	9803	0.01	1721
3	imp2 cla	6.555	17698	0.03	1519
4	Acide clavulanique	8.420	16817032	23.90	783113
5	imp3 cla	9.429	43421	0.06	2814
6	imp3 amox	10.601	128710	0.18	15233
7	imp4 amox	11.351	219470	0.31	25038
8	amoxicilline	12.029	52984988	75.30	3361740
9	imp5 cla	14.447	18913	0.03	2584
10	imp7 amox	16.508	37091	0.05	4729
11	imp8 amox	18.531	67413	0.10	6692

**Figure 7 : Chromatogramme type poudre normale**



	Peak Name	RT	Area	% Area	Height
1	imp1 amox	2.653	308638	0.52	52990
2	imp2 amox	3.311	22943	0.04	3542
3	Acide clavulanique	8.595	3619230	6.06	291911
4	imp3 amox	10.581	486592	0.81	53250
5	imp4 amox	11.334	875972	1.47	104707
6	amoxicilline	12.024	54036422	90.43	3424050
7	imp inc	19.749	403859	0.68	37823

**Figure 8 : Chromatogramme type poudre oxydée**



### III-2-2- Discussion :

D'après les résultats obtenus dans l'état normal et oxydée :

\*L'amoxicilline est moins sensible à l'oxydation après l'exposition aux conditions atmosphériques (Aire du chromatogramme de l'amoxicilline est presque inchangé) mais on observe une légère apparition des impuretés : impamox2, impamox3, et notable dégradation engendrant l'impamox4 (passage de 0,31 à 1,47%) qui dépasse la norme (1%).

\*l'acide clavulanique s'oxyde plus facilement (il reste seulement 21% de la teneur de l'état normal)

Les impuretés de l'acide clavulanique sont faiblement détectées surtout dans l'état oxydé qui peuvent être dus à l'apparition de nouveaux produits secondaires ayant une faible absorbance en UV.

## IV- Stabilité de l'amoxicilline et l'acide clavulanique dans un médicament sous forme de suspension reconstituée

### Présentation du travail :

On a effectué des dosages pendant 7 jours, On a pris l'échantillon en suspension, puis on a effectué le premier dosage, ensuite on l'a mis dans le réfrigérateur de température entre 2°C et 8°C. On a répété cette opération pendant les sept jours avec le même échantillon comme si c'est un patient qui l'utilise et ce pour avoir le pourcentage restant de l'Amoxicilline et l'acide clavulanique pendant cette durée.

### IV-1-Matériel et méthodes :

Sont cités auparavant avec les modifications suivantes : la longueur de la colonne est de 15cm, le débit de la phase mobile est 2ml/min.

### Présentation des échantillons :

L'échantillon en question est sous forme de poudre destinée à être reconstituée dans 60 ml d'eau, la suspension obtenue contient 100 mg /ml d'amoxicilline et 12,5 mg/ml d'acide clavulanique (densité 1,058).

L'étude faite sur trois échantillons (trois sources des médicaments différents A, B et C)

### IV-2-Dosage des principes actifs dans la suspension :

#### Solution standard :

On pèse 150 mg d'amoxicilline trihydratée et 37,5mg de clavulanate de potassium SCR, on les solubilise dans une fiole de 100 ml et on complète avec de l'eau. On agite par ultrason pendant 15 min.

