



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية  
République Algérienne Démocratique Et Populaire  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
Ministère De L'enseignement Supérieur Et De La Recherche Scientifique



**Université Constantine 1 Frères  
Mentouri  
Faculté des Sciences de la Nature et de  
la Vie**

**جامعة قسنطينة 1 الإخوة منتوري  
كلية علوم الطبيعة والحياة**

**Département : Microbiologie**

**قسم : الميكروبيولوجيا**

**Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master**

**Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie**

**Filière : Biotechnologies**

**Spécialité : Mycologie et biotechnologie fongique**

**N° d'ordre :**

**N° de série :**

**Intitulé :**

---

**Etude de l'efficacité du conservateur (la nipagine) dans le médicament  
Histagan 0.01% contre la contamination microbienne**

---

**Présenté par : Saci Lina Choubeila  
Sid Ikram**

**Le : 22/06/2024**

**Présidente : Ghorri Sana (MCA – U Constantine 1 Frères Mentouri).**

**Encadrante : Zaamouchi Ahlem (MCB – U Constantine 1 Frères Mentouri).**

**Examineur : Bouanaka Hamza (MCB- U Constantine 1 Frères Mentouri).**

**Année universitaire**

**2024 - 2025**

## **Remerciements**

Au terme de ce mémoire, nous souhaitons tout d'abord exprimer notre profonde reconnaissance envers **Dieu Tout-Puissant**, qui nous a accordé la force, le courage et la patience nécessaires pour mener à bien ce travail.

Nous tenons à exprimer nos plus vifs remerciements au **groupe SAIDAL Constantine – site 2**, qui nous a accueillies au sein de ses structures et nous a offert une opportunité précieuse de mettre en pratique nos acquis théoriques dans un cadre professionnel enrichissant. Nous adressons une mention toute particulière au personnel du laboratoire, pour leur accueil chaleureux, leur disponibilité exemplaire, leur patience ainsi que leur encadrement technique rigoureux. Leur expertise, leur pédagogie et leur esprit de collaboration ont été des atouts majeurs dans l'élaboration et la concrétisation de ce mémoire.

Nous adressons notre gratitude la plus sincère à notre encadrante, **Madame le Docteur Zaamouchi Ahlem**, pour son encadrement précieux, sa disponibilité constante malgré ses nombreuses responsabilités, ainsi que pour sa bienveillance, ses conseils avisés et sa patience exemplaire. Merci de nous avoir guidées tout au long de cette aventure scientifique.

Nos remerciements vont également à **Madame Ghorri Sana** pour avoir accepté de présider notre jury de soutenance. Nous sommes profondément honorées par votre présence et reconnaissantes pour l'attention portée à notre travail.

Nous exprimons également toute notre reconnaissance à **Mr Bouanaka Hamza**, pour avoir accepté d'évaluer ce mémoire. Vos remarques pertinentes et vos suggestions constructives nous ont été précieuses.

Enfin, nous remercions chaleureusement toutes les personnes, citées ou non, qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail, par leur soutien moral, technique ou scientifique.

## **Dédicace**

À tous ceux qui me sont chers, à ceux à qui je dois mon succès :

À notre Seigneur, Dieu Tout-Puissant, merci de m'avoir donné la vie, la foi, et d'avoir exaucé mes prières pour que j'y parvienne

À mon père qui a fait de moi ce que je suis aujourd'hui, Dans ses yeux, je vois la fierté, le respect, l'amour, la compréhension et la générosité. Grâce à toi, j'ai appris à être cette fille qui ne cesse de faire tout pour te rendre heureux et fier.

À celle dont les paroles m'accompagnent depuis l'enfance, la première femme forte et courageuse, celle qui a souffert sans jamais nous laisser souffrir. Celle qui m'a appris à être forte et à atteindre mes objectifs, peu importe les obstacles. Celle qui m'a encouragée à poursuivre mes rêves, même lorsque tout semblait impossible. Mon ange gardien, ton amour et ta présence dans ma vie, le simple fait d'être ma mère, continueront d'éclairer mon chemin.

À Mon premier ami d'enfance, mon épaule solide, celui qui m'a montré le véritable sens de la fraternité et m'a offert tant de moments de bonheur : mes pensées les plus profondes vont à toi, mon frère Badreddine

À ma sœur Meriem, ma confidente, mon soutien inébranlable, ta présence à mes côtés dans chaque étape de ma vie dans les réussites, les joies comme les peines est un cadeau inestimable. Ton amour, ton écoute et tes encouragements ont été une source constante de force. Merci d'être cette sœur unique et précieuse que la vie m'a donnée

À toute ma famille, merci pour votre amour inconditionnel, votre bienveillance et vos prières silencieuses. Votre présence, qu'elle soit proche ou lointaine, a toujours été une source de paix, de force et d'équilibre. Ce succès est aussi le vôtre.

À mon binôme Ikram, merci d'être la meilleure version de toi-même. Ta contribution a été essentielle dans cette réussite.

À mes chers amis et collègues, votre amitié précieuse a illuminé mon parcours et enrichi cette aventure

Enfin, je dédie ce travail à moi-même. C'est le moment d'y être inchallah

**LINA CHOUBEILA**

## **Dédicace**

*Avant toute chose, je rends grâce à Allah ,source de toute science, de toute sagesse et de toute force.*

*Grâce à Lui, j'ai pu accomplir ce modeste travail, que je dédie :*

*À mes très chers parents, source de tendresse et d'affection.Vos sacrifices et votre soutien m'ont permis d'arriver jusqu'ici.*

*À mon cher frère , et à ma chère sœur, qui m'ont soutenu et encouragé, merci pour votre support.*

*À toutes les personnes qui me sont chères et proches, pour leur soutien et leur contribution.*

*À mes amies, et tout particulièrement à mon binôme Choubeila, avec qui j'ai partagé cette réussite. Merci pour ton soutien et ta précieuse contribution.*

**IKRAM**

# Table des matières

Résumé

ملخص

Abstract

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction ..... 1

Synthèse bibliographique

## Chapitre 1 : Les conservateurs dans les médicaments

1. Définition et rôle des conservateurs ..... 2

2. Classification des conservateurs ..... 2

2.1. Classification selon la source ..... 2

2.1.1. Conservateurs naturels ..... 2

2.1.2. Conservateurs artificiels ..... 2

2.2. Classification selon la composition chimique ..... 3

2.2.1 Acides

2.2.2. Esters ..... 3

2.2.3. Alcools ..... 3

2.2.4. Phénol ..... 3

2.2.5. Composés mercuriels ..... 3

2.2.6. Composés quaternaires d'ammonium ..... 3

2.3 Classification Selon le mécanisme d'action ..... 3

2.3.1. Conservateurs antioxydants ..... 3

2.3.1.1. Le premier groupe ..... 3

2.3.1.2. Le deuxième groupe ..... 4

2.3.1.3. Le troisième groupe ..... 4

2.3.2. Conservateurs antimicrobiens .....	4
2.3.2.1. Les conservateurs antifongiques .....	4
2.3.2.2. Les conservateurs antibactériens .....	4
3. Mécanisme d'action antimicrobienne et cible des conservateurs .....	5
3.1. Les conservateurs bactéricides ou fongicides .....	5
3.2. Les conservateurs bactériostatiques ou fongistatiques .....	5
4. Exemples courants de conservateurs utilisés en pharmacie .....	6
4.1. Les conservateurs antimicrobiens .....	6
4.1.1. Les parabènes .....	6
4.1.1.1. Méthylparabène .....	6
4.1.2. Alcool éthylique .....	7
4.1.3. Benzoate de sodium .....	8
4.1.4. Sulfite de sodium .....	9
4.1.5. Benzoate de potassium .....	9
4.2. Conservateurs antioxydants .....	10
4.2.1. Alpha-tocophérol .....	10
4.2.2. Acide ascorbique .....	10
4.2.3. Chlorure de sodium .....	11
5. Réglementation des conservateurs pharmaceutiques en Algérie .....	12

## **Chapitre 2 : La contamination microbienne des médicaments**

1. Source de contamination microbienne .....	14
2. Les facteurs qui favorisent la croissance microbienne .....	14
2.1. Facteurs nutritionnels .....	14
2.2. Air dans la zone de fabrication .....	14
2.3. Humidité (activité de l'eau-aw) .....	14

2.4. Potentiel d'oxydoréduction (Redox Potential) .....	15
2.5. Température de stockage .....	15
2.6. pH .....	15
2.7. Matériaux d'emballage .....	15
3. Conséquences des contaminations .....	15
4. Généralités sur les micro-organismes utilisés dans la contamination artificielle des médicaments .....	17
4.1 <i>Aspergillus brasiliensis</i> .....	18
4.1.1. Définition .....	18
4.1.2. Taxonomie .....	18
4.1.3. Habitat .....	18
4.1.4. Caractères morphologiques .....	18
4.1.5. Pouvoir pathogène .....	19
4.2 <i>Candida albicans</i> .....	19
4.2.1. Définition .....	19
4.2.2. Taxonomie .....	19
4.2.3. Aspect morphologique .....	20
4.2.4. Habitat .....	20
4.2.5. Toxicité et pouvoir pathogène .....	21
4.3 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	21
4.3.1. Définition .....	21
4.3.2. Habitat .....	22
4.3.3. Aspects morphologiques .....	22
4.3.4. Taxonomie .....	22
4.3.5. Toxicité et pouvoir pathogène .....	22
4.4 <i>Escherichia coli</i> .....	23
4.4.1. Définition .....	23
4.4.2. Taxonomie .....	23
4.4.3. Habitat .....	23
4.4.4. Aspects morphologiques .....	24

4.4.5. Pouvoir pathogène .....	24
4.5. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	25
4.5.1. Définition .....	25
4.5.2. Aspects morphologiques .....	25
4.5.3. Taxonomie .....	25
4.5.4. Habitat .....	25
4.5.5. Toxicité et pouvoir pathogène .....	26

### **Chapitre 3 : Histagan 0,01 %**

1. Présentation d’Histagan 0,01 % .....	27
1.1. Définition .....	27
1.2. Composition d’Histagan 0,01 % .....	27
1.2.1. Principe actif : Dexchlorphéniramine maléate .....	27
1.2.2. Les excipients : .....	28
2. Mécanisme d’action de l’Histagan 0,01 % .....	28
2.1. Effet Histamine .....	29
2.2. Effet antihistaminique/ .....	29
2.3. Comment agissent les antihistaminiques ? .....	30
3. Propriétés d’Histagan 0,01 % .....	30
3.1. Propriétés physico-chimiques .....	30
3.2. Propriétés pharmacodynamiques .....	30
3.3. Propriétés pharmaceutiques .....	30

### **Matériels et méthodes**

1. Matériels	
1.1. Le sirop HISTAGAN 0.01 % .....	32
2. Microorganismes utilisés .....	32
2.1. Réactivation des souches .....	33
2.2. Mise en évidence de la pureté des souches fongiques .....	33
3. Mise en culture des souches et préparation des inoculums .....	34

4. Calibrage des inoculums et détermination de la concentration .....	35
5. Calcul du titre initial (N).....	36
6. Contamination artificielle du sirop HISTAGAN 0.01 % (Challenge Test) .....	36
6.1. Principe du test (Challenge Test) .....	37
6.2. Étapes de la contamination .....	37
7. Dénombrement de microorganismes viables .....	37
(méthode par dilution-neutralisation) .....	38
7.1. Calculs microbiens .....	38
7.2. Concentration survivante à chaque temps ( $N_x$ ) .....	38
7.3. Taux de réduction logarithmique .....	38
8. Critères d'acceptation .....	38
9. Identification et dosage du conservateur Parahydroxybenzoate de méthyle par HPLC .....	40
9.1. Principe de la chromatographie liquide haute performance .....	40
9.2. Objectif .....	41
9.3. Préparation des solutions .....	41
9.3.1. Solution mobile et solvant .....	41
9.3.2. Préparation de la Solution standard.....	41
9.4. Injection et séparation des échantillons .....	42

## Résultats et discussion

1. Mise en évidence de la pureté des souches fongiques .....	45
2. Détermination de la concentration .....	46
3. Dénombrement de la population microbienne initiale .....	46
4. Dénombrement des microorganismes viables .....	46
5. Calcul de la réduction logarithmique et interprétation .....	47
5.1. <i>Escherichia coli</i> .....	47
5.2. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	48

5.3. <i>Candida albicans</i> .....	49
5.4. <i>Aspergillus brasiliensis</i> .....	50
6. Identification et dosage du conservateur par HPLC .....	50
6.1. Résultats du dosage .....	50
6.2. Identification par temps de rétention (Tr) .....	51
<b>Discussion</b> .....	54
<b>Conclusion</b> .....	57
<b>Références bibliographiques</b>	
<b>Annexes</b>	

# Résumé

## Résumé

Ce travail s'inscrit dans le cadre de l'évaluation de l'efficacité des conservateurs antimicrobiens dans les médicaments liquides, en particulier le sirop antihistaminique HISTAGAN 0,01 %, produit par la société SAIDAL. Dans un premier temps, l'étude consiste à tester l'efficacité du méthylparabène (nipagine), un conservateur largement utilisé pour sa stabilité chimique et son activité antimicrobienne. Pour cela, le sirop a été soumis à une contamination artificielle avec des micro-organismes standards, à savoir : *Escherichia coli* ATCC® 8739, *Staphylococcus aureus* ATCC® 6538, *Candida albicans* ATCC® 10231 et *Aspergillus brasiliensis* ATCC® 16404. Le test challenge réalisé à J0, J14 et J28, a montré une réduction significative de la charge microbienne, confirmant que la formulation du sirop garantit une stabilité microbiologique conforme aux exigences de la Pharmacopée Européenne. Dans un second temps, un dosage quantitatif du méthylparabène a été réalisé par chromatographie liquide à haute performance (HPLC). Cette méthode analytique a permis de vérifier avec précision la concentration réelle du conservateur dans le produit fini. Les résultats ont confirmé la présence et la stabilité du méthylparabène à une concentration suffisante pour assurer une conservation antimicrobienne efficace tout au long de la durée de conservation du médicament. Ce travail met ainsi en évidence l'importance du contrôle des conservateurs dans les formulations pharmaceutiques liquides afin de garantir la qualité, la sécurité et l'efficacité des médicaments.

**Mots-clés :** conservateurs antimicrobiens , méthylparabène , Histagan 0,01 %, Contamination artificielle, micro-organismes standards, dosage quantitatif.

## الملخص

يندرج هذا العمل في إطار تقييم فعالية المواد الحافظة المضادة للميكروبات في الأدوية السائلة، لا سيما شراب الهيستامين HISTAGAN 0,01 %، الذي تنتجه شركة صايدال . في المرحلة الأولى، تمثلت الدراسة في اختبار فعالية الميثيل بارابين (نيباجين)، وهو مادة حافظة شائعة الاستخدام بفضل ثباتها الكيميائي ونشاطها المضاد للميكروبات. ولهذا الغرض، تم تعريض الشراب لتلويث اصطناعي باستخدام كائنات مجهرية قياسية، وهي: *Staphylococcus aureus* ATCC® 6538، *Escherichia coli* ATCC® 8739، *Candida albicans* ATCC® 10231 و *Aspergillus brasiliensis* ATCC® 16404. وقد أظهر الاختبار، الذي أُجري على فترات منتظمة (اليوم 0، اليوم 14، اليوم 28)، انخفاضًا ملحوظًا في الحمل الميكروبي، مما يؤكد أن تركيبة الشراب تضمن استقرارًا ميكروبيولوجيًا يتوافق مع متطلبات الدستور الأوروبي للأدوية. في المرحلة الثانية، تم إجراء تحليل كمي للميثيل بارابين باستخدام تقنية الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC). وقد سمحت هذه الطريقة بتحقيق دقة في تحديد التركيز الفعلي للمادة الحافظة في المنتج النهائي. وقد أكدت النتائج وجود واستقرار الميثيل بارابين بتركيز كافٍ لضمان حفظ مضاد للميكروبات فعال طوال فترة صلاحية الدواء. تُبرز هذه الدراسة أهمية اختيار ومراقبة المواد الحافظة في تركيبات الأدوية السائلة لضمان جودة وأمان وفعالية الأدوية متعددة الجرعات.

**الكلمات المفتاحية:** المواد الحافظة المضادة للميكروبات، الميثيل بارابين، استاغان 0,01 %، التلويث الاصطناعي، الكائنات المجهرية المرجعية، التحليل الكمي.

## Abstract

This work is part of the evaluation of the effectiveness of antimicrobial preservatives in liquid medicines, particularly the antihistamine syrup HISTAGAN 0.01%, produced by the SAIDAL company. In the first phase, the study focused on testing the effectiveness of methylparaben (nipagin), a widely used preservative known for its chemical stability and antimicrobial activity. To this end, the syrup was subjected to artificial contamination with standard microorganisms, namely : *Escherichia coli* ATCC® 8739, *Staphylococcus aureus* ATCC® 6538, *Candida albicans* ATCC® 10231, and *Aspergillus brasiliensis* ATCC® 16404. The test, conducted at regular intervals (Day 0, Day 14, Day 28), showed a significant reduction in microbial load, confirming that the syrup formulation ensures microbiological stability in accordance with the requirements of the European Pharmacopoeia. In the second phase, a quantitative assay of methylparaben was performed using High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). This analytical method enabled precise verification of the actual concentration of the preservative in the final product. The results confirmed the presence and stability of methylparaben at a sufficient concentration to ensure effective antimicrobial preservation throughout the product's shelf life. This study thus highlights the importance of selecting and controlling preservatives in liquid pharmaceutical formulations to ensure the quality, safety, and efficacy of multidose medications.

**Keywords :** antimicrobial preservative, methylparaben, Histagan 0.01%, artificial contamination, standard microorganisms, quantitative assay.