#### Préparation de l'échantillon :

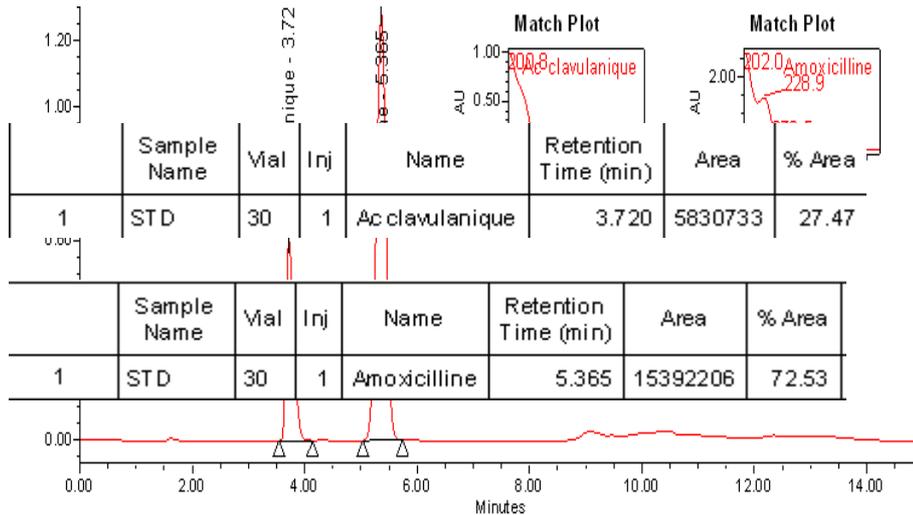
-On reconstitue la poudre, avec de l'eau jusqu'au trait du flacon.

-On dissout une masse voisine de 2 g de la suspension dans 1000 ml d'eau. (5000 ml ou 2000ml).

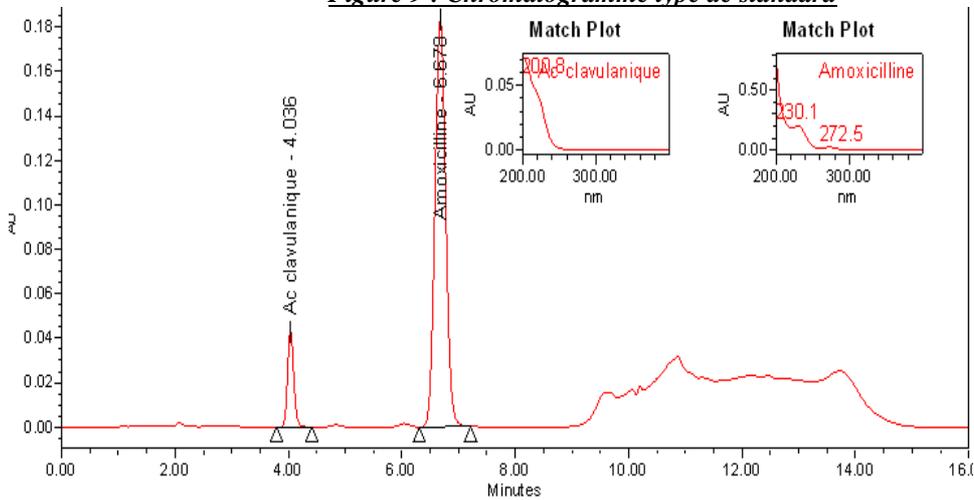


**IV-3-Résultat :**

L'identification de l'amoxicilline et de l'acide clavulanique se fait par comparaison des temps de rétention dans le standard et l'essai.



**Figure 9 : Chromatogramme type de standard**



Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height
Ac clavulanique	4.036	329626	12.02	43194



Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height
Amoxicilline	6.678	2413742	87.98	183174

**Figure 10 : Chromatogramme type de l'essai C**

Pour calculer de la teneur (en % et en mg/ml) de l'amoxicilline et de l'acide clavulanique dans la suspension, on utilise les formules suivantes :

$$T (\text{mg/ unité}) = \frac{\text{Aire essai} / \text{Aire std} \times m_{\text{std}} / V_{\text{std}} \times V_{\text{de}} / v_{\text{e}} \times T_{\text{std}} (\%)/100}{(100 - T_{\text{eau}})/100}$$

$$T (\%) = \frac{T (\text{mg/ml}) \times 100}{VT}$$

$m_{\text{std}}$  : masse de la substance de référence (mg)

$V_E$  : volume d'essai (ml) ( $V_e = m_e / d$ ) avec  $d = 1,058$  et  $m_e \approx 2g$

$T_{\text{std}}$  : Titre de la substance de référence (%)

$V_{\text{std}}$  : volume de dilution de standard (ml)

$T_{\text{eau}}$  : teneur en eau du std (%)

$V_{\text{dE}}$  : volume de dilution d'essai (ml)

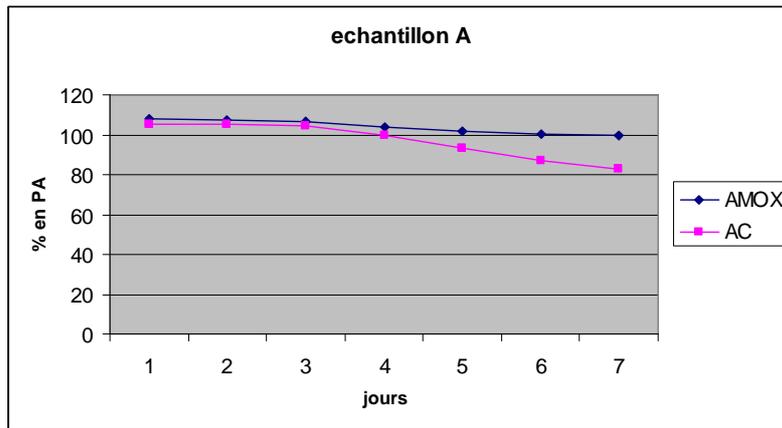
$VT$  : valeur théorique déclarée dans la Spécialité pharmaceutique 100mg/ml pour l'amoxicilline et 12,5mg/ml pour l'acide clavulanique).

Les données de dosage dans différents échantillons pendant sept jours sont représentées dans le tableau ci-dessous.

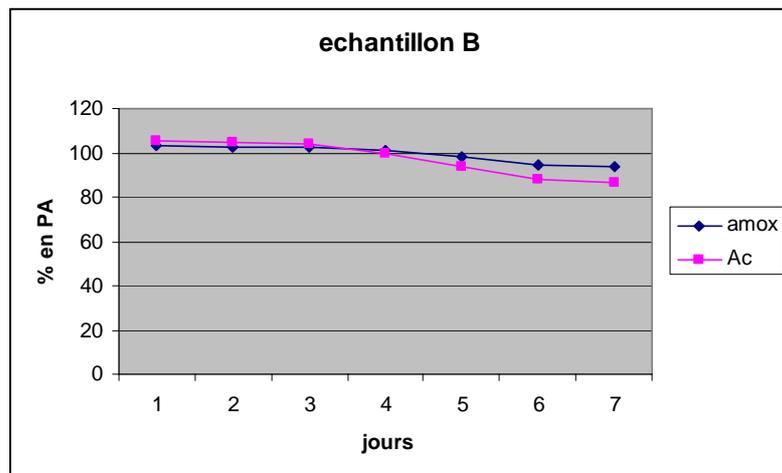
**TABLEAU 5 : Résultat de dosage l'amoxicilline et l'acide clavulanique.**

jours	Amoxicilline (%)							Acide clavulanique (%)						
	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7
Echantillon A	107,8	107,1	107,0	104,2	102,0	100,5	99,3	105,3	105,1	104,9	99,4	93,2	87,0	83,1
Echantillon B	103,4	102,9	102,5	101,0	98,1	94,8	94,0	105,1	104,6	104,1	99,5	93,8	87,9	86,2
Echantillon C	107,9	107,4	107,1	106,6	106,0	104,0	102,6	102,5	101,3	100,9	100,7	93,5	89,8	84,8

Ces résultats sont représentés pour chaque échantillon comme suite :