## Liste des abréviations

***C.albicans*** : *Candida albicans*

***S. Aureus*** : *Staphylococcus aureus*

***A. brasiliensis*** : *Aspergillus brasiliensis*

***E.coli*** : *Escherichia coli*

**Do** : densité optique

**TPN** : Total Parenteral Nutrition

**SARM** : Staphylococcus aureus résistant à la méthicilline

**OMS** : Organisation mondiale de la Santé OMS

**Ph. EUR** : Pharmacopée européenne

**USP** : Pharmacopées américaine

**ATCC** : American Type Culture Collection

**TSA** : Tryptic Soy Agar

**SAB** : Sabouraud dextrosé-gélosé

**NaCl** : chlorure de sodium

**min** : minute

**nm** : nanomètres

**ml** : millilitre

**g** : gramme

**mg** : milligramme

**µL** : microlitre

**UV** : ultraviolets

**HPLC** : High Performance Liquid Chromatography

**CFU** : Unité Formant Colonie

**Tr** : temps de rétention

**AH1** : antihistaminiques du récepteur H1

**EDTA** : Acide éthylène d'ammonium tétraacétique

**HCL** : Acide chlorhydrique

**Aw** : activité de l'eau

**NI** : pas d'augmentation (No Increase), utilisé dans les critères microbiologiques

**LNCPP** : Laboratoire National de Contrôle des Produits Pharmaceutiques

**AMM** : Autorisation de Mise sur le Marché

**ICH** : International Council for Harmonisation

**FDA** : Food and Drug Administration

**°C** : degré Celsius.

**AAPS** : American Association of Pharmaceutical Scientists

**ADN** : acide désoxyribonucléique.

**ADP** : adénosine diphosphate.

**ANPP** : Agence Nationale des Produits Pharmaceutiques (Algérie)

**FDA** : Food and Drug Administration (Agence américaine des produits alimentaires et pharmaceutiques).

**DL** :dose létale

**pH** : potentiel hydrogène.

**USP** : United States Pharmacopeia

**DCI** : dénomination commune internationale .

**IUPAC** :International Union of Pure and Applied Chemistry

## Liste des figures

**Figure 1 :** Formule structurale de méthyl parabène.

**Figure 2 :** Formule structurale d'alcool éthylique

**Figure 3 :** Formule structurale de benzoate de sodium

**Figure 4 :** Formule structurale de sulfite de sodium

**Figure 5 :** Formule structurale de benzoate de potassium

**Figure 6 :** Formule structurale de alpha-tocophérol.

**Figure 7 :** Formule structurale de l'acide ascorbique.

**Figure 8 :** Formule structurale de Chlorure de Sodium.

**Figure 9 :** HISTAGAN 0.01%

**Figure 10 :** Les antihistaminiques traitent la rhinite allergique et d'autres allergies

**Figure 11 :** Le sirop HISTAGAN 0.01%

**Figure 12 :** La mise en culture des souches fongiques et bactériennes

**Figure 13 :** La préparation des suspensions fongiques et bactériennes

**Figure 14 :** Les suspensions diluées et les boîtesensemencés

**Figure 15 :** Les flacons contaminés et les boîtesensemencées

**Figure 16 :** Schéma général de l'évaluation de l'efficacité de conservation antimicrobienne

**Figure 17 :** Principe de fonctionnement de la HPLC

**Figure 18 :** Appareil d'HPLC (Chromatographie Liquide à Haute Performance)

**Figure 19 :** Nombre de microorganisme et taux de réduction de *E. coli* en fonction du temps

**Figure 20 :** Nombre de microorganisme et taux de réduction de *Staphylococcus aureus* en fonction du temps

**Figure 21 :** Nombre de microorganisme et taux de réduction de *Candida albicans* en fonction du temps

**Figure 22 :** Nombre de microorganisme et taux de réduction d'*Aspergillus brasiliensis* en fonction du temps

**Figure 23 :** Chromatogramme de l'HPLC de produit fini (a) et de Nipagine standards (b)

## Liste des tableaux

**Tableau 1 :** Exemples de conservateurs selon leur cible d'action.

**Tableau 2 :** Taxonomie du genre *Aspergillus brasiliensis*

**Tableau 3 :** Taxonomie du genre *Candida albicans*

**Tableau 4 :** Taxonomie du genre *Staphylococcus aureus*

**Tableau 5 :** Taxonomie du genre *Escherichia coli*

**Tableau 6 :** Taxonomie du genre *Pseudomonas aeruginosa*

**Tableau 7 :** Les souches microbiennes testées

**Tableau 8 :** Critères d'acceptation dans les préparations orales

**Tableau 9 :** Conditions chromatographiques

**Tableau 10 :** Etude macroscopique et microscopique des souches fongiques et bactériennes

**Tableau 11 :** Résultats de la densité Optique (Charge microbienne) pour chaque souche testée

**Tableau 12 :** Taille des inoculums microbiens en UFC/mL

**Tableau 13 :** La diminution du nombre des microorganismes durant le temps

**Tableau 14 :** Résultats du dénombrement des microbes (UFC) en fonction du temps

**Tableau 15 :** Taux de réduction de résultats de l'efficacité du nipagine contre *E. coli*

**Tableau 16 :** Taux de réduction de résultats de l'efficacité du nipagine contre *Staphylococcus aureus*

**Tableau 17 :** Taux de réduction de résultats de l'efficacité du nipagine contre *Candida albicans*

**Tableau 18 :** Taux de réduction de résultats de l'efficacité du nipagine contre *Aspergillus brasiliensis*

**Tableau 19 :** Dosage et identification du nipagine

**Tableau 20 :** Calcul de la teneur en nipagine

# Introduction

La qualité microbiologique des médicaments constitue un enjeu fondamental dans l'industrie pharmaceutique (Jimenez, 2004). Les produits à base d'eau, tels que les sirops, et en particulier les formes multidoses – c'est-à-dire celles utilisées à plusieurs reprises après ouverture – sont les plus exposés au risque de contamination microbienne. À chaque usage, une contamination exogène peut survenir par contact avec l'environnement, les instruments de dosage ou l'utilisateur lui-même. Cette problématique devient encore plus préoccupante lorsqu'il s'agit de populations sensibles telles que les enfants, les personnes âgées ou les patients immunodéprimés (Uddin et al., 2020).

Pour faire face à ces risques, l'utilisation de conservateurs antimicrobiens s'est imposée comme une mesure indispensable dans les formulations liquides. Ces substances ont pour fonction d'inhiber ou de limiter la croissance des micro-organismes dans le produit, tout au long de sa durée d'utilisation. Leur efficacité doit cependant être démontrée expérimentalement, notamment à travers des tests de conservation antimicrobienne, tels que ceux définis par la Pharmacopée Européenne (chapitre 5.1.3), qui exige une réduction significative de la charge microbienne sur une période de 28 jours, dans des conditions simulées de contamination (Ph. Eur., 2020). Parmi les conservateurs les plus couramment utilisés figure le méthylparabène (ou Nipagine), un ester de l'acide *p*-hydroxybenzoïque. Il est largement reconnu pour sa bonne stabilité chimique, sa tolérance cutanée et muqueuse, ainsi que pour son activité antimicrobienne à large spectre, notamment contre les bactéries Gram-positives, Gram-négatives, et les champignons. Il est ainsi intégré dans de nombreux produits pharmaceutiques, cosmétiques et alimentaires.

Cependant, malgré son utilisation répandue, une problématique majeure persiste : peut-on garantir que le méthylparabène utilisé dans une formulation spécifique, comme un sirop antihistaminique, offre une protection microbienne suffisante et stable tout au long de sa durée d'utilisation, sans dépasser les seuils toxiques ? (Cao et al., 2021)

Dans ce contexte, la présente étude s'inscrit dans une démarche de contrôle qualité du sirop antihistaminique HISTAGAN 0,01 %, produit par le groupe pharmaceutique algérien SAIDAL. Ce sirop contient du méthylparabène comme agent conservateur. L'objectif principal de ce travail est d'évaluer l'efficacité antimicrobienne de ce conservateur à travers un test challenge, ainsi que de vérifier la teneur réelle en nipagine par chromatographie liquide à haute performance (HPLC), afin de s'assurer que la formulation respecte les normes de sécurité et d'efficacité exigées.

---

# Synthèse bibliographique

---

# **Chapitre 1 : Les conservateurs dans les médicaments**

### 1.Définition et rôle des conservateurs

Un conservateur est une substance chimique naturelle ou synthétique ajoutée à des produits tels que les aliments, les médicaments, les peintures, les échantillons biologiques, le bois, etc., afin de prévenir leur décomposition due à la croissance microbienne ou à des changements chimiques indésirables. (Shitole et al., 2022)

Les conservateurs sont couramment ajoutés aux aliments et aux produits pharmaceutiques dans le but de prolonger leur durée de conservation. L'ajout de conservateurs à ces produits, en particulier ceux qui contiennent une forte teneur en eau, est essentiel pour éviter les altérations et la dégradation causées par les micro-organismes pendant le stockage. (Shitole et al., 2022)

Les conservateurs sont ajoutés aux produits pour empêcher la croissance de bactéries, levures ou moisissures pouvant provoquer des maladies. La conservation chimique ne permet pas d'éviter complètement la détérioration des produits, mais elle ralentit le processus de dégradation causé par les micro-organismes. (Shitole et al., 2022)

### 2.Classification des conservateurs :

Les conservateurs sont classés en fonction de divers facteurs, notamment la source, la composition chimique, et le mécanisme d'action. (Al-Rubaye, 2022)

#### 2.1.Classification selon la source

##### 2.1.1Conservateurs naturels

Ces agents sont issus de sources naturelles, telles que les plantes, les minéraux, les animaux, etc. Ils sont principalement utilisés comme conservateurs alimentaires. Parmi les exemples, on peut citer l'huile de neem, le sel (chlorure de sodium), le citron et le miel. (Al-Rubaye, 2022)

##### 2.1.2Conservateurs artificiels

Ces conservateurs sont fabriqués par synthèse chimique et agissent contre divers micro-organismes en faible concentration. Par exemple : benzoates benzoate de sodium, sorbates, propionates, nitrites.(Shaikh et al., 2016)

### 2.2 Classification selon la composition chimique

Également appelé conservateur de classe II. Il est défini par Food and Drug Administration (FDA) comme tout produit chimique, lorsqu'il est ajouté aux aliments, tend à prévenir ou ralentir la croissance microbienne, ils sont classés en différentes catégories chimiques en fonction de leur structure moléculaire et de leur mécanisme d'action. Cette classification est essentielle pour comprendre leur efficacité, leur toxicité potentielle et leur domaine d'application. (Langeh et al., 2023)

**2.2.1.Acides** : par exemple, acide benzoïque, acides sorbiques, acides boriques

**2.2.2.Esters** : par exemple, méthylparabène, éthylparabène, propylparabène, butylparabène, benzoate de sodium, propionate de sodium

**2.2.3.Alcools** : par exemple, chlorobutanol, alcool benzylique, alcool phényléthylique

**2.2.4.Phénols** : par exemple, phénol, chlorocrésol, o-phénylphénol

**2.2.5.Composés mercuriels** : par exemple, thiomersal, nitromersol, nitrate de phénylmercure, acétate de phénylmercure

**2.2.6.Composés quaternaires d'ammonium** : par exemple, chlorure de benzalkonium, chlorure de cétylpyridinium. (Dwivedi et al., 2017)

### 2.3 Classification selon le mécanisme d'action

#### 2.3.1.Conservateurs antioxydants

Dans les médicaments, les antioxydants sont utilisés pour empêcher les réactions d'oxydation qui peuvent endommager les substances actives ou les excipients. Ces réactions, causées notamment par l'oxygène, la lumière ou la chaleur, peuvent altérer l'efficacité du traitement, changer l'apparence du produit ou même produire des composés indésirables. Les antioxydants permettent donc de protéger la qualité du médicament et de prolonger sa durée de conservation. (Musakhanian et al., 2022). Les antioxydants sont classés en trois groupes :

##### 2.3.1.1.Le premier groupe

Est constitué des véritables antioxydants, ou anti-oxygène, qui inhibent probablement l'oxydation en réagissant avec les radicaux libres et en bloquant la chaîne de réaction. Parmi les exemples, on trouve les gallates d'alkyle, le butylhydroxyanisole, le butylhydroxytoluène, le nordihydroguaiarétique acide et les tocophérols. (Joseph Price, 2006)

### **2.3.1.2.Le deuxième groupe**

Comprend les agents réducteurs ; ces substances possèdent un potentiel redox inférieur à celui du médicament ou de l'adjuvant qu'elles sont censées protéger, et sont donc plus facilement oxydées. Les agents réducteurs peuvent également agir en réagissant avec les radicaux libres. Parmi les exemples, on trouve l'acide ascorbique, les sels de potassium et de sodium de l'acide sulfureux. (Joseph Price, 2006)

### **2.3.1.3.Le troisième groupe**

Regroupe les antioxydants synergistes, qui ont généralement un effet antioxydant modeste en eux-mêmes, mais qui peuvent probablement améliorer l'action des antioxydants du premier groupe en réagissant avec les ions métalliques responsables de la catalyse de l'oxydation. Des exemples d'antioxydants synergistes sont l'acide citrique, les sels d'acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA), la lécithine et l'acide tartrique. (Fahlebon et Shabrwy , 2007)

### **2.3.2.Conservateurs antimicrobiens**

Sont utilisés dans les préparations pour tuer ou inhiber la croissance des micro-organismes (bactéries, moisissures, levures) qui peuvent être introduits pendant la fabrication ou l'utilisation. Ils sont utilisés dans des préparations stériles telles que les gouttes ophtalmiques et les injections multi dose et les préparations orales pour maintenir la stérilité pendant l'utilisation. Ils peuvent également être ajoutés aux produits dans leur contenant final et doivent être préparés en utilisant des précautions aseptiques. (Fahlebon et Shabrwy , 2007). Les conservateurs antimicrobiens sont classés en deux sous-groupes principaux :

#### **2.3.2.1.Les conservateurs antifongiques**

Sont des substances ajoutées aux produits alimentaires, pharmaceutiques ou cosmétiques pour inhiber la croissance des champignons, notamment les moisissures et les levures, prolongeant ainsi la durée de conservation et assurant la sécurité des produits. tels que les acides benzoïque et ascorbique et leurs sels, ainsi que des composés phénoliques comme le méthyl, l'éthyle, le propyl et le butyl p-hydroxybenzoate (parabènes). (Mishra et al., 2021)

#### **2.3.2.2.Les conservateurs antibactériens**

Sont des substances ajoutées aux formes posologiques non stériles pour les protéger de la croissance microbienne ou des micro-organismes qui sont introduits accidentellement pendant ou après le processus de fabrication. Incluent des composés tels que les sels d'ammonium quaternaires, les alcools, les phénols, les mercuriels et les biguanides. (Villiers, 2009)

### 3.Mécanisme d'action antimicrobienne et cible des conservateurs :

La recherche sur les mécanismes des conservateurs dans les produits pharmaceutiques est importante, car elle permet de comprendre comment ces produits chimiques protègent les formulations contre la croissance microbienne et la détérioration, conduisant à des conservateurs plus efficaces et plus sûrs, ainsi qu'à une meilleure qualité des produits pour les consommateurs. (Tang & Du, 2024). On distingue deux mécanismes d'action, suivant le type de conservateur antimicrobien utilisé. (Martini & Seiller, 1999)

#### 3.1.Les conservateurs bactéricides ou fongicide

Tuent directement les bactéries ou les champignons : c'est une action dite irréversible

#### 3.2.Les conservateurs bactériostatiques ou fongistatiques

Inhibent la multiplication des bactéries ou les champignons. C'est une action dite réversible car ils ne tuent pas les micro-organismes.

Les conservateurs agissent sur les micro-organismes de façon différente selon le conservateur considéré, à un niveau bien déterminé de la structure ou du métabolisme du micro-organisme, appelé site d'action ou cible du conservateur. (Martini & Seiller, 1999).

L'action peut se situer au niveau de la paroi bactérienne, des membranes, au niveau ribosomal sur la synthèse des protéines, ou au niveau des acides nucléiques et des enzymes associées... (Martini & Seiller, 1999).

**Tableau 1:** Exemples de conservateurs selon leur cible d'action. (Anurova et al., 2019)

Cible	Exemples de conservateurs
Destruction de la paroi cellulaire / Perturbation de la perméabilité membranaire	Parabènes, chlorure de benzalkonium, glutaraldéhyde, EDTA, chlorhexidine, acide borique, borates
Réduction du pH intracellulaire	Acide caproïque, acide lactique, acide formique, acide propionique, acide acétique et leurs sels
Inhibition des enzymes	Acide sorbique, acide benzoïque, acide salicylique et leurs sels, bronopol, hexétidine, sels de phénylmercure
Endommagement de l'ADN et de l'ARN	Bronopol, hexétidine, imidazolidinyl urée, hexaméthylènetétramine, DMDM-hydantoïne

### 4.Exemples courant de conservateurs utilisés en pharmacie

Les conservateurs pour pharmacie sont des agents chimiques conçus pour prévenir ou limiter la croissance de micro-organismes tels que les bactéries et les champignons dans les produits pharmaceutiques et vétérinaires. Leur objectif est d'assurer la stabilité, la sécurité et la durée de vie de ces produits, protégeant à la fois les utilisateurs et les patients.

Il existe plusieurs types de conservateurs largement utilisés dans les formulations pharmaceutiques, chacun ayant des caractéristiques spécifiques et des domaines d'application bien définis. Parmi les plus courants, on peut citer :

#### 4.1. Les conservateurs antimicrobiens :

##### 4.1.1. Les parabènes

Sont une classe de conservateurs largement utilisés dans les produits cosmétiques, pharmaceutiques et alimentaires en raison de leurs propriétés antimicrobiennes. Sur le plan chimique, ce sont des esters de l'acide p-hydroxybenzoïque, qui agissent en inhibant la croissance microbienne, prolongeant ainsi la durée de conservation des produits. (Chatterjee et al., 2024). Les principaux parabènes utilisés en formulation pharmaceutique sont : Methylparaben, Ethylparaben, Propylparaben, Isopropylparaben, Butylparaben, Isobutylparaben, et le Benzylparaben. (Himoudy, 2016)

méthylparabène constitue un exemple typique de parabène largement utilisé, notamment pour ses propriétés antifongiques et antibactériennes :

##### 4.1.1.1. Méthylparabène

Le méthylparabène se présente sous forme de cristaux incolores ou de poudre cristalline blanche. Il est inodore ou presque inodore et a un goût légèrement piquant. (Shaikh et al., 2016)

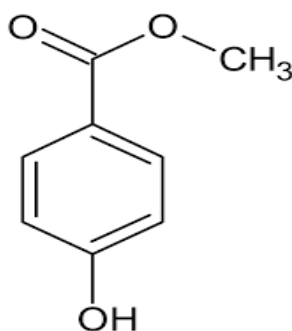
Le méthylparabène est largement utilisé comme conservateur antimicrobien dans les cosmétiques, les produits alimentaires et les formulations pharmaceutiques. Il peut être utilisé seul ou en association avec d'autres parabènes ou agents antimicrobiens. (Dr.B.V. Ramana,2024).

Dans les cosmétiques, le méthylparabène est le conservateur antimicrobien le plus fréquemment utilisé. Les parabènes sont efficaces sur une large plage de pH et présentent un large spectre d'activité antimicrobienne, bien qu'ils soient particulièrement efficaces contre les levures et les moisissures. (Dr.B.V. Ramana,2024). L'activité antimicrobienne augmente avec la longueur de la chaîne alkyle, mais la solubilité dans l'eau diminue ; c'est

pourquoi on utilise fréquemment un mélange de parabènes pour assurer une conservation efficace. (Shaikh et al., 2016).

L'efficacité du conservateur est également améliorée par l'ajout de propylène glycol (2-5%), ou par l'association avec d'autres agents antimicrobiens comme la midurée. (Dr.B.V. Ramana,2024).

En raison de la faible solubilité des parabènes, on utilise plus souvent leurs sels (notamment le sel de sodium) dans les formulations. Toutefois, cela peut augmenter le pH des formulations peu tamponnées. (Dr.B.V. Ramana,2024)

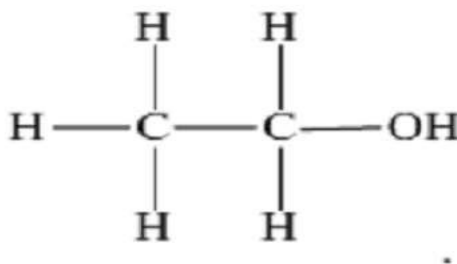


**Figure 1 :** Formule structurale de méthyl parabène. (Shaikh et al., 2016)

### 4.1.2. Alcool éthylique :

L'éthanol est un liquide volatil, inflammable, incolore, à l'odeur légèrement caractéristique. Il s'agit de l'alcool le plus courant dans les boissons alcoolisées. Il est largement utilisé comme solvant, dans la fabrication de produits de soin, et comme biocarburant. L'éthanol est miscible à l'eau et à de nombreux solvants organiques. Il présente des caractéristiques à la fois polaires et non polaires, ce qui en fait un solvant efficace en milieu biologique comme industriel. (Zakhari, 2006).

L'éthanol et ses solutions aqueuses à différentes concentrations sont largement utilisés dans les formulations pharmaceutiques et les produits cosmétiques. Bien que l'éthanol soit principalement utilisé comme solvant, il est également employé comme désinfectant, et dans certaines solutions, comme conservateur antimicrobien. Les solutions topiques à base d'éthanol sont utilisées dans le développement de systèmes de délivrance transdermique de médicaments en tant qu'agents favorisant la pénétration. L'éthanol a également été utilisé dans la formulation de préparations transdermiques comme co-tensioactif (Dr.B.V.Ramana, 2024).



**Figure 2 :** Formule structurale d'alcool éthylique. (Shaikh et al., 2016)

### 4.1.3. Benzoate de sodium :

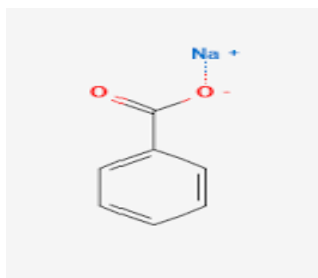
Le benzoate de sodium est le sel de sodium de l'acide benzoïque, largement utilisé comme conservateur dans les produits alimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques. Il inhibe la croissance des bactéries, des levures et des champignons, en particulier dans des conditions acides. (Linke et al., 2018).