**Figure 11 : Teneur des principes actifs dans l'échantillon**



**Figure 12 : Teneur des principes actifs dans l'échantillon B**

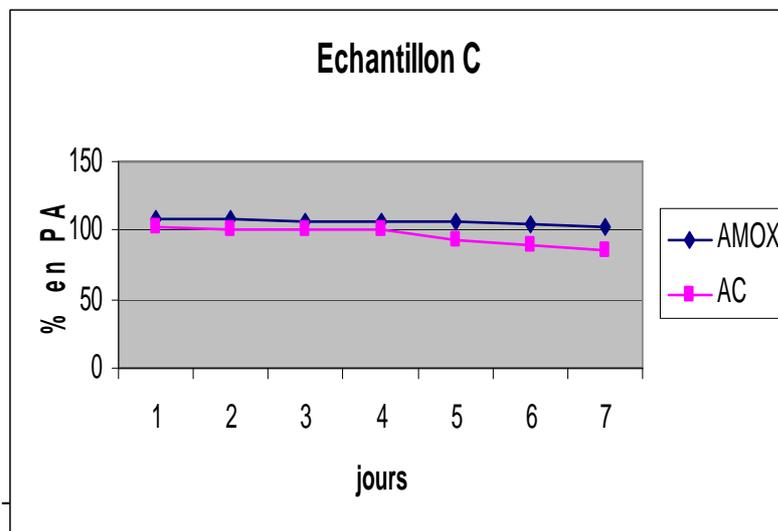




Figure 13 : Teneur des principes actifs dans l'échantillon C

#### **IV-4-Discussion :**

En passant du premier jour au septième jour, la teneur de l'amoxicilline et de l'acide clavulanique diminue dans les trois échantillons (A, B et C) malgré la conservation des suspensions dans des conditions de température prescrite (2 à 8°C) et à l'abri de la lumière (tableau 5).

Une diminution notable de la teneur de l'acide clavulanique a été observée (il reste environ 85% de la valeur déclarée). Cette dégradation est due à une grande sensibilité de l'acide clavulanique à l'hydrolyse par rapport à l'amoxicilline.

La norme de la teneur des principes actifs dans le cas des études de stabilité des suspensions n'est pas bien fixée (varie de  $\pm 10\%$  à  $\pm 20\%$ )

Les valeurs de l'amoxicilline répondent correctement à ces exigences tandis que les teneurs de l'acide clavulanique dans les deux derniers jours sont suspectées par rapport à la norme adoptée.

La différence de teneur en principe actif pour les trois échantillons dans le même jour peut être due à la nature de la substance active (différents fabricants et fournisseurs..), La nature des excipients (la quantité d'excipients est souvent majoritaire dans une formulation médicamenteuse) ainsi que La qualité de la formulation.



---

# **Partie B :**

## **Dégradation forcée de l'acide clavulanique**



## I-Objectif :

Ce travail a pour objectif d'évaluer le comportement de l'acide clavulanique vis-à-vis des conditions de " stress " (hydrolyse, photodégradation et thermodégradation). C'est une étude à court terme qui porte d'immenses informations sur la stabilité du médicament lors du stockage en conditions normales. Les impuretés formées sont en quantité suffisante pour être détectées.

## II- Matériel et méthodes :

Chaîne de chromatographie liquide HPLC qualifiée avec des performances suivantes :

- Pompe quaternaire
- Injecteur automatique
- Détecteur UV, DAD (barrette de diode)
- Logiciel Empower

Les études de dégradation forcée ont été faites suivant les conditions chromatographiques suivantes :

- ❖ **Colonne :** Agilent zorbax C18 SB, de dimension 15cm×4,6mm, : 5 µm
- ❖ **Débit :** 2 mL/min.
- ❖ **Température :** 40°C
- ❖ **Longueur d'onde :** 230 nm.
- ❖ **Volume d'injection :** 50 µL.
- ❖ **Diluent :** Phase A
- ❖ **Mode de séparation :** gradient
- ❖ **Temps d'acquisition :** 60 min
- ❖ **Phase mobile :** Phase A - phase B

-Phase A : Tampon phosphate monopotassique  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,05M) et ajuster à pH=5 avec NaOH 0,1M)

- phase B : Acétonitrile.



Temps (min)	$\bar{O}A$	$\bar{O}B$
0,00	98,0	2,0
7,00	98,0	2,0
22,0	93,0	7,0
40,0	93,0	7,0
48,0	80,0	20
52,0	100,0	0,0
60,0	100,0	0,0

- **Réactifs** : Le phosphate monopotassique à une qualité de réactif pour analyse, (fournisseur sigma) NaOH, et HCl (grade réactif) d'origine Scharlau.

- **Solvants** : L'acetonitrile est de grade HPLC (Merck).

- Verrerie de préparation est de classe A (Fioles, pipettes ...)