Le benzoate de sodium est principalement utilisé comme conservateur antimicrobien dans les cosmétiques, les aliments et les produits pharmaceutiques. Il est utilisé à des concentrations de 0,02 à 0,5 % dans les médicaments oraux, 0,5 % dans les produits parentéraux et de 0,1 à 0,5 % dans les cosmétiques. (Dr.B.V. Ramana,2024).

L'efficacité du benzoate de sodium en tant que conservateur est toutefois limitée par sa plage de pH d'activité relativement étroite. Il est parfois préféré à l'acide benzoïque en raison de sa meilleure solubilité. Cependant, dans certaines formulations, il peut altérer le goût du produit. (Shaikh et al., 2016).

Le benzoate de sodium a également été utilisé comme lubrifiant pour comprimés, à des concentrations de 2 à 5 % p/p. (Shaikh et al., 2016).

Des solutions de benzoate de sodium ont aussi été administrées par voie orale ou intraveineuse pour évaluer la fonction hépatique. (Dr.B.V. Ramana,2024).

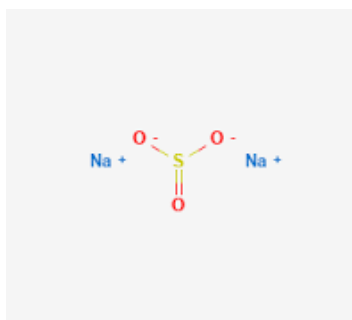


**Figure 3 :** Formule structurale de benzoate de sodium. (Shaikh et al., 2016)

### 4.1.4. Sulfite de sodium :

Le sulfite de sodium se présente sous forme de poudre blanche inodore ou de prismes hexagonaux. À noter que le sulfite de sodium disponible dans le commerce se présente souvent sous forme de poudre blanche à beige ou rose, non conforme aux spécifications de la pharmacopée il doit être conservé dans un récipient bien fermé, dans un endroit frais et sec (Shaikh et al., 2016).

Le sulfite de sodium est utilisé comme antioxydant dans des applications similaires à celles du métabisulfite de sodium. C'est également un conservateur antimicrobien efficace, notamment contre les champignons à faible pH (0,1 % p/v de sulfite de sodium est utilisé). Le sulfite de sodium est utilisé dans les cosmétiques, les produits alimentaires et les applications pharmaceutiques telles que les formulations parentérales, les inhalations, les formulations orales et les préparations topiques. (Shaikh et al., 2016).

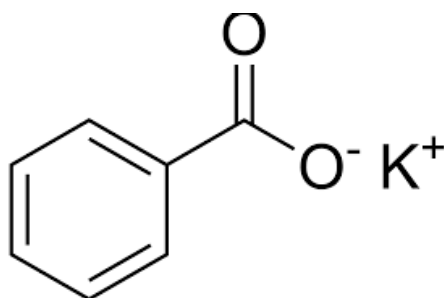


**Figure 4:** Formule structurale de Sulfite de sodium . (Shaikh et al., 2016).

### 4.1.5. Benzoate de potassium

Le benzoate de potassium se présente sous forme de poudre cristalline ou de granulés légèrement hygroscopiques, blancs, inodores ou presque inodores. Les solutions aqueuses sont légèrement alcalines et ont un goût astringent sucré. (Shaikh et al., 2016).

Le benzoate de potassium est principalement utilisé comme conservateur antimicrobien dans une large gamme de boissons, d'aliments et de certaines formulations pharmaceutiques. Son efficacité augmente avec la baisse du pH ; son efficacité est maximale à un pH de 4,5 ou moins. Cependant, à faible pH, l'acide benzoïque non dissocié peut produire un goût léger, quoique perceptible, dans les produits alimentaires. Le benzoate de potassium est de plus en plus utilisé comme alternative au benzoate de sodium dans les applications où une faible teneur en sodium est souhaitable. En thérapeutique, le benzoate de potassium a également été utilisé dans la prise en charge de l'hypokaliémie. (Shaikh et al., 2016).



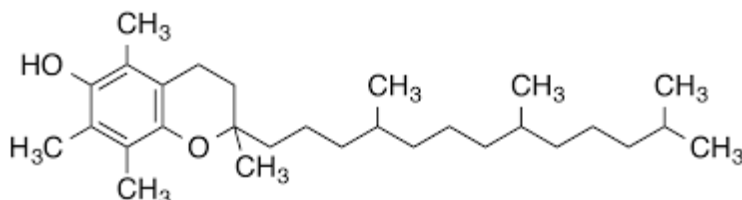
**Figure 5:** Formule structurale de Benzoate de potassium. (EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources (ANS), 2016)

## 4.2. Conservateurs antioxydants

### 4.2.1. Alpha- tocophérol

L' $\alpha$ -tocophérol est un produit naturel. La Ph Eur 6.0 décrit l' $\alpha$ -tocophérol comme un liquide visqueux, clair, incolore ou brun-jaunâtre et huileux.

L' $\alpha$ -tocophérol est un antioxydant utile dans diverses formulations pharmaceutiques, principalement en raison de ses propriétés de solvant pour les médicaments peu solubles. Il est largement utilisé dans les produits pharmaceutiques à base de graisses et d'huiles et peut également améliorer l'efficacité des antioxydants en association avec d'autres substances comme la lécithine. (Dr.B.V. Ramana,2024)



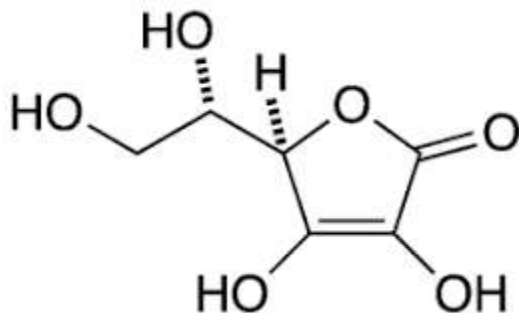
**Figure 6 :** Formule structurale de Alpha- tocophérol. (Dr.B.V. Ramana,2024)

### 4.2.2. Acide ascorbique

L'acide ascorbique se présente sous forme de poudre cristalline blanche à jaune pâle, non hygroscopique, inodore, ou sous forme de cristaux incolores avec un goût acide prononcé. Il s'assombrit progressivement au contact de la lumière. (Tingry et al., 2024).

L'acide ascorbique est utilisé comme antioxydant dans les formulations pharmaceutiques aqueuses à une concentration de 0,01-0,1 % p/v. Il a été utilisé pour ajuster le pH des solutions pour injection et comme adjuvant pour les liquides oraux. Il est également largement utilisé dans les aliments en tant qu'antioxydant. (Dr.B.V. Ramana,2024)

L'acide ascorbique a également prouvé son utilité comme agent stabilisant dans les micelles mixtes contenant du tétrazépam. (Dr.B.V. Ramana,2024).



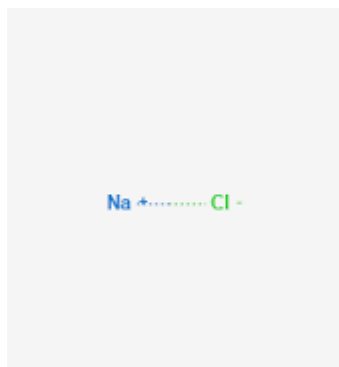
**Figure 7 :** Formule structurale de l'acide ascorbique. (EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP), 2013)

### 4.2.3. Chlorure de sodium

Le chlorure de sodium se présente sous forme de poudre cristalline blanche ou de cristaux incolores ; il a un goût salin. Le réseau cristallin a une structure cubique centrée sur les faces. Le chlorure de sodium solide ne contient pas d'eau de cristallisation, bien qu'en dessous de 0°C, il puisse cristalliser sous forme de dihydrate. (Shaikh et al., 2016)

Le chlorure de sodium est largement utilisé dans une variété de formulations pharmaceutiques parentérales et non parentérales, principalement pour produire des solutions isotoniques.

Il a été utilisé comme lubrifiant et diluant dans les formulations de gélules et de comprimés par compression directe, bien que cette pratique soit aujourd'hui peu courante. Le chlorure de sodium a également été utilisé comme agent de canalisation et comme agent osmotique dans les noyaux de comprimés à libération contrôlée. Il a servi comme modificateur de porosité dans les enrobages de comprimés et pour contrôler la libération du médicament à partir de microcapsules. (Shaikh et al., 2016)



**Figure 8 :** Formule structurale de Chlorure de Sodium. (Shaikh et al., 2016)

### 5. Réglementation des conservateurs pharmaceutiques en Algérie

Selon l'Agence Nationale des Produits Pharmaceutiques Les conservateurs sont des substances indispensables dans de nombreuses formulations pharmaceutiques, en particulier celles destinées à un usage multidose ou sous forme liquide. Leur rôle principal est d'éviter la contamination microbienne pendant toute la durée d'utilisation du médicament. En Algérie, l'usage de ces agents est strictement encadré par l'ANPP, qui veille à la sécurité, à l'efficacité et à la qualité des médicaments mis sur le marché.

La réglementation algérienne dans ce domaine ne se construit pas de manière isolée : elle s'aligne largement sur des normes internationales reconnues. Parmi ces références, la Pharmacopée Européenne (Ph. Eur.) est utilisée comme base analytique. Les lignes directrices de l'ICH – notamment les guides Q1 (sur la stabilité), Q3 (concernant les impuretés), et Q6 (relatif aux spécifications) – sont également prises en compte pour assurer une évaluation rigoureuse des produits. Les recommandations de l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) viennent en complément de ce cadre réglementaire, offrant une vision plus large et harmonisée à l'échelle mondiale.

L'intégration d'un conservateur dans une spécialité pharmaceutique nécessite une justification claire au moment du dépôt du dossier d'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM). Cette justification repose sur plusieurs critères : l'efficacité antimicrobienne, qui doit être prouvée à travers un test spécifique (souvent appelé *Challenge Test*, décrit dans la monographie 5.1.3 de la Ph. Eur.), la détermination de la concentration minimale efficace, la compatibilité avec les autres composants de la formulation, et l'absence d'effets indésirables aux doses prévues.

Parmi les substances les plus couramment utilisées en Algérie, on retrouve les parabènes (tels que le méthylparabène et le propylparabène), souvent employés dans les

formes orales, mais dont l'usage reste encadré, notamment en pédiatrie. Le chlorure de benzalkonium est parfois utilisé dans les préparations ophtalmiques, bien que son potentiel irritant impose certaines précautions. Des agents comme le benzoate de sodium ou l'acide sorbique sont fréquents dans les sirops, tandis que des substances comme le phénol ou le chlorocrésol peuvent être présentes dans des préparations injectables, sous stricte surveillance.

Avant la commercialisation, chaque produit contenant un conservateur fait l'objet de contrôles approfondis réalisés par le Laboratoire National de Contrôle des Produits Pharmaceutiques (LNCPP). Ces contrôles visent à vérifier non seulement la conformité des dosages mais aussi l'efficacité réelle des conservateurs dans la formulation.

En résumé, la réglementation algérienne impose une approche rigoureuse et scientifiquement fondée quant à l'utilisation des conservateurs, dans le but de garantir à la fois la qualité des médicaments et la sécurité des patients.

## **Chapitre 2 : Contamination microbienne des médicaments**

### 1.Source de contamination microbienne

La contamination des préparations pharmaceutiques par des micro-organismes a pris de l'importance car elle représente un danger pour la santé des patients dont l'immunité est déjà affaiblie par la maladie. (Mayank et al., 2018)

Plusieurs éléments contribuent à une contamination microbienne à chaque étape de la fabrication des formes pharmaceutiques. (Murtaza et al., 2021) Ces éléments peuvent inclure : les matières premières : Les produits biologiques tels que les enzymes, les hormones et les vitamines sont généralement riches en sources de carbone, ce qui favorise naturellement la croissance microbienne. Le personnel : est un facteur critique et constitue une source majeure de contamination durant la fabrication des produits pharmaceutiques. Des études ont démontré une corrélation entre les micro-organismes présents dans les zones de nettoyage et ceux trouvés sur la peau humaine. (Mayank et al., 2018)

Le procédé de fabrication, l'environnement de stockage, et les matériaux d'emballage. (Murtaza et al., 2021) sont souvent une source de contamination. Leur conception et leur matériau doivent limiter les points d'entrée potentiels pour les microbes. (Mayank et al., 2018)

### 2.Les facteurs qui favorisent la croissance microbienne

#### 2.1.Facteurs nutritionnelle

Les micro-organismes ont besoin de nutriments pour leurs activités métaboliques et leur croissance. Plusieurs additifs pharmaceutiques sont utilisés à ces fins, tout comme certains produits végétaux ou animaux présents dans la formulation.

D'autre part, l'eau déminéralisée, traitée par échange d'ions, contient généralement une quantité suffisante de nutriments pour favoriser la croissance de certaines bactéries comme *Pseudomonas* (Murtaza et al., 2021) telle que : carbone organique assimilable et carbone organique biodégradable), et d'autres nutriments jouent un rôle dans le contrôle de la croissance microbienne, notamment le phosphore, l'azote, l'ammoniac, le manganèse, le sulfate, le fer et les substances humiques. (Canada, 2022)

#### 2.2.Air dans la zone de fabrication

L'atmosphère contient des milliards de particules et de microbes en suspension, comme le *pénicillium*, l'*aspergillus*, etc., qui présentent un risque de contamination des produits pharmaceutiques. Pour prévenir ce risque, les procédés de fabrication sont menés dans des salles blanches et aseptiques équipées d'un flux continu d'air stérile. (Hashim & Celiksoy, 2025)

#### 2.3.Humidité (activité de l'eau – aw)

Les micro-organismes ont besoin d'un accès facile à l'eau pour croître, et les formulations aqueuses leur offrent cette possibilité. Dans ces formulations, l'activité de l'eau peut être réduite en incorporant des concentrations élevées de sucre ou par dessiccation. Sur les surfaces de

produits secs, tels que les comprimés, des films d'eau condensée peuvent se former en raison d'un stockage en milieu humide, favorisant ainsi le développement fongique. (Murtaza et al., 2021)

### **2.4.Potentiel d'oxydoréduction (Redox Potential)**

L'environnement influence l'équilibre des réactions d'oxydoréduction, lesquelles sont essentielles aux fonctions biologiques et à la biosynthèse nécessaires à la croissance microbienne. (Murtaza et al., 2021).

### **2.5.Température de stockage**

Le développement microbien et la détérioration peuvent être efficacement contrôlés grâce à la gestion de la température de stockage. Entre 20 °C et 60 °C, des altérations peuvent se produire, tandis que des températures trop basses ou trop élevées réduisent la croissance microbienne et la détérioration. Les produits stockés dans un environnement froid, spécifiquement entre 8 et 12 °C, peuvent présenter une détérioration minimale. Avant le remplissage et le scellement, l'eau injectable est stockée à une température supérieure à 80 °C . (Hashim & Celiksoy, 2025).

### **2.6.PH**

Le pH joue aussi un rôle crucial dans la prévention des attaques microbiennes. Les détériorations sont rares lorsque le pH est supérieur à 8, En revanche, les produits à pH très bas (entre 3 et 4) tels que les sirops sont plus susceptibles d'être attaqués par les levures ou moisissures. Les levures peuvent même élever le pH du produit en produisant des métabolites d'acides organiques, ce qui peut entraîner une croissance bactérienne secondaire. (Hashim & Celiksoy, 2025)

### **2.7.Matériaux d'emballage**

Ils ont également un impact important sur la qualité microbiologique du produit. Il a été démontré que l'utilisation de cartons à la place du plastique peut réduire considérablement le transfert de micro-organismes de l'emballage aux formulations pharmaceutiques finales. La délivrance de médicaments en pharmacie hospitalière comprend le reconditionnement de médicaments en vrac achetés auprès d'un grossiste ou de tout autre fournisseur approprié, dans de petits sachets ou contenants. Ce reconditionnement de produits en vrac peut également augmenter le risque de contamination microbienne. (Mayank et al., 2018)

## **3.Conséquences des contaminations**

La contamination microbienne de produit pharmaceutique peut entraîner des modifications indésirables de leur caractéristiques physiques, telles que la séparation des émulsions en phases, la modification de la texture des crèmes, la détérioration des sirops avec turbidité ou formation de

dépôts, ainsi que des modifications d'odeur, de couleur et de goût. Ces modifications sont indésirables en raison de leurs effets non seulement sur l'aspect esthétique des produits, mais aussi sur les résultats thérapeutiques et le mode d'administration des médicaments, ce qui représente une menace latente pour la santé des consommateurs. Ce risque sanitaire est dû soit à l'infection microbienne elle-même, soit aux métabolites et toxines microbiens provoquant des symptômes de diarrhée, de gastro-entérite et/ou de douleurs abdominales d'intensité variable. (Wilson & Wilson, 2021).

De plus, la présence de microbes nocifs dans les médicaments peut entraîner des rappels de produits coûteux, entraînant des pertes financières et d'image, une perte de ventes de produits, une diminution de la confiance des clients et, dans de nombreux cas, des poursuites judiciaires. (Pullirsch et al., 2014).

La contamination microbienne des médicaments provoquer :

-La réduction ou perte de l'effet thérapeutique du médicament : L'évaluation microbiologique des produits non stériles est particulièrement pertinente, car la contamination microbienne peut réduire, voire supprimer, l'effet thérapeutique des médicaments ou provoquer des infections d'origine médicamenteuse. (Ratajczak et al., 2015).

-Altération des propriétés chimiques, physiques et organoleptiques : Les microbes présents dans les médicaments les rendent non seulement dangereux d'un point de vue infectieux, mais peuvent également modifier leurs propriétés chimiques, physiques et organoleptiques. (Ratajczak et al., 2015).

-Modification ou dégradation des principes actifs : la contamination du produit pharmaceutique par les micro-organismes provoquer la dégradation d'un médicament au cours du temps correspond à une perte de stabilité du principe actif ou des excipients. (Helali, 1998).

-Production de métabolites ou toxines bactériennes toxiques : Les micro-organismes peuvent transformer les médicaments en produits toxiques. La présence même d'un faible niveau de micro-organismes pathogènes, de niveaux plus élevés d'agents pathogènes opportunistes ou de métabolites bactériens toxiques, qui persistent même après la mort des contaminants primaires, peut rendre le produit inefficace. Non seulement la présence de micro-organismes capables de provoquer des infections bactériennes indésirables est nuisible, mais également la présence de métabolites ou de toxines peut entraîner des symptômes graves, même en faibles quantités. Certaines maladies liées à ces toxines incluent la diarrhée, la gastro-entérite aiguë ou des douleurs abdominales. Les symptômes varient d'un léger inconfort à une issue fatale, selon la sensibilité individuelle à la toxine, la quantité de toxine ingérée et l'état de santé général de la victime. (Ratajczak et al., 2015).

-Augmentation de la résistance aux antibiotiques : L'utilisation de médicaments contaminés peut favoriser la propagation de bactéries résistantes, rendant les infections plus difficiles à traiter. Les micro-organismes disposent de mécanismes de défense étendus pour faire face au stress et prospérer dans diverses conditions de pH. Ainsi, la manière dont les produits pharmaceutiques sont manipulés devient cruciale. Toute bactérie exposée à des pH légèrement ou fortement acides pourrait développer une souche résistante et entraîner une instabilité microbienne de la préparation pharmaceutique. (Hashim & Celiksoy, 2025).

-Risque d'infections médicamenteuses (infections causées par le médicament lui-même)

Des cas graves de contamination ont été signalés, parmi lesquels :

La prolifération de bactéries Gram-négatives dans les solutions de lavage de la vessie a été responsable d'infections douloureuses.

Les *Pseudomonas* contaminant des solutions antiseptiques ont infecté la peau de patients gravement brûlés, entraînant l'échec des greffes de peau et, par la suite, la mort due à une septicémie à Gram-négatif. (Themes, 2016).

Des infections virales fatales résultant de l'utilisation de tissus humains ou de fluides contaminés comme composants des médicaments ont été bien documentées. Les effets les plus graves ont été observés avec des produits injectés contaminés, où des cas de choc bactériémique généralisé et, dans certains cas, la mort des patients ont été rapportés. (Themes, 2016).

Plus récemment, la contamination de fluides de nutrition parentérale (TPN) par *Pseudomonas* lors de leur préparation aseptique en pharmacie hospitalière a causé la mort de plusieurs enfants dans le même hôpital. Il est bien connu que des produits pharmaceutiques de formes diverses sont susceptibles d'être contaminés par une variété de micro-organismes, allant des véritables agents pathogènes à un assortiment de pathogènes opportunistes. Les désinfectants, antiseptiques, poudres, comprimés et autres produits qui offrent un environnement inhospitalier aux contaminants sont également exposés à ce risque. (Themes, 2016).

#### **4.Généralités sur les micro-organismes utilisés dans la contamination artificielle des médicaments**

Les essais destinés à vérifier l'efficacité des agents conservateurs, tels que décrits dans les pharmacopées européenne (Ph. Eur. 5.1.3) et américaine (USP <51>), reposent sur l'utilisation de micro-organismes types représentant les principales sources possibles de contamination des médicaments. Parmi eux figurent *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* et *Aspergillus brasiliensis*. Ces micro-organismes illustrent chacun une catégorie particulière de germes : bactéries Gram positives, Gram négatives, levures et moisissures. Leur sélection permet d'évaluer l'efficacité des conservateurs à limiter ou éliminer une grande variété de microbes pouvant altérer la qualité et la sécurité du produit. (Kar, 2007).

## 4.1 *Aspergillus brasiliensis*

### 4.1.1. Définition

*Aspergillus brasiliensis* est un champignon filamenteux appartenant au groupe des aspergilles noirs (section Nigri), dans le genre *Aspergillus*. Il a été identifié comme une espèce distincte en 2007 par Varga et ses collègues, autrefois classée parmi les *Aspergillus niger*. Aujourd'hui, cette espèce est couramment utilisée comme souche de référence pour évaluer l'efficacité des conservateurs dans les pharmacopées européenne et américaine. (Varga et al., 2007)

### 4.1.2. Taxonomie

**Tableau 2 :** Taxonomie du genre *Aspergillus brasiliensis* (Canada, 2019)

Domaine	Eucaryotes
Règne	Champignons
Embranchement	<i>Ascomycota</i>
Classe	<i>Eurotiomycetes</i>
Ordre	<i>Eurotiales</i>
Famille	<i>Trichomaceae</i>
Genre	<i>Nigri</i>
Espèce	<i>Aspergillus brasiliensis</i>

### 4.1.3. Habitat

*Aspergillus brasiliensis* est un champignon largement présent dans la nature, notamment dans les environnements riches en matières organiques comme les sols, les fruits secs et certains produits agricoles. On le retrouve dans divers pays aux climats chauds ou tempérés, ce qui montre sa capacité d'adaptation. Son habitat naturel est donc principalement composé de substrats végétaux en décomposition, ce qui lui permet de jouer un rôle écologique de décomposeur. (Varga et al., 2007).

### 4.1.4. Caractères morphologiques

Ce champignon forme des colonies noires et denses à surface veloutée, typiques des espèces du groupe des aspergilles noirs. Il pousse rapidement sur différents milieux de culture. Au microscope, ses structures reproductrices présentent une tête conidienne bien développée, composée de cellules caractéristiques (phialides) organisées en deux rangées, et de spores sphériques avec une surface finement rugueuse. (Varga et al., 2007)

### 4.1.5. Pouvoir pathogène :

Parmi les espèces du genre *Aspergillus*, *A. brasiliensis* a longtemps été considérée comme peu pathogène. Cependant, certaines souches de cette espèce pourraient produire de l'ochratoxine A, une mycotoxine néphrotoxique et potentiellement cancérigène (Samson et al., 2004). En plus de son potentiel toxigène, *A. brasiliensis* peut être à l'origine d'infections opportunistes chez l'humain. Elle est notamment impliquée dans des cas d'otite externe invasive, une forme sévère d'infection de l'oreille pouvant entraîner une perte auditive irréversible, voire le décès du patient dans les cas les plus graves (Parize, 2008).

## 4.2 *Candida albicans*

### 4.2.1. Définition

*Candida albicans* est un champignon polymorphe, considéré comme un membre du microbiome humain normal. Il s'agit d'un organisme endosymbiotique dans le tube digestif. Chez la plupart des individus, il réside comme un commensal inoffensif, mais dans certaines conditions, il peut devenir pathogène et provoquer des infections allant d'infections cutanées superficielles de la peau à des infections systémiques potentiellement mortelles. (Mayer et al., 2013).

Les autres espèces de *Candida* rencontrées dans les infections humaines sont *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. stellatoidea*, *C. krusei* et *C. lusitana*. En raison de l'homologie génétique relativement élevée entre *C. albicans* et *C. stellatoidea*, cette dernière a été reclassée comme une variante négative en sucrose de *C. albicans*. (McCullough et al., 1996).

### 4.2.2. Taxonomie

Le genre *Candida* appartient à la classe des Deuteromycetes et a été décrit comme une «fosse taxonomique» dans laquelle des levures sans stade sexuel connu ou autres caractères phénotypiques remarquables ont été classées. Ses membres sont biologiquement divers et comprennent des levures ayant des affinités ascomycètes et basidiomycètes. Il y a actuellement entre 150 et 200 espèces reconnues dans ce genre.

Il existe sept espèces de *Candida* d'importance médicale majeure, la plus importante étant *C. albicans*, la plus fréquemment isolée. On pense qu'elle est la plus virulente chez l'homme. (McCullough et al., 1996).

**Tableau 3 :** Taxonomie du genre *Candida albicans* (Barnett, 2000)

Règne	Champignons
Embranchement	<i>Ascomycota</i>
Classe	<i>Hemiascomycètes</i>
Ordre	<i>Saccharomycétales</i>
Famille	<i>Candidaceae</i>
Genre	<i>Candida</i>
Espèce	<i>Candida albicans</i>

#### 4.2.3.Aspect morphologique

*C. albicans* est un champignon levuriforme dit polymorphe Non pigmentées, non capsulées, qui peut se développer sous plusieurs formes : soit sous forme de levure à bourgeonnement de forme ovoïde, soit sous forme de cellules allongées en ellipses avec des constriction au niveau des septa (pseudo-hyphes), soit sous forme d'hyphes vrais à parois parallèles. (Mayer et al., 2013)

Il peut également former des chlamydospores qui sont des structures semblables à des spores, produites dans des conditions distinctes.

Le champignon peut subir un changement phénotypique entre les morphologies blanche et opaque

La transition entre la croissance en levure et en hyphes (nommée dimorphisme) est étroitement régulée par un réseau de voies de transduction de signaux en réponse aux stimuli environnementaux (Jacobsen et al., 2012).

Au sein du genre, les espèces sont caractérisées principalement par la morphologie des colonies, leur capacité à utilisées différents types carbonés ainsi que leur aptitude à effectuer la fermentation. (McCullough et al., 1996)

#### 4.2.4.Habitat

*C. albicans* est un champignon qui évolue principalement dans le tube digestif il est également présent dans la cavité buccale de près de 75 % de la population

Chez les personnes en bonne santé, cette colonisation reste généralement bénigne. Et ne cause pas de symptômes

Les infections à *Candida albicans* peuvent se produire dans diverses zones corporelles, comme la bouche, le vagin, et peuvent évoluer vers des infections systémiques plus graves chez les personnes immunodéprimées. (Mayer et al., 2013).

### 4.2.5. Toxicité et pouvoir pathogène

La présence du *Candida albicans* dans les médicaments les rend non seulement dangereux d'un point de vue infectieux, mais peut également modifier leurs propriétés physiques, chimiques et organoleptiques, altérer la composition de leurs principes actifs ou les transformer en produits toxiques. (Mugoyela et al., 2010).

La détérioration physicochimique résultant de la croissance du *candida albicans* est une raison satisfaisante pour considérer le produit comme dangereux pour l'usage humain, En effet les infections microbiennes ne sont pas seulement le résultat de la présence physique de micro-organismes, mais aussi de leurs métabolites/toxines qui deviennent nocifs même s'ils sont présents en quantités infimes. (Mugoyela et al., 2010).

Certaines de ces maladies liées aux toxines comprennent la gastro-entérite aiguë, les douleurs abdominales et la diarrhée. Les symptômes varient d'une légère détresse gastrique à la mort, selon la sensibilité individuelle à la toxine, la quantité de toxine ingérée et l'état de santé général de la victime. (Mugoyela et al., 2010).

De plus la présence même d'un faible niveau du *candida opportunistes* ou de métabolites microbiens toxiques qui persistent même après la mort des contaminants d'origine peut rendre le produit inefficace. (Mugoyela et al., 2010).

Sur le plan clinique *C. albicans* peut provoquer deux types majeurs d'infections chez l'homme : des infections superficielles, telles que la candidose buccale ou vaginale, et des infections systémiques menaçant la vie, la candidose systémique est associée à un taux de mortalité brut élevé, même avec un traitement antifongique de première ligne (Mayer et al., 2013).

## 4.3 *Staphylococcus aureus*

### 4.3.1. Définition

*Staphylococcus aureus* est une bactérie Gram positive (colorée en violet par coloration de Gram) en forme de cocci et généralement disposée en grappes dites « en forme de raisin ». responsable d'une grande variété de maladies cliniques.

Elle est naturellement présente sur la peau et les muqueuses, et l'homme en est le principal réservoir. Cependant, s'il pénètre dans la circulation sanguine ou les tissus internes, il peut provoquer diverses infections potentiellement graves. (Taylor & Unakal, 2025)

Il est l'une des principales causes de bactériémie et d'endocardite infectieuse, ainsi que d'infections ostéoarticulaires, cutanées et des tissus mous, pleuropulmonaires et liées aux dispositifs. (Tong et al., 2015) *Staphylococcus aureus* compris des souches résistantes aux médicaments comme le SARM rendant leur traitement plus difficile. (Taylor & Unakal, 2025)

4.3.2.Habitat

Le réservoir naturel des *staphylocoques* notamment *Staphylococcus aureus* est l'homme et les animaux à sang chaud.

Cependant, éliminées dans le milieu extérieur, ces bactéries très résistantes sont fréquemment retrouvées dans l'environnement.

Le site de colonisation préférentiel de *S.Aureus* chez l'homme est la muqueuse nasale.

20 à 30% des adultes sont porteurs de *S. aureus* au niveau des fosses antérieures du nez. 20% au niveau digestif et entre 8 et 15% au niveau vaginal. A partir des sites de portage, *S. aureus* colonise les territoires cutanés, en particulier les zones humides (aisselle,périnée)et les mains. (Allano, 2024).

4.3.3.Aspects morphologiques

*Staphylococcus aureus* est une bactérie a Gram positive forme des colonies brillantes, lisses, entières, surélevées et translucides, souvent pigmentées de couleur dorée.

Sous le microscope elle se présente des grappes irrégulières en forme de raisin (du grec staphyle, grappe de raisin ; kokkus, baie (Foster, 2004)

4.3.4.Taxonomie

Tableau 4 : Taxonomie du genre *Staphylococcus aureus* (Gherardi et al., 2018)

Règne	Bactéries
Embranchement	<i>Bacillota</i>
Classe	<i>Bacilli</i>
Ordre	<i>Caryophanales</i>
Famille	<i>Staphylococcaceae</i>
Genre	<i>Staphylococcus</i>
Espèce	<i>Staphylococcus aureus</i>

4.3.5.Toxicité et pouvoir pathogènes

*S. aureus* est une bactérie pyogène et toxigène, responsable d nombreuses infections nosocomiales et communautaires. Elle provoque des infections suppuratives dues à

la multiplication de la bactérie et des infections toxiques liées à la diffusion de toxines spécifiques. (Allano, 2024).

Par ailleurs *Staphylococcus aureus* constitué une cause majeure d'infections sanguines communautaires, et il est responsable de morbidité et de mortalité. En cas de pénétration dans le système cardiovasculaire, elle peut provoquer une endocardite infectieuse ou une thrombophlébite. (Gunawardana et al., 2022).

Ainsi, la contamination des médicaments par *Staphylococcus aureus* augmente le risque de complications endovasculaires, et modifie les propriétés physiques, chimiques et organoleptiques du médicament, entraînant ainsi une perte ou une diminution de son activité thérapeutique. (Gunawardana et al., 2022).

4.4 *Escherichia coli*

4.4.1.Définition

La bactérie *Escherichia coli* a été découverte par le pédiatre allemand Theodor Escherich (1857–1911), qui l'a isolée des excréments de bébés en 1885. *E. coli* est une bactérie Gram négative, non sporulante, en forme de bâtonnet, anaérobie facultative et coliforme appartenant au genre *Escherichia* qui habite généralement l'environnement, les aliments et l'intestin inférieur des animaux à sang chaud. Dans les domaines de la biotechnologie et de la microbiologie, c'est l'organisme modèle procaryote le plus étudié. Il peut vivre pendant de longues périodes dans les excréments, le sol et l'eau, et est fréquemment utilisé comme organisme indicateur de contamination de l'eau. (Basavaraju & Gunashree, 2022).

4.4.2.Taxonomie

Tableau 5 : Taxonomie du genre *Escherichia coli* (Basavaraju & Gunashree, 2022)

Domaine	Bactéries
Règne	Bactéries
Embranchement	<i>Protéobactéries</i>
Classe	<i>Gammaproteobacteria</i>
Ordre	<i>Enterobacterales</i>
Famille	<i>Enterobacteriaceae</i>
Genre	<i>Escherichia</i>
Espèce	<i>Escherichia coli</i> ( <i>E. coli</i> )

### 4.4.3.Habitat

*E. coli* est une bactérie qui vit naturellement dans notre intestin. Son nom courant, « colis bacille », vient du fait qu'elle habite principalement le côlon, où elle fait partie de notre flore intestinale normale. Chez l'être humain, *E. coli* est même l'une des principales bactéries présentes dans l'intestin aérobie. Chaque personne porte donc sa propre population d'*E. coli*. Logiquement, on retrouve aussi cette bactérie dans les eaux usées. Bien que les égouts puissent favoriser la dispersion de nombreuses bactéries dans l'environnement et vers d'autres animaux, ce n'est pas un endroit idéal pour la survie d'*E. coli* sur le long terme. C'est d'ailleurs pour cette raison qu'elle est utilisée comme un excellent indicateur de pollution fécale dans les eaux. On peut aussi retrouver *E. coli* sur la peau et les muqueuses, surtout autour des orifices naturels du corps. (Ari & Sezonov, 2008).

### 4.4.4.Aspects morphologiques

*E. Coli* est un bacille à extrémités arrondies, de type Gram négatif. Sa taille est d'environ 2 à 4 micromètres de longueur pour 0,6 micromètre de largeur. Elle ne possède ni capsule ni spores. À l'observation, elle apparaît soit isolée, soit groupée en courtes chaînettes, et parfois même sous forme de très longs filaments. *E. coli* est équipée de cils et se déplace généralement grâce à une ciliature péritriche (des cils répartis tout autour de la cellule). Cependant, sa mobilité peut varier selon le milieu de culture utilisé. La figure 1 montre une observation microscopique d'*Escherichia coli* colorée par la technique de Gram. (Hart Tony, 1997).

### 4.4.5.Pouvoir pathogène

*Escherichia coli* est une bactérie responsable de diverses infections, notamment les infections urinaires, intestinales et néonatales. Elle est la principale cause des infections urinaires communautaires, en particulier chez les femmes, et peut également être impliquée dans les infections nosocomiales. Certaines souches provoquent des gastro-entérites pouvant entraîner des diarrhées sévères, voire un syndrome hémolytique et urémique, surtout chez l'enfant. Chez le nouveau-né, *E. coli* peut être responsable de septicémies et de méningites transmises lors de l'accouchement. Sa pathogénicité repose sur plusieurs facteurs : la capsule polysaccharidique (notamment de type K1) qui inhibe la phagocytose, les adhésines qui facilitent l'adhésion aux cellules hôtes, et la production de toxines comme l'hémolysine, les entérotoxines (LT et ST), ou la Shiga-like toxine. (Nauciel & Vildé, 2005).

Ce qui concerne les produits pharmaceutiques contaminé par *E.coli* avec des niveaux supérieurs aux limites de la pharmacopée peuvent entraîner des altérations et une détérioration des principes actifs et provoquer des effets indésirables par des infections ou des toxines.

La présence de ce pathogène peut avoir le potentiel de réduire ou même d’inactiver l’activité thérapeutique du produit et a le potentiel d’affecter négativement la santé du patient. (Pullirsch et al., 2014).

4.5 *Pseudomonas aeruginosa*

4.5.1.Définition

*Pseudomonas aeruginosa* est un bacille Gram négatif, aérobie et non sporulé, présent dans l’environnement, capable de provoquer diverses infections chez les hôtes immunocompétents et immunodéprimés. Sa prédilection à provoquer des infections chez les hôtes immunodéprimés, son extrême polyvalence, sa résistance aux antibiotiques et son large éventail de défenses dynamiques en font un organisme extrêmement difficile à traiter en médecine moderne. (Wilson & Pandey, 2025).

*Pseudomonas aeruginosa* produit plusieurs substances extracellulaires qui peuvent contribuer à sa virulence. (Nicas & Iglewski, 1985).

4.5.2.Aspects morphologiques

*Pseudomonas aeruginosa*, comme la plupart des autres organismes à Gram négatif, possède une enveloppe cellulaire composée d’une membrane externe, d’une couche de peptidoglycane et d’une membrane cytoplasmique interne. (Sadoff & Artenstein, 1974)

*P. aeruginosa* possède un flagelle unique et des pili de type IV qui sont nécessaires à la motilité et à l’infection respiratoire. Le flagelle est essentiel pour la motilité, et l’adhésion aux cellules et à la formation d’un biofilm, et les pili de type IV, qui sont des appendices composés de polymères de piline, qui permettent aux bactéries de se déplacer sur les surfaces en plus de jouer des rôles importants dans la formation du biofilm et la fixation des cellules épithéliales respiratoires. (Reynolds & Kollef, 2021).

4.5.3.Taxonomie

Tableau 6: Taxonomie du genre *Pseudomonas aeruginosa* (Wilson & Pandey, 2025)

Domaine	Bactéries
Embranchement	g-Proteobacteria
Classe	<i>Gammaproteobacteria</i>
Ordre	<i>Pseudomonadales</i>
Famille	<i>Pseudomonadaceae</i>
Genre	<i>Pseudomonas</i>

Espèce	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
--------	-------------------------------

### 4.5.4.Habitat

*Pseudomonas aeruginosa* est fréquemment présent dans l'environnement, notamment en eau douce. En milieu urbain, les bassins thermales, les jacuzzis et les piscines en sont des réservoirs. Il peut provoquer un large éventail d'infections communautaires, telles que des folliculites, des plaies perforantes pouvant entraîner une ostéomyélite, des pneumonies, des otites externes et bien d'autres. C'est un pathogène souvent opportuniste et une cause importante d'infections nosocomiales telles que la pneumonie sous ventilation mécanique, les infections urinaires liées aux cathéters, etc. En milieu hospitalier, les bassins thermales comprennent l'eau potable, les robinets, les éviers, les brosses à dents, les machines à glaçons, les solutions désinfectantes, les savons, les équipements d'inhalothérapie, les endoscopes et les lave-endoscopes. (Wilson & Pandey, 2020).

### 4.5.5.Toxicité et pouvoir pathogènes

*Pseudomonas aeruginosa* se distingue également des pathogènes opportunistes par la production d'un grand nombre de produits potentiellement impliqués dans la pathogenèse. Nos études se sont concentrées sur quatre de ces produits : la toxine A et l'exoenzyme S, qui catalysent toutes deux le transfert d'ADP-ribose du NAD vers les protéines eucaryotes, et les deux principales protéases de *P. aeruginosa*, l'élastase et la protéase alcaline. De ces quatre produits, la toxine A est la plus toxique (dose létale moyenne (DL 0,2 kg par souris). Sa toxicité est due à sa capacité à inhiber la synthèse protéique dans les cellules sensibles en catalysant l'ADP-ribosylation du facteur d'élongation 2 (EF-2). L'activité de ces quatre produits suggère un rôle dans la pathogenèse. (Nicas & Iglewski, 1985).