- Balance de précision (0,1 mg)
- Bain marie avec régulateur de température.
- Bain ultrason
- Une Lampe UV à 254 nm

### III- Préparation des échantillons :

On prépare des solutions test d'acide clavulanique 0,75 mg/l. (75 mg dans 100 ml de la phase A) selon les conditions suivantes:

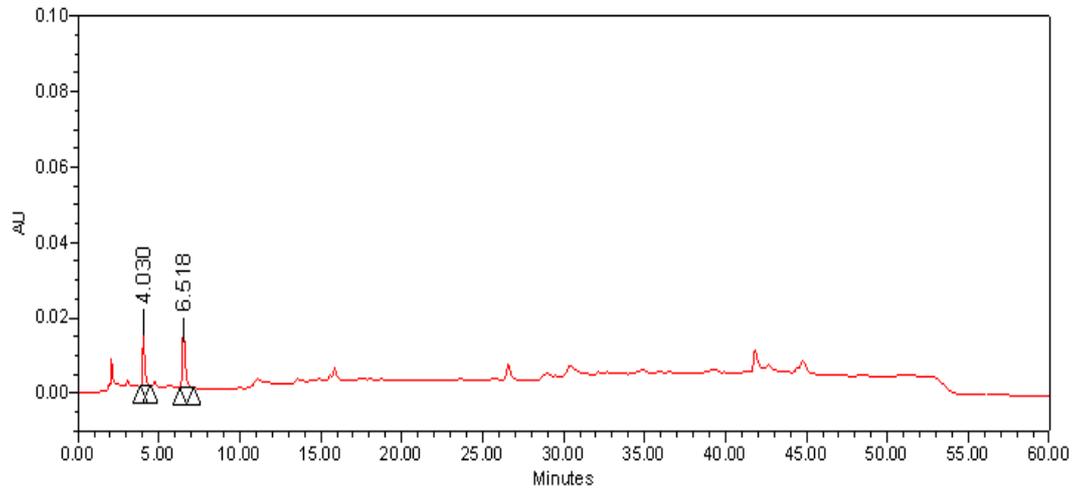
- La température (de l'échantillon a été stocké à 85 ° C pendant 3 h).
- L'acide (HCl 1 M aqueux (1 ml) a été ajouté et l'échantillon a été conservé à température ambiante pendant 30 min).
- Base (NaOH 0,5 M aqueuse (1 ml) a été ajouté et l'échantillon a été stocké à 25 ° C pendant 2 min).
- la lumière (l'échantillon a été allumé à 254nm pendant 24 h à 25 ° C);

Les échantillons ont été dégradées, neutralisées si nécessaire.

### IV- Résultat et discussions :

#### IV-1-Résultat de l'hydrolyse acide et basique:

Après traitement des données concernant l'hydrolyse acide et basique on obtient :

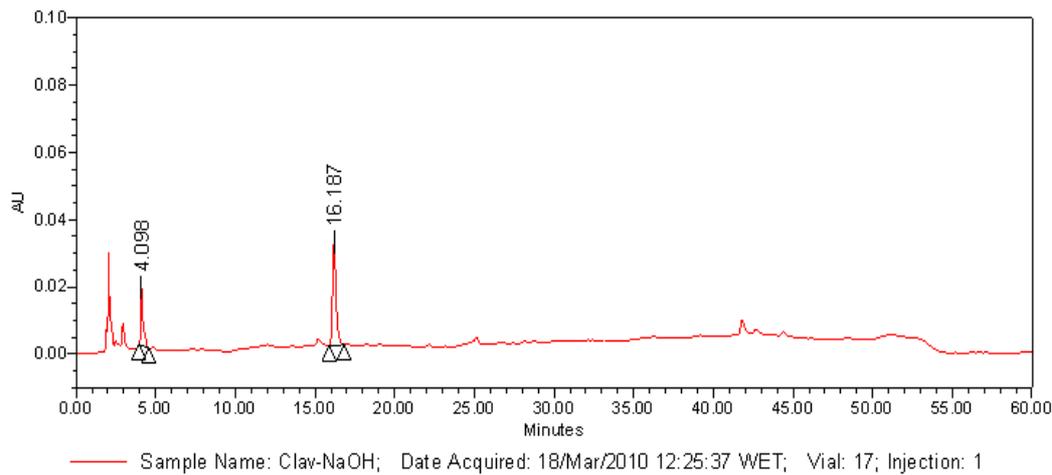


— Sample Name: Clav-HCl; Date Acquired: 18/Mar/2010 11:24:21 WET; Vial: 16; Injection: 1