## **Chapitre 3 : Histagan 0.01%**

## 1.Présentation d’Histagan 0.01%

### 1.1. Définition

Les antihistaminiques sont une classe pharmaceutique de médicaments qui agissent pour traiter les maladies liées à l’histamine. (Farzam, Sabir, et O’Rourke 2025).

Ce médicament fait partie de la famille chimique des Alkyl amines substituées, fabriqué par SAIDAL 2. Présenté sous forme du sirop à 0,0 1% : Flacons de 125 ml (Figure9).

Les antihistaminiques agissent en bloquant les récepteurs de l’histamine, une substance bioactive produite par l’organisme. En empêchant l’action de l’histamine, ils permettent de soulager des symptômes tels que les démangeaisons, les gonflements, l’inflammation, la congestion nasale, la toux, les nausées et les vertiges. (Leynadier et al. 1984).



Figure 9 : HISTAGAN 0.01%

### 1.2.Composition d’Histagan 0.01%

Histagan 0.01% est un médicament présenté sous une forme galénique liquide qui se compose d’un principe actif et des excipients.

#### 1.2.1. Principe actif : Dexchlorphéniramine maléate

Ce principe actif est une substance responsable de l’effet thérapeutique d’un médicament. Il possède des caractéristiques spécifiques qui déterminent sa manière d’agir sur l’organisme (pharmacodynamie) ainsi que sa façon d’être absorbé, distribué, métabolisé et éliminé par celui-ci (pharmacocinétique). (Mrozovski 2025).

Dénomination chimique : (Z)-Buténedioate de (3S) -3-(4-chlorophényle) -N, N-diméthyl-3-(pyridin-2-yl) propan-1-amine.

Formule brute :  $C_{20}H_{23}ClN_2O_4$  et La masse molaire : 358.5g/mol.

### 1.2.2. Les excipients :

sont des molécules qui facilitent la formulation du principe active comme:

**-Eau purifiée :** sert de solvant pour la dissolution du saccharose constituant le sirop, tout en garantissant la cohésion et l'homogénéité de la formulation.

**-L'acide citrique monohydraté :** L'acide citrique (acide 2-hydroxy-propane-1,2,3-tricarboxylique) est un composé naturellement présent dans les plantes et les animaux. On le retrouve en grande quantité dans les agrumes et divers autres fruits. Sous sa forme pure, il se présente comme une substance incolore, inodore, au goût très acide. Il est facilement soluble dans l'eau et possède une masse moléculaire de 192,124 g/mol.(Angumeenal et Venkappayya 2013) Il est employé dans l'HISTAGAN pour réguler le pH de la solution de sirop, favorisant ainsi la stabilité du principe actif et préservant sa solubilité.

**-Le sorbitol :** est un polyol à six carbones généralement dérivé du glucose, est largement utilisé dans les produits alimentaires, de soins personnels et pharmaceutiques. (Zhou, Smith, et Qi 2024) est incorporé afin d'améliorer la saveur de la solution d'Histagan, facilitant ainsi l'acceptation du médicament par le patient.

**-L'arôme de cerise :** est utilisé pour dissimuler le goût ou l'odeur du sirop.

**-Le parahydroxybenzoate de méthyle (NIPAGINE) :** Le méthylparabène (n° CAS 99-76-3) est un ester méthylique de l'acide p-hydroxybenzoïque. Il s'agit d'un composé stable et non volatil utilisé comme conservateur antimicrobien dans les aliments, les médicaments et les cosmétiques depuis plus de 50 ans. (Soni et al. 2002); Il est utilisé comme conservateur dans l'Histagan en raison de ses propriétés antimicrobiennes et antifongiques.

**-Le saccharose :** agit comme agent sucrant et édulcorant.

## 2.Mécanisme d'action de l'histagan 0,01%

Histagan 0,01% est une solution pharmaceutique formulée à base de dexchlorphéniramine un antihistaminique H1 indiqué dans le traitement symptomatique des réactions allergiques diverses. (Yamauchi & Ogasawara, 2019).

Pour mieux comprendre le mode d'action de l'Histagan 0,01 % ou bien l'effet des antihistaminique H1, il est essentiel d'expliquer d'abord les effets de l'histamine dans l'organisme.

## 2.1.Effet Histamine

L'histamine est un puissant vasodilatateur, qui, en outre, augmente la perméabilité capillaire ; elle provoque une bronchoconstriction, active les cellules inflammatoires, stimule les sécrétions gastriques et exerce selon les cas des effets inhibiteurs ou stimulants sur le système nerveux central ou périphérique. (Yamauchi & Ogasawara, 2019).

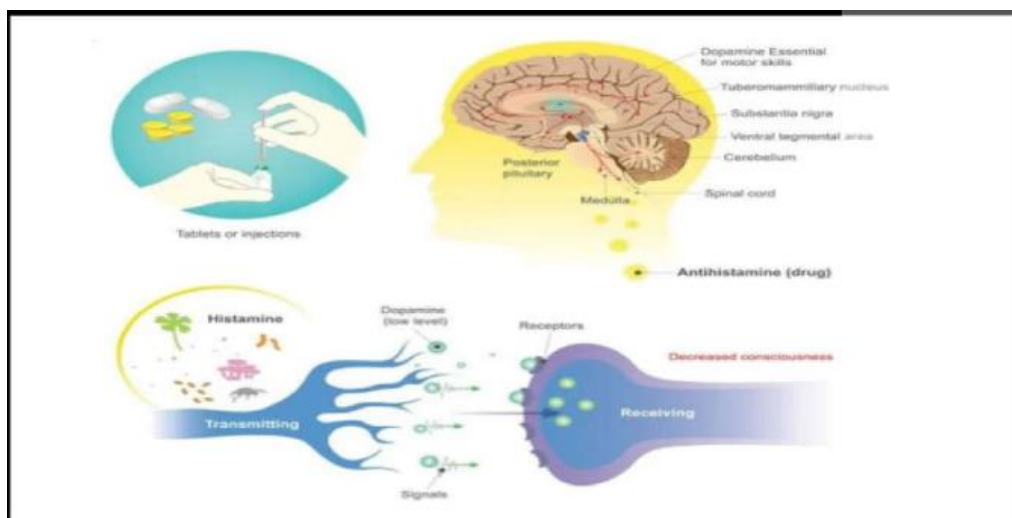
L'histamine exerce ses différents effets biologiques en activant des récepteurs spécifiques localisés sur la surface des membranes de différentes cellules, telles que les muscles lisses, les mastocytes, les cellules immunocompétentes ou inflammatoires, les cellules endothéliales ou épithéliales, les fibres nerveuses, etc. (Yamauchi & Ogasawara, 2019)

Les actions biologiques de l'histamine résultent de l'activation de quatre types de récepteurs H1, H2, H3 et H4. (Yamauchi & Ogasawara, 2019).

Les récepteurs H1 prédominent au niveau des muscles lisses (bronches, intestins, etc.), des fibres nerveuses, et des cellules immuno-inflammatoires, les récepteurs H2 dans l'estomac, le cœur, les récepteurs H3 sur les fibres nerveuses centrales ou périphériques et les récepteurs H4 sur les cellules immuno-inflammatoires. (Yamauchi & Ogasawara, 2019).

## 2.2.Effet antihistaminique (dexchlorphéniramine) : (Demoly & Bousquet, 2003)

Les antihistaminiques, longtemps considérés comme des antagonistes de l'histamine, c'est-à-dire des médicaments empêchant la fixation de l'histamine sur son récepteur H1, sont en fait des agonistes inverses, c'est-à-dire des médicaments stabilisant la forme inactive du récepteur H1(Figure10).



**Figure 10 :** Les antihistaminiques traitent la rhinite allergique et d'autres allergies  
(Demoly & Bousquet, 2003)

### **2.3.Comment agissent les antihistaminiques ?**

Les AH1, en stabilisant la forme inactive du récepteur H1, favorisent cette forme dans l'équilibre forme active (cible de l'histamine) /forme inactive (cible des AH1) (Demoly & Bousquet, 2003).

Les AH1 possèdent certaines propriétés antiinflammatoires, variables d'une molécule à l'autre, démontrées à la fois in vitro et in vivo. (Demoly & Bousquet, 2003)

Ils bloquent par exemple in vitro la libération de médiateurs par les basophiles et les mastocytes (histamine, tryptase, leucotriène C4, prostaglandine D2, diverses interleukines), ils réduisent l'état d'activation d'éosinophiles en culture. (Demoly & Bousquet, 2003).

In vivo, après tests de provocation nasale ou oculaire ou durant les contacts allergéniques naturels, ils diminuent la libération de cytokines, l'afflux d'éosinophiles et l'expression de molécules d'adhésion telles que ICAM1. (Demoly & Bousquet, 2003).

Les effets observés uniquement in vitro (blocage de la libération d'histamine, de leucotriène C4, de radicaux libres de l'oxygène notamment) le sont à fortes concentrations d'AH1 (1–10  $\mu$ M) ... (Demoly & Bousquet, 2003).

Les effets observés in vivo pourraient s'expliquer par l'inhibition du facteur de transcription NF $\kappa$ B, inhibition pour certains auteurs pas forcément liées à leurs propriétés antihistaminiques, c'est-à-dire leur action sur le récepteur H1. (Demoly & Bousquet, 2003).

## **3.Propriétés d'Histagan 0,01 %**

### **3.1.Propriétés physico-chimiques**

Histagan se présente sous forme d'une solution limpide et incolore. Il est généralement conditionné dans des flacons stériles afin d'assurer une administration précise et sécurisée. La concentration en principe actif, Dexchlorphéniramine maléate, est de 0,01 % (poids/volume), une teneur adaptée pour garantir l'effet thérapeutique attendu tout en limitant les risques d'effets secondaires. (vidal, 2013).

### **3.2.Propriétés pharmacodynamiques**

Histagan est un antagoniste des récepteurs H1 de l'histamine. Son mécanisme d'action repose sur l'inhibition des effets de l'histamine, un médiateur chimique majeur dans les réponses allergiques et inflammatoires. (vidal, 2013).

### **3.3. Propriétés pharmaceutiques**

Histagan 0,01 % est élaboré à partir d'excipients rigoureusement choisis afin d'assurer sa stabilité, sa sécurité et son efficacité. Il est conservé dans des conditions contrôlées visant sa stabilité et son efficacité. Le produit doit être conservé à une température inférieure à 25 °C afin de préserver sa stabilité et son efficacité visant à préserver sa qualité durant toute sa durée de vie. Sa formulation est conçue pour permettre une administration simple et précise, garantissant ainsi un traitement optimal pour les patients. (vidal, 2013).

## **Matériel et méthodes**

Dans le but d'étudier l'efficacité des conservateurs dans le sirop antihistaminique Histagan 0.01%. Une étude est effectuée durant une période de 2 mois à partir du 1 février 2025. Il est à noter que l'étude a été menée au sein du laboratoires de microbiologie de la société SAIDAL Constantine site 02.

## 1. Matériel

### 1.1. Le sirop Histagan 0.01%

Le sirop utilisé dans cette étude, a été fabriqué par SAIDAL 2. Présenté sous forme de sirop à 0,01% : Flacons de 125 ml (figure11)



**Figure 11** : Le sirop Histagan 0.01%

## 2. Microorganismes utilisés

Quatre souches microbiennes ont été utilisées, elles sont présentées dans le (Tableau7). Et qui ont été aimablement fournies par le laboratoire de microbiologie de l'unité pharmaceutique SAIDAL. Ces souches microbiennes ont été choisies en raison de leur implication fréquente dans les maladies, de leur capacité à causer des lésions dans le corps humain, ainsi que de leur utilisation courante dans l'industrie pharmaceutique pour tester l'efficacité de molécules antimicrobiennes.

**Tableau 7** : Les souches microbiennes testées.

Les souches	Nom de souche	Origine	Propriété
Souches bactériennes	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739	Gram -
	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	Gram +
Souches fongiques	<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	Levure
	<i>Aspergillus brasiliensis</i>	ATCC 16404	Champignons

### **2.1.Réactivation des souches**

Les souches microbiennes conservées sur cryobilles ont été repiquées sur milieux solides appropriés afin de vérifier leur pureté avant l'utilisation.

Les souches bactériennes (*Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*) ont étéensemencées sur gélose TSA (Tryptic Soy Agar) (Annexe2) et incubées à 35 °C pendant 24 heures.

Les souches fongiques (*Candida albicans* et *Aspergillus brasiliensis*) ont été cultivées sur gélose Sabouraud) (Annexe2) et incubées respectivement à 30°C pendant 48 heures , et 25 °C pendant 5 à 7 jours.

### **2.2.Mise en évidence de la pureté des souches fongiques**

Pour confirmer l'identité de nos souches préalablement référencées, des observations macroscopiques des colonies sur milieu de culture ainsi que des observations microscopiques ont été réalisées.

### **3.La mise en culture des souches et la préparation des inoculums**

Afin de préparer les suspensions microbiennes, tout d'abord, les souches bactériennes d'*Escherichia coli* et de *Staphylococcus aureus* sontensemencées sur la surface d'un milieu gélosé aux peptones de caséine et de soja (Casein Soy Peptone Agar) (Annexe2).

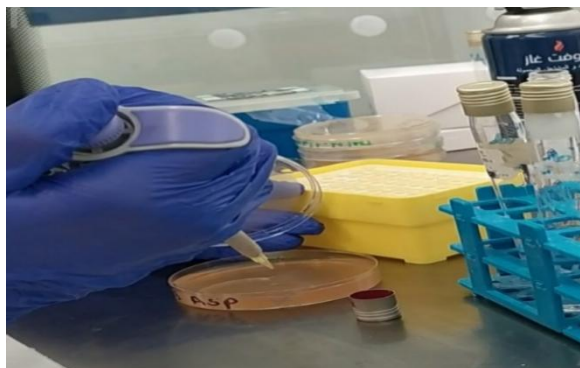
Les cultures bactériennes sont incubées à une température de 35 °C pendant 18 à 24 h afin d'optimiser leurs croissances.

Les souches fongiques d'*Aspergillus brasiliensis* et de *Candida albicans* sontensemencées sur Sabouraud dextrosé-gélosé (Annexe2) sans addition d'antibiotique et incubées respectivement 7 jours à 25 °C et 24 heures à 30°C afin d'optimiser leurs croissance (figure12).

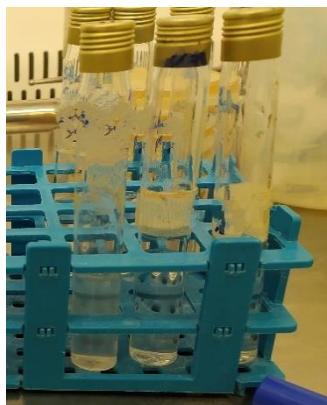
Une fois la période d'incubation terminée, on procède au prélèvement des colonies, a l'aide d'une anse de platine stérile, on racle délicatement quelques colonies bien isolées et identiques de chacune des souches à tester.

L'anse contenant les colonies est ensuite déchargée dans 9 ml d'eau physiologique à 0.9% de Na Cl stérile. (Annexe1) Le tube contenant les colonies d'*Aspergillus brasiliensis* est additionné de 3 à 4 gouttes de Tween80.

Les suspensions sont alors bien homogénéisées à l'aide d'un vortex pour obtenir une répartition uniforme des cellules fongiques dans le milieu liquide (figure13).



**Figure 12 :** La mise en culture des souches fongiques et bactériennes



**Figure 13 :** La préparation des suspensions fongiques et bactériennes

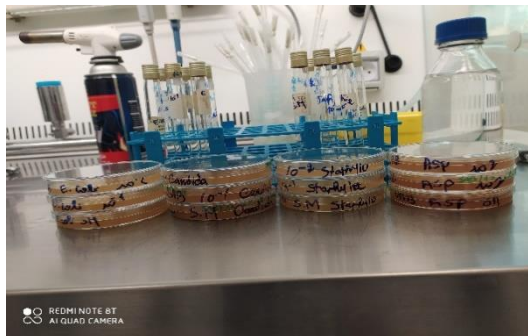
#### **4.Calibrage des inoculums et Détermination de la concentration**

Dans le cadre des tests d'efficacité des conservateurs, il est primordial de préparer des suspensions de micro-organismes à une concentration bien définie, généralement autour de  $10^7$  à  $10^8$  UFC/mL pour les bactéries et d'environ  $10^6$  à  $10^7$  UFC/mL pour les champignons. Cette concentration est souvent spécifiée par la Pharmacopée Européenne (Ph. EUR.), car elle garantit la reproductibilité et la fiabilité des résultats. L'une des méthodes couramment utilisées pour ajuster cette concentration est la spectrophotométrie, qui permet d'estimer indirectement la concentration des micro-organismes dans une suspension.

L'absorbance étant déterminée dans une gamme de longueurs d'onde allant de 500 nm à 650 nm. L'inoculum a été ajusté à une densité optique (DO) de 0,1 à 0,2 à une longueur d'onde de 600 nm pour les bactéries et de 620 nm pour les champignons. Cela correspond à une turbidité standard de 0,5 sur l'échelle de Mac Farland (Ortiz et al., 2020). Nous avons vérifié la densité optique à chaque étape d'ajustement jusqu'à obtenir les valeurs souhaitées.

Les inoculums calibrés ont été utilisés immédiatement.

Afin de vérifier le nombre réel d'UFC : Nous avons procédé au contrôle de nombre d'unités formant colonie (UFC) au moment de l'ensemencement initial (Titre initial). Par réalisation des dilutions décimales successives dans leurs diluants et ensemencement sur milieux gélosés suivis d'un dénombrement. L'incubation était à 35°C pendant 18 h à 24 h pour les bactéries et à 30 °C pendant 48 h pour *C. albicans* et une semaine pour *A. brasiliensis* à 25°C (figure14).



**Figure 14** : Les suspensions diluées et les boîtes ensemencées

### 5.Calcul de Titre initial (N)

$$N = \frac{\bar{C}}{V \times d}$$

Permet de déterminer la concentration de l'inoculum avant son ajout dans le produit.

Avec :

C : la moyenne du nombre de colonies dénombrées sur deux boîtes

V : volume d'inoculum déposé dans chaque boîte

d : le facteur de dilution correspondant à la dilution dénombrée.

### 6.Contamination artificielle du sirop HISTAGAN 0.01%(Challenge Test)

Dans le but d'évaluer l'efficacité du système de conservation antimicrobienne du sirop Histagan 0.01 %, un test de contamination artificielle, connu sous le nom de Challenge Test, est réalisé.

Ce test est essentiel pour la stabilité microbiologique du produit et pour se prémunir d'une éventuelle contamination.

### **6.1.Principe du test (Challenge Test)**

Selon la Ph. EUR le test consiste à contaminer volontairement le produit fini ou la préparation dans son récipient définitif avec un inoculum standardisé et maintenir cette préparation à une température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 28 jours pour évaluer l'efficacité de sa conservation antimicrobienne.

### **6.2.Étape de la contamination**

Cette méthode se base sur le principe la contamination artificielle des préparations avec des souches calibrées et maintenir cette préparation à l'abri de la lumière pendant 28 jours.

Une série de récipients (4 flacons) du produit à examiner a étéensemencés avec une suspension de l'un des microorganismes d'essais afin d'obtenir un inoculum de  $10^5$  à  $10^6$  microorganismes par millilitre de préparation. Le volume d'inoculum ne dépasse pas 1 pour cent du volume du produit. Les flacons du sirop sont mélangés soigneusement pour assurer une répartition homogène (figure15).



**Figure 15:** Les flacons contaminés et les boîtes ensemencées

### **7.Dénombrement de microorganismes viables (méthode par dilution neutralisation)**

Pour chaque essai, un volume de 1 mL du sirop contaminé est prélevé à T0, T14, T28. Ce prélèvement est ensuite soumis à une série de dilutions décimales successives à l'aide d'un diluant neutralisant approprié. La détermination du nombre de microorganisme viable de chaque dilution par dénombrement sur plaque est effectuée afin de s'assurer que l'effet antimicrobien résiduel présent dans le sirop est bien neutralisé et ne perturbe pas le dénombrement. Après dilution, les échantillons sont laissés au repos pendant une durée de  $30 \pm 15$  minutes à température ambiante, permettant ainsi un contact suffisant entre le milieu

neutralisant et le sirop pour garantir une neutralisation complète avant la phase de dénombrement microbien.