**Peak Summary with Statistics**  
Name:

	Sample Name	Vial	Inj	Retention Time (min)	Area	% Area	Resolution	EP Plate Count
1	Clav-HCl	16	1	6.518	191441	61.56	1.086316e+001	7.495759e+003
2	Clav-HCl	16	1	4.030	119538	38.44		1.037682e+004
Mean				5.274				
Std. Dev.				1.760				
% RSD				33.37				

***Figure 14 : Chromatogramme de l'hydrolyse acide (HCl)***



**Peak Summary with Statistics**  
**Name:**

	Sample Name	Vial	Inj	Retention Time (min)	Area	% Area	Resolution	EP Plate Count
1	Clav-NaOH	17	1	4.098	182887	27.82		4.966798e+003
2	Clav-NaOH	17	1	16.187	474504	72.18	3.908949e+001	2.790283e+004
Mean				10.142				
Std. Dev.				8.548				
% RSD				84.28				

**Figure 15 : Chromatogramme de l'hydrolyse basique (NaOH)**

Le résultat de l'hydrolyse acide et basique est représenté dans le tableau suivant :

**Tableau 6: hydrolyse par HCl et NaOH de l'acide clavulanique**

	%AC restant	%Imp formée tr=4,0	%Imp formée tr=16,1
<b>HCL 1M</b>	<b>61,56</b>	<b>38,44</b>	<b>Trace</b>
<b>NaOH 0,5M</b>	<b>trace</b>	<b>27,82</b>	<b>72,18</b>

#### **IV-2-Discussion:**

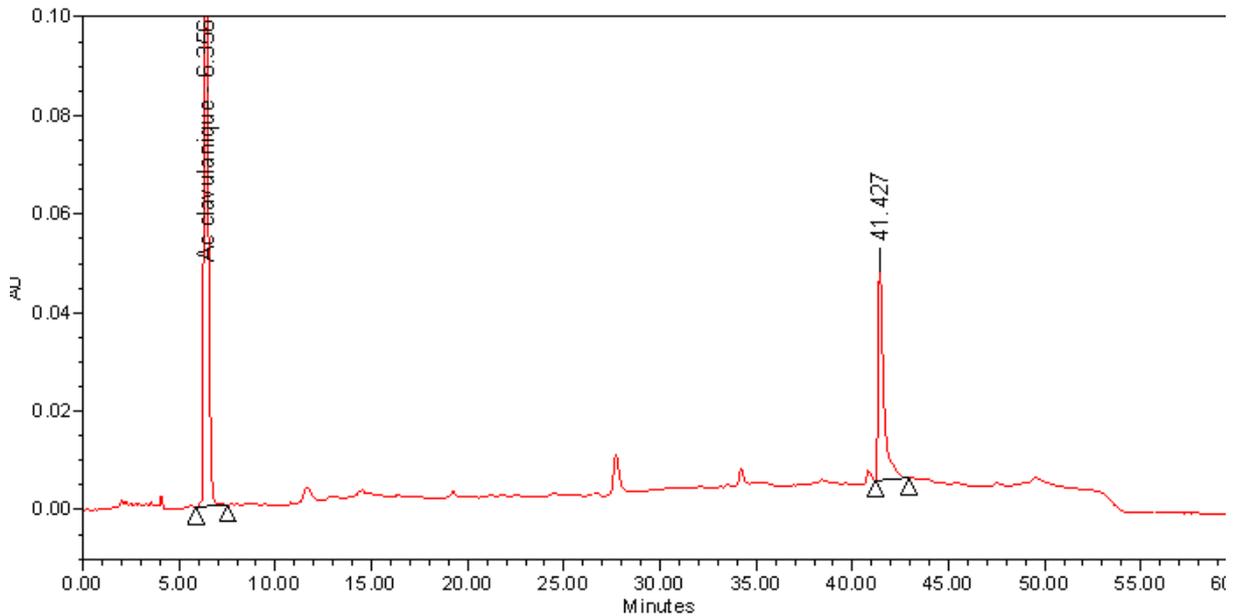
L'Hydrolyse acide est orientée vers la formation d'une impureté majoritaire à 4,03 min, tandis que l'hydrolyse basique en plus de cette impureté conduit à la formation d'intense impureté à 16,1 min.

L'hydrolyse basique est plus agressive, la totalité de l'acide clavulanique est transformée en produits de dégradation (notamment l'impureté en temps de rétention 16,1 min) tableau 4.

#### **IV-3-Résultat de la photodégradation et thermodégradation :**



Après traitement des données concernant la thermodégradation (température) et la photodégradation (UV) on obtient :



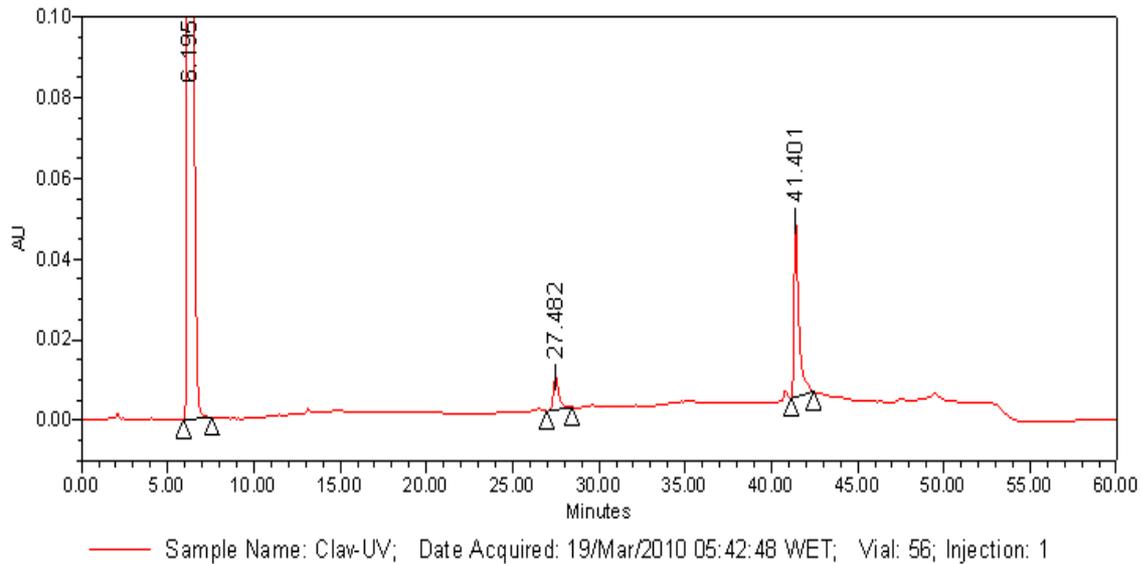
— Sample Name: Clav-T=85°C; Date Acquired: 19/Mar/2010 08:46:16 WET; Vial: 58; Injection: 1

#### Peak Summary with Statistics

Name: Ac clavulanique

	Sample Name	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	EP Plate Count
1	Clav-T=85°C	58	1	Ac clavulanique	6.356	2056644	70.13	4.208178e+003
Mean					6.356			
Std. Dev.								
% RSD								

***Figure 16 : Chromatogramme de thermodégradation***



**Peak Summary with Statistics**  
Name:

	Sample Name	Vial	Inj	Retention Time (min)	Area	% Area	Resolution	EP Plate Count
1	Clav-UV	56	1	6.195	6966516	87.15		2.011041e+003
2	Clav-UV	56	1	41.401	845282	10.57	2.927981e+001	1.503096e+005
3	Clav-UV	56	1	27.482	181770	2.27	3.956959e+001	4.364724e+004
Mean				25.026				
Std. Dev.				17.731				
% RSD				70.85				

**Figure 17 : Chromatogramme de photodégradation**

Le résultat de thermodégradation et photodégradation est représenté dans le tableau suivant:

**Tableau 7 : Thermodégradation et photodégradation de l'acide clavulanique**

	% AC restant	% imp tr=27,4	% imp tr=41,4
T° 85°C	70,13	Minoritaire	29,87
UV	87,15	2,27	10,57

#### IV-4-Discussion :

En comparant la photodégradation et la thermodégradation (même mécanisme radicalaire) :

On peut constater (tableau 7) :

- Il y a lieu formation d'une impureté majoritaire moins polaire à temps de rétention élevé (41,4min)
- L'acide clavulanique est plus sensible à la température (70,13% restant) que la lumière. (87,15% restant)

La comparaison de deux phénomènes a montré que l'acide clavulanique est plus sensible à l'hydrolyse notamment basique que la photodégradation et la thermodégradation.