Des boîtes de Petri contenant le milieu TSA pour les souches bactériennes et le milieu SAB pour les souches fongiques sont ensemencées par 0,1 ml de chaque flacon déjà contaminé.

### **7.1.Calculs microbiens**

Calcule du nombre N de micro-organismes présents dans l'échantillon d'essai à des intervalles de temps donné à l'aide des équations.

### **7.2.Concentration survivante à chaque temps (N<sub>x</sub>)**

$$N_x = \frac{C}{V \times d}$$

Nombre de micro-organismes encore présents à j14 ou j28.Avec :

N<sub>x</sub>: le nombre de micro-organismes survivants dans la formulation contaminée, en unités formant colonies par millilitre, à chaque temps de prélèvement, tx (T14 ou T28)

C : : nombre de colonies dénombrées sur les boîtes

V : : le volume d'inoculum déposé dans chaque boîte, en millilitres

d : le facteur de dilution correspondant à la dilution retenue et dénombré

### **7.3.Le taux de réduction logarithmique**

Noté Rx permet de mesurer l'efficacité du conservateur en comparant le nombre initial de micro-organismes inoculés dans la formulation (N0) avec le nombre de micro-organismes encore vivants à un temps donné (Nx).

$$R_x = \log(N_0) - \log(N_x)$$

Rx : taux de réduction exprimé en logarithme décimal (log<sub>1</sub>)

N0 : concentration initiale au moment de l'inoculation (t<sub>0</sub>)

Nx : concentration survivante à un temps de prélèvement donné ( t<sub>14</sub> ou t<sub>28</sub>)

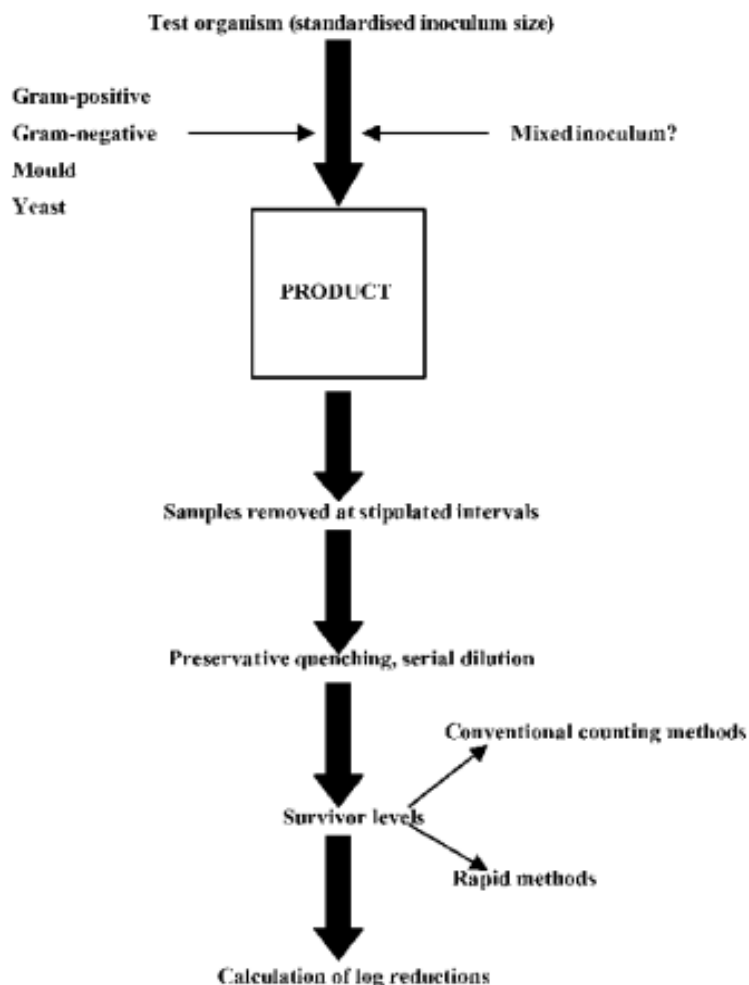
### 8.Critères d'acceptation

Les critères pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne dans les préparations orales sont donnés dans le tableau (8) en termes de réduction logarithmique du nombre de micro-organismes viables par rapport à la valeur obtenue pour l'inoculum (figure13).

**Tableau 8 :** Critères d'acceptation dans les préparations orales (Ph. EUR.)

	Réduction logarithmique	
	14 j	28 j
Bactéries	3	NI
Champignons	1	NI

NI : pas d'augmentation du nombre de microorganismes viables par rapport à la lecture précédente



**Figure 16 :** Schéma général de l'évaluation de l'efficacité de conservation antimicrobienne

### 9. Identification et dosage du conservateur Parahydroxybenzoate de méthyle par HPLC (Chromatographie Liquide à Haute Performance)

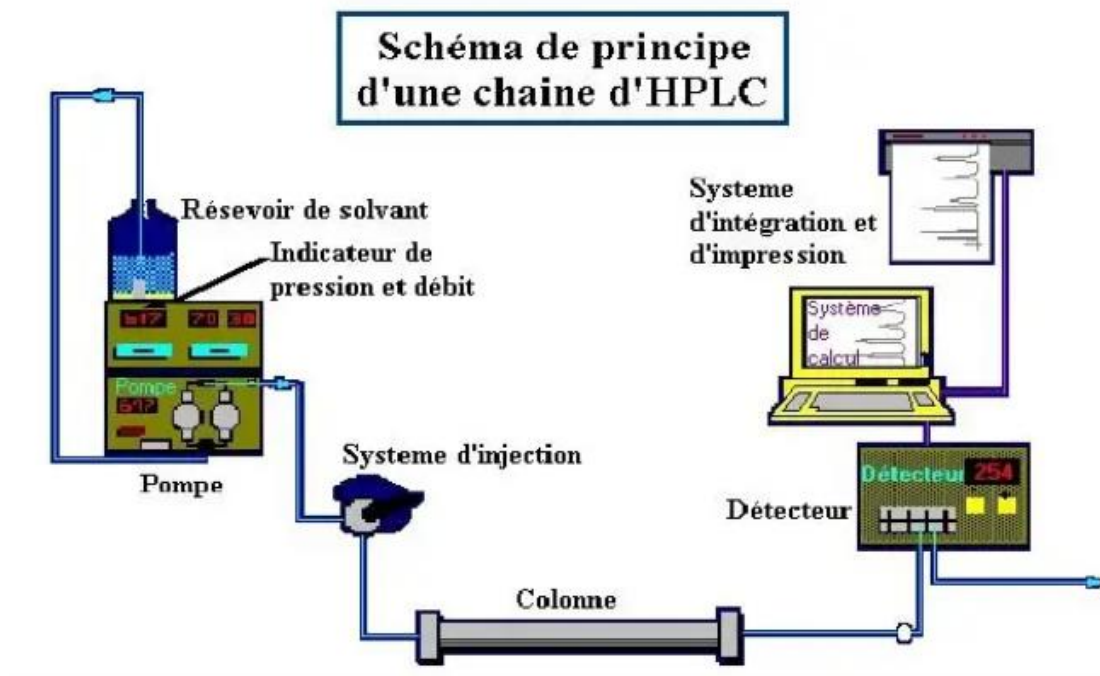
Cette méthode analytique permet une séparation précise et une quantification fiable des composants, assurant ainsi la conformité du produit aux normes de la Pharmacopée Européenne.

Le dosage est important pour garantir la stabilité, la sécurité et l'efficacité du produit tout au long de sa durée de vie.

#### 9.1. Principe de la chromatographie liquide haute performance (HPLC)

L'HPLC est une technique de chromatographie sur colonne qui pompe à haute pression un échantillon (analyte) dissous dans un solvant (phase mobile) à travers une colonne avec un matériau de garnissage chromatographique immobilisé (phase stationnaire) (figure17). Les propriétés de l'échantillon et du solvant, ainsi que la nature de la phase

stationnaire, déterminent le temps de rétention des analytes ou la vitesse à laquelle ils traversent la colonne (Petrova et Sauer, 2017).



**Figure 17** : Principe de fonctionnement de la HPLC

## 9.2.Objectif :

Déterminer la teneur en Parahydroxybenzoate de méthyle dans le sirop, en comparant le chromatogramme de la solution à examiner à celui d'une solution standard de concentration connue.

## 9.3.Préparation des solutions :

### 9.3.1.La solution mobile et le solvant

#### -La Phase mobile :

Une solution de phosphate monopotassique est préparée en dissolvant 13,609 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  à 0.1 M dans l'eau distillée, puis en ajustant le volume à 1000 mL dans une fiole jaugée.

#### -Le solvant :

Un solvant composé d'éthanol à 40 % est préparé en mélangeant 42 ml d'éthanol à 96% dans une fiole de 100 ml puis on complétant le même volume avec de l'eau distillée.

### **9.3.2.Préparation de la Solution standard**

Une prise d'essai de 60mg de parahydroxybenzoate de méthyle (Nipagine) est introduite dans une fiole jaugée de 50 ml. Le mélange est mis dans l'ultrason pendant 2 min. Après refroidissement le volume est ajusté avec de l'éthanol à 40%. Après une agitation pendant 15 min, ensuite 5 ml de cette solution sont transférés dans une fiole jaugée de 20 ml, et le volume est ajusté avec le même solvant.

#### **-solution à examiner**

Pour analyser le produit fini, un volume correspondant à 10 ml du sirop HISTAGAN® 0,01% est introduit dans une fiole jaugée de 50 ml. On y ajoute ensuite 25 ml de phase mobile, puis le mélange est bien agité afin d'assurer une homogénéisation complète. Le volume est finalement complété jusqu'au trait de jauge avec le même solvant (phase mobile).

### **9.4.Injection et séparation des échantillons**

Une fois que les solutions (solution standard et solution à tester) sont préparées, elles sont introduites dans l'appareil de chromatographie liquide à haute performance (HPLC) (figure 20), ces dernières traversent une colonne chromatographique contenant une phase stationnaire.

En raison de la phase mobile pompée à un débit constant (1,0 mL/min), les divers éléments du mélange migrent à des vitesses différentes en fonction de leur affinité pour la phase stationnaire et de leur capacité à se dissoudre dans la phase mobile.

Dans cette colonne, la séparation des composants, y compris le parahydroxybenzoate de méthyle, a lieu chaque composé apparaît à un temps de rétention distinct (durée nécessaire pour parvenir au détecteur), facilitant ainsi son identification

Afin de garantir la reproductibilité des résultats, plusieurs injections ont été effectuées trois injections ont été réalisées pour l'échantillon à analyser, tandis que cinq injections ont été effectuées pour la solution standard.

Le détecteur, réglé à une longueur d'onde de 240 nm, capte les signaux générés par les composés au fur et à mesure qu'ils émergent de la colonne. Ces signaux sont convertis en chromatogramme, dans lequel chaque pic représente un composé.

L'analyse comparative du temps de rétention et de la surface du pic de l'échantillon à étudier par rapport à celle de la solution standard permet :

L'identification du conservateur (parahydroxybenzoate de méthyle) se fait par correspondance des temps de rétention. L'évaluation de la concentration s'effectue par calcul basé sur la surface du pic, en se référant à la courbe d'étalonnage ou en appliquant une règle de proportion directe, si la réponse présente une linéarité.



**Figure 18:** Appareil d'HPLC (Chromatographie Liquide à Haute Performance)

**Tableau 9:** Conditions chromatographiques

Les conditions	
La colonne	Agilent Zorbax CN, 5 $\mu$ m (250 x 4,6 mm).
Phase stationnaire	Cyano (CN) – phase polaire modérée
Phase mobile	Solution tampon $\text{KH}_2\text{PO}_4$ à 0,1 M / Éthanol à 40 %
Débit	1,0 mL/min
Longueur d'onde	240 nm
Volume d'injection	20 $\mu$ L
Détecteur	UV
Température de la	25 °C

colonne	
Durée d'analyse	Environ 20 minutes


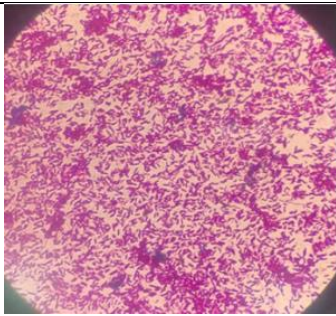

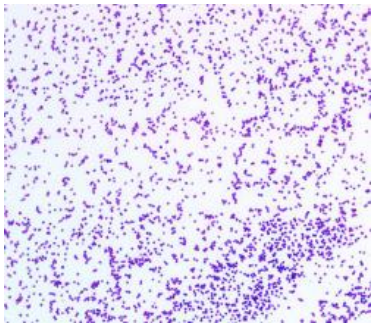

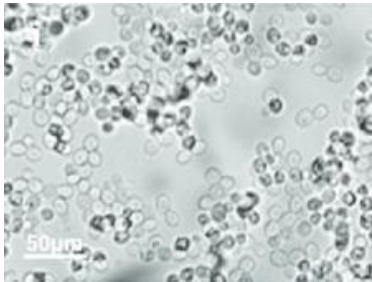

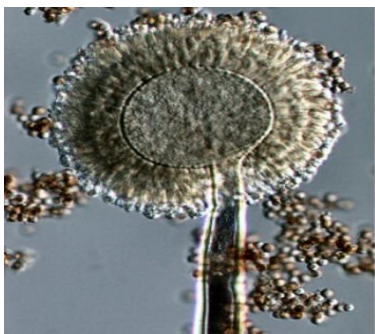
---

## Résultats et Discussion

## Résultats

### 1.Mise en évidence de la pureté des souches fongiques

**Tableau 10** : Etude macroscopique et microscopique des souches fongiques et bactériennes

Les souches	Étude macroscopique	Étude microscopique
<i>Escherichia coli</i>		 (Juda & Khalaf, 2024)
<i>Staphylococcus aureus</i>		 (Jumaah et al., 2014)
<i>Candida albicans</i>		 (Khodavandi et al., 2011)
<i>Aspergillus brasiliensis</i>		 (Manikandan et al., 2010)

## 2.Détermination de la concentration

**Tableau 11** : Résultats de la densité Optique (Charge microbienne) pour chaque souche testée

Lecture de la densité optique (DO) ; par spectrophotométrie Longueur d'onde utilisée : 600 nm (Bactéries) ; 620 nm (champignons)				
Les souches microbiennes	Longueur d'onde utilisée (nm)	Densité optique	Normes NCCLS	Concentration des suspensions microbiennes
<i>Escherichia coli</i>	600nm	0.11	≈ 0,08 – 0,13	10 <sup>7</sup> à 10 <sup>8</sup> UFC/mL
<i>Staphylococcus aureus</i>		0.13	≈ 0,08 – 0,13	
<i>Candida albicans</i>	620nm	0.11	≈ 0,09 – 0,11	10 <sup>6</sup> à 10 <sup>7</sup> UFC/mL
<i>Aspergillus brasiliensis</i>		0,12	≈ 0,09 – 0,13	

## 3.Dénombrement de la population microbienne initiale de l'inoculum













**Tableau 12:** Taille des inoculums microbiens en UFC/mL

	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Aspergillus brasiliensis</i>
N	1,5×10 <sup>7</sup> UFC/mL	1,8×10 <sup>7</sup> UFC/mL	2,2 ×10 <sup>6</sup> UFC/mL	1,0 ×10 <sup>6</sup> UFC/mL

Selon le Tableau, la taille des inoculums utilisés est en conformité avec les exigences.

## 4.Dénombrement de microorganismes viables (méthode par dilution neutralisation)

**Tableau 13** : La diminution du nombre des microorganismes durant le temps

	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C.albicans</i>	<i>A. brasiliensis</i>
<b>j0</b>				
<b>J14</b>				
<b>J28</b>				

**Tableau14** : Résultats du dénombrement des microbes (UFC) en fonction du temps

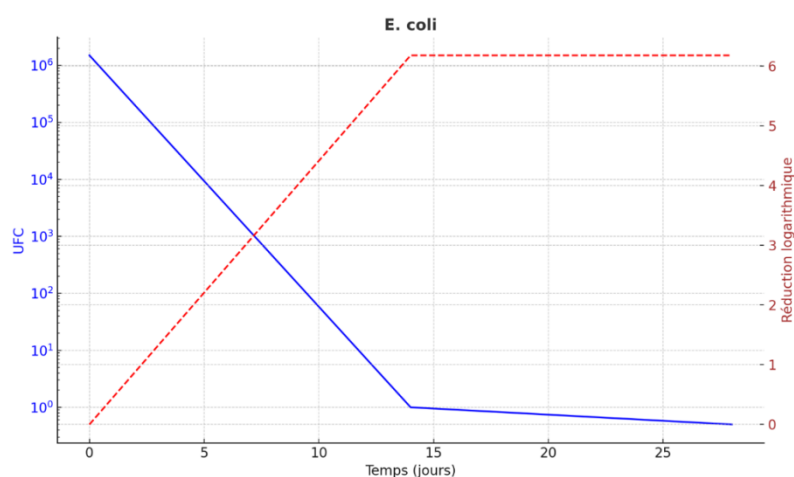
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Aspergillus brasiliensis</i>
<b>N à j0</b>	$1,5 \times 10^6$	$1,8 \times 10^6$	$2,2 \times 10^5$	$1,0 \times 10^4$
<b>N à j14</b>	<1	<1	<1	<1
<b>N à j28</b>	0	0	0	0

## 5.Calcul de la réduction logarithmique et interprétation des résultats

### 5.1.*Escherichia coli*

**Tableau 15** : Taux de réduction du nipagine contre *E. coli*

	Résultats (UFC)	Réduction logarithmique	Norme	Conformité
<b>J0</b>	<b><math>1,5 \times 10^6</math></b>	<b>/</b>	<b>/</b>	<b>/</b>
<b>J14</b>	<b>&lt;1</b>	<b>6,18</b>	<b><math>\geq 3</math></b>	<b>OUI</b>
<b>J28</b>	<b>0</b>	<b>6,18</b>	<b>NI</b>	<b>OUI</b>

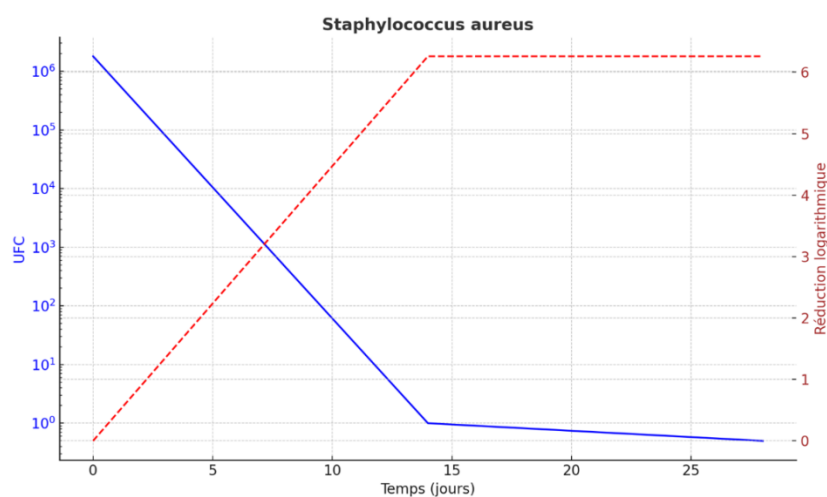


**Figure 19** : Nombre de microorganisme et taux de réduction de *E. coli* en fonction du temps

## 5.2. *Staphylococcus aureus*

**Tableau16** : Taux de réduction du nipagine contre *Staphylococcus aureus*

	Résultats (UFC)	Réduction logarithmique	Norme	Conformité
<b>J0</b>	<b><math>1,8 \times 10^6</math></b>	<b>/</b>	<b>/</b>	<b>/</b>
<b>J14</b>	<b>&lt;1</b>	<b>6,26</b>	<b><math>\geq 3</math></b>	<b>OUI</b>
<b>J28</b>	<b>0</b>	<b>6,26</b>	<b>NI</b>	<b>OUI</b>