---

## Conclusion

L'utilisation des combinaisons de  $\beta$ -lactamines et inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases semble également être une bonne alternative aux monothérapies, l'association de l'amoxicilline et de l'acide clavulanique a pour objectif de renforcer l'activité de l'antibiotique par inhibition des enzymes bactériennes (bêtalactamases) par l'acide clavulanique.

L'étude de stabilité des antibiotiques, notamment des bêtalactamines, a une importance capitale suite à l'apparition d'éventuels impuretés toxiques ou un sous- dosage en principe actif qui peut déclencher le phénomène de résistance des bactéries.

En vu de la première partie, on constate que l'acide clavulanique est très instable à cause de l'oxydation après l'exposition de poudre à l'air atmosphérique. En suspension reconstituée, l'acide clavulanique est plus sensible à l'hydrolyse que l'amoxicilline. Cette instabilité est traduite par une baisse de teneur.

L'étude de la dégradation forcée a confirmé que l'acide clavulanique est très instable vis-à-vis de l'hydrolyse, notamment basique, qu'à la photodégradation ou la dégradation par température.

En conclusion, l'association de l'amoxicilline et de l'acide clavulanique en poudre doit être conservée dans des emballages étanches et à l'abri de la lumière, en plus l'ajout d'un conservateur est obligatoire. Lorsque le médicament est soumis à la suspension, la conservation à une température de  $+2^{\circ}\text{C}$  à  $+8^{\circ}\text{C}$  est indispensable.

## Bibliographie

[1]-Source interne de LNCM.2007-2008, Rabat



[2]-Graham, L.Patrick, Paul Depovere ; chimie pharmaceutique ; boeck ; 2 ème édition

[3]-Pharmacopée Européenne ;sixième édition ; tome 1 ,01-2008

[4]-Roy Camille.R ; Atlas de chirurgie orthopédique ;  
*Masson, TOME I, 1989*

[5]- M.Moulin, A .Coquerel; Pharmacologie (connaissances et pratique), Masson ; 2 ème édition 2002.

[6]-Bulletin d'information pharmacothérapeutique, Burkina Faso , Volume10-  
n°32,juin 2007

[7]- Sharon S. Castle<sup>a</sup> ;<sup>a</sup>VA Medical Center, Huntington, USA, 2007

[8]- CH.B.V.N. Raju, H.K. Sharma, CH.S. Rao, et G.N. Rao ; Acta  
Chromatographica ,2009,1, 57–70

[9] -E .Bergogne-bérézin, P.Dellamonica ; antibiothérapie en pratique clinique ;  
Masson ; 2 eme édition 1999

[10] -Massova, I., and S. Mobashery.. Kinship and diversification of  
bacterialpenicillin-binding proteins and beta-lactamases. Antimicrob Agents  
Chemother; 1998, 42:1-17

[11] - Suvorov, M., S. B. Vakulenko, and S. Mobashery.. Cytoplasmic-  
membraneanchoring of a class A  $\beta$ -lactamase and its capacity in manifesting  
antibioticresistance. Antimicrob Agents Chemother ; 2007, 51:2937-42.

[12] - Q . Timour ;Odonto\_pharmacologie clinique : thérapeutique et urgence  
médicale en pratique quotidienne ;Edition .CdP ;1999



---

[13] - Parag S. Saudagar, Shrikant A. Survase, Rekha S. Singhal ; Biotechnology Advances , 2008, 26,335–351

[14] -Comité OMS d'experts des spécifications relatives aux préparations pharmaceutiques,trente-quatrième rapport, Organisation Mondiale de la Santé, Genève

[15] -Médicament de la commande à l'administration ; Centre formation des hôpitaux universitaires de Genève, 10 novembre 2005