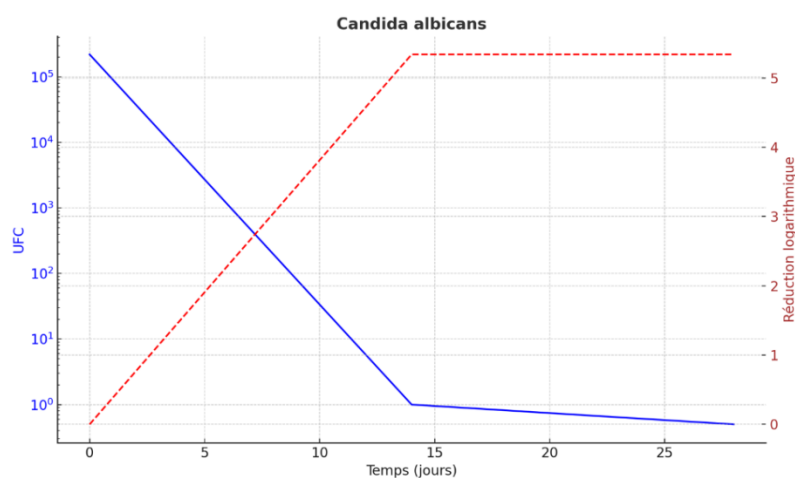


**Figure 20 :** Nombre de microorganisme et taux de réduction de *Staphylococcus aureus* en fonction du temps

### 5.3.Candida albicans

**Tableau 17:** Taux de réduction du nipagine contre *Candida albicans*

	Résultats (UFC)	Réduction logarithmique	Norme	Conformité
<b>J0</b>	$2,2 \times 10^5$	/	/	/
<b>J14</b>	<b>&lt;1</b>	<b>5,34</b>	$\geq 1$	<b>OUI</b>
<b>J28</b>	<b>0</b>	<b>5,34</b>	<b>NI</b>	<b>OUI</b>

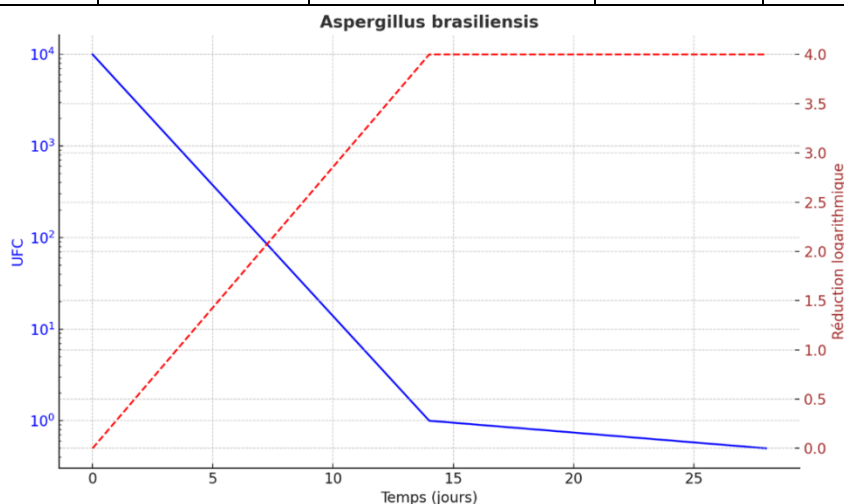


**Figure 21 :** Nombre de microorganisme et taux de réduction de *Candida albicans* en fonction du temps

#### 5.4. *Aspergillus brasiliensis*

**Tableau 18 :** Taux de réduction du nipagine contre *Aspergillus brasiliensis*

	Résultats (UFC)	Réduction logarithmique	Norme	Conformité
<b>J0</b>	$1,0 \times 10^4$	/	/	/
<b>J14</b>	<b>&lt;1</b>	<b>4</b>	<b><math>\geq 1</math></b>	<b>OUI</b>
<b>J28</b>	<b>0</b>	<b>4</b>	<b>NI</b>	<b>OUI</b>



**Figure 22 :** Nombre de microorganisme et taux de réduction d'*Aspergillus brasiliensis* en fonction du temps

## 6. Identification et dosage du conservateur par HPLC

### 6.1. Résultats du dosage :

Les résultats des mesures de concentration de nipagine par absorption UV-visible pour la solution standard et l'échantillon sont présentés dans le tableau suivant :

**Tableau 19 :** Dosage et identification du nipagine

Tests	Les normes	Résultats obtenus
Dosage de conservateur	0,108_0,132 g/100ml	0,1139g/100ml

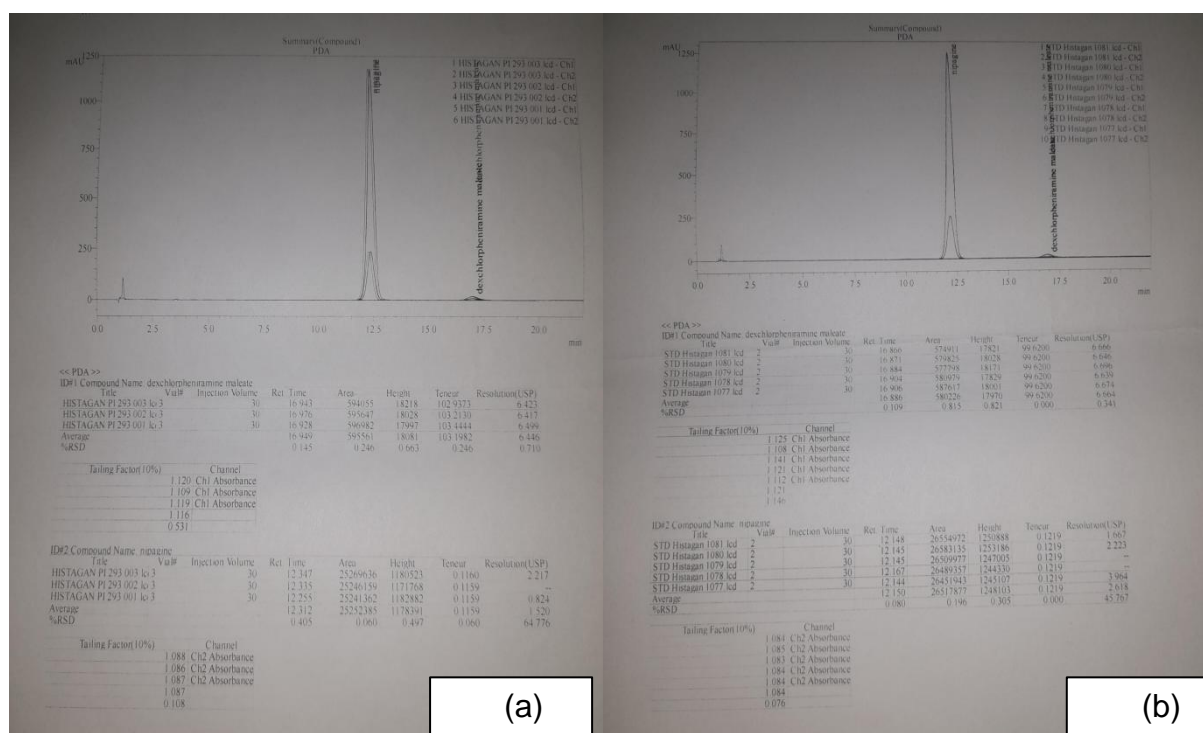
Le résultat obtenu pour la teneur en conservateur dans la solution indique que la quantité de conservateur est conforme aux exigences de la monographie interne de la société SAIDAL. Donc le produit analysé est Conforme.

## 6.2. Identification par temps de rétention (Tr)

**-Echantillon de Nipagine :** Les 3 pics des 3 essais relatif à l'échantillon d'excipient sont superposables, avec des temps de rétentions très proches [Tr (mn) : 12,347\_12,335\_12,255]

**-Standard de Nipagine :** De même, les pics d'excipient standard sont superposables également [Tr (mn) : 12,148\_12,145\_12,144\_12,143\_12,144]

On remarque une superposition des deux pics, l'excipient échantillon et l'excipient standard. Cela confirme que le composé détecté dans la solution testée est bien identique au standard de Nipagine, ce qui valide l'identification de la substance (figure 25).



**Figure 23:** Chromatogramme de l'HPLC de produit fini (a) et de Nipagine standards (b)  
Ceci est confirmé avec la formule suivante :

$$\text{Teneur en nipagine (g/100ml)} = \frac{Se}{Sst} \times \frac{Pst}{\text{Dilution st}} \times \frac{\text{Dilution e}}{Vsirop} \times \text{Pureté}$$

$$= \frac{Se}{Sst} \times \frac{Pst}{50} \times \text{Pureté}$$

Avec :

Se : Surface du nipagine dans la solution à examiner.

Sst : Surface du nipagine dans la solution standard.

Pst : Prise d'essai du nipagine dans la solution standard, en g.

Dilution st : Dilution de la solution standard, en ml

V sirop : Volume prélevé du sirop, en ml.

Dilution e : Dilution de la solution à examiner, en ml.

Pureté : Pureté du nipagine (matière première titrée), exprime en%.

Norme : 0,108 g/100ml à 0,132 g/100ml.

Le résultat obtenu par l'équation montre que la quantité de conservateur mesurée dans le flacon est conforme aux normes de la monographie interne de la société SAIDAL.

**Tableau 20 : Calcul de la teneur en nipagine**

	Numéro d'essai	SHBE	SHBS	Pureté (%)	Pst(mg)	Tr(min)	Résultats (g/100ml)
Nipagine Echantillon	1	25269636		99,69	60mg	12,347	0,1139
	2	25246159				12,335	
	3	25241362				12,255	
	MOY	<b>25252385</b>				<b>12,312</b>	
Nipagine standard	1		26554372			12.148	
	2		26583135			12.145	
	3		26580977			12.144	
	4		26489357			12.143	
	5		26451943			12.144	
	MOY		<b>26517877</b>			<b>12.150</b>	

L'analyse HPLC réalisée sur l'échantillon de Nipagine a permis de vérifier

-L'identité en comparant les temps de rétention et la forme des pics chromatographiques avec ceux de la référence standard.

-Sa concentration, qui s'est avérée conforme aux normes (0,108 – 0,132 g/100 mL).

### Discussion

L'étude menée a permis d'évaluer l'efficacité du conservateur nipagine (parahydroxybenzoate de méthyle) présent dans le sirop HISTAGAN 0,01 %, en conformité avec les critères de la Pharmacopée Européenne. Les tests ont porté sur quatre souches microbiennes représentatives : *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* et *Aspergillus brasiliensis*, incluant à la fois des bactéries Gram +/-, des levures, et des moisissures.

Les résultats obtenus au cours de cette étude montrent de manière claire et cohérente que le conservateur utilisé, la nipagine (parahydroxybenzoate de méthyle), présente une activité antimicrobienne efficace sur l'ensemble des souches microbiennes testées.

Dès le début de l'expérimentation, les inoculums ont été préparés à des concentrations conformes aux normes de la Pharmacopée Européenne, permettant une évaluation fiable de l'efficacité du conservateur dans le produit fini. Après 14 jours, une réduction significative du nombre de microorganismes viables a été observée pour toutes les souches, avec des réductions logarithmiques allant de 4 pour *Aspergillus brasiliensis* à plus de 6 pour *E. coli* et *S. aureus*, ce qui dépasse les seuils réglementaires fixés ( $\geq 3$  pour les bactéries,  $\geq 1$  pour les levures et moisissures). Aucun développement microbien n'a été détecté à J28, confirmant une absence de reprise de croissance, ce qui indique une protection efficace et durable.

La sensibilité élevée des bactéries à Gram positif comme *Staphylococcus aureus* et à Gram négatif comme *Escherichia coli* témoignent du large spectre d'action de la nipagine. De plus, les résultats observés pour *Candida albicans*, avec une réduction de plus de 5 log, et pour *Aspergillus brasiliensis*, malgré sa nature filamenteuse plus résistante, démontrent également une bonne activité antifongique.

Ces résultats sont en accord avec plusieurs études de la littérature, une étude menée par Hang Guo (2011) à confirmer l'efficacité antifongique et antibactérienne de nipagine contre les levures, les moisissures et les bactéries à Gram positif. Selon cette étude, une réduction d'au moins 2 log du nombre de bactéries a été observée après 14 jours, sans aucune reprise de croissance jusqu'au 28<sup>e</sup> jour, indiquant une efficacité satisfaisante du nipagine contre les bactéries. Concernant les levures et moisissures, aucune augmentation du compte microbien n'a été constatée pendant toute la période d'observation, ce qui répond aux critères des normes de la pharmacopée européenne.

D'autre part, la recherche de la Réduction de la Charge Antimicrobienne sur les systèmes de neutralisation a démontré que les parabènes, notamment le methyl- et propylparaben, maintiennent une activité antimicrobienne contre *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans* et *Aspergillus niger*, confirmant un spectre d'action très étendu. En complément, des travaux sur les membranes modèles ont montré que les parabènes perturbent efficacement les membranes bactériennes, avec une activité légèrement supérieure contre *S. aureus*, ce qui renforce l'idée d'un mécanisme d'action membranaire commun à nos quatre souches.

De plus Nasrollahi et al. (2022) ont observé que les parabènes inhibent la croissance de *C. albicans* in vitro .

L'analyse par HPLC a montré une superposition nette des pics chromatographiques entre l'échantillon analysé et la solution standard. Cette superposition témoigne d'une grande similarité dans le comportement chromatographique des deux solutions, ce qui suggère la présence d'un même composé. En effet, les temps de rétention observés sont très proches, avec une valeur moyenne d'environ 12,31 min pour l'échantillon et 12,15 min pour le standard. Cela confirme clairement la présence de la nipagine (parahydroxybenzoate de méthyle) dans l'échantillon examiné.

La teneur en nipagine que nous avons obtenu (0,1139mg/100 mL) répond aux normes autorisées par la Pharmacopée donc on peut l'utiliser sans risque dans la préparation pharmaceutique

Les résultats obtenus sont en accord avec l'étude de Al-Qudaihi et al. (2025) qui a montré que le Parahydroxybenzoate de méthyle était le conservateur le plus répandu avec 77 % dans les produits pharmaceutiques.

D'autres études confirment cette tendance. Par exemple, selon Soni et al. (2002) les parabènes, en particulier le méthylparabène, sont largement utilisés en raison de leur efficacité antimicrobienne, leur stabilité chimique et leur faible coût.

# Conclusion

Aujourd'hui, la sécurité microbiologique des médicaments est devenue une priorité incontournable dans l'industrie pharmaceutique, notamment pour les formes liquides, qui sont particulièrement exposées au risque de contamination.

Au terme de cette étude, l'évaluation de l'efficacité du méthylparabène (Nipagine) en tant que conservateur antimicrobien dans le sirop antihistaminique HISTAGAN 0,01 % a permis de démontrer que cette substance assure une protection microbiologique satisfaisante contre différents types de contaminants fongiques et bactériens. En se conformant aux exigences de la Pharmacopée Européenne, la formulation a montré une réduction significative de la charge microbienne durant une période de 28 jours, garantissant ainsi la stabilité et la sécurité du produit.

Le dosage par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) a confirmé la présence du conservateur à une concentration adéquate et stable, assurant son efficacité sans dépasser les seuils susceptibles d'être toxiques.

En général, nous pouvons conclure que la formulation est protégée contre toute prolifération microbienne susceptible de présenter un risque potentiel pour l'utilisateur. Le méthylparabène a donc rempli pleinement sa fonction de conservateur antimicrobien.

En perspective, ce travail constitue une base solide pour des recherches plus approfondies, pouvant inclure :

- L'évaluation de la stabilité du conservateur dans des conditions de stress (température, lumière, oxydation), afin de mieux cerner sa durée de vie réelle.
- La comparaison de l'efficacité de la Nipagine avec d'autres conservateurs, qu'ils soient synthétiques ou naturels, pour déterminer des solutions optimales selon la formulation.
- Le développement de formulations combinées, associant le méthylparabène à d'autres agents synergiques, afin d'augmenter son efficacité tout en réduisant sa concentration.
- L'intégration progressive de conservateurs naturels validés, permettant de répondre aux exigences croissantes du marché en matière de produits plus sûrs et plus respectueux de la santé.

Ce mémoire ne constitue ainsi qu'une première étape dans la compréhension et l'optimisation de la conservation antimicrobienne des sirops médicamenteux. Il ouvre la voie à des recherches futures visant à concilier efficacité, innocuité et innovation dans le domaine pharmaceutique.

## **Références bibliographiques**

**(A)**

-Al-Qudaihi, G., Al-Rouqi, R., & Al-Saleh, I. (2025). Evaluating paraben concentrations in skincare products and assessing their potential health risks. *Journal of Environmental Exposure Assessment*, 4(1), 6-6

-Al-Rubaye, I. M. M. (2022). A review of the literature on antimicrobial preservatives : Definition, properties, classification, safety, side effects and antimicrobial effectiveness testing. *Atena Journal of Public Health*, 4, 7-7.

-Angumeenal, A. R., et D. Venkappayya. 2013. « An overview of citric acid production ». *LWT-Food Science and Technology* 50 (2) : 367-370.

**(C)**

-Canada (2019). Screening assessment for aspergillus awamori strain and aspergillus brasiliensis strain 60-66.

-Canada, S. (2022, février 25). Conseils sur la surveillance de la stabilité biologique de l'eau potable dans les réseaux de distribution [Lignes directrices].

-Cao, X., Zhang, T., Zhang, Q., et al. (2021). Toxicity of parabens and their metabolites. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 209, 111-829.

-Chatterjee, S., Adhikary, S., Bhattacharya, S., Chakraborty, A., Dutta, S., Roy, D., Ganguly, A., Nanda, S., & Rajak, P. (2024). Parabens as the double-edged sword : Understanding the benefits and potential health risks. *Science of The Total Environment*, 954, 176-547.

-Crovetto, S. I., Moreno, E., Dib, A. L., Espigares, M., & Espigares, E. (2017). Bacterial toxicity testing and antibacterial activity of parabens. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 99(5-6), 858-868.

**(D)**

-De Villiers, M. M. (2009). Antimicrobial preservatives. A Practical Guide to Contemporary Pharmacy Practice. 3rd ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 203-205.

-Demoly, P., & Bousquet, J. (2003). New H1-antihistamines in rhinitis. *REVUE FRANCAISE D ALLERGOLOGIE ET D IMMUNOLOGIE CLINIQUE*, 43(1), 64-68.

-Dr.B.V.Ramana. (2024). Preservatives used in Pharmaceuticals and impact on Health. *International Journal of Life Sciences Biotechnology and Pharma Sciences*, 20(1), 15-38.

**(E)**

---

-EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP). (2013). Scientific Opinion on the safety and efficacy of vitamin C (ascorbic acid, sodium ascorbate, calcium ascorbate, ascorbyl palmitate, sodium calcium ascorbyl phosphate and sodium ascorbyl phosphate) as a feed additive for all animal species based on a dossier submitted by DSM Nutritional Products Ltd. EFSA Journal, 11(2).

-EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources (ANS). (2016). Scientific Opinion on the re-evaluation of benzoic acid (E 210), sodium benzoate (E 211), potassium benzoate (E 212) and calcium benzoate (E 213) as food additives. EFSA Journal, 14(3).

-European Pharmacopoeia. (2020). Pharmacopée Européenne (10e éd., chapitre 5.1.3). Strasbourg : EDQM

## (F)

-Fahelbom, K. M., & El-Shabrawy, Y. (2007). Analysis of preservatives in pharmaceutical products. Pharm. Rev, 5, 1-55.

-Farzam, Khashayar, Sarah Sabir, et Maria C. O'Rourke. 2025. « Antihistamines ». In StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.

## (G)

-Gunawardana, S. L. A., Jayanika, S. T. C., Dabare, P. R. L., & Siriwardhene, M. A. (2022). Microbial contamination of selected nonsterile pharmaceuticals in OPD pharmacy of a teaching hospital in Sri Lanka. World Journal of Advanced Research and Reviews, 13(3), 295-303.

-Głaz, P., Rosińska, A., Woźniak, S., Boguszevska-Czubara, A., Biernasiuk, A., & -Matosiuk, D. (2023). Effect of commonly used cosmetic preservatives on healthy human skin cells. Cells, 12(7), 10-76.

## (H)

-Hashim, Z. A., & Celiksoy, V. (2025). Pharmaceutical products microbial contamination; approaches of detection and avoidance. Microbes and Infectious Diseases, 6(1), 159-170.

-Helali. (1998). Bulletin d'INFORMATION du MEDICAMENT et de PHARMACOVIGILANCE. Bulletin CRIM, 8(5), 128-140

## (J)

-Jimenez, L. (2004). Microbial contamination control in the pharmaceutical industry.

-Joseph Price, J. P. (2006). Remington : The science and practice of pharmacy (Vol. 1). Lippincott Williams & Wilkins.

---

-Juda, E. K., & Khalaf, K. J. (2024). Effect of Some Metals Ions on Hemolysin Production from Clinical Isolates of *Escherichia coli*. *Journal of Contemporary Medical Sciences*, 10(1).

-Jumaah, N., Joshi, S. R., & Sandai, D. (2014). Prevalence of bacterial contamination when using a diversion pouch during blood collection : A single center study in Malaysia. *The Malaysian journal of medical sciences: MJMS*, 21(3), 47.

### (K)

-Kar, A. (2007). *Pharmaceutical microbiology*. New Age International.

-Katerji, A., Trefi, S., Bitar, Y., & Ibrahim, A. (2023). Evaluation of new formulations for neutralizing antimicrobial preservatives in pharmaceutical preparations. *Heliyon*, 9(3), 14-555.

-Khodavandi, A., Alizadeh, F., Harmal, N. S., Sidik, S. M., Othman, F., Sekawi, Z., & Chong, P. P. (2011). Expression analysis of SIR2 and SAPs1-4 gene expression in *Candida albicans* treated with allicin compared to fluconazole. *Trop Biomed*, 28(3), 589-598.

### (L)

-Langeh, J. A., Bhat, A., Bandral, J. D., Gupta, S., & Choton, S. (2023). Role of Preservatives in Preservation of Fruits and Vegetables : A review. *Chemical Science Review and Letters*, vol, 12(48), 217-221.

-Langeron, M., & Guerra, P. (1939). Remarques sur le *Candida stellatoidea* (Jones et Martin 1938). *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 17(3), 257-260.

-Leynadier, F., M. D. Pujade-Lauraine, S. Sirot, et J. Dry. 1984. « Effets antihistaminiques des psychotropes ». *Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique* 24 (4): 197-200.

-Linke, B. G. O., Casagrande, T. A. C., & Cardoso, L. A. C. (2018). Food additives and their health effects : A review on preservative sodium benzoate. *African Journal of Biotechnology*, 17(10), 306-310.

### (M)

-Manikandan, P., Varga, J., Kocsubé, S., Revathi, R., Anita, R., Dóczi, I., Németh, T. M., Narendran, V., Vágvolgyi, C., Bhaskar, M., Manoharan, C., Samson, R. A., & Kredics, L. (2010). Keratitis caused by the recently described new species *Aspergillus brasiliensis* : Two case reports. *Journal of Medical Case Reports*, 4(1), 68.

-MARTINI M.C., SEILLER M., (1999) *Actifs et additifs en cosmétologie*, Ed Technique et documentation Lavoisier, Paris 2ème édition, 431.

---

-Mayank K., M. K., Khurana, S., & Sahoo, S. N. and D. P. K. (2018). MICROBIAL CONTAMINATION OF PHARMACEUTICALS. World Journal of Pharmaceutical and Life Sciences, 2018(VOLUME 4, NOVEMBER ISSUE 11), Article VOLUME 4, NOVEMBER ISSUE 11.

-MEZRIOUI, K., ALLAGUI, M. B., & MOUMNI, M. (2018). Analyse des agents fongiques nécrotrophes associés aux raisins de table en post-récolte.

-Mishra, B., Mishra, A. K., Kumar, S., Mandal, S. K., NSV, L., Kumar, V., Baek, K.-H., & -Mohanta, Y. K. (2021). Antifungal Metabolites as Food Bio-Preservative : Innovation, Outlook, and Challenges. Metabolites, 12(1), 12.

-Moser, C. L., & Meyer, B. K. (2011). Comparison of Compendial Antimicrobial Effectiveness Tests : A Review. AAPS PharmSciTech, 12(1), 222-226

-Mrozovski, Jean-Michel. 2025. « Quand les médicaments sont en rupture ». Actualités Pharmaceutiques 64 (646): 50-52.

-Mugoyela, V., Mugoyela, V., & Mwambete K.D. (2010). Microbial contamination of nonsterile pharmaceuticals in public hospital settings. Therapeutics and Clinical Risk Management, 443.

-Murtaza, G., Khan, M. A., Zeb-Un-Nisa, & Shafiq, S. (2021). A Review on the Microbial Contamination in the Non-sterile Pharmaceutical Products. Pharmaceutical Science and Technology, 5(2), Article 2.

-Musakhanian, J., Rodier, J.-D., & Dave, M. (2022). Oxidative Stability in Lipid Formulations : A Review of the Mechanisms, Drivers, and Inhibitors of Oxidation. AAPS PharmSciTech, 23(5), 151.

#### (N)

-Nicas, T. I., & Iglewski, B. H. (1985). The contribution of exoproducts to virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. Canadian Journal of Microbiology, 31(4), 387-392.

#### (O)

-Ortiz, S., McDonough, R. T., Dent, P., Goodisman, J., & Chaiken, J. (2020). Coupled Turbidity and Spectroscopy Problems : A Simple Algorithm for Volumetric Analysis of Optically Thin or Dilute, In Vitro Bacterial Cultures in Various Media. Applied Spectroscopy, 74(3), 261-274.

#### (P)

-Parize P, (2008). Antifungal therapy of *Aspergillus* invasive Otitis externa: efficacy of Voriconazole and Review, Antimicrob. Agents Chemother.

---

-Petrova, O. E., & Sauer, K. (2017). High-performance liquid chromatography (HPLC)-based detection and quantitation of cellular c-di-GMP. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 1657, 33-43

-Pharmacopée Européenne 10.0, Chapitre 5.1.3 : Efficacité de la conservation antimicrobienne. Direction européenne de la qualité du médicament & soins de santé (EDQM), Conseil de l'Europe, 2019.

-Pullirsch, D., Bellemare, J., Hackl, A., Trottier, Y.-L., Mayrhofer, A., Schindl, H., Taillon, C., Gartner, C., Hottowy, B., Beck, G., & Gagnon, J. (2014). Microbiological contamination in counterfeit and unapproved drugs. *BMC Pharmacology and Toxicology*, 15(1), 34.

### (R)

-Ratajczak, M., Kubicka, M. M., Kamińska, D., Sawicka, P., & Długaszewska, J. (2015). Microbiological quality of non-sterile pharmaceutical products. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 23(3), 303-307.

-Reynolds, D., & Kollef, M. (2021). The epidemiology and pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections : An update. *Drugs*, 81(18), 2117-2131.

### (S)

-Sadoff, J. C., & Artenstein, M. S. (1974). The outer cell-wall membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Infectious Diseases*, 130(Supplement), S81-S93.

-Samson R. A., Houbraken J.Q., Kujipers A.F., Frank J.M and Frisvad J.C, (2004). New ochratoxin A or sclerotium Producing species in *Aspergillus*. *Studies in Mycology*, 50, 45-61.

-Saoudi, R., & Seddiki, L. (2024). Isolement et caractérisation des *Escherichia coli* responsables des infections urinaires et l'étude de leur profil de résistance aux antibiotiques [PhD Thesis, Université Mouloud Mammeri].

-Schmitt, P. de O., Fischer, A. F., Silva, R. M. L. da, & Cruz, A. B. (2022). Compatibility and efficiency of preservatives in emulsive cosmetics containing high surfactant content. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 58, 191088.

-Shaikh, S. M., Doijad, R. C., Shete, A. S., & Sankpal, P. S. (2016). A Review on : Preservatives used in Pharmaceuticals and impacts on Health. *PharmaTutor*, 4(5), 25-34.

-Shitole, S., Shinde, S., Waghmare, S., & Kamble, H. (2022). A Review On Preservatives Used in Pharmaceuticals and Impacts on Health. *Iconic Research And Engineering Journals*, 5(7), 131-140.

---

-Soni, M. G., S. L. Taylor, N. A. Greenberg, et GA12387298 Burdock. 2002. « Evaluation of the health aspects of methyl paraben: a review of the published literature ». Food and chemical Toxicology 40 (10): 133-573.

-Souci, S. W., & Raible, K. (1960). Zur Wirkungsanalyse der Konservierungsstoffe Diskussionsvorschlag. Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung, 112(5), 376-382.

-Staniszewska, M., Bondaryk, M., Swoboda-Kopec, E., Siennicka, K., Sygitowicz, G., & Kurzatkowski, W. (2013). Candida albicans morphologies revealed by scanning electron microscopy analysis. Brazilian Journal of Microbiology, 44(3), 813-821.

### (T)

-Tang, Z., & Du, Q. (2024). Mechanism of action of preservatives in cosmetics. Journal of Dermatologic Science and Cosmetic Technology, 1(4), 054-100.

-Taylor, T. A., & Unakal, C. G. (2025). Staphylococcus aureus Infection. In StatPearls. StatPearls Publishing.

-Themes, U. F. O. (2016, juin 20). Microbial spoilage, infection risk and contamination control. Basicmedical Key.

-Tingry, S., Santiago, I., Adaidi, Z., Zebda, A., & Holade, Y. (2024, mars). Les capteurs électrochimiques à base de nanomatériaux pour la détection de l'acide ascorbique pour des applications biomédicales et agroalimentaires. Club Microcapteurs chimiques 2024.

-Tong, S. Y. C., Davis, J. S., Eichenberger, E., Holland, T. L., & Fowler, V. G. (2015). Staphylococcus aureus infections: Epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. Clinical Microbiology Reviews, 28(3), 603-661.

### (V)

-Varga, J., Kocsubé, S., Tóth, B., Frisvad, J. C., Perrone, G., Susca, A., Meijer, M., & --- Samson, R. A. (2007). Aspergillus brasiliensis sp. Nov., a biseriata black Aspergillus species with world-wide distribution. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 57(8), 1925-1932.

-vidal. (2013). Vidal le dictionnaire (édition 2013)—Collectif—Vidal—Grand format—Dalloz Librairie Paris.

### (W)

-Wilson, M. G., & Pandey, S. (2025). Pseudomonas aeruginosa. In StatPearls. StatPearls Publishing.

---

-Wilson, M., & Wilson, P. J. K. (2021). Microbes and Infectious Diseases. In M. Wilson & P. J. K. Wilson, Close Encounters of the Microbial Kind (p. 3-48). Springer International Publishing.

**(Z)**

-Zakhari, S. (2006). Overview : How is alcohol metabolized by the body? Alcohol Research & Health: The Journal of the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism, 29(4), 245-254.

-Zhou, Yingqiao, Richard L. Smith, et Xinhua Qi. 2024. « Chemocatalytic production of sorbitol from cellulose via sustainable chemistry—a tutorial review ». Green Chemistry 26 (1): 20-243.

## **Annexes**

### Annexe 1

#### Préparation de l'eau physiologique :

- **Préparer le matériel nécessaire :**

- Balance de précision
- Bécher ou flacon de 1 L
- Agitateur ou cuillère stérile
- Eau distillée ou purifiée
- Chlorure de sodium (NaCl, qualité pharmaceutique)

- **Peser le sel :**

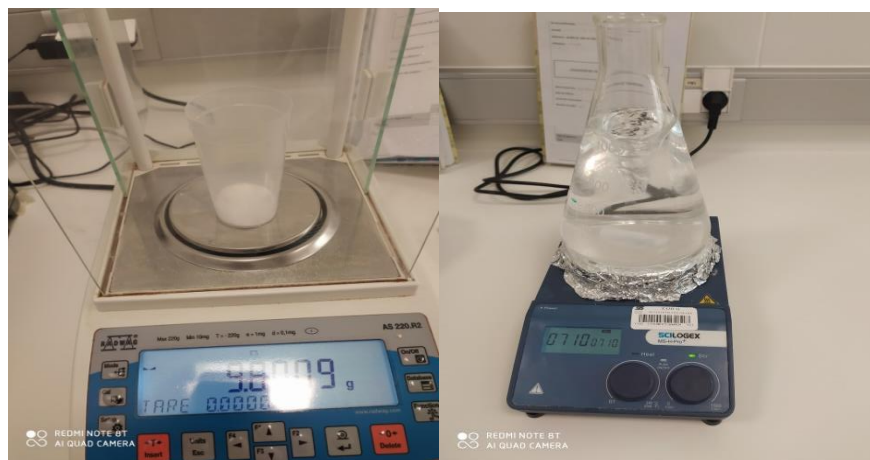
- Peser 9 grammes de chlorure de sodium (NaCl).

- **Dissoudre le sel :**

- Verser environ 800 mL d'eau distillée dans le bécher.
- Ajouter les 9 g de NaCl.
- Mélanger jusqu'à dissolution complète.

- **Compléter le volume :**

- Ajouter de l'eau distillée jusqu'à atteindre 1000 mL (1 L).



préparation de l'eau physiologique

## **Annexe 2**

### **Préparation des milieux de culture TSA et SAB**

Les milieux TSA et SAB sont déjà prêts à l'emploi sous forme de poudre déshydratée

#### **1. Pesée de la poudre :**

- TSA : 42 g / litre (se référer à l'étiquette du fabricant)
- SAB : 65 g / litre (variable selon la marque)

#### **2. Dissolution :**

- Verser la poudre dans un bécher contenant environ 800 mL d'eau distillée.
- Chauffer et agiter jusqu'à dissolution complète (ne pas faire bouillir fort, juste jusqu'à transparence).

#### **3. Ajustement du volume :**

- Compléter avec de l'eau distillée jusqu'à 1000 mL.

#### **4. Stérilisation :**

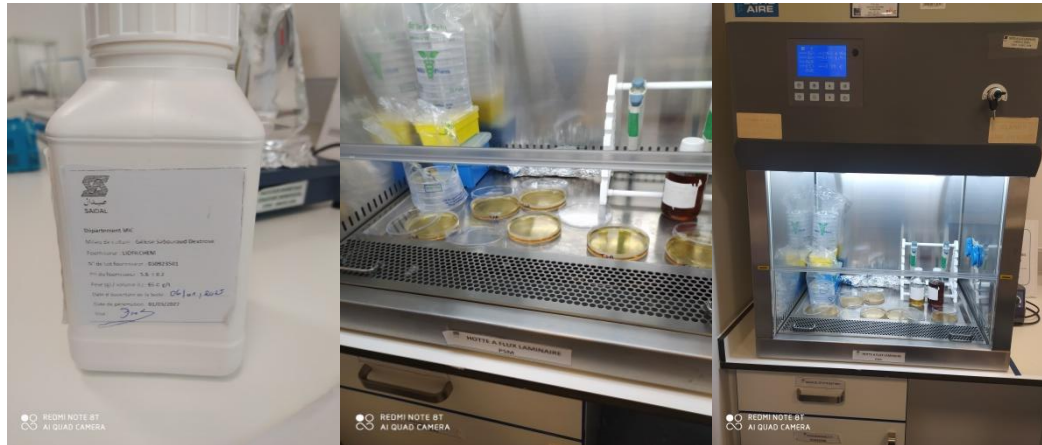
- Autoclaver à 121 °C pendant 15 minutes (1 atm de pression).

#### **5. Refroidissement et distribution :**

- Laisser tiédir à 45–50 °C.
- Verser dans des boîtes de Pétri stériles ou des tubes inclinés si besoin.

#### **6. Stockage :**

- Laisser gélifier à température ambiante.
  - Conserver les milieux solidifiés au réfrigérateur (2–8 °C) dans des sachets ou boîtes fermées.
-



Préparation des milieux de cultures

### Annexe 3

#### Identification de l'HISTAGAN 0.01% :

- Nom commercial :HISATAGAN SAIDAL
- Dosage : 10 ml/5ml
- Laboratoire : Saidal groupe
- Classe thérapeutique : posologie
- Classe pharmacologique : antihistaminique
- Forma et présentation : sirop FL/125ml
- Remboursable : oui
- Forme pharmaceutique : solution buvable
- Aspect : liquide limpide ; incolore ; odeur de cerise ; gout doux
- DCI : Maléate de dexchlorphéniramine
- Génériques : Histone ; Feniramine ; Dexchlorpheniramine
- Nom IUPAC : (Z)-Butènedioate de (3S)-3-(4-chlorophényl)- 3-(pyridin-2-yl)-

N,Ndiméthylpropan-1-amine

- Indication : il est indiqué dans le traitement symptomatique des manifestations allergiques.
- Posologie : le traitement symptomatique doit être limité aux moments où survient la toux ; Les prises doivent être espacées de 4 heures au minimum.
- Prix : 145 DA
- Posologie usuelle :
- ✓ pour Adulte 4 cuillères à café (soit 20 ml de sirop) par prise de 3 à 4 fois par jour.

## Annexes

- ✓      Enfant de 30 mois à 10 ans (soit 5ml de sirop) : : 1 cuillère à café 2 à 3 fois par jour .
  - ✓      Enfant de 10 à 15 ans (soit 10 ml de sirop) : 2 cuillères à café ; 3 à 4 fois par jour.
-

Année universitaire : 2024-2025	Présenté par : Saci Lina Choubeila Sid Ikram
Etude de l'efficacité des conservateurs dans les médicaments contre les contaminations microbiennes	
Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Mycologie et Biotechnologie Fongique	
<p><b>Résumé</b></p> <p>Ce travail s'inscrit dans le cadre de l'évaluation de l'efficacité des conservateurs antimicrobiens dans les médicaments liquides, en particulier le sirop antihistaminique Histagan 0,01 %, produit par la société SAIDAL. Dans un premier temps, l'étude consiste à tester l'efficacité du méthylparabène (nipagine), un conservateur largement utilisé pour sa stabilité chimique et son activité antimicrobienne. Pour cela, le sirop a été soumis à une contamination artificielle avec des micro-organismes standards, à savoir : <i>Escherichia coli</i> ATCC® 8739, <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 6538, <i>Candida albicans</i> ATCC® 10231 et <i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC® 16404. Le test challenge réalisé à J0, J14 et J28, a montré une réduction significative de la charge microbienne, confirmant que la formulation du sirop garantit une stabilité microbiologique conforme aux exigences de la Pharmacopée Européenne. Dans un second temps, un dosage quantitatif du méthylparabène a été réalisé par chromatographie liquide à haute performance (HPLC). Cette méthode analytique a permis de vérifier avec précision la concentration réelle du conservateur dans le produit fini. Les résultats ont confirmé la présence et la stabilité du méthylparabène à une concentration suffisante pour assurer une conservation antimicrobienne efficace tout au long de la durée de conservation du médicament. Ce travail met ainsi en évidence l'importance du contrôle des conservateurs dans les formulations pharmaceutiques liquides afin de garantir la qualité, la sécurité et l'efficacité des médicaments.</p>	
<p><b>Mots-clés</b> : Les conservateurs antimicrobiens, méthylparabène, Histagan 0,01 %, Contamination artificielle, micro-organismes standards ,dosage quantitatif .</p>	
<p><b>Laboratoires de recherche</b> : Laboratoire de microbiologie de la société SAIDAL constantine site 2</p>	
<p><b>Présidente</b> : Ghorri Sana (MCA – U Constantine 1 Frères Mentouri).</p> <p><b>Encadrante</b> : Dr Zaamouchi Ahlem (M.C.B - U Constantine 1 Frères Mentouri).</p> <p><b>Examineur</b> : Bouanaka Hamza (MCB- U Constantine 1 Frères Mentouri).</p>	

